Diala , Jour , Volume , 36 , 2009

إنتاج إنزيم السليليز من بكتريا *Serratia odoriferia* في ظروف مختلفة

م.م. علياء معن عبد الحميد صالح
جامعة ديالى / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الخلاصة

تم الحصول على 45عزلة محلية لبكتريا *Serratia* من عينات سريرية وغير سريرية مختلفة ومقارنة انتاجها للانزيم المحلل للسليليز (cellulase) وانتخبت العزلة الاكثر انتاجا وشخصت على انها بكتريا *Serratia odoriferia* .

درست الظروف المؤثرة في الانتاج ولوحظ ان افضل انتاج يكون عند استخدام الوسط الزرعي السائل كاربوكسي مثيل سليلوز Carboxymethyl celluase(CMCase)المضاف له 5% من السكروز وبرقم هيدروجيني 6.5 وتلقيحه بـ 5% من اللقاح البكتيري وحضنه بالحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 28 درجة مئوية لمدة 72 ساعة . بلغت الفعالية النوعية للانزيم 5 وحدة / ملغم بروتين .

المقدمة Introduction

من المعروف ان الاحياء المجهرية تنتج العديد من الانزيمات المختلفةالمحللة للمواد المعقدة ومن بينها الانزيمات المحللة للسليلوز (E.C. 3.2.1.4). هناك العديد من الاحياء المجهرية مثل البكتريا والاعفان والخمائر المنتجة لهذه الانزيمات للاستفادة منها في نموها ونشاطها و من هذه الاجناس البكتيرية *Bacillus subtilis ,Clostridium cellulolyticum,Pseudomonase sp,E.coli* , (23،16،8،2) ، في حين تشمل الخمائر والاعفان *Aspergillus niger ,Trichoderma rees* (7,18)
يختلف انتاج الانزيم باختلاف السلالات والظروف المزرعية كمكونات الوسط والتهوية والرقم الهيدروجيني p H ودرجة الحرارة ومن المهم معرفة الظروف الملائمة للانتاج للحصول على حصيلة انزيمية جيدة خاصة عندما يكون الانزيم مفيدا للاستخدامات الصناعية او المجالات الحياتية وهو ماينطبق على انزيم السليليز الذي يدخل في صناعة المنظفات والاغذية مثل العصائر والورق حيث يعمل على قصر عجينة الورق واعطائها الملمس الناعم واللون البراق والوقود مثل الايثانول والبنزين وفي المجالات الطبية(15,14,6,5)

ولقلة الدراسات حول انزيمات السليليز المنتجة من سلالات *Serratia* **جاءت هذه الدراسة** لتحقق الاهداف الاتية : الحصول على عزلات لبكتريا *Serratia* منتجة للسليليز ومقارنة انتاجها وانتخاب العزلة الاغزر انتاجا ودراسة الظروفالمؤثرة في الانتاج لمعرفة افضلها.

المواد وطرائق العمل

عزلات البكتريا التابعة لجنس *Serratia*

عزلت البكتريا من نماذج سريرية (قشع وجروح وبراز)وغير سريرية (مياه ،تربة،مواد غذائية) ومن الجهاز الهضمي لحشرة الصرصر الامريكي، بعد زرع جزء من النموذج او عالقه على وسط الاكار

المغذي nutrient agar وحضنه بدرجة 37م لمدة 24 – 48 ساعة ، ونقلت المستعمرات الى وسط الماكونكي (MacConkey agar) ووسط اختبار تحلل الدنا (DNase agar) لغرض التعرف على البكتريا .

تشخيص البكتريا

اجريت الفحوصات الخاصة بتصنيف البكتريا اعتمادا على مصنف بيركي (11) .

