

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

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

الخلاصة

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

درست الظروف المؤثرة في الانتاج ولوحظ ان افضل انتاج يكون عند استخدام الوسط الزراعي السائل كاربوكسي مثيل سليولوز Carboxymethyl cellulase (CMCase) المضاف له 5% من السكر و برقم 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 للأنزيم 5 وحدة / ملغم بروتين .

المقدمة Introduction

من المعروف ان الاحياء المجهرية تنتج العديد من الانزيمات المختلفة المحللة للمواد المعقدة ومن بينها الانزيمات المحللة للسليولوز (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* , (٢٠٨،١٦،٢٣) ، في حين تشمل الخمائر والاعفان *Aspergillus niger* , *Trichoderma rees* (7,18) يختلف انتاج الانزيم باختلاف السلالات والظروف المزربية كمكونات الوسط والتهوية والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة ومن المهم معرفة الظروف الملائمة للانتاج للحصول على حصيله انزيمية جيدة خاصة عندما يكون الانزيم مفيدا للاستخدامات الصناعية او المجالات الحياتية وهو ما ينطبق على انزيم السليوليز الذي يدخل في صناعة المنظفات والاعذية 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 السليوليز المنتجة من سلالات *Serratia* جاءت هذه الدراسة لتحقيق الاهداف الاتية : الحصول على عزلات لبكتريا *Serratia* منتجة للسليوليز ومقارنة انتاجها وانتخاب العزلة الاغزر انتاجا ودراسة الظروف المؤثرة 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 عاقله 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 (١1) .

انتاج الانزيم المحلل للسليولوز cellulose

استخدم وسط كاربوكسي مثيل سليولوز الصلب cellulase Carboxymethyl (CMCase) المضاف له 5% من السكر و 1% من صبغة congo red (7, ١٣) لمعرفة العزلات المنتجة للسليولوز وغربلتها من ملاحظة وقياس مناطق الترسيب حول المستعمرات النامية . كما اعد الوسط الزراعي السائل كاربوكسي مثيل سليولوز cellulase (CMCase) المضاف له 5% من السكر و 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 18 ساعة وحضنت الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 28 درجة مئوية لمدة 72 ساعة ثم نبذ المزروع بسرعة 5000Xg لمدة 15 دقيقة بدرجة 4م . واخذ الرائق (ا لمستخلص الانزيمي الخام) وتم تقدير فعالية الانزيم وتركيز البروتين

تقدير فعالية الانزيم

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (٢٤،٩) في تقدير الانزيم المحلل للسليولوز . اضيف 0.5 مللتر من المستخلص الانزيمي مع 0.5 مللتر من وسط CMCase السائل المضاف له 10% من السكر بـرقم هيدروجيني 4.8 PH .

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 (١) وعلى الطول الموجي 450 باستخدام الكاشف P-nitrophenil (٢٠،١٢،١) عرفت وحدة الانزيم بانها كمية الانزيم التي تحرر ١ مايكرومول من السكريات المختزلة (Cellobiose ، Glucose) في الدقيقة عند ظروف القياس .

تقدير البروتين

استخدمت طريقة براد فورد Bradford method (٤) 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 كلوز ، سليلوبايوز ، زيلين ، زيلوز ، سكروز ومسحوق البرسيم المجفف. وبعدها تم تنمية البكتريا في الوسط الافضل بظروف مختلفة تضمنت الرقم الهيدروجيني من (2 - 12) ودرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (١٥ - ٦٠) م . كما تم استخدام بعض المواد الكيميائية والمعادن بتركيز 10 mM المذاب في 0.05 مولار من دارئ الفوسفات وبرقم هيدروجيني PH 7.2 لمعرفة تأثيرها على فعالية الانزيم .

