استخلاص وتنقية أنزيم الكايتنيز من خميرة Saccharomyces cerevisiae

ميس عماد احمد
قسم علوم الحياة ـ كلية العلوم
جامعة بغداد

الخلاصة

تم التحري عن انتاج انزيم الكايتنيز من خميرة Saccharomyces cerevisiae حيث زرعت هذه الخميره في وسط سائل يحتوي على الكايتين ومواد نتروجينية مختلفة . اجريت غربلة لسلالات الخميرة المستعملة لتعين السلالة الاعلى انتاجا للانزيم . بينت النتائج ان السلالة S2 اعطت اعلى فعالية نوعية بلغت 3.5وحدة /ملغم بروتين .

نقي الكايتنيز من العزلة Saccharomyces cerevisiae S2 بعد خطوات تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع % 70-40 اجريت عملية الديلزة واخيرا كروماتوغرافيا المبادل الايوني DEAE-Sephadex ، وكان عدد مرات التنقية 5.3مرة بحصيلة انزيمية مقدارها 68.1% .

كانت قيم الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية وثبات الانزيم هي ٧ وبلغت 5.5 وحدة/مليليتر ، كما لوحظ ان اقصى فعالية للانزيم كانت عند درجة حر ارة ٣٠ مْ وبلغت 6.9 وحدة/مليليتر .

المقدمـــــــة

يعد الكايتنيز من انزيمات التحلل المائي تنتج من الكثير من الكائنات الحية منها خميرة Saccharomyces cerevisiae ، تقسم هذه الانزيمات وفق عملها الى الكايتنيز الداخلي (Endochitinase) حيث يعمل على تحطيم الاواصر الداخلية لسلاسل الكايتين، والكايتنيز الخارجي (Exochitinase) اذ حيث يعمل على الاواصر الطرفية محرر وحدات السكر الثنائي(١،٢) . وقد اشارت الدراسات ان الكايتنيز المنتج من الخميرة له دور في عملية انقسام الخلايا.

اول من وصف الكايتنيز من خميرة Saccharomyces cerevisiae كانت من قبل (٣) واشار الى ان معظم الانزيم يفرز خارج الخلايا.

يتأثر انتاج الانزيم بعوامل عديدة منها: مكونات الوسط الزرعي ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وغيرها كما تتاثر فعالية الانزيم بالظروف المحيطة من درجة الحرارة والايونات والرقم الهيدروجيني. واستعملت الانزيمات المحللة للكايتين

لانتاج السكر N-acetyl glucose amine ولهذه المركبات اهمية في انتاج مواد كيمياوية وعقاقير طبية فضلا عن استعماله في صناعة المنتجات الغذائية.
لقد حظي الكايتينيز المنتج من البكتريا والفطريات باهمية كبيرة في تحليل هياكل الحشرات وازالتها من البيئة فضلا عن المجالات الطبية والعلاجية مثل استخدامها في علاج الامراض الفطرية (Antifungal drug) (٤).

المـــــواد وطرائــق العمـــــل

تم الحصول على ٥ سلالات جاهزة من خميرة Saccharomyces cerevisiae من نماذج خميرة الخبز من الاسواق المحلية، واجريت بعض الاختبارات والفحوصات التشخيصية لهذه السلالات وتضمنت:

صفات المزرعة: درست صفات المزرعة لعزلات الخميرة لتنميتها على وسط YEPD الصلب وحضنها بدرجة ٣٠ْم لمدة ٤٨ ساعة لوحظ شكل المستعمرات ولونها وقوامها وارتفاعها ورائحتها وغيرها من الصفات للتأكد من تشخيصها (٥).

الفحص المجهري: اجري الفحص المجهري لملاحظة اشكال الخلايا وتجمعاتها وطرق تكاثرها بمزج جزء من المستعمرات مع قطرة من صبغة المثيل الازرق على شريحة زجاجية ثم وضع عليها غطاء الشريحة وفحصت بالمجهر بقوة تكبير (40 X).

الاوساط المستخدمة في انتاج الكايتينيز:

١- الاوساط السائلة المستعملة لتنمية الخميرة وانتاج الانزيم (٦): استعمل الوسط السائل الحاوي على المكونات الاساسية الاتية مع تغيير المصدر النيتروجيني باذابة ٠.٥ غم NaCl و ١غم MgSO4 و٠.٥ غم yeast extract و ٠.٥% Colloidal chitin و ١غم K2HSO4 و٠.٥ غم Trypton في ١٠٠ مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٦ وعقم الوسط بالموصدة.
حضرت الاوساط من المكونات المذكورة مع استبدال التربتون بمصادر نيتروجينية مختلفة هي : كازايين وببتون وجيلاتين وبالتركيز نفسه ٠.٥%.