انتاج الانزيم المحلل للسليلوز cellulose

استخدم وسط كاربوكسي مثيل سليلوز الصلب Carboxymethyl celluase (CMCase) المضاف له 5% من السكروز و 1% من صبغة congo red(7, 13) لمعرفة العزلات المنتجة للسليليز وغربلتها من ملاحظةوقياس مناطق الترسيب حول المستعمرات النامية . كما اعد الوسط الزرعي السائل كاربوكسي مثيل سليلوز Carboxymethyl celluase(CMCase)المضاف له 5% من السكروز 1% من صبغة congo red ونظم الرقم الهيدروجيني الى 6.5 وعقم الوسط بدرجة 121م لمدة 15 دقيقة بعد تعبئتها في دوارق حجم 250مل بواقع 50مل للدورق .

زرعت الاوساط بالبكتريا بعمر 18ساعة وحضنت الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 28 درجة مئوية لمدة 72 ساعة ثم نبذ المزروع بسرعة 5000Xg لمدة 15 دقيقة بدرجة4 م .واخذ الرائق (ا لمستخلص الانزيمي الخام) وتم تقدير فعالية الانزيم وتركيز البروتين

تقدير فعالية الانزيم

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (24،9) في تقدير الانزيم المحلل للسليلوز . اضيف 0.5 مللتر من المستخلص الانزيمي مع 0.5 مللتر من وسط CMCase السائل المضاف له 10% من السكروز برقم هيدروجيني PH 4.8 .

وحضن المزيج بدرجة 50 م لمدة نصف ساعة بعد ذلك اضيف 3 مللتر من كاشف DNsA وترك ليغلي لمدة 5 دقائق تم قياس كمية Cellobiose المتكونة من خلال استخدام المنحني القياسي الموجود في الشكل (1) وعلى الطول الموجي 450 باستخدام الكاشف P-nitrophenil (20،12،1)

عرفت وحدة الانزيم بانها كمية الانزيم التي تحرر 1 مايكرومول من السكريات المختزلة (Cellobiose ، Glucose) في الدقيقة عند ظروف القياس .

تقدير البروتين

استخدمت طريقة براد فورد Bradford method (4) بعد ان تم ترسيب البروتين باضافة 5% من محلول حامض الخليك TCA ثم اذابته بمحلول 0.05 مولار من هيدروكسيد الصوديوم .

تعين الظروف المؤثرة في انتاج الانزيم

نميت البكتريا في وسط CMCase السائل ودرس تاثير اضافة انواع مختلفة من المصادر الكربونية بتركيز 5% في الانتاجية تضمنت كلكوز ،سليلوبايوز، زايلين ،زايلوز،سكروز ومسحوق البرسيم المجفف.وبعدها تم تنمية البكتريا في الوسط الافضل بظروف مختلفة تضمنت الرقم الهيدروجيني من (2– 12) ودرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (15 – 60) م .كما تم استخدام بعض المواد الكيمياوية والمعادن بتركيز 10 mM المذاب في 0.05 مولار من دارئ الفوسفات وبرقم هيدروجيني PH 7.2 لمعرفة تاثيرها على فعالية الانزيم .

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا المنتجة للانزيم المحلل للسليلوز:

تم الحصول على 45عزلة محلية لبكتريا *Serratia* منتجة للانزيم المحلل للسليلوز، تباينت هذه العزلات في نسبة التحلل(جدول 1) التي ظهرت بشكل مناطق ترسيب حول المستعمرات النامية في وسط CMCase الصلب ، وابدت العزلة SME14 اعلى نسبة تحلل بلغت 3.5 لذا انتخبت هذه العزلة وشخصت وتبين انها تعود للنوع ***Serratia odoriferia*** اعتمادا على مصنف بيركي(11،22)

الظروف المؤثرة في الانتاج

المصدر الكربوني

لوحظ ان احتواء الوسط على السكروز مصدر للكربون يعطي اعلى انتاجية للسليليز مقارنة بالمصادر الكربونية الاخرى وكانت الفعالية النوعية للانزيم 4.2 وحدة / ملغم بروتين (جدول 2)وقد اشارت دراسات اخرى الى ان انتاج الانزيم من *Bacillus subtilis.* ، *Clostridium thermocellum* يكون افضل عند وجود السكروز بنسبة 1%،5% على التوالي (8)(21).

