تحديد الظروف المثلى لانتاج نزيم الاكاريز من العزلة المحلية *Bacillus* sp. H12

هالة مشعل علي غازي منعم عزيز

جامعة بغداد، كلية العلوم، قسم التقنيات الإحيائية

الاستلام 2010/1/10 القبول 2/3/ 2010

الخلاصة

تم الحصول على 27 عزلة من البكتريا العائدة إلى جنس *Bacillus* sp. المعزولة من التربة، وأختبرت قابليتها على إنتاج انزيم الاكاريز بإستعمال الوسط الانتاجي الصلب، وتميزت 14 عزلة بقابليتها المختلفة على انتاج الانزيم وذلك بتكوينها هالة شفافة حول المستعمرة البكتيرية بعد تغطية الطبق بمحلول اليود (كاشف لوكال) إذ تراوحت أقطار هالة التحلل بين 1.08-1.11 سم. أنتخبت العزلة المحلية *Bacillus* sp. H12 كونها أعطت أعلى فعالية نوعية 11.73 وحدة/ملغم بروتين بإستعمال المزارع المغمورة. حددت الظروف المثلى لإنتاج الانزيم بطريقة المزارع المغمورة للعزلة المحلية *Bacillus* sp. H12 بإستعمال الاكاروز مصدراً كربونياً 0.3%، وخلاصة اللحم البقري 0.5% والببتون 0.5% مصدراً نيتروجينياً، وكلوريد الصوديوم بتركيز 0.5%، ولقح الوسط الانتاجي بعدد خلايا1 ×10^8 خلية/مليلتر عند رقم هيدروجيني ابتدائي مقداره 7 بعد 24 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 37°م في الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

DETERMINATION OF THE OPTIMUM CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF AGARASE FROM LOCAL ISOLATE *BACILLUS* SP. H12

Hala M. Ali* **Ghazi M. Aziz**

Department of Biotechnology , College of Science, University of Baghdad

Received 10/1/2010 Accepted 2 /3 / 2010

ABSTRACT

Twenty seven bacterial local isolates of *Bacillus* sp. were obtained from soil samples. The isolates were tested for agarase production on solid media; fourteen isolates were able to develop clear zone around the bacterial growth after floating the plates with iodine reagent (Lugol´s solution), with clear zone diameter between (1.08-1.11cm). There were further treated in submerged culture which led to selection of *Bacillus* sp. H12, since it was the most efficient that gave higher specific activity of agarase 11.73 unit/mg protein. The optimum conditions for agarase production using submerged cultures were 0.3% agarose as carbon source, 0.5% beef extract and peptone as nitrogen sources, 0.5% sodium chloride, at initial pH 8 and inoculum size 1×10^8cell/ml at 37˚C for 24 hrs using shaker incubator at 150 rpm.

Key words: Agarase production, *Bacillus* sp.

---

* **To whom correspondence should be addressed (E-mail: Hala_biotech@yahoo.com).**

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المقدمة

يقع انزيم الاكاريز من ضمن انزيمات Glycoside hydrolase، وهي مجموعة من الانزيمات التي تقوم بتحليل الآواصر التي تربط جزيئتان من الكربوهيدرات (1). ويقوم الاكاريز بتحليل الاكار مائياً عن طريق مهاجمة الآصرة الكلايكوسايدية التي تربط جزيئات الكالاكتوز الداخلة بتركيب الاكاروز لينتج أنواعاً مختلفة من السكريات القليلة Oligosaccharide (2). سمي انزيم الاكاريزAgarose-4-glycanohydrolase تبعاً للجنة الانزيمات التابعة للاتحاد الدولي للكيميائيين الحياتيين ورقمه التصنيفي هو EC3.2.1.X.

يفرز انزيم الاكاريز من أجناس مختلفة من البكتيريا ومنها البكتيريا الخيطية Actinomycetes، والرخوياتMolluscs(3). لقد تمكنStanier (4) من عزل بكتيريا محللة للاكار من سواحل النرويج وشخصها على أنها *Bacillus gelaticus* ووجد بأنها تقوم بتحليل الآكار إلى سكر وتنمو بصورة جيدة على الأوساط المحتوية على3% كلوريد الصوديوم والتي يكون فيها الآكار المصدر الوحيد للكربون والطاقة وأوضح ان الانزيم المسؤول على تحلل الاكارمن النوع المفرز خارج الخلوي، فضلاً عن ذلك إكتشافه إختبار تفاعل اليود الذي يعد اختباراً مؤكداً لتحلل الاكار وكذلك تمكن Bibb *et al.* (5) و Suzuki *et al.* (6) من عزل بكتيريا *Streptomyces* و*Bacillus* sp. من التربة والتي أثبتت قدرتها على إنتاج انزيم الاكاريز. وعزلت كذلك مجموعة من البكتيريا المسؤولة عن تحلل الاكار شملت الأجناس البكتيرية الآتية:

Pseudomonas و Cytophaga و *Altermonas* و *Alterococcus* و *Microscilla* و *Vibrio* و *Pseudoaltermonas* و *Reichenbachia* و *Zobellia* و *Microbulbifer* و *Thalassomonas* و *Agarivorans* الموجودة في البيئات البحرية بصورة طبيعية لوجود الآكار المنتج من الطحالب الحمر البحرية الذي تستهلكه مصدراً للطاقة والكربون (7،8،9،10). ولقلة الدراسات المحلية حول هذا الانزيم والأحياء المجهرية المنتجة له فقد هدف البحث الى الحصول على عزلة محلية من بكتيريا *Bacillus* sp. كفؤة في انتاج الاكاريز وتحديد الظروف المثلى لأنتاجه.

المواد وطرائق العمل

إختبار العزلات البكتيرية على إنتاج الاكاريز

تم الحصول على سبعة وعشرين عزلة عائدة لجنس *Bacillus* sp. من جامعة بغداد، كلية العلوم، قسم التقنيات الاحيائية. وتم التحري عن قابلية هذه العزلات المحلية على إنتاج الاكاريز بتنمية العزلات على الوسط الانتاجي المحضر على وفق الطريقة المذكورة من قبل Suzuki *et al.*(6) بإستعمال محلول اليود وذلك عن طريق تغطية الطبق بعد التنمية عند 37ْم لمدة 72 ساعة بمحلول اليود وحددت قدرة العزلات على تحليل الآكار بحساب النسبة بين قطر منطقة التحلل (الهالة المتكونة) وقطر النمو البكتيري.

أختبرت أيضاً كفاءة العزلات على انتاج الاكاريز بإستعمال الوسط الانتاجي السائل المحضرمن قبل Suzuki *et al.*(6) والذي تم تحويره بإضافة الآكار بنسبة 0.3% بدلاً من 1.5%.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تقدير فعالية انزيم الاكاريز

قدرت فعالية إزيم الاكاريز بالاعتماد على المنحنى القياسي للكالاكتوز وفق الطريقة الموصوفة من قبل Suzuki *et al.*(6) بحساب السكريات المختزلة المتحررة بفعل الانزيم. أما طريقة تقدير البروتين فقد قدرت وفق الطريقة الموصوفة من قبل Bradford (11).

تحديد نوع مادة التفاعل وتركيزها الامثل لعمل الاكاريز

حضرت محاليل الاكار (محلول التفاعل) بتراكيز مختلفة هي 0.5، 0.8، 1% والاكاروز (محلول التفاعل) بتراكيز مختلفة هي 0.1، 0.3، 0.5، 0.7، 1% بإذابتها في محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.1 مولر ذي الرقم الهيدروجيني 7 وقدرت الفعالية الانزيمية في كل محلول من المحاليل أعلاه لتحديد مادة التفاعل وتركيزها الأمثل لعمل الانزيم.

تحديد الظروف البيئية المثلى لانتاج الاكاريز

تعيين المصدر الكربوني الأمثل لانتاج الاكاريز

لأجل تعيين المصدر الكربوني الأمثل لانتاج الاكاريز تم تحضير الوسط الغذائي المحتوي على مصادر كربونية مختلفة شملت الفركتوز و الاكار و المالتوز و الاكاروز و الاكاروز ذو الانصهار الواطئ و السكروز والكلوكوز بتركيز 0.3% وضبط الرقم الهيدروجيني بمقدار 7 ووزع الوسط بواقع 50 مليلتر في دوارق بحجم 250مليلتر. لقحت الدوارق بالبكتيريا *Bacillus* sp. H12 بتركيز 1×10^{8} خلية/مليلتر وحضنت في درجة حرارة 37°م بالحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة لمدة 24 ساعة. نبذت المزارع بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة لفصل الكتلة الحيوية للبكتيريا والحصول على المستخلص الخام للانزيم لأجل تقدير الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين تبعاً للطرائق الموصوفة في Suzuki *et al.* (6) وBradford (11)، فضلاً عن ذلك تم تعيين التركيز الأمثل للمصدر الكربوني المنتخب بإضافته إلى الوسط وبتراكيز مختلفة هي 0، 0.1، 0.3، 0.5، 1.0، 2.0% واتباع كافة الظروف والخطوات السابقة في الحضن وتقدير الفعالية الانزيمية وحساب تركيز البروتين.

تعيين المصدر النيتروجيني الأمثل لانتاج الاكاريز

درس تأثير تركيز 0.5% من الببتون وتراكيز مختلفة (0، 0.25، 0.5، 0.75، 1%) من خلاصة اللحم البقري للوسط الانتاجي وذلك بمزج تراكيز مختلفة من هذين المصدرين النيتروجينين لتعيين تركيز المصدر النيتروجيني الأمثل لانتاج الاكاريز من البكتيريا *Bacillus* sp. H12 .

تعيين الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لانتاج الاكاريز

حضر الوسط الانتاجي للاكاريز بأرقام هيدروجينية مختلفة هي 4، 5، 6، 7، 8، 9 لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لانتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12 .

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تعيين درجة الحرارة المثلى لانتاج الاكاريز

حضن الوسط الانتاجي للاكاريز في درجات حرارية مختلفة هي 30، 37، 40، 45، 50°م لتحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12.

تحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج الاكاريز

تم متابعة انتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12 بمدد زمنية مختلفة هي 24، 48، 72، 96 ساعة بعد تلقيح الوسط الانتاجي بالبكتيريا لتحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12.

النتائج والمناقشة

قابلية العزلات المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. على انتاج الاكاريز في الوسط الصلب

أخضعت عزلات بكتيريا *Bacillus* sp. المحلية جميعها إلى فحص قدرتها على إنتاج الاكاريز بتنميتها على الوسط الصلب لانتاج الاكاريز وتميزت العزلات H1، H2، H3، H5، H6، H12 ، H15 ، H16 ، H18 ، H21 ، H22 ، H25 ، H26 ، H27 بانتاجها للانزيم وتراوحت النسبة بين قطر منطقة التحلل (قطر الهالة الشفافة clear zone) وقطر النمو البكتيري bacterial growth بين 1.06 - 2.0 سم، وتميزت العزلة H12 بأعلى نسبة تحلل مقدارها 2.0 (جدول1 وشكل1).

جدول(1): الغربلة شبة الكمية لعزلات بكتيريا *Bacillus* sp. المحلية المنتجة للاكاريز

رمز العزلة	النسبة Z/G	رمز العزلة	النسبة Z/G
Bacillus sp. H1	1.06	*Bacillus* sp.H15	1.2
Bacillus sp.H2	1.1	*Bacillus* sp.H16	1.3
Bacillus sp.H3	1.13	*Bacillus* sp.H17	0
Bacillus sp. H4	0	*Bacillus* sp.H18	1.33
Bacillus sp. H5	1.11	*Bacillus* sp.H19	0
Bacillus sp. H6	1.09	*Bacillus* sp.H20	0
Bacillus sp.H7	0	*Bacillus* sp.H21	1.2
Bacillus sp.H8	0	*Bacillus* sp.H22	1.16
Bacillus sp.H9	0	*Bacillus* sp.H23	0
Bacillus sp.H10	0	*Bacillus* sp.H24	0
Bacillus sp.H11	0	*Bacillus* sp.H25	1.3
Bacillus sp.H12	2.0	*Bacillus* sp.H26	1.11
Bacillus sp.H13	0	*Bacillus* sp.H27	1.08
Bacillus sp.H14	0		

Z : قطر منطقة التحلل (الهالة المتكونة، سنتمتر).

G : قطر النمو البكتيري .

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

شكل(1): قدرة العزلة البكتيرية *Bacillus* sp.H12 على تحليل الآكار وتكوينها الهالة الشفافة حول المستعمرة البكتيرية بعد التنمية عند 37°م لمدة 27 ساعة.

أتصفت الطريقة المتبعة في غربلة هذه العزلات بالسرعة والكفاءة في تحديد العزلات الكفؤة بانتاج الانزيم والاستدلال عليه عن طريق متابعة تحلل الآكار في الوسط الصلب بعد تصبيغه بمحلول اليود(كاشف لوكال) لمدة 5 دقائق لاظهار المنطقة الشفافة التي تميزت كونها شفافة قياساً بإجزاء الطبق الآخرى التي تلونت باللون الأزرق الداكن. ظهور الهالة الشفافة حول المستعمرة البكتيرية دلالة على انتاج الاكاريز وتحليل الاكار وهذا ما أشارت إليه العديد من المصادر في إمكانية إستعمال هذه الطريقة في الاستدلال على إنتاج الانزيم وإن إستعمال كاشف لوكال مع الاكار يعد مؤشراً لعزل البكتيريا المحللة للاكار(8،12). كما أستعمل بخار اليود للكشف عن مناطق التحلل للاكار حول المستعمرات البكتيرية (13).

إختيار العزلة الأكفأ في إنتاج الاكاريز في المزارع المغمورة

أختبرت قدرة أربعة عشر عزلة محلية والتي حللت الاكار على الوسط الصلب في إنتاج الاكاريز في المزارع المغمورة لتحديد العزلة الأكفأ في الانتاج وتشير النتائج المبينة في الجدول(2) إن العزلة *Bacillus* sp. H12 قد حافظت على إنتاجها العالي للاكاريز، إذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم المنتج من هذه العزلة 11.73 وحدة/ملغم بروتين مقارنة بالفعالية النوعية لبقية العزلات والتي كانت بين 1.12-9.92 وحدة/ملغم بروتين.

تعد طريقة قياس فعالية الاكاريز إعتماداً على قابليتها التحليلية للاكارمن أكثر الطرائق إستعمالاً لتحديد فعالية هذا الانزيم في راشح المزروعة البكتيرية والتي تعتمد على تقدير كمية السكريات المختزلة المتحررة كالكالاكتوز بعد تحلل الآكار بفعل أنزيم الاكاريز والكشف عنها بإستعمال كاشف DNSA Dinitrosalicyclic acid 3,5 (6،8). أعتمدت كذلك هذه الطريقة في تقدير كمية السكريات المختزلة المتحررة من التحلل المائي للآكار وبإستعمال كاشف DNSA. إذ أعتمدت شدة اللون فيها على كمية السكريات المختزلة المتحررة وبوجود منحنى قياسي للـــ D-galactose وعرفت الفعالية الانزيمية بأنها كمية الانزيم التي تحرر 1 مايكرومول من السكريات المختزلة المتمثلة بالكالاكتوز بالدقيقة الواحدة عند ظروف التقدير (13،14). لقد لوحظ انتاج لانزيم

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

α-neoagarooligosaccharide من بكتيريا *Bacillus* sp. MKO3 بفعالية نوعية بلغت 0.45 وحدة/ملغم بروتين(15).

جدول(2): قابلية العزلات المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. على إنتاج الاكاريز بإستعمال الوسط الانتاجي عند رقم هيدروجيني7 بعد24 ساعة من الحضن وبدرجة حرارة37ْم.

رمز العزلة	الفعاليةالنوعية(وحدة/ملغم بروتين)
Bacillus sp. H1	2.25
Bacillus sp.H2	4.51
Bacillus sp.H3	8.46
Bacillus sp. H5	3.74
Bacillus sp. H6	4.96
Bacillus sp.H12	11.73
Bacillus sp.H15	8.72
Bacillus sp.H16	2.25
Bacillus sp.H18	1.12
Bacillus sp.H21	2.50
Bacillus sp.H22	5.35
Bacillus sp.H25	9.02
Bacillus sp.H26	6.24
Bacillus sp.H27	9.92

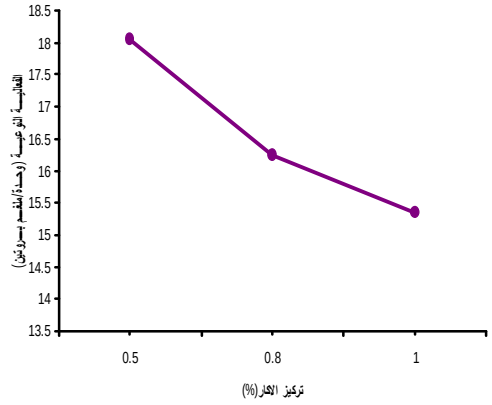
بينما وجد