استخلاص وتنقية انزيم الكايتنيز من بكتريا Bacillus sp

شذى سلمان حسن
ميس عماد احمد
جنان عطية غافل
كلية العلوم / قسم علوم الحياة
جامعة بغداد

الخلاصة

تم الحصول على ٤ عزلات من بكتريا Bacillus sp ودرست قدرتها على انتاج الكايتنيز حيث اظهرت نتائج الغربلة الكمية ان العزلة Bacillu sp A3 هي الاغزر انتاجا وبلغت الفعالية النوعية 3.8وحده/ملغم بروتين.

زرعت البكتريا في اوساط تخمر سائلة احتوت بعض الاملاح فضلا عن مواد نتروجينية مختلفة وتمت دراسة الظروف المثلى لانتاج انزيم الكايتنيزمن درجة حرارة والرقم الهيدروجيني وبينت النتائج ان اعلى فعالية نوعية كانت عند الوسط السائل الحاوي على الكازائين مصدرا نتروجينا عند ٣٠م والرقم الهيدروجيني ٨ وبلغت 5.1 وحدة/ملغم بروتين.

نقي الكايتنيز من العزلةBacillu sp A3 بعد خطوات تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٨٠% ثم التخلص من الملح بانبوب الديلزة واخيرا كروماتوغرافيا المبادل الايوني ثنائي سيفادكس Sephadex-G100 ، وكان عدد مرات التنقية 2.1 مرة بحصيلة انزيمية مقدارها 23.3% وكانت قيم الرقم الهيدروجيني للانتاج عند ٨ عند درجة حر ارة ٣٠ مْ لمدة ٦ ايام

المقدمة

يعد انزيم الكايتنيز من اهم الانزيمات في مجال التقنيات الاحيائية لاهميتها في السيطرة على الامراض التي تسببها الحشرات والفطريات للإنسان والحيوان والنبات[١]. تقسم هذه الانزيمات على وفق طبيعة عملها وتكسرها للاواصر الى الكايتنيز الداخلي(Endochitinase)اما الذي يكسر الاواصر الطرفية للسلاسل محرر وحدات السكر الثنائي يدعى Exochitinase () [2,3] . اشارت العديد من البحوث الى انتاج الكايتنيز من بكتريا Bacillus حيث وجد انها تحلل الكايتين محررة السكر N-acetyl glucose amine في الوسط الزرعي السائل الحاوي على الكايتين الغروي[٤].

دون [٥] قوائم مركزة للاحياء مجهرية مختلفة التي لها اهمية في تحليل الكايتين سواء موجودبصورة طبيعية او المحللة لقطعة كايتين مطمورة وكان ابرزها جنس بكتريا Bacillus الاكثر اهمية فب تحلل الكايتين في التربة القاعدية .

تلعب انزيمات الكايتنيزدورا فسيولوجيا مهما في حياة الكائن الحي الذي ينتجها فهي بالاضافة الى دورها التغذوي Nutritional rol وخاصة للاحياء المجهرية حيث يعمل الكائن كمصدر وحيد للكاربون والنتروجين[٦]. يتأثر انتاج الانزيم بعوامل عديدةمنها: مكونات الوسط الزرعي ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وغيرها كمايتأثر فعاليتة بلظروف المحيطة من درجة الحرارة والايونات والرقم الهيدروجيني. استعملت الانزيمات المحللة للكايتين لانتاج السكر N-acetyl glucose amine ولهذه المركبات اهمية في انتاج مواد كميائية وعقاقير طبية فضلا عن استعمالها في صناعة المنتجات الغذائية[٧]

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)[٨]

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على ٤ سلالات جاهزة من بكتريا Bacillu sp ، واجريت بعض الاختبارات والفحوصات التشخيصية لهذه السلالات وتضمنت:

صفات المزرعة: درست صفات المزرعة لعزلات البكتريا لتنميتها على وسط الاكار المغذي الصلب وحضنها بدرجة ٣٠ْم لمدة ٤٨ ساعة لوحظ شكل المستعمرات ولونها وقوامها وارتفاعها ورائحتها وغيرها من الصفات للتأكد من تشخيصها [٩].

الفحص المجهري: اجري الفحص المجهري لملاحظة اشكال الخلايا وتجمعاتها بمزج جزء من المستعمرات مع قطرة من صبغة غرام على شريحة زجاجية ثم وضع عليها غطاء الشريحة وفحصت بالمجهر . وتميزت الخلايا بشكلها العصوي وسبوراتها المركزية او طرفية الموقع [١٠].