الرقم الهيدروجيني:

بلغت الفعالية النوعية 4.7 وحدة / ملغم بروتين في الوسط ذي الرقم الهيدروجيني 6.5 وهو اعلى مما في بقية الارقام (شكل3) وهو ما لوحظ ايضا للسليليز المنتج من بكتريا *Cellumonas sp* (13) في حين اشارت دراسات اخرى ان الرقم الهيدروجيني الامثل لعمل الانزيم المنتج من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* هو 7.0(2)بينما كان الرقم الهيدروجيني الامثل لعمل الانزيم المنقى من بكتريا *Bacillus subtilis.* هو 6.5 (8) وعموما تستخدم الارقام الهيدروجينية المتعادلة او القريبة من القاعدية في الاوساط الانتاجية للسليليز من البكتريا .

درجة الحرارة :

اعطت بكتريا *Serratia odoriferia* اعلى انتاجية للسليليز عند درجة حرارة 35 م ، حيث بلغت الفعالية النوعية للانزيم 4.08 وحدة / ملغم بروتين بينما ادى ارتفاع درجة الحرارة الى انخفاض واضح في الانتاجية (شكل 4) .الا ان دراسات اخرى اشارت الى ان افضل درجة حرارة لانتاج السليليز من بكتريا *E.coli* هي 39 م (23) في حين كانت درجة 35 م هي المثلى لانتاج السليليز من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* (2) بينما كانت اعلى فعالية للانزيم المنتج من بكتريا . *Bacillus sp* عند درجة حرارة 60 م ، وعموما فان في درجات الحرارة المنخفضة يتباطئ نمو الكائن الحي وينخفض انتاجه في حين ان انخفاض انتاج الانزيم في درجات الحرارة العالية يعزى الى قلة ثبات الانزيم وتغير تركيبة البروتيني فضلا عن تاثيرها في نمو البكتريا (9) .

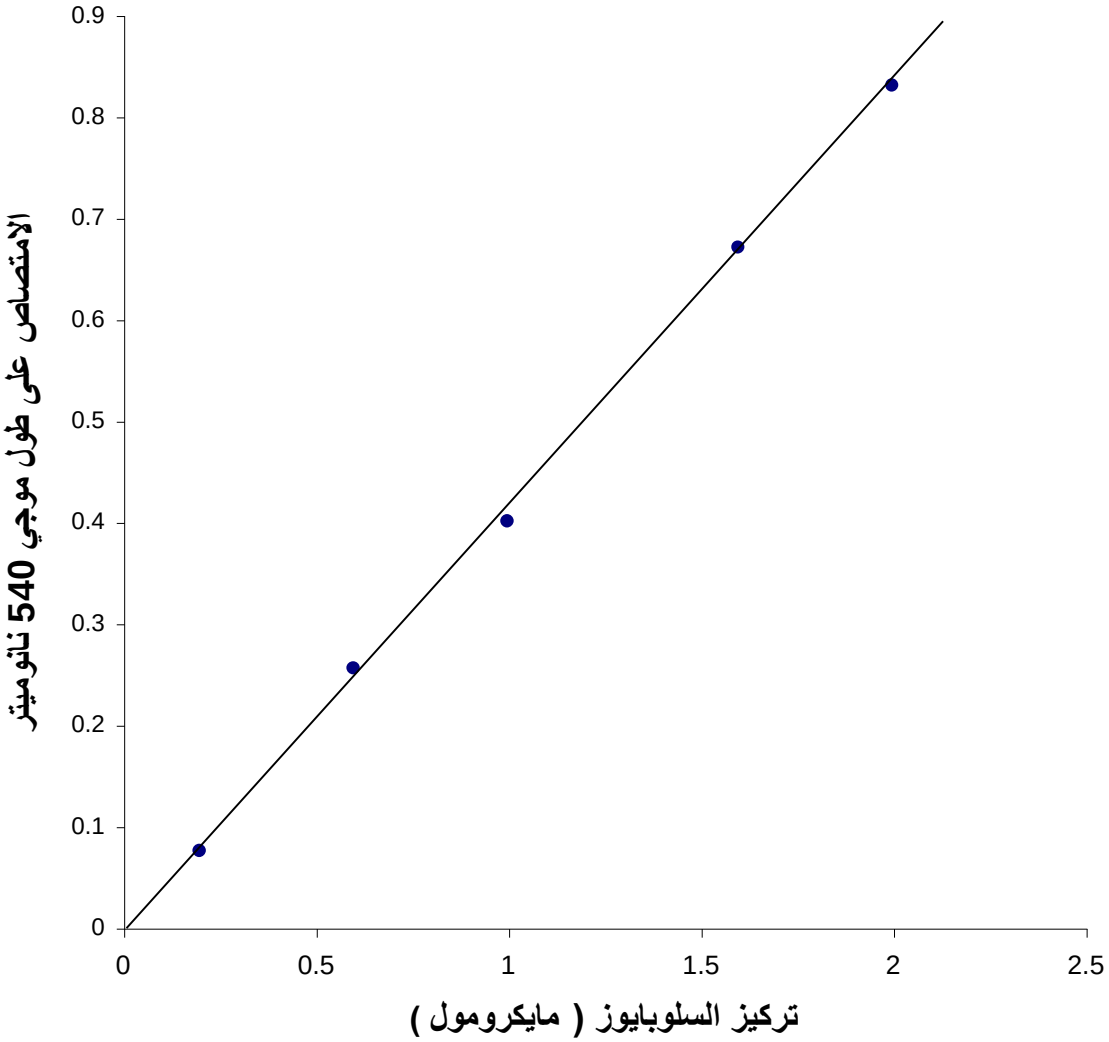
دراسة تاثير بعض المواد الكيمياوية في فعالية الانزيم:

درس تاثير بعض الايونات الفلزية في فعالية الانزيم ولوحظ ان اضافة ايونات المنغنيزو الزئبق والنحاس والفضة والرصاص بتركيز 10 ملي مولاري ادى الـــى خفض الفعالية النوعية للانزيم بنسبة 50 ,85,82,70 ,100% على التوالي في حين عند معاملة الانزيم بنفس التركيز من ايونات الخارصين والصوديوم والمغنسيوم ادى النخفض فعالية الانزيم بنسبة قليلة (جدول 3).

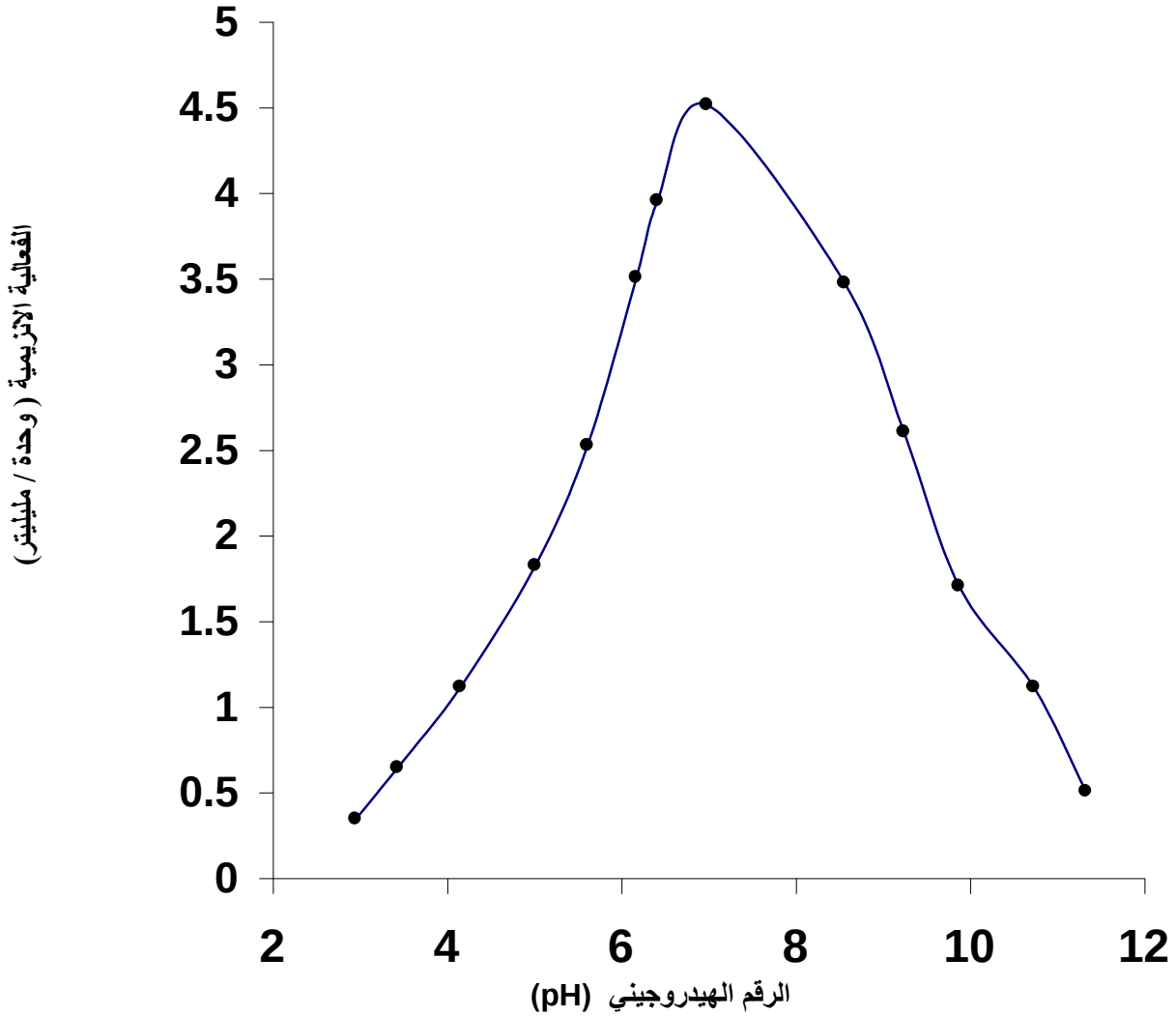
تعمل ايونات الزئبقيك كمثبط لاتنافسي للانزيم من خلال تاثيرها في تركيب الانزيم وموضعه الفعال اذ تعمل على كسر الاواصر ثنائية الكبريت واكسدة مجاميع الثايول SH.... في الموضع الفعال كما انها

تؤثر في مجاميع الاميدازول و الكاربوكسيل من خلال تكوين معقدات تؤدي الى تغير تركيب البروتين (17)، كما ان معظم الايونات الموجبة احادية التكافؤ مثل الصوديوم تؤدي الى زيادة فعالية العديد من الانزيمات بسبب الدور الذي تلعبه في الحفاظ على البنية الفراغية الملائمة لاحداث التاثير الحفزي للانزيم (10) .