2 -وسط خلاصة الخميرة والببتون والدكستروز (YEPD) (٧) يحتوي الوسط على المكونات الاتية: باذابة ٢٠ غم كلوكوز و١٠غم yeast extract و٢٠ غم Trypton في الماء المقطر واكمل الحجم الى لتر وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٥ وعقم بالموصدة حيث استخدم هذا الوسط في تنشيط وتشخيص وتنمية عزلات الخميرة.

حسبت الفعالية النوعية للانزيم (specific activity)كمايأتي: الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين) =فعالية الانزيم (وحدة مليليتر/ ملغم بروتين)

استخلاص الانزيم: تم استخلاص الانزيم من المزارع السائلة بعد عمل نبذ المزرعة بسرعة ٤٥٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة تحت التبريد، اخذ الرائق الذي يمثل الانزيم الخام وقدرت فعالية الانزيم وتركيز البروتين وحسبت الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين). اتبعت طريقة Bollr وجماعتة(٨) لتقدير الانزيم وطريقة Lowery وجماعتة (٩) لتقدير البروتين

تنقية الانزيم

استخدمت خطوات عدة لتنقية الانزيم المستخلص تضمنت :

١- الترسيب بكبريتات الامونيوم Ammonum sulphat precipitation :

اضيفت بلورات كبريتات الامونيوم الى المستخلص الخام تدريجيا للحصول على نسبة اشباع٢٠ -٠% ووضعت في حمام ثلجي مع التحريك المستمر لمدة نصف ساعة، ثم نبذ محلول بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة بدرجة حرارة (٤مْ) ، فصل بعدها المحلول الرائق واضيف له وزن اخر من كبريتات الامونيوم للحصول على نسبة اشباع ٤٠-٢٠ % ، ونبذ المحلول ثم اخذ الرائق ورفعت نسبة الاشباع الى ٤٠ - ٧٠ % باتباع الخطوات والظروف نفسها.

ذوب الراسب في اقل حجم من دارئ الفوسفات 0.02مولارلرقم الهيدروجيني ٧ وقدر الحجم النهائي للمحلول الانزيمي (١٠).

الديلزه (الفرز الغشائي)

اجريت عملية ديلزة لمحلول الانزيم المأخوذ من خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم بعد وضعه في كيس ديلزه مقابل الماء المقطر لمدة ٢٤ ساعة في ظروف مبرده ، ثم حددت فعالية الانزيم وتركيز البروتين والحجم النهائي للمستخلص .

كروماتوغرافيا التبادل الايوني

١- تحضير عمود المبادل الايوني DEAE- Sephadex:

٢- طريقة العمل :

مرر محلول الانزيم الخام عبر عمود المبادل الايوني DEAE- Sephadex الذي سبقت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات ، نظمت سرعة الجريان لتكون ٣٠ ملليتر /ساعة .جمعت اجزاء الغسل بواقع ٥ ملليتر لكل جزء واستردت البروتينات المرتبطة بالعمود باستخدام محاليل ذات تراكيز متدرجة من كلوريد البوتاسيوم (KCl) المذابة بدارئ فوسفات ذي الرقم الهيدروجيني ٧ بتراكيز (0.3, 0.2, 0.1,0.05) مولاري بسرعة جريان نفسها.

اجريت متابعة لتراكيز البروتين في الاجزاء المفصولة بقراءة الامتصاصية على الطول الموجي ٢٨٠ نانوميتر، ثم جمعت اجزاء القمم واجري لها تقدير للفعالية الانزيمية .

الظروف المثلى لثبات الانزيم المنقى جزئيا

١- تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم: حضن الانزيم بدرجة حرارة ٢٨مْ لمدة ١٥ دقيقة بمديات مختلفة من الارقام الهيدروجينية (٥-٨)، وذلك بمزج حجوم متساوية من محلول الانزيم مع محاليل الدارئة ذات الارقام الهيدروجينية محضرة بتركيز ٥٠ ملي مولار. رسمت العلاقة بين قيم الرقم الهيدروجيني المختلفة والنسبة المئوية للفعالية الانزيمية المتبقية لتعين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم.