الاوساط المستخدمة في انتاج الكايتينيز

١- الاوساط السائلة المستعملة لتنمية البكتريا وانتاج الانزيم [١١]: 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 وخلاصة الخميرة) وبالتركيز نفسه ٠.٥%.

2 - وسط الصلب: استخدم الوسط الصلب (YEPD) [١٢] 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 لمعرفة العزلات المنتجة للانزيم.

دراسة العوامل المؤثرة في انتاج الكايتينيز

١- تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج الكايتينيز

نشطت البكتريا في الوسط السائل وحضنت بدرجة ٣٠ْم لمدة ١٨ ساعة. لقح وسط الانتاج السائل المحضر بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين ٤-١٠ ب٢ مليلتر من عالق البكتريا ثم حضنت بدرجة ٣٠ْم لمدة ٦ ايام. رسبت الخلايا وقيست الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين وحسبت الفعالية نوعية في الرائق.

٢- تأثير درجة الحرارة في انتاج الكايتينيز

نشطت البكتريا بزرعها في وسط السائل وحضنت بدرجة ٣٠ْم لمدة ١٨ ساعة. لقح وسط الانتاج السائل ب ٢ مليليتر من عالق البكتريا وحضنت بدرجات حرارية مختلفة (٢٠ و٢٥ و٣٠ و٣٥)ْم لمدة ٦ ايام ثم استخلص الانزيم من المزرعة بعد نبذها وقيست الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين.

استخلاص الانزيم: تم استخلاص الانزيم من المزارع السائلة بعد عمل نبذ المزرعة بسرعة ٤٥٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة، اخذ الرائق الذي يمثل الانزيم الخام وقدرت فعالية الانزيم وتركيز البروتين وحسبت الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين). اتبعت طريقة (١٣) لتقدير الانزيم وطريقة (١٤) 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 اشباع (٢٠%) ووضعت في حمام ثلجي مع تحريك المستمر لمدة نصف

ساعة، ثم نبذ محلول بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة بدرجة حرارة (٤مْ) ، ثم فصل المحلول الرائق واضيف له وزن اخر من كبريتات الامونيوم للحصول على نسبة اشباع (٤٠%) ، ونبذ المحلول ثم اخذ الرائق ورفعت نسبة الاشباع الى 80% باتباع الخطوات والظروف نفسها.
ذوب الراسب في اقل حجم من دارئ الفوسفات 0.02M ذي الرقم الهيدروجيني (8) وقدر الحجم النهائي للمحلول الانزيمي.

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 .

٢- كروماتوغرافيا التبادل الايوني

١- تحضير عمود المبادل الايوني Sephadex -G100:

٢- طريقة العمل :

مرر محلول الانزيم الخام عبر عمود المبادل الايوني Sephadex -G100 الذي سبقت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات ، نظمت سرعة الجريان لتكون ٣٠ مليليتر /ساعة .جمعت اجزاء الغسل بواقع ٥ مليليتر لكل جزء واستردت البروتينات المرتبطة بالعمود باستخدام محاليل ذات تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم (NaCl) المذابة بدارئ فوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 8 بتراكيز (0.3, 0.2, 0.1) 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 .

النتائج والمناقشة

تباينت سلالات البكتريا الاربعة في قدرتها على انتاج الكايتنيز في الاوساط السائلة ، جدول (١)
بينت النتائج ان انتاجية الانزيم من هذة السلالات تتراوح بين 3.8-1.5وحدة/ملغم بروتين . وتتميز سلالة البكترياBacillu sp A3 بانتاجية اعلى من غيرها.

جدول (١) انتاجية الكايتنيز من سلالات البكترياBacillu sp A3 عند الزرع في وسط السائل وحضنها بدرجة ٣٠مْ لمدة ٤ ايام .