لقد اوضحت دراسات اخرى الى ان فعالية السليليز المنقى من بكتريا *Bacillus sphaericus* تقل عند معاملته بتركيز 1 ملي مولاري من ايونات المغنسيوم والزبقيك والفضة الثنائية بينما تزيد الفعالية النوعية له عند معاملته بنفس التركيز من ايونات الالصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم (8)، وفي دراسة اخرى على نفس الانزيم المنقى من بكتريا *Erwinia coratovora* لوحظ ازدياد الفعالية النوعية للانزيم عند معاملة بتركيز 5 ملي مولار من ايونات الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والباريوم والمنغنيز في حين لم تتاثر الفعالية النوعية للانزيم عند معاملته بتركيز 5,10 ملي مولار من ايونات الرصاص والفضة والحديديك(8,3) بينما حصل تثبيط كلي لفعالية الانزيم المنقى من بكتريا *Thermomonospora fusca* عند معاملته بايونات الزئبقيك والرصاص الثنائية(20) بينما ازدادت الفعالية النوعية للانزيم المنقى من بكتريا *Clostridium thermocellum* و *Pseudomonase fluorescens* عند معاملته بايونات الصوديوم والمغنسيوم في حين قلت الفعالية النوعية للانزيم عند معاملته بتركيز 5ملي مولاري من ايونات المغنسيوم والفضةوالنحاس والزئبقيك الثنائية (16,2).