٢- تعين الثبات الحراري للانزيم : حضن 0.5 مليليتر من محلول الانزيمي في حمام مائي بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (٣٠-٥٠) مْ لمدة ١٥ دقيقة ثم بردت الانابيب في حمام ثلجي وقدرت الفعالية المتبقية ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة والنسبة المئوية للفعالية الانزيمية المتبقية لتعين درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم .

النتائج والمناقشة

تباينت سلالات الخميرة الخمسة في قدرتها على انتاج الكايتنيز في الاوساط السائلة ، جدول (١)

بينت النتائج ان انتاجية الانزيم من هذة السلالات تتراوح بين 1-3.5 وحدة/ملغم بروتين . وتتميز سلالة الخميرة Saccharomyces cerevisiae S_2 بانتاجية اعلى من غيرها.

جدول (١) انتاجية الكايتنيز من سلالات خميرة Saccharomyces cerevisiae عند الزرع في وسط السائل وحضنها بدرجة ٣٠مْ لمدة ٦ ايام .

رمز العزلة	الفعالية النوعية وحدة/ملغم بروتين
S1	1
S2	3.5
S3	2.9
S4	3
S5	1.5

تنقية الانزيم

١- الترسيب بكبريتات الامونيوم

تركز الانزيمات عادة في خطوات التنقية الاولى للتخلص من نسبة كبيرة من الماء والحصول على درجة من النقاوة وتستخدم الاملاح عموما لهذا الغرض مثل املاح الامونيوم والصوديوم بشكل كبريتات وتستخدم كبريتات الامونيوم في ترسيب لامتلاكها القابلية العاليةعلى الذوبان وتوفيرها وكلفتها المناسبة وعدم اضرارها بالانزيمات (11) .

بينت النتائج ان الفعاليةالنوعية للانزيم بعد الديلزة تزداد مع زيادة نسبة الاشباع لكبريتات الامونيوم شكل (١) ، اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم اقصاها عند نسبة الاشباع ٧٠% وكانت 4.5 وحدة/ملغم بروتين وبعدد مرات تنقية 1.3 بحصيلة انزيمية مقدارها 75.5% .

اعقبت خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم خطوة الديلزة بلماء المقطر . اشارت دراسة ان الكايتنيز المنتج من بكتريا Bacillus cereus يترسب بنسبة اشباع ٧٥% من كبريتات الامونيوم اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم 2.5وحدة/ملغم بروتين. (12)، بينما بلغت الفعالية النوعية 3.5وحدة/ملغم بروتين و كانت نسبة الاشباع ٧٥% لترسيب الانزيم من بكتريا Serratia marcescense (13).

كروماتوغرافيا التبادل الايوني

اعقبت خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم خطوة كروماتوغرافيا التبادل الايوني عبر عمود ثنائي امينو اثيل سيفادكس DEAE-Sephadex لتنقية الانزيم المنتج من Saccharomyces cerevisiae s2

اظهرت النتائج وجود قمة بروتينية في اجزاء الغسل بينما تظهر في عملية الاسترداد قمتان للبروتين في الاجزاء ٥٠ – ٥٣ .

كان تركيز كلوريد البوتاسيوم الازم لاسترداد الانزيم 0.2 مولار ، وقد استخدم هذا الملح لما يتميز بة من قوة ايونية عالية مقارنة باملاح كلوريد البوتاسيوم . استنتج من ذلك ارتباط هذا الانزيم بالمبادل الايوني DEAE-Sephadex ، مما يدل على انه يحمل محصلة شحنة سالبة ضمن الظروف المستخدمة في التجربة شكل (٢) ، كما ارتفعت الفعالية النوعية للكايتنيز في هذة الخطوة من 4.2 الى 17.2 وحدة/ملغم بروتين مع عدد مرات تنقية بلغت 5.3 مرة بحصيلة انزيمية 68.1% جدول (٢)

جدول (٢) : خطوات تنقية انزيم الكايتنيز المنتج من خلايا عزلة s2 Saccharomyces cerevisiae

خطوات التنقية	الحجم مليليتر	الفعالية الانزيمية وحدة/مل	تركيز البروتين ملغم/وحدة	الفعالية النوعية وحدة/مليلتر	الفعالية الكلية وحدة	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية %
المستخلص الانزيمي الخام	٣٠	3.8	1.18	3.2	114	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم ٧٠%	١٨	4.8	1.14	4.2	86.4	1.3	75.7
المبادل الايوني DEAE-Sephadex	١٥	5.18	0.3	17.2	77.7	5.3	68.1