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا المنتجة للانزيم المحلل للسليولوز:

تم الحصول على 45 عزلة محلية لبكتريا *Serratia* منتجة للانزيم المحلل للسليولوز ، تباينت هذه العزلات في نسبة التحلل (جدول ١) التي ظهرت بشكل مناطق ترسيب حول المستعمرات النامية في وسط CMCase الصلب ، وابتدت العزلة SME14 اعلى نسبة تحلل بلغت 3.5 لذا انتخبت هذه العزلة وشخصت وتبين انها تعود للنوع *Serratia odorifera* اعتمادا على مصنف بيركي (٢٢،١١)

الظروف المؤثرة في الانتاج

المصدر الكربوني

لوحظ ان احتواء الوسط على السكروز مصدر للكربون يعطي اعلى انتاجية للسليوليز مقارنة بالمصادر الكربونية الاخرى وكانت الفعالية النوعية للانزيم 4.2 وحدة / ملغم بروتين (جدول ٢) وقد اشارت دراسات اخرى الى ان انتاج الانزيم من *Bacillus subtilis* ، *Clostridium thermocellum* يكون افضل عند وجود السكروز بنسبة 1%، 5% على التوالي (٨) (٢١).

الرقم الهيدروجيني:

بلغت الفعالية النوعية 4.7 وحدة / ملغم بروتين في الوسط ذي الرقم الهيدروجيني 6.5 وهو اعلى مما في بقية الارقام (شكل ٣) وهو ما لوحظ ايضا للسليليز المنتج من بكتريا *Cellumonas sp* (١٣) في حين اشارت دراسات اخرى ان الرقم الهيدروجيني الامثل لعمل الانزيم المنتج من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* هو 7.0 (٢) بينما كان الرقم الهيدروجيني الامثل لعمل الانزيم المنقى من بكتريا *Bacillus subtilis* هو 6.5 (٨) وعموما تستخدم الارقام الهيدروجينية المتعادلة او القريبة من القاعدية في الاوساط الانتاجية للسليليز من البكتريا .

درجة الحرارة :

اعطت بكتريا *Serratia odorifera* اعلى انتاجية للسليليز عند درجة حرارة ٣٥ م ، حيث بلغت الفعالية النوعية للانزيم 4.08 وحدة / ملغم بروتين بينما ادى ارتفاع درجة الحرارة الى انخفاض واضح في الانتاجية (شكل ٤) . الا ان دراسات اخرى اشارت الى ان افضل درجة حرارة لانتاج السليليز من بكتريا *E.coli* هي 39 م (٢٣) في حين كانت درجة 35 م هي المثلى لانتاج السليليز من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* (٢) 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 (٩) .