الفعالية النوعية وحدة/ملغم بروتين	رمز العزلة
3.8	A1
2.0	A2
1.5	A3
2.9	A4

انتاج الانزيم في اوساط التخمر السائلة لسلالة A3

استعملت اوساط سائلة تحتوي مصادر نتروجينية مختلفة في انتاج الكايتنيز بينت النتائج الموضحة في الشكل (١) ان اعلى فعالية نوعية كانت في الوسط الحاوي على الكازين وبلغت 5.1 وحدة/ملغم بروتين. واظهرت اوطأ انتاجية في الوسط الحاوي على التريبتون وكانت ٢ وحدة/ملغم بروتين. يتضح من النتائج ان اضافة الكازين الى الوسط يدعم نمو البكتريا وانتاج الانزيم بشكل افضل من بقية المصادر النتروجينية المستعملة وهو من المواد المشجعة للنمو التي يحتاجها الكائن وتتلائم هذة النتائج مع نتائج دراسة اخرى استهدفت انتاج الكايتنيز من بكتريا Enterobacter Spp استخدم فيها الوسط الحاوي على الكازين وبلغت الفعالية النوعية ٤.٩ وحدة/ملغم بروتين (١٥). وتتفق هذه النتائج مع ماذكرة (١٦) الذي اثبت وجود فعالية واضحة للانزيم في وسط الجيلاتين لبكتريا Serratia marcescenase.

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 (17) .

بينت النتائج ان الفعاليةالنوعية للانزيم بعد الديلزة تزداد مع زيادة نسبة الاشباع لكبريتات الامونيوم شكل (2) ، اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم اقصاها عند نسبة الاشباع 80% وكانت 4.3 وحدة/ملغم بروتين وبعدد مرات تنقية 3 .1 بحصيلة انزيمية مقدارها 62.6% .

اعقبت خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم خطوة الديلزة بلماء المقطر . اشارت دراسة ان الكايتنيز المنتج من بكتريا Bacillus cereus يترسب بنسبة اشباع 75% من كبريتات الامونيوم اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم 3.3وحدة/ملغم بروتين. (18)، بينما بلغت الفعالية النوعية لبكتريا Serratia 3.5وحدة/ملغم بروتين و كانت نتسبة الاشباع ٧٥% لترسيب الانزيم من بكتريا Serratia marcescense (19).

٢- كروماتوغرافيا التبادل الايوني

اعقبت خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم خطوة كروماتوغرافيا التبادل الايوني عبرعمودSephadex - G100 لتنقية الانزيم النمأخوذ من Bacillu sp A3

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

كان تركيز كلوريد الصوديوم الازم لاسترداد الانزيم 0.2 مولار ، وقد استخدم هذا الملح لما يتميز بة من قوة ايونية عالية مقارنة باملاح كلوريد الصوديوم شكل (3) ، كما ارتفعت الفعالية النوعية للكايتنيز في هذة الخطوة من 4.3 الى 8.2 وحدة/ملغم بروتين مع عدد مرات تنقية بلغت 2.1مرة بحصيلة انزيمية 23.3 جدول (٢)

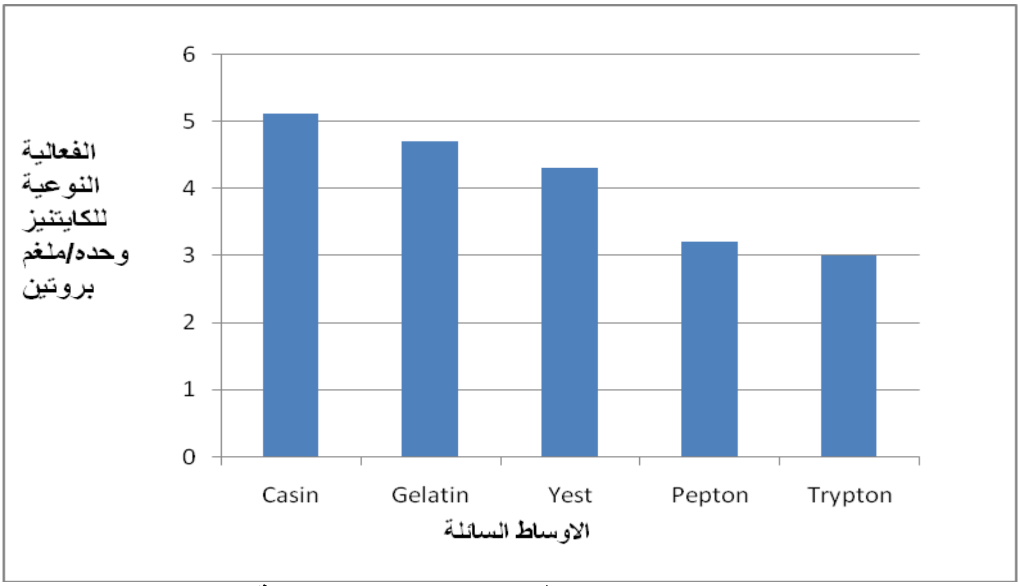
جدول (٢) : خطوات تنقية انزيم الكايتنيز المنتج من خلايا عزلة Bacillu sp A3

