P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS) Open Access
2015 ,(9), (3) :72-79

استخلاص وتنقية انزيم السليوليز من بكتريا *Sphingomonas paucimobilis* المعزولة من اوراق الاشجار المتساقطة.

علي عدنان عبد* احمد محمد تركي ** محمد عدنان عبد**

*مديرية تربية الانبار
** جامعة الانبار – كلية العلوم

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2015.127591

الكلمات المفتاحية:
cellulase enzyme,
chromatography,
SDS-PAGE,
Sphingomonas
. pucimobili

الخلاصة:
تم الحصول على ١٥ عزلة بكتيرية من البكتريا المحللة للسليلوز المعزولة من اوراق الاشجار المتساقطة وتباينت هذه العزلات في قدرتها على تحليل السليلوز وقد اثبتت نتائج تشخيص افضل عزلة بكتيرية منتخبة من بين تلك العزلات انها تعود الى بكتريا *Sphingomonas pucimobili* واظهرت نتائج تنقية الانزيم المنتج من قبل هذه البكتريا باستخدام الوسط الزرعي المحور والمستخلص بطريقة الترشيح فائق السرعة ان الفعالية النوعية للأنزيم كانت ١,١٦ وحدة/ملغم بروتين وتراوحت نسبة الاشباع بكبريتات الامونيوم (٠ – ٤٠)% إذ بلغت الحصيلة الانزيمية عندها ٩.٤٧% وبعدد مرات تنقية ٢,٤٦ وعند استخدام عمود التبادل الايوني DEAE – cellulose اظهرت النتائج ان الحصيلة الانزيمية بلغت ١١,٩٢% وعدد مرات التنقية كانت ٥,٨٠ بينما كانت الحصيلة الانزيمية ٨,٦٣% عند استخدام الترشيح الهلامي Sephadex G – 75 وبعدد مرات تنقية ١٢,٩ وقد بلغ الوزن الجزيئي لأنزيم السليوليز المنقى والمقدر بطريقة الترحيل الكهربائي ٤١ كيلو دالتون.

المقدمة

ترتبط بعض الانزيمات ارتباطا وثيقا بأغشية بعض عضيات الخلية مثل الغشاء البلازمي والميتوكندريا والبلاستيدات الخضراء والشبكة الاندوبلازمية , وعليه فأنه كثيرا ما يكون من الصعب فصلها. بيد أن معظم الانزيمات تكون محاليل غروية في الماء يمكن الى حدما فصلها بسهولة وبالطرق نفسها المستخدمة للبروتينات الاخرى وكثيرا ما تكون عملية فصل البروتينات عملية طويلة وشاقة تعتمد على تمايز (اختلاف) الذوبان في محاليل مختلفة للأنزيم (قيد الدراسة) وللبروتينات الاخرى الخاملة والموجودة كملوثات (1). لذلك اصبح من الضروري الاهتمام بالطرق الخاصة لتنقية الانزيمات وتطويرها لوجود حاجة متواصلة لتنقيتها لذا فقد انبثق لها في السنوات الماضية حقل تنقية الانزيمات كعلم حديث ليكون من العلوم المهمة في تنقية الانزيمات بسبب الطلب المتزايد عليها في العديد من الصناعات(2).

* Corresponding author at Anbar Education Directorate
E-mail address: Aligenetic82@yahoo.com

ذكر (3) ان السليوليز هو انزيم تنتجه الفطريات والبكتريا لانتاجه لقدرته على تحليل السليلوز الى بنيته الاساسية β– glucose او Oligosaccharides لهذا السبب يستخدم في عددٍ من التطبيقات المتنوعة ، أذ يتكون هذا الانزيم بصورة عامة من مجموعتين الاولى Ctalytic domain المجموعة المحفزة ويرمز لها CD التي تعمل على تحفيز تحلل اواصر 1,4 glucosidase β للسليلوز ، والثانية Cellulose–Binding Domain (CBD) مجموعة الارتباط بالسليلوز التي تسمى حاليا Carbohydrate Binding Model (CBM1) وان احد اهم صفات هذه المجموعة انها تفتقر إلى فعالية التحفيز اذ انها ترتبط بسطح السليلوز بواسطة ثلاثة احماض امينية عطرية وان ازالة هذه المجموعة يسبب انخفاضاً كبيراً في فعالية الارتباط والتحلل ضد السليلوز البلوري ولا يؤثر في تحلل السليلوز غير البلوري الامر الذي ادى الى اقتراح ان وظيفة هذه المجموعة (CBM1) تتعلق في تحليل السليلوز البلوري (4). الانزيمات التي تحلل السليلوز تعمل على تحفيز تحلل السليلوز الذائب وغير الذائب عن طريق كسر الاواصر

الكلايكوسيدية (β-1,4) التي تربط بين وحدات الكلوكوز. وتشكل الانزيمات عصب الحياة للأحياء جميعا اذ تشكل جانبا مهما من عمليات التصنيع(5).

المواد وطرق العمل

العزل والتشخيص:-

جمعت ١٥ عينة من أوراق أشجار مختلفة وتم وضعها داخل حفرة في الأرض ذات أبعاد (الطول ٠.٧٥م، العرض ٠.٥٠م، العمق ٠.٣٠م) ورطبت الأوراق وطمرت داخل الحفرة وتركت لمدة ٢٠ يوماً ثم اخذ ١٠ غرام من كومبوست أوراق الشجر ووضعت داخل اكياس وسجل على الكيس الذي أخذت فيه النماذج المعلومات كافة مثل رقم العينة ، نوع الورق ومكان جمع النماذج وعند الوصول الى المختبر مزجت مع ٩٠ مل ماء مقطر (معقم) واجريت سلسلة تخافيف لها وتم زراعتها مباشرة (التخفيف الرابع والخامس) على لقح وسط اكار السليلوز الصلب المتكون من 0.8 gm K_2HPO_4 , 0.2 gm $MgSO_4.7H_2O$, 0.2 gm KH_2PO_4 , 0.2 gmNaCl , 1 gm $NaNO_3$, 0.01 gm $CaCO_3$, 0.5 gm Yeast extract , 17 gm Agar and 5 gm CMC في لتر ماء مقطر مع ضبط الـ pH الى ٧ (6)، وحضنت بدرجة حرارة ٣٠ م° لمدة ٤٨ ساعة. ولغرض اختيار العزلات الاكفاء نشطت العزلات المنتجة لأنزيم السليوليز بنقل مليء عروة الناقل (Loop Full) من المزارع المحفوظة الى وسط الاكار المغذي ثم اعيد زراعة العزلات المنقاة على وسط اكار السليلوز الذي تم وصفه من قبل (7) في مركز الطبق داخل دائرة لا يتجاوز قطرها ١سم وحضنت في درجة حرارة ٣٠م° لمدة (٢٤، ٤٨، ٧٢) ساعة وسجل قطر التحلل من خلال تكون الهالة الشفافة (حزام تحلل السليلوز حول تلك المستعمرات) وبناء على نتائج هذا الاختبار تم انتخاب عزلة بكتيرية واحدة باعتبار انها الأكفأ في انتاج انزيم السليليز لغرض استخدامها في الدراسات اللاحقة وشخصت تلك العزلة البكتيرية المنتجة لأنزيم السليوليز باستخدام الفحوصات المجهرية والكيموحيوية اعتمادا على المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتريا ولتأكيد التشخيص تم استخدام نظام (Api – Strep. , Api – Staph. , Api – 20E) و كذلك جهاز Vitek 2 system .

قياس فعالية انزيم السليوليز:-

تم قياس فعالية الانزيم في الوسط السائل على النحو الآتي:

أ- تهيئة المنحنى القياسي للكلوكوز

حضر المنحنى القياسي وفق الطريقة التي وصفها (8) .وبحسب ما موضح في جدول (١) إذ استخدمت النتائج التي ظهرت من الجدول في رسم المنحنى القياسي لتقدير الكلوكوز بين الامتصاصية وتركيز الكلوكوز واستعمل في تقدير الكلوكوز في النماذج

جدول (١) تحضير المنحنى القياسي للكلوكوز

Glucose (A) (ml) 10mg/ml	1	1	1	1	1
D.W ml	0.5	1	2	3	4
Dilution factor	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
Glucose (B) mg/ml	6.7	5	3.3	2.5	2
Glucose (B) (ml) mg/ml	1	1	1	1	1
D.W ml	1.23	1	0.65	0.66	1
Dilution factor	1:2.23	1:2	1:1.65	1:1.66	1:2
Concentration mg/ml	3	2.5	2	1.5	1
3.5DNS reagent (ml)	3	3	3	3	3
١٠٠ م°	حمام مائي لمدة ٥ دقائق				
Absorbent 540 nm	0.912	0.767	0.686	0.498	0.326

ب-قياس فعالية معقد الانزيم:-تم القياس في الوسط السائل بحسب طريقة (9). وباستخدام CMC كمادة

باخذ ١٠ مل من المزرعة السائلة ووضعت في انبوبة ونعمل لها طرداً مركزياً مبرداً بسرعة ١٤٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٤ م° .ثم اخذ ٠.٥ مل من الراشح بوصفه (crude enzyme) واضيف لها ١.٥ مل من محلول CMC ١% المحضر في محلول فوسفات الصوديوم ٠.٠٠٥ مولاري (pH 7) وحضنت لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة ٤٠ م° في (حمام مائي هزاز). ثم اضيف ٣ مل من كاشف DNS لكل انبوبة لإيقاف التفاعل. وضعت الانابيب في حمام مائي مغلي بدرجة حرارة ١٠٠ م° لمدة ١٠ دقائق. ثم تركت

الانابيب لتبرد بدرجة حرارة الغرفة وقرئت على طول موجي ٥٤٠ نانوميتر .

استخلاص وتنقية انزيم السليوليز:-

اجريت هذه التجربة في كلية العلوم لجامعة Nottingham Trent وقد تضمنت العملية الخطوات الاتية :

تركيز وتنقية انزيم السليوليز:-

ان عملية تنقية الانزيم تعني التخلص من الشوائب الموجودة مع الانزيم لتفادي الاستنتاجات الخاطئة، اجريت عملية استخلاص وتنقية انزيم السليوليز من العزلات البكتيرية قيد الدراسة كالتالي:-

نميت العزلة البكتيرية المحلية باستخدام الوسط الزرعي السائل المحور الذي رمز له سابقا (E) تحت الظروف المثلى لإنتاج الانزيم .ثم فصلت الكتلة الحيوية بوضع المزرعة بعد انتهاء مدة الحضن المثلى في جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٤م° . اخذ الراشح (٣٠٠) مل تقريبا واجريت له عملية التركيز باستخدام الترشيح فائق السرعة (Amicon ultra – 15 centrifugal filter devices) اي ان حجم الفلتر المستخدم هو ١٥ مل ذات غشاء (10000 NMWL) والذي يوضع داخل انبوبة طرد مركزي مبرد حجم ٥٠ مل اجريت عملية الترشيح بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة وبدرجة حرارة ٤م° .اخذ الراشح المركز المتحصل عليه من الخطو السابقة واجريت له عملية الترسيب باستخدام كبريتات الامونيوم وفق الطريقة الموضحة من قبل (12) بدرجة حرارة ٤م° مع التحريك المستمر وبنسب اشباع تراوحت (٠ – ٤٠)% ثم فصلت الرواسب المتكونة بعد كل اضافة بالطرد المركزي المبرد بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٢٥ دقيقة بدرجة حرارة ٤م° ، اهمل الرائق واذيب الراسب في اقل كمية ممكنة (١٠) مل تقريبا من محلول (A) المنظم. ثم اجريت عملية النضح الغشائي (Dialysis) للراسب المتحصل عليه من الخطوة السابقة وبنفس المحلول المنظم (A) لمدة يوم واحد وتم استبدال المحلول المنظم كل اربع ساعات . بعد الانتهاء من عملية الديلزة اجريت للمحلول عملية (كروموتوغرافيا التبادل الايوني) حيث تم تحديد المبادل الايوني الانسب للاستخدام وفق المعادلة المذكورة من قبل (12) التي تنص الاتي

$$\Delta P = PI - pH$$

حيث ان ΔP = محصلة الشحنة المحمولة على الانزيم

pH = الاس الهيدروجيني الامثل للأنزيم

PI = نقطة التعادل الكهربائي التقريبية التي تعرف (على انها الرقم الهيدروجيني الذي تكون فيه محصلة الشحنة التي يحملها الانزيم صفراً)

و وفقا لناتج المعادلة اعلاه التي تم تطبيقها تم اختيار المبادل الايوني السالب وهو (DEAE – cellulose) ذو الشحنة الموجبة لكي يرتبط بشحنة الانزيم السالبة والذي حضر وعبئ في عمود الفصل لتصبح ابعاده ١.٥ × ١٥ سم حيث تمت موازنة العمود بالمحلول المنظم (A) لمدة يوم كامل اضيف المحلول الانزيمي المركز بالترشيح الفائق وكبريتات الامونيوم الى عمود المبادل الايوني ثم جمعت الاجزاء التي لم ترتبط بالمبادل الايوني والمتدفقة من العمود في انابيب اختبار بسرعة جريان ٠.٥ مل/دقيقة ثم اجريت عملية الاسترداد (ازالة او شطف البروتينات المرتبطة) باستخدام التدرج الملحي الخطي (Linear Salt Gradient) حيث غسل العمود بتراكيز متدرجة من (٠.١ – ٠.٥) مولاري من NaCl وتم قراءة الامتصاصية لكل جزء من الاجزاء المنفصلة من العمود عند الطوليين الموجيين ٢٨٠ و ٥٤٠ نانوميتر لمعرفة تركيز البروتين وفعالية الانزيم على التوالي ، جمعت بعدها الاجزاء ذات الفعالية الانزيمية العالية وتم قياس الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين لها .

تلت خطوة التبادل الأيوني إمرار المحلول الأنزيمي الناتج من الخطوة السابقة على عمود الترشيح الهلامي Sephadex G – 75 الذي حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة ذات ابعاد ٠.٦ × ٥٠ سم حيث تمت موازنة العمود بالمحلول المنظم (A) لمدة يوم كامل واستردت الاجزاء بمحلول الموازنة نفسه وبسرعة تدفق ٠.٢٥ مل/دقيقة ، تم قراءة الامتصاصية لكل جزء من الاجزاء المنفصلة من العمود عند الطوليين الموجيين ٢٨٠ و ٥٤٠ نانوميتر لمعرفة تركيز البروتين وفعالية الانزيم على التوالي ، جمعت بعدها الاجزاء ذات الفعالية الانزيمية العالية وتم قياس الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين لها .و تم حفظ العينات المتحصل عليها من الخطوة السابقة بدرجة حرارة –٢٠ م° باعتبارها هي الانزيم المنقى.

تقدير الوزن الجزيئي للانزيم:-

تم تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم السليوليز المنقى من العزلة البكتيرية*Sphingomonas paucimobilis* قيد الدراسة عن طريق

اجراء عملية الترحيل الكهربائي(13) إذ استخدم في هذه الطريقة هلام جاهز محضر من شركة Sigma والذي يتم وضعها مباشرة في الجهاز حيث تحتوي على ٥% من هلام الحصر (Stacking gel) في الجهة العليا و ١٢% من هلام الفصل (Separating gel) في الجهة السفلى والمحضر وفق طريقة (14). جهزت عينة انزيم السليوليز المراد معرفة الوزن الجزيئي لها بأخذ ٢٥ مايكروليتر من العينة ومزجها مع ٢٥ مايكروليتر من محلول (Sample Buffer Laemmli 2x concentrate) المجهز من شركة Sigma (S3401 – 1vL) ثم وضعت في حمام مائي مغلي لمدة ٥ دقائق وتركت بعدها العينات لتبرد بدرجة حرارة الغرفة (وضع التانك الجاهز الحاوي على الهلام في جهاز الترحيل مباشرة وأُغمر بمحلول المنظم 5% SDS) وتم تحميل العينات على الهلام واجريت عملية الترحيل لمدة ساعتان ونصف بقوة ١٢٠ فولت وبعد الانتهاء اخذ الهلام وتم غسله بالماء المقطر لأكثر من مرة لمدة ٣٠ دقيقة ثم تم تصبيغ الهلام بصبغة (Coomassie Brilliant Blue) المجهزة من شركة Sigma لمدة ليلة كاملة وبدرجة حرارة الغرفة وذلك لتوضيح الحزم البروتينية التي تمثل البروتينات المكونة للإنزيم ، تم تحديد الوزن الجزيئي لعينة الانزيم المنقى وذلك بمقارنتها مع الدليل الحجمي للبروتين (10 – 250 KDa , sigma , USA) .

النتائج والمناقشة

أوضح الفحص الذي أجري لـ ١٥ عينة من اوراق الاشجار والتي تمثل انواعاً مختلفة من الاوراق المتساقطة التي كانت محفوظة في حفرة خاصة ان نسبة العينات التي اعطت فحصا موجبا هي (١٠٠)% إذ تم الحصول على ١٥ عزلة تباينت في قدرتها على تحليل السليلوز وذلك من خلال قياس معدل قطر المنطقة الشفافة حول العزلة وهذا التباين عائد الى طبيعة العزلات البكتيرية التي تقوم في تحليل السليلوز. فقد ذكر (15) ان هذا التباين عائد الى طبيعة العزلات في انتاج الانزيمات المحللة للسليلوز فضلا عن الوقت المستهلك في عملية التحلل. واوضح (16) ان الـ pH له دور فعال جدا في زيادة سرعة التحلل من خلال زيادة فعالية الانزيمات المحللة للسليلوز إذ وجد ان الـ pH الامثل للتحلل كان ٦.٥ – ٧.٥ . اما (6) فقد استطاع الحصول على ٢٨ عزلة بكتيرية محللة للسليلوز من مجموع ٧٢ عزلة تم جمعها من اوراق الاشجار المتساقطة .

اظهرت نتائج الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية وباستخدام نظام (Api – Strep. , Api – Staph. , Api – 20E) وجهاز Vitek 2 system للعزلة البكتيرية المنتخبة كعزلة بكتيرية كفوءة في تحليل السليلوز انها سالبة لملون كرام ، متحركة ، منتجة لكل من الكتليزوالاوكسديز وسالبة لليوريز إذ اثبتت مجمل الاختبارات الزرعية والكيموحيوية والمجهرية تلك ان هذه العزلة تحمل صفات بكتريا *Sphingomonas paucimobilis* وتم تأكيد تلك النتائج باستخدام نظام Api – 20E للعائلة المعوية الذي اثبت انها تعود للجنس البكتيري نفسه *Sphing. paucimobilis* جدول (٢) ولتشخيصها بشكل دقيق تم استخدام جهاز Vitek 2 system الذي اكدت نتائجه انها تعود لبكتريا *Sphing. paucimobilis* وبنسبة تشخيص عالية بلغت ٩٧%.

جدول رقم (٢) نتائج تشخيص العزلة البكتيرية*Sphingo.paucimobilis*باستخدام نظام API–20E

Isolates	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H_2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Sphingomonaspaucimobilis	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

وجاءت نتائج التشخيص هذه متوافقة مع نتائج عدد من الباحثين الذين استطاعوا عزل البكتريا المحللة للسليلوز وتشخيصها فقد شخص (19) بكتيريا *Sphingomonas sp.* كأكفاء عزلة بكتيرية محللة لسليلوز ومعزولة من التربة . في حين شخص (6) بكتريا *Bacillus subtilis* التي عزلها من اوراق الاشجار المتساقطة واثبت انها افضل عزلة بكتيرية محللة للسليلوز من بين ٢٨ عزلة تم الحصول عليها من هذه الاوراق التي كانت جميعها محللة للسليلوز .

انتج انزيم السليوليز من العزلة المحلية *Sphingomonas paucimobilis* باستخدام الوسط المحلي السائل المحور من قبل الباحثين واستخلص الانزيم من المزروع البكتيري السائل تحت الظروف

المثلى المتحصل عليها من التجارب السابقة . و بهدف الحصول على مستخلص انزيمي نقي للتخلص من اكبر قدر ممكن من البروتينات والشوائب والصبغات ومواد اخرى غير مرغوب بها أجريت له مجموعة من الخطوات الكيميائية والفيزيائية المتعاقبة إذ تم قياس كفاءة كل خطوة من خطوات التنقية تلك بما يعرف بالحصيلة الانزيمية Yield او الاسترداد (وهي تعبر عن النسبة المؤية للفعالية الانزيمية الموجودة اصلا التي تم الاحتفاظ بها) وعلى عدد مرات التنقية Fold purification (وهي تعبر عن العامل الذي تزداد به الفعالية النوعية للمستخلص) وقد شملت تلك الخطوات الترشيح فائق السرعة (Amicon Ultrafiltration) التي تعد من الطرائق المستخدمة على نطاق واسع على المستويات المختبرية والصناعية ولاسيما في تنقية الانزيم وذلك لكون هذه الطريقة لا تحتاج الى مواد كيميائية كثيرة ويتم العمل بها على درجات حرارية منخفضة ولا يحدث تغير في طور البروتين اي لا يحدث تحول من ذائب الى راسب ، تبين خطوات التنقية الموضحة في الجدول (٣) ان المستخلص الانزيمي المنقى والمتحصل عليه من العزلة المحلية *Sphingo. paucimobilis 15* كان بفعالية نوعية ٧.٢٣ وحدة/ملغم بروتين وبعدد مرات تنقية بلغ ١٢.٩ وحصيلة انزيمية ٨.٦٣.

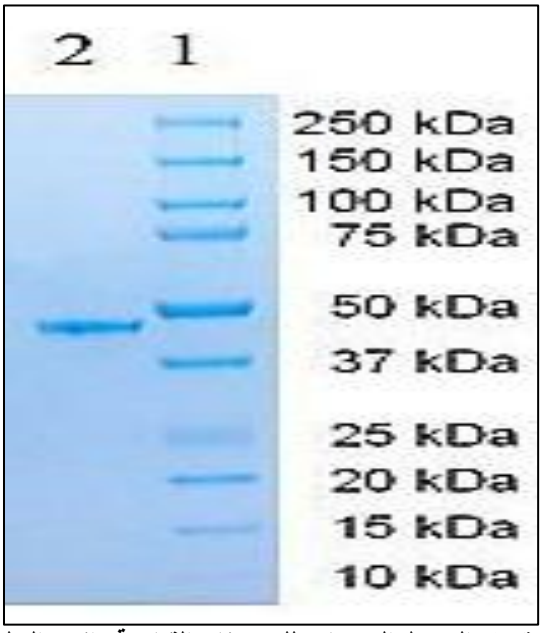
جدول (٣) مراحل تنقية انزيم السليوليز من العزلة المحلية *Sphingomonaspaucimobilis 15*

مراحل التنقية	الحجم الكلي مل	فعالية الانزيم وحدة/مل	تركيز البروتين ملغم/مل	الفعالية الكلية وحدة	الفعالية النوعية وحدة/ملغم بروتين	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية %
المستخلص الانزيمي الخام	300	3.38	6.01	10^4 × 1	0.56	1	100
الترشيح فائق السرعة Amicon ultra filtration	18.5	6.27	5.38	115.99	1.16	2.07	11.43
التركيز بكبريتات الامونيوم (0 - 40) %	14	6.86	4.96	96.04	1.38	2.46	9.47
التبادل الايوني بعمود DEAE-Cellulose	16	7.56	2.32	120.96	3.25	5.80	11.92
الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-75	10	8.76	1.21	87.6	7.23	12.9	8.63

تشير البحوث العلمية الى ان استخدام طريقة الترشيح فائق السرعة مجدية في مجال تركيز الانزيم وكذلك استخدام الترسيب بكبريتات الامونيوم كأحد خطوات التنقية لانزيم السليوليز المنتج من قبل البكتريا فقد استخدم (11) طريقة الترشيح الفائق وحصل من خلالها على عدد مرات تنقية ٧ وحصيلة انزيمية ٩٦ اثناء تنقية انزيم السليوليز من بكتريا *Bacillus brevis*. كما نقى (18) انزيم السليوليز من بكتريا *Salinivibrio sp.* باستخدام عدة خطوات شملت التركيز بالترشيح فائق السرعة كذلك الترسيب بكبريتات الامونيوم ومن ثم كروماتوكرافيا التبادل الايوني والترشيح الهلامي حيث بلغت عدد مرات تنقية المتحصل عليها ٢٩.٥ والحصيلة الانزيمية ١٨.٩ . ونجد انه عند استخدام الترسيب بكبريتات الامونيوم من قبل (19) بنسبة اشباع ٩٠% كانت عدد مرات التنقية المتحصل عليها ٧.٨٥٥ وحصيلة انزيمية ٦١.٧٥ . اما (20) فقد استخدما الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٨٠% كخطوة اولية من خطوات تنقية انزيم السليوليز إذ حصلا على عدد مرات تنقية ٢.٣ وحصيلة انزيمية بلغت ٤٥ . وهذه النتائج تكون متقاربة نوعا ما الى ما حصلنا عليه وقد ذكر (21) ان معاملة مستخلص الانزيم الخام بالملح تعد خطوة مهمة في عملية الاستخلاص والتنقية إذ ان الملح يحتوي على ايون ثنائي سالب الشحنة مثل كبريتات الامونيوم او ثنائي موجب الشحنة مثل كلوريد المغنيسيوم وهذا الامر يؤدي الى ترسيب الانزيم لان ايونات الالكتروليت (electrolyte) تتحد مع جزيئات الماء مما يقلل من كمية المحلول المتوافرة لذوبان الغرويات الموجودة وبالتالي يترسب الانزيم . اما (22) فقد قام بتنقية انزيم السليوليز المستخلص من بكتريا *Sinorhizobiumfredii* باتباع عدة خطوات شملت الاولى منها الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٤٠ – ٦٠% ثم التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني DEAE – sepharose إذ تمكن من الحصول على عدد مرات تنقية بلغت ١.٩.

تم تحديد الوزن الجزيئي لأنزيم السليوليز باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي SDS – PAGE واظهرت النتائج ان الوزن الجزيئي لأنزيم السليوليز المنتج من قبل العزلة المحلية *Sphingo. paucimobilis 15*كان حوالي ٤١ كيلو دالتون عند مقارنته بالبروتين القياسي ،صورة (١).

2. Xin, L. and Hui-Ying, Y. 2012, Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus sp*. L1. J IndMicrobiolBiotechnol , 39:1117–1124 .
3. Zou, N. and Plank, J. 2015, Intercalation of cellulase enzyme into a hydrotalcite layer structure . J. Physics and Chemistry of Solids . 76. P: 34 – 39 .
4. Tonozuka, T., Yoshida, M. and Takeuchi, M. 2014, Enzymes for Cellulosic Biomass Conversion . Research Approaches to Sustainable Biomass Systems . p: 225 – 242 .
5. Nagaraju, M., Narasimha, G. and Rangaswamy, V. 2009, impact of sugar industry effluents on soil cellulose activity. J. Int. Biodeter. Biodegr. 63:1088 – 1092.
6. Ardhiani, K. H., Nungki, A. P. K. and Endang, S. S. 2013, Role of Bacteria and Mold as Agent Plant Litter Composting . J. Biological and Environment Sciences : 73 – 76 .
7. Puspita, L., Eko, S., Niken, F. G. and Wiwik, R. 2012, Isolation and Characterization of Cellulase Produced by Cellulolytic Bacteria from Peat Soil of OganKomeringIlir, South Sumatera . Int. J. Environ. And Bioene. 3 (3) : 145 – 153 .
8. Adney, B. and Baker, J. 1996, Chemical Analysis and Testing Task, Measurement of Cellulase Activities. P: 1–9.
9. Saraswati, B., Ravi Kumar, M., Makesh Kumar, D. J., Balashanmugam, P., BalaKumaran, M. D. and Kalaichelvan, P. T. 2012, cellulose production by *Bacillus subtilis* isolated from cow dung . Archives of Applied Science Research. 4(1): 269 – 279.
10. Vijayaraghavan, P.and Vincent, S. G. P. 2012, Purification and Characterization of CarboxymethylCellulase from *Bacillus* sp. Isolated from a Paddy Field . Polish Journal of Microbiology, 61(1): 51–55 .



صورة (١) الترحيل الكهربائي للبروتينات القياسية وانزيم السليوليز على هلام الاكريليمايد بتركيز ١٥% والمصبغ بصبغة Coomassie Brilliant Blue
Lane 1: standard proteins
Lane 2: Cellulase from *Sphingomonas* M.W. 41 KDa

ويستدل من نتيجة الترحيل الكهربائي على نقاوة الانزيم ووزنه الجزيئي حيث اعطى انزيم السليوليز الذي قدر الوزن الجزيئي له حزمة بروتينية واحدة على الهلام الذي قد يعكس نقاوة الانزيم المنتج من العزلة البكتيرية واستخدم العديد من الباحثين هذه التقنية لتقدير الوزن الجزيئي للأنزيم المنتج من الاحياء المجهرية وتحديد نقاوته . وتتقارب نتائجنا مع (2) اللذان حصلا على انزيم السليوليز بوزن جزيئي مقداره ٤٤.٣ كيلو دالتون والمقدر بطريقة الترحيل الكهربائي . في حين وجد (23) حزمة بروتينية بحجم ٢١ كيلو دالتون تمثل انزيم السليوليز المنقى من بكتريا *Lysobacter sp.* باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي . كما اوضح (22) الى امتلاك بكتريا *Sinorhizobium fredii* حزمة بروتينية بوزن ١٤.٤٠٠ كيلو دالتون تمثل انزيم السليوليز وذلك باستخدام الترحيل الكهربائي . اما (20) فقد استخدما طريقة الترحيل الكهربائي لتقدير الوزن الجزيئي لأنزيم السليوليز المستخلص من بكتريا الـ *Bacillus sp.* والذي بلغ ١٨٥ كيلو دالتون .

المصادر

1. Li, X. and Yu, H. Y. 2011, Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus sp*. LY9. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38(11):1837–1843

11. Singh, V. K. and Kumar, A. 1998, Production and Purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis*vs-1. J. Biochemistry andMolecular Biology International, 45 (3) : 443 – 452.
12. Segel, I. P. 1976, Biochemical calculation. Jon Willey and Sons, Inc. New York .
13. Iqbal, H. M. N., Ahmed, I., Zia, M. A, and Irfan, M. 2011, Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichodermaviride* under SSF and its detergent compatibility. J. Advances in Bioscience and Biotechnology, (2): 149 – 156.
14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685.
15. Sizova, M. V., Izquierdo, J. A., Panikov, N. S. and Lynd, L. R. 2011, "Cellulose and Xylan-Degrading Thermophilic Anaerobic Bacteria from Biocompost" . Applied Environmental Microbiolology, 77 (7) : 2282.
16. Noor, E., Rusli, M. S., Yani, M., Halim, A. and Reza, N. 2006, "Pemanfaatan Sludge LimbahKertasUntukPembuatanKomposDenganMetode Windrow and Cina". JurnalTeknikIndustriPertanian. 15 (2) : p. 67 – 71 .
17. Chen, H. J., Chang, H. J., Fan, C., Chen, W. H. and Lee, M. S. 2011, Screening, isolation and characterization of cellulose biotransformation bacteria from specific soils . j.International Conference on Environment and Industrial Innovation. 12: 216 – 220 .
18. Chung-Yi, W., Yi-Ru, H., Chang-Chai, N., Helen, C., Hsin-Tang, L., Wen-Sheng, T. and Yuan-Tay, S. 2009, Purification and characterization of a novel halostablecellulase from *Salinivibrio sp.* strain NTU-05. J. Enzyme and Microbial Technology, 44 : 373–379 .
١٩. الراوي ، ظافر فخري عبد القادر (٢٠٠٤) عزل وتشخيص البكتريا المحللة للسليلوز ودراسة بعض الخصائص الانزيمية ، اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الانبار .
20. Rawat, R. and Tewari, L. 2012, Purification and characterization of an acidothermophiliccellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3 . J. Extremophiles , 16:637–644 .
21. Shanmugapriya, K., Saravana, P. S., Krishnapriya, Manoharan, M., Mythili, A. and Joseph, S. 2012, Isolation, screening and partial purification of cellulase from cellulase producing bacteria. Int. J. Adv. Biotech. and Res. 3 (1) : 509 – 514 .
22. Chen, Po – Jui, Tao – Chun, W. Yao – Tsung, C. and Liang – Ping, L. 2004, Purification and characterization of carboxymethyl cellulose from *Sinorhizobiumfredii* . Bot. Bull. Acad. 45: 111 – 118.
23. Muranova, T. A., Krasovskaya, L. A., Tsfasman , I. M., Stepnaya, O. A., and Kulaev, I. S. 2004, Structural investigations and identification of the extracellular bacteriolyticendopeptidase L1 from *Lysobacter sp.* XL1. J.Biochemistry (Mosc) 69(5): 501 – 5.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :72-79

Extraction and Purification of Cellulase form *Sphingomonas paucimobilis* Isolated from deciduous trees leaves

Ali A. Abed **Ahmed M. Turky** **Mohammed A. Abid**

E.mail: Aligenetic82@yahoo.com

Abstract:-

Total of 15 bacterial isolates from cellulose degrading bacteria were obtained from deciduous trees leaves, these isolates varied in their ability to degrade cellulose, results of diagnosis of most efficient isolate was prove that it belong to *Sphingomonas pucimobili*. The results of enzyme purification produced from this bacteria using modified medium which extracted by Amicon Ultrafiltration showed that enzyme activity was 1.16 U/mg of protein and the saturation value with ammonium sulphate was 0-40% with enzyme accumulation 9.47% in total purification number of 2.46, in ion exchange chromatography the results of enzyme accumulation reached 11.92% and total purification number was 5.80 while the accumulation value was 8.63% and total purification number was 12.9 when gel filtration was used. The molecular weight of extracted and purified cellulase enzyme was 41 kDa calculated by poly acrylamide gel electrophoresis.