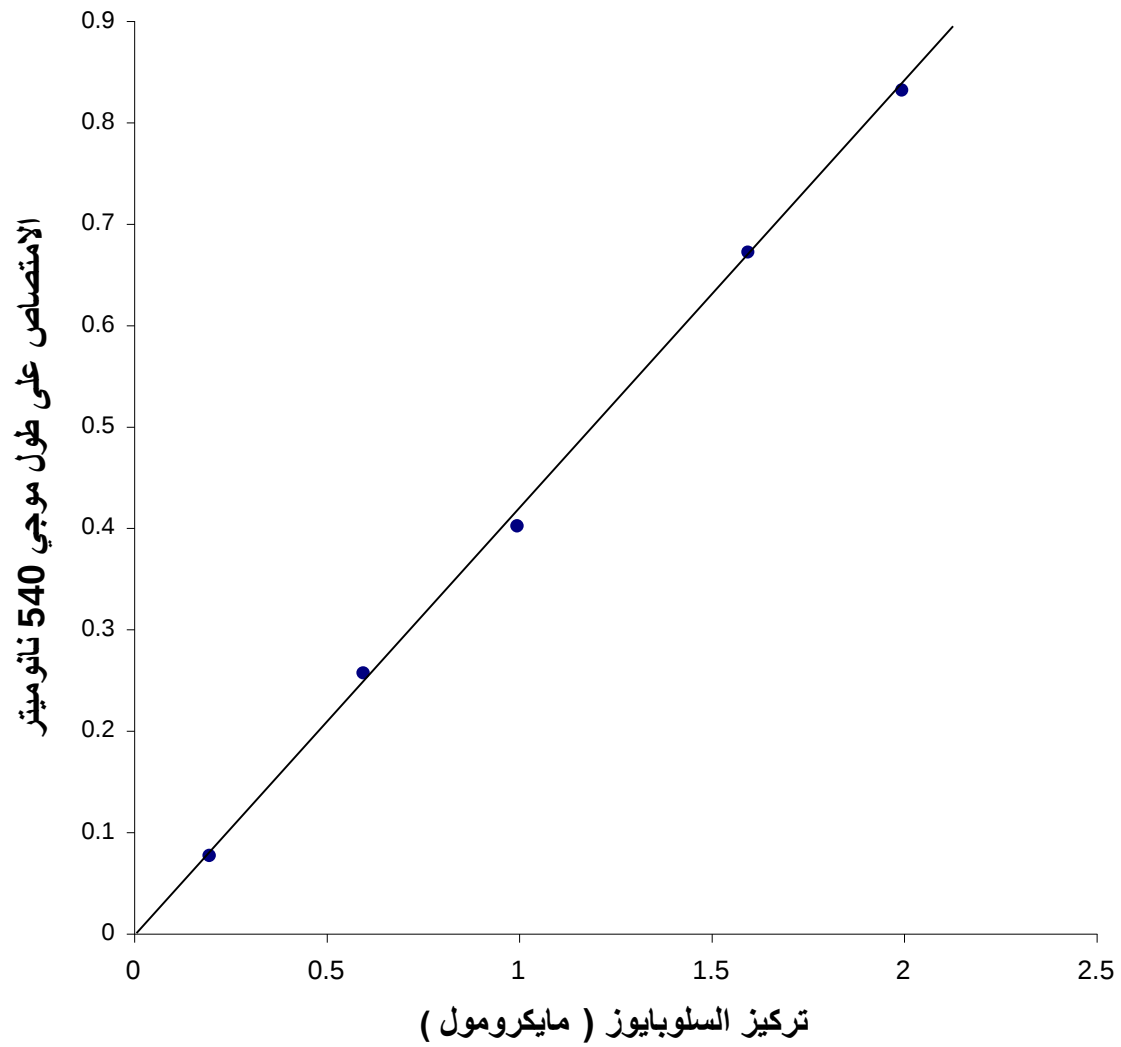
دراسة تاثير بعض المواد الكيميائية في فعالية الانزيم:

درس تاثير بعض الايونات الفلزية في فعالية الانزيم ولوحظ ان اضافة ايونات المنغنيزو الزئبق والنحاس والفضة والرصاص بتركيز 10 ملي مولاري ادى الى خفض الفعالية النوعية للانزيم بنسبة 50, 70, 82, 85, 100% على التوالي في حين عند معاملة الانزيم بنفس التركيز من ايونات الخارصين والصوديوم والمغنسيوم ادى الخفض فعالية الانزيم بنسبة قليلة (جدول ٣) .