الشكل (1) : المنحنى القياسي لتقدير تركيز السلوبايوز .



الشكل (2) : الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم السليليز (المنقى) من العزلة *S. odorifera* SME14

ت	رمز العزلة	الاسم العلمي	المصدر	انتاج الصبغة	اقطار مناطق الترسيب في وسط آكار Rhan (ملم)

33	S3	*S. marcescens*	جروح ملوثة	متصبغة	2.4
34	S7	*S.marcescens*	مياه سواقي	=	2.5
35	S3	*S.marcescens*	مياه سواقي	=	2.0
36	S7	*S.marcescens*	مياه سواقي	=	2.0
37	S5	*S.marcescens*	قشع	=	2.4
38	S8	*S.marcescens*	مياه آسنة	=	2.7
39	S5	*S.marcescens*	مياه آسنة	=	2.4
40	S46	*S.fonticola*	مياه آسنة	=	2.5
41	S47	*S.liqueficanse*	ادرار	غير مولده للصبغة	2.5
42	S48	*S.marcescens*	ادرار	متصبغة	2.0
43	S50	*S.marcescens*	جروح ملوثة	=	2.0
44	S55	*S.marcescens*	جروح ملوثة	=	1.8
45	S66	*S.marcescens*	جروح ملوثة	=	1.5
46	S67	*S.marcescens*	قشع	=	2.3
47	S77	*S.marcescens*	قشع	=	2.0
48	S80	*S.plymuthica*	أوراق نبات الخس مصابة	=	2.0
49	S4	*S. marcescens*	ادرار	=	2.5
50	S2	*S. marcescens*	قشع	=	2.5

الجدول (1) : عزلات بكتريا *Serratia* المنتجة لانزيم السلليز من مصادر مختلفة .

المادة	التركيز %	الفعالية النوعية وحدة/ ملغم بروتين

زايلبن	5	2.5
زايلوز	5	2.8
سليلوبايوز	5	3.3
مسحوق البرسيم	5	3.8
كلكوز	5	4
سكروز	5	4.2

جدول(2) : إنتاجية أنزيم السلليز من العزلة *S. odorifera* SME14 باستخدام مصادر كربونية مختلفة

المادة	التركيز ملي مولار	الفعالية المتبقية %

50	**10**	**$MnCl_2$**
30	**10**	**$HgCl_2$**
18	**10**	**$CuSO_4$**
15	**10**	**$AgCl_2$**
Zero	**10**	**Pb Cl_2**
85	**10**	**Zn So_4**
80	**10**	**NaCl**
87	**10**	**$MgSO_4$**
98	**10**	**$FeSO_4$**

الجدول (3) . تأثير الايونات الفلزية في فعالية أنزيم السلليز المنقى من العزلة *S. odorifera* SME14

References

1. Ali , A. S. (2004) . The relative effects of some elements on the DNS method in cellulase assay . Appl.sciences and environmental management . 10 (3): 93-96.

2. Bakare,M.K.; Adewale,I.O.and Shonukan, O.O.(2005).Purification and characterization of cellulase from the wild- type and two improved mutants of ***Pseudomonas fluorescens*** . Biotechnol.4(9): 898-904.

3. Beatrice,P.B.(1991). Cellulase EGZ of Erwinia ***sp*** . structural organization and importance. 4 (3) : 325-333.

4. Bradford , M. M.(1976) Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding.analytical Biochemistry. 72: 248-254 .

5. Brant , A.; Hole , A.; Cannon , J.and Welch, J.J.(2004). Occupational asthma caused by cellulase and lipase in detergent industry. (NHLI) , SCHOOL of medicine, London.