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 الانزيمـــي الخام	٣٠	6.6	**1.74**	3.8	198	1	100
الترســـيب بكبريتـــات الامونيـــوم 80%	١٨	6.9	**1.6**	4.3	124	1.3	6 2.6
المبـــادل الايـــوني Sephade G-100	14	3.3	**0.4**	8.2	46.2	2.1	23.3

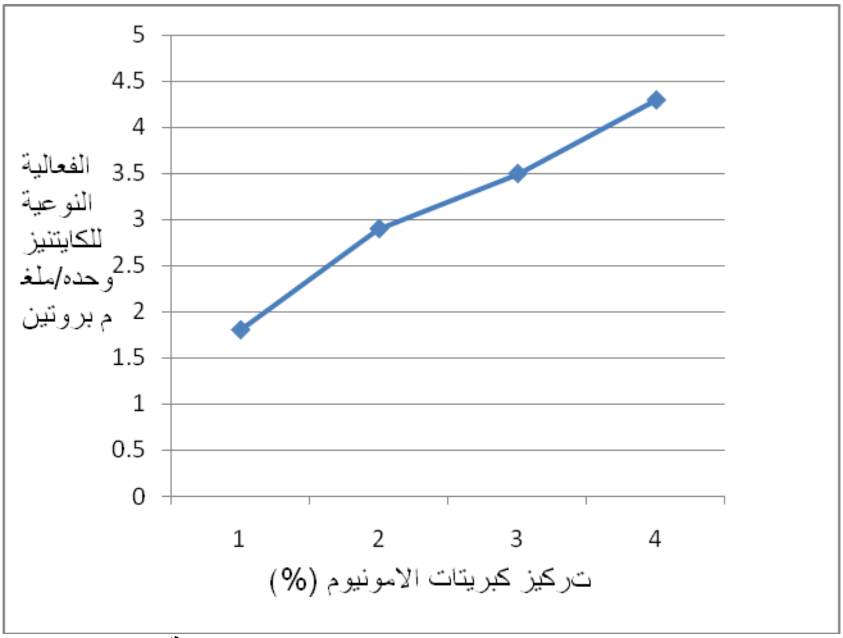
الظروف المثلى لانتاج الكايتنيز

١-الرقم الهيدروجيني: لوحظ عند تنمية عزلة Bacillu sp A3في وسط السائل بأرقام هيدروجينية مختلفة شكل (٤) ان الرقم الهيدروجيني ٨ كان الافضل لانتاج الانزيم واعطى انتاجية مقدارها 5.1 وحدة/ملغم بروتين وكان افضل من بقية الارقام الهيدروجينية بينما كان الرقم الهيدروجيني الافضل لانتاج الكايتنيز من Bacillus cereus هو ٧.8 (20). في حين ان الرقم الهيدروجيني الافضل لانتاج الانزيم من Pseudomonas aeruginosa كان ٥.٥ (٢١).

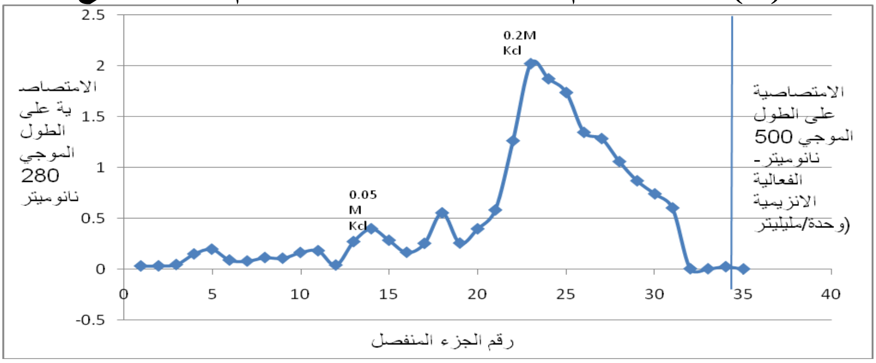
٢- درجة الحرارة: بعد ان حضنت الاوساط الملقحة بالعزلة Bacillu sp A3 بدرجات مختلفة تراوحت بين 20-٣٥ مْ. بينت النتائج ان درجة الحرارة الافضل لانتاج الكايتنيز تكون عند ٣٠مْ شكل (5) وبلغت الفعالية النوعية للانزيم في هذه الدرجة 5.1 وحدة/ملغم بروتين وبدأت الفعالية بالانخفاض مع ارتفاع درجة الحرارة. تتفق هذة النتائج مع ماجاء به (22) بانتاج الكايتنيز من بكتريا Enterobacter Spp حيث كانت ٣٠مْ وفعالية نوعية للانزيم بلغت 3.2وحدة/ ملغم بروتين. حيث ان لدرجة الحرارة تأثيرا مهما في انتاج وتركيب الانزيمات وارتفاع درجة الحرارة عن الحد المعين قد يؤدي الى موت الكائن وتوقف انتاج الانزيم وتغير تركيب الانزيم وتثبيط عمله (23).