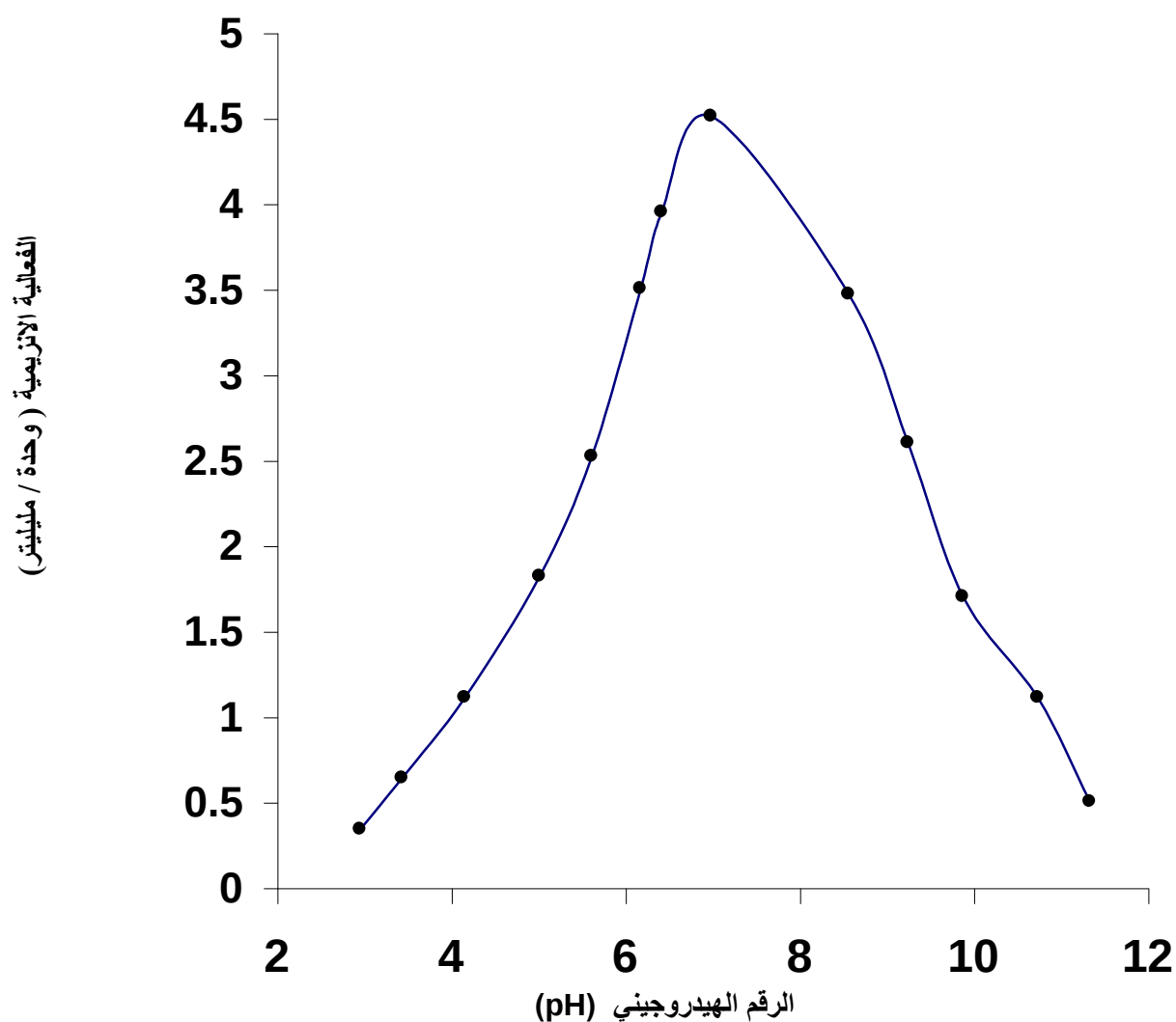
تعمل ايونات الزئبق كمثبط لاتنافسي للانزيم من خلال تاثيرها في تركيب الانزيم وموضعه الفعال اذ تعمل على كسر الاواصر ثنائية الكبريت واكسدة مجاميع الثايول SH.... في الموضع الفعال كما انها

تؤثر في مجاميع الاميدازول و الكاربوكسيل من خلال تكوين معقدات تؤدي الى تغير تركيب البروتين (١٧)، 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 لاجداث التأثير الحفزي للانزيم (١٠) .

لقد اوضحت دراسات اخرى الى ان فعالية السليليز المنقى من بكتريا *Bacillus sphaericus* تقل عند معاملته بتركيز 1 ملي مولاري من ايونات المغنسيوم والزنك 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 تتأثر الفعالية النوعية للانزيم عند معاملته بتركيز 5,10 ملي مولار من ايونات الرصاص والفضة والحديدك (٨,٣) بينما حصل تثبيط كلي لفعالية الانزيم المنقى من بكتريا *Thermomonospora fusca* عند معاملته بايونات الزنك والرصاص الثنائية (٢٠) 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 5 ملي مولاري من ايونات المغنسيوم والفضة والنحاس والزنك الثنائية (١٦,٢) .