6. Chen .(2004) . Industrial uses of thermophillic cellulase . University

7. Chen, P.U.; Chun , T.; Chang, T.and Lin ,P.(2004). Purification and characterizatiron of charboxy methyl cellulose from ***Sinorhizobium fredii*** . Taiwan.

8. Crispen, M.;Rajni, H.K.; Remigio, Z.and Bo. M. (2000). Purification and characterizatiron of cellulose produced by two Bacillus strains . Biotechnol . 83(3): 177-178.

9. Fullbrook, P.D.(1983). Practical Limits and prospects. In : Industrial enzymology . (eds. Godfery, T. and Reicheh , J.) 110-111.

10. HO, P.P.K.;Milikin, E.B.; Bobbitt,J.L.; Grinnan, E.L.; Burck, P.J.; Frank, B.H.; Boeck, L.D. and Squires, R.W. (1970). Crysrtalline L asparaginase from ***E coli*** Purification and chemical characterizatiron . J.Biol. chem. 245: 3708-3715.

11. Holt, J.G.;Krieg, N.R.; Sneath james, p.H.A.; Staley, T.and Williams , S.T. (1996). Facultatively anaerobic gram negative Rod. In: Bergey's Manual of determinative Bacteriology. (9^{th} ed.).

12. Junior, P.S.; Correia, M.J. and Olivera, J. (2003). Cellulase activity of Lentinula edodes. J.Biol. and Biotechnol. Brazil.

13. Kasing,A.and Sarawak, M. (1995). Cellulase production practical Biotechnology. National center of Biotechnol .

14. Krik,T. and Jeffries, W.(1996). Roles of microbial enzymes in pulp and paper prossing.

15. Kung, JR.; Carmem, P.R. and Tung,R.S.(1990). Barleng and vetch silage. Dariy sciences. 73(5): 1304-1311.

16. Leff, L.G.;Kernan,R.M.;Mcarthur,J.V. and Shimkets.(1992).The processive endo cellulose celf C***lostridium cellulolyticum***. Appl. Bacteriology. 72(3): 244-251.

17. Nassar, M.N.(1993). Formation and Stability of protein drugs. The second arab canferfnce on perspectives of modern Biotechnology

18. Pandey, A.K.(2004). Production of cellulose – thermostable xylanases by ***Aspergillus nigr.*** Microbiol. 7(3).

19. Riske,F.J.; Eveleigh,D.E.and Macmillan,J.D.(1986). Purification cellobiohydrolase from ***Trichderma rees***i. Industrial Microbiol. (4): 259-264.

20. Spiridonov, N.A.and Wilson, D.B. (1998). Regulation of biosynthesis of individual Cellulose in ***Thermomonospora fusca.*** Biotechnol . 180(14): 3529-3552.

21. Thomas,K.NG.and Zeikus, J.G. (1981). Comparison of extra cellular Cellulase activities of C***lostridium cellulolyticum*** and ***Trichderma rees***i . Appl. Environ Microbiol. 42(2): 231-240.

22. Whitaker, J.R. and Bernhard, R.A (1972). Experiments for: An Introduction to Enzymology. The Whiber Press.

23. Wulff,N.A. (2005). Expression and Purification of Cellulase xf 818 from ***Xylella fastidosa*** in ***Ecoli*** . Part springer science.

24. Zhang, Y.G.; Himmel, E. and Mielenz. (2006). Outlook for Cellulase hmprovement : Screening and strategies. **.** Biotechnology advancas. 24: 452-481.

Diala , Jour , Volume , 36 , 2009

Production of cellulase by *Serratia odoriferia* in different conditions.

Abstract

Forty five serratia isolates were obtained from different clinical and non clinical specimens .The cellulase activity was compared among these isolates,one was selected according .to its maximum cellulase production was diagnosed as a ***Serretia odoriferia*** .The favorable conditions were observed in carboxymethyle cellulose (CMCase) medium supplied with 5% sucrose ,at pH 6.5 when it was inoculated with 5% cell/ml bacterial inoculum and for incubated in shaker incubater (120rpm) at 28c º for 72 hr.The specific activity was 5 unite/mg protein at these conditions.