ثبات الانزيم

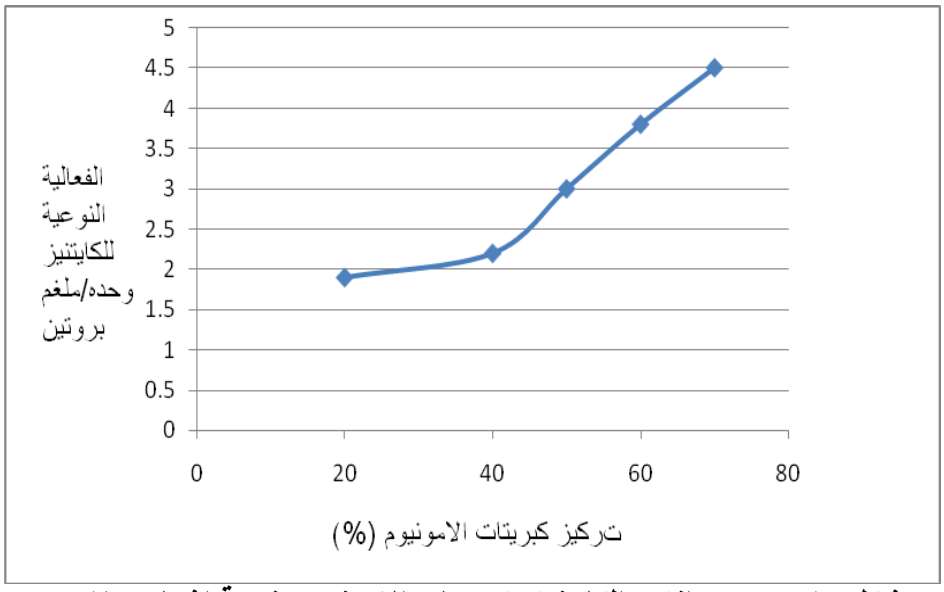
١- **تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم** :

بينت النتائج ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم المستخلص من الخميرة عند ٧ وبلغت 5.5 وحدة/مليليتر بينما بلغت اوطئ فعالية عند الرقم الهيدروجيني ٥ وبلغت 0.73 وحدة/مليليتر شكل (٣) .

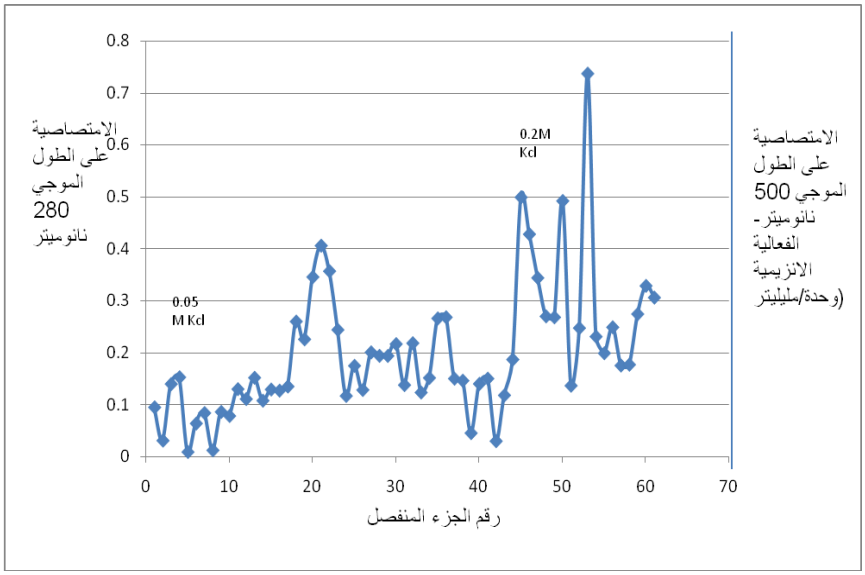
حيث كان افضل رقم هيدروجيني لثبات الانزيم المنتج من بكتريا Bacillus cereus هو٦وبلغت الفعالية النزيمية 3.5 وحده/مليليتر(14). في حين بلغت الفعالية الانزيمية 2.8 وحده/مليليتر للكايتنيز من بكتريا Pseudomonas aeruginosa عند الرقم الهيدروجيني ٦ (15)

2 - **تعين الثبات الحراري:**

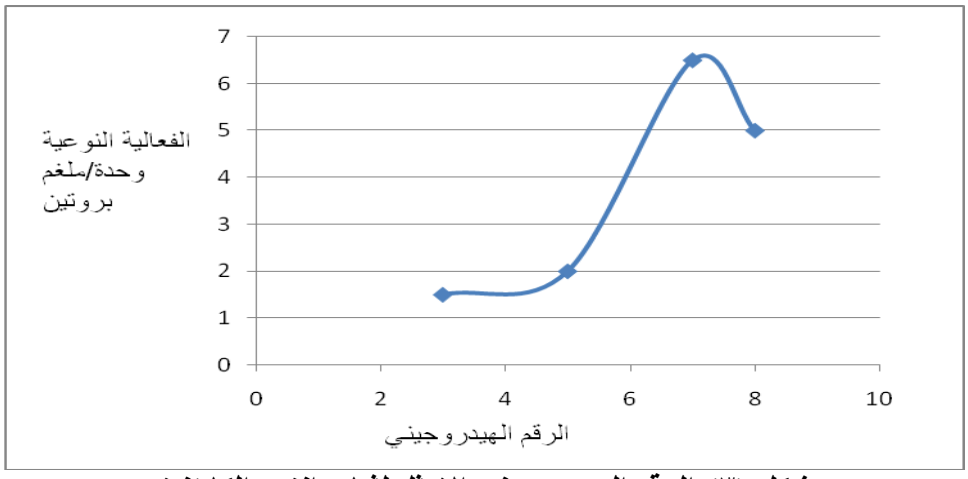
اظهرت نتائج ثبات الانزيم المستخلص من الخميرة عند درجة ٣٠ مْ وبلغت 6.9 وحدة/مليليتر ، بينما بلغ اوطئ ثبات عند ٥٥مْ وبلغت 3.5 وحدة/مليليتر شكل (٤). تتفق هذاه النتائج مع ماجاء به (16) (17)بانتاج الكايتنيز من خميرة Saccharomyces cerevisiae عند ٣٠مْ . في حين بلغت الفعالية الانزيمية للكايتنيز المنتج من بكتريا Serratia marcescense ٥ وحده/مليليتر عند ٣٥مْ (18) .



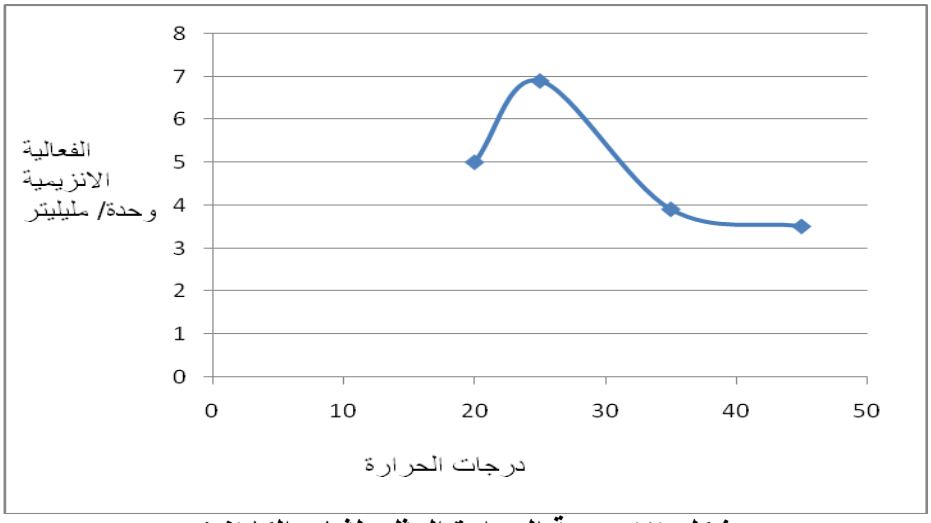
شكل(١) ترسيب انزيم الكايتنيز بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٧٠%



شكل (٣) كروماتوكرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم الكايتنيز المنتج من خميرة Saccharomyces cerevisiaeS2 باستخدام عمود التبادل الايوني (١.٥×١٥) سم، الذي تمت موازنته بمحلول داريء الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني (٧) ثم الاسترداد بمحاليل متدرجة من كلوريد البوتاسيوم الايونية (٠.٥، ٠.١، ٠.٢، ٠.٣). سرعة الجريان ٣٠ ملليلتر/ساعة (حجم الجزء ٥ ملليلتر).



شكل (٣) الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم الكايتنيز



شكل (٤) درجة الحرارة المثلى لثبات الكايتنيز

References:

1- Fekacuruz, J; Hidago, A; Lova, J.M.; Beniterz, T; Pintor-Toro,J and Liobell, A. (1992). Isolation and characterization of the three chitinase from Trichoderma barzianum. Eur.J.Biochem 206(4) :859-867.

2- Robbins, P.W.; Albright, C. and Benfield, B. (1988) Cloning and expression of Streptomyces plicatus chitinase in Escherichia coli. J.Biol.Chem. 263 (7) :443-447.

3- Zlatkovic, D.; Jakovlige, D.; Zekovic, D. and Varvic, M.M. (2003). A glucan from active dry baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae): A chemical and investigation of the structure. J.serb.chem.soc. 68(11):805-809.

4- Sakai, K.; Uchiyama, T.; Matahira, Y. and Nango, F. (1991) Immobilization of chitinolytic enzymes and continues production of N-acytylglucoasamine with immobilized enzyme. J.Ferment.Bioengin. 72(3):168-172.

5- Levin, D (2005) Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 69(2):262-291.

6- Handric, L.W. (2002). Production of beta-glucan-mannan preparation by autolysis of cell under certain PH, temperature and time condition united state patent No. 644(12) :211-218.

7- Magnelli, P.; Cipollic, J.F and Abeijon, C (2002) A refined method for the determination of Saccharomyces cerevisiae cell wall composition and b-1,6-glucan find structure. A.Biochem. 301 (8) ;136-150

8- Boller,T,and Mauch,F and Vgelu (1988). Chitinase from **Phaseolusvulguris**,leaves,Meth,Enzymol,vol;161,pp. 479-484. Wood, W.A and Kellogy S.T(eds).Academic press

9- Lowry,O.H ; Roseberousgh ,N.T, Farr,A.L and Randall ,R.J.C (1951) protein measurement with the fold phenol reagent , J.Biol.511(3):231_240

10- Wang, D.; Cooney, C.; Demain, A; Dunil Humphrey, A. and Lilly, M. (1979) Fermantation and enzyme technology. John Wiley, Inc. Canada.

11- Daihya, N; Rupinder, T; Ram, P.T. and Gurinda, S.H. (2005) Chitinase from Enterobacter spp., its purification, characterization and reaction pattern. Electronic J. Biotech. Vol 8 (5):0717-3458.

12- Pleban,S ;Chernin ,L .and Chet ,I .1997 Chitinolytic enzymes of an endophytic strain of Bacillus cereus Lettersin Applied Microbiology . September, vol; 4(2). 284-288

13- Green, A. (2005) Production of chitilytic enzyme by Serratia marcescens using various chitinase. J.Chem.Technol.Biotechnol. 80 (7):28-34.

14- Folders, J.; Tommassen, L.; and Bitter, W. (2002) Identification of chitin binding protein secreted by Pseudomonas aeruginosa J.Bacterol. 182(8):1257-1263.

15- Levin, D (2005) Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 69(2):262-291.

16- Van Aalten, D; Synstad, M; Brurbeg, B; Hough ,E; Rilse B; Eijsink, V and Wierenga, R.K. (2000) Structure of two domain chitotyiosidase from

17- Zlatkovic, D.; Jakovlige, D.; Zekovic, D. and Varvic, M.M. (2003). A glucan from active dry baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae): A chemical and investigation of the structure. J.S.C.S 68(11):805-809.

Summary:

Saccharomyces cerevisiae ability of chitinase production from the isolates was studied.

The yeast was culture in liquid state fermentation contain chitine with the differented nitrogen source. Quantitative screening appeared that Saccharomyces cerevisiae S_2 was the highest chitinase producer specific activity 3.5 unit/mg protein.

Chitinase purification from Saccharomyces cerevisiae S_2 after ammonium sulphat precipitation 70% saturation and dialysis tube to remove the salt. The last step include ion exchange chromatography DEAG-sephadex. The purification fold was 5.3 and the recovery is 68.1%. The favorable condition for chitinase stable were PH 7 the enzyme activity 5.5 unit/ml and the enzyme activity incubation period at 30 C is 6.9 unit/ml.