الشكل (١) : المنحنى القياسي لتقدير تركيز السلويايوز .



الشكل (٢) : 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)
---	------------	--------------	--------	--------------	---

٢.٤	متصبغة	جروح ملوثة	<i>S. marcescens</i>	S3	٣٣
٢.٥	=	مياه سواقي	<i>S.marcescens</i>	S7	٣٤
٢.٠	=	مياه سواقي	<i>S.marcescens</i>	S3	٣٥
٢.٠	=	مياه سواقي	<i>S.marcescens</i>	S7	٣٦
٢.٤	=	قشع	<i>S.marcescens</i>	S5	٣٧
٢.٧	=	مياه آسنة	<i>S.marcescens</i>	S8	٣٨
٢.٤	=	مياه آسنة	<i>S.marcescens</i>	S5	٣٩
٢.٥	=	مياه آسنة	<i>S.fonticola</i>	S46	٤٠
٢.٥	غير مولده للصبغة	ادرار	<i>S.liqueficanse</i>	S47	٤١
٢.٠	متصبغة	ادرار	<i>S.marcescens</i>	S48	٤٢
٢.٠	=	جروح ملوثة	<i>S.marcescens</i>	S50	٤٣
١.٨	=	جروح ملوثة	<i>S.marcescens</i>	S55	٤٤
١.٥	=	جروح ملوثة	<i>S.marcescens</i>	S66	٤٥
٢.٣	=	قشع	<i>S.marcescens</i>	S67	٤٦
٢.٠	=	قشع	<i>S.marcescens</i>	S77	٤٧
٢.٠	=	أوراق نبات الخس مصابة	<i>S.plymuthica</i>	S80	٤٨
٢.٥	=	ادرار	<i>S. marcescens</i>	S4	٤٩
٢.٥	=	قشع	<i>S. marcescens</i>	S2	٥٠

الجدول (١) : عزلات بكتريا *Serratia* المنتجة لانزيم السلليز من مصادر مختلفة .

المادة	التركيز %	الفعالية النوعية وحدة/ ملغم بروتين
--------	-----------	------------------------------------

٢.٥	٥	زابلين
٢.٨	٥	زابلوز
٣.٣	٥	سليلوبايز
٣.٨	٥	مسحوق البرسيم
٤	٥	كلكوز
٤.٢	٥	سكروز

جدول (٢) : إنتاجية أنزيم السليلز 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 (٣) . تأثير الايونات الفلزية في فعالية أنزيم السليلز 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) A rapid 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 thermophilic cellulase . University
7. Chen, P.U.; Chun , T.; Chang, T.and Lin ,P.(2004). Purification and characterization of carboxy methyl cellulase from *Sinorhizobium fredii* . Taiwan.
8. Crispin, M.;Rajni, H.K.; Remigio, Z.and Bo. M. (2000). Purification and characterization of cellulase produced by two Bacillus strains . Biotechnol . 83(3): 177-178.
9. Fullbrook, P.D.(1983). Practical Limits and prospects. In : Industrial enzymology . (eds. Godfrey, 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). Crystalline L asparaginase from *E coli* Purification and chemical characterization . 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. (9th 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 processing.
15. Kung, JR.; Carmem, P.R. and Tung,R.S.(1990). Barleg and vetch silage. Dairy sciences. 73(5): 1304-1311.

16. Leff, L.G.;Kernan,R.M.;Mcarthur,J.V. and Shimkets.(1992).The processive endo cellulose celf *Clostridium cellulolyticum*. Appl. Bacteriology. 72(3): 244-251.
17. Nassar, M.N.(1993). Formation and Stability of protein drugs. The second arab canferfnc 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 reesi*. 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 *Clostridium cellulolyticum* and *Trichderma reesi* . 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.

**Production of cellulase by *Serratia odorifera* 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 odorifera* .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 ° for 72 hr.The specific activity was 5 unite/mg protein at these conditions.