شكل(١) انتاج الانزيم في اوساط التخمر السائلة من بكتريا

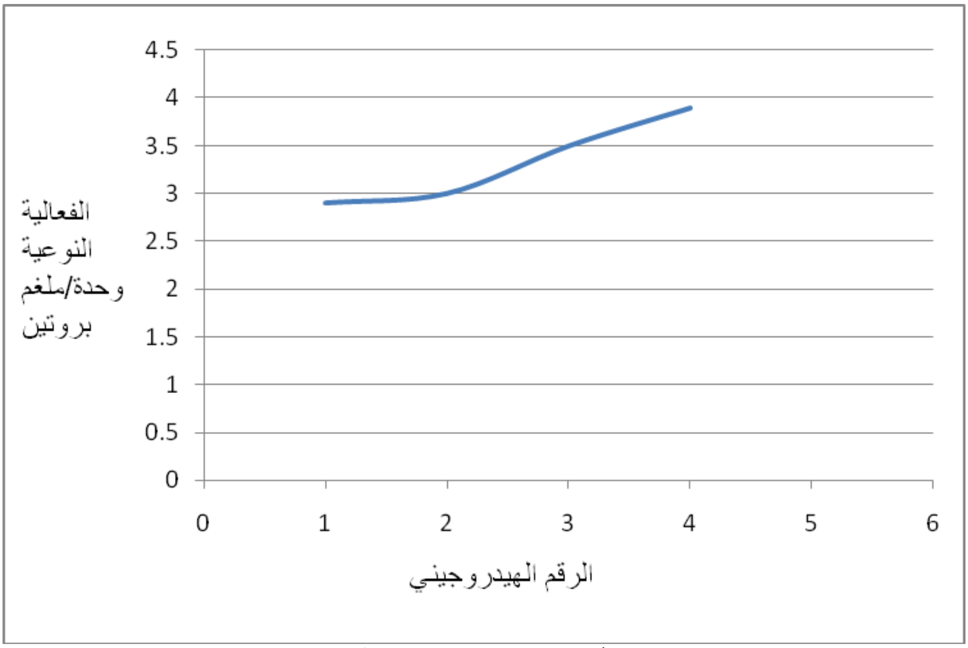


شكل(2) ترسيب انزيم الكايتنيز بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 80%

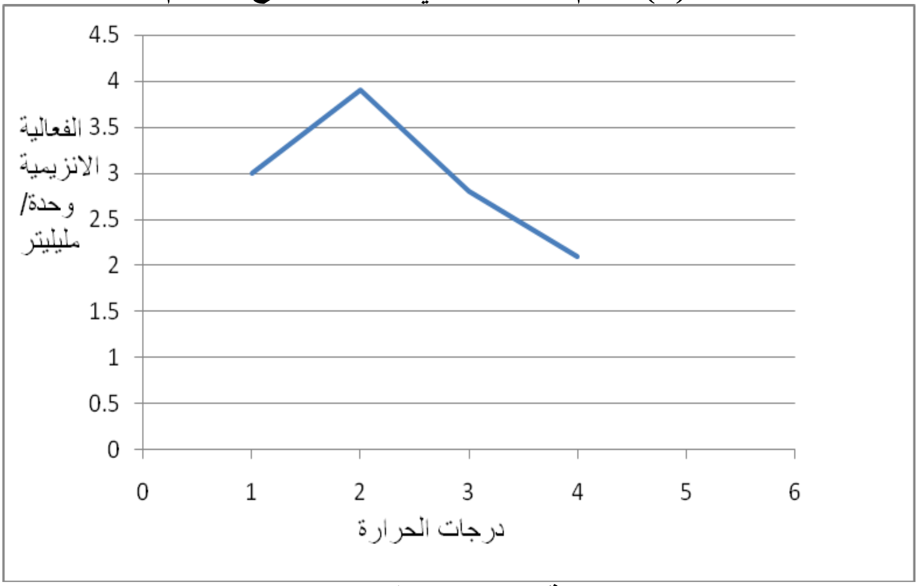


شكل (٣)

كروماتوكرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم الكايتنيز المنتج من بكتريا Bacillus sp باستخدام عمود التبادل الايوني Sephadex - G100 (١.٥×١٥) سم، الذي تمت موازنته بمحلول داريء الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني (٨) ثم الاسترداد بمحاليل متدرجة القوة الايونية (٠.٠٥، ٠.١، ٠.٢، ٠.٣). سرعة الجريان ٣٠ مليلتر/ساعة (حجم الجزء ٥ مليليتر).



شكل (٤) الرقم الهيدروجيني الامثل الانتاج الانزيم



شكل (٥) درجة الحرارة المثلى لانتاج الكايتنيز

References:

1-Gohal.V;Singh ; A,Vimal,M,Ashwini,P and Chatpar,H.S. (2006) Bioprospec and antifungal potentical of chitinolytic microorganism;Afarican .J.Biotechology 5 (2):54-72

2- 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.

3-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.

4-Tortora,P.P;Wellner,V.P;Pinkus,L.M and Mester,A(2004) observation on the PH dependeice of gluteminase ,Nal.Acd.Sc. 70(10):2717:2721.

5- 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.

6-Strich ,Siber, F (1983) utilization of Chitinase sol carbon and nitrogen source by Chromobactium Violacecum .FEMS, Microbio.letts .19:129-132.

7-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.

8-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.

9-Claus,D and Berkeley ,R.C.W (1989) Genus Bacillus . In:Bergeys manual of systematic bacteriology ,Vol.11 ,pp.1105- 1139 .

10-Logan ,N.A and Berkeley R.C.W (1984) Identifacation of Bacillus Strains using the API system ,J,Gen .Microbiol,130: 1871-1882.

11-Benhamous, N.; Gagne, S; Quere, D.L. and Degbi (2002) Bacterial mediated induced resistance in cucumber beneficial effect of the endophytic beneficial effect of the endophytic bacterium Serratia plymutnica on the protection against infection by Pythium ultimum. Phytopanol. 90 (1) ;45-56.
12-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.
13-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
14-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
15-Levin, D (2005) Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 69(2):262-291.
16- Zlatkovic, D.; Jakovlige, D.; Zekovic, D. and Varvic, M.M. (2003). A glucan from active dry baker’s yeast (Saccharomyces cerevisiae):A chemical andinvestigation of the structure. J.serb.chem.soc. 68(11):805-809
17- Benhamous, N.; Gagne, S; Quere, D.L. and Degbi (2002) Bacterial mediated induced resistance in cucumber beneficial effect of the endophytic beneficial effect of the endophytic bacterium Serratia plymutnica on the protection against infection by Pythium ultimum. Phytopanol. 90 (1) ;45-56.
18-Naja, G; Mustin, C. and Volesky, B. (2005) A high resolution; a new approach to studying binding site of microbial biosorbent. Water Research 39 (9):579-588.
19-Wang, D.; Cooney, C.; Demain, A; Dunil Humphrey, A. and Lilly, M. (1979) Fermantation and enzme technology. John Wiley, Inc. Canada.

20 -Folders, J.; Tommassen, L.; and Bitter, W. (2002) Identification of chitin binding protein secreted by Pseudomonas aeruginosa J.Bacterol. 182(8) :1257-1263.
21-Green, A. (2005) Production of chitilytic enzyme by Serratia marcescens using various chitinase. J.Chem.Technol.Biotechnol. 80 (7):28-34.
22- 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.
23- 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.

Summary:

Four Bacillus sp ability of chitinase production from the isolates was studied.

Quantitative screening appeared that Bacillu sp A3 was the highest chitinase producer specific activity 3.8 unit/mg protein. The bacteria was culture in liquid state fermentation contain chitine with the differented nitrogen source.

The favorable condition for chitinase producer were PH 8 the enzyme activity 5.1 unit/mg protine and the enzyme activity incubation period at 30 C .

Chitinase purification from Bacillu sp A3 after ammonium sulphat precipitation 80% saturation and dialysis tube to remove the salt. The last step include ion exchange chromatography sephadex G-100. The purification fold was 21 and the recovery is 23.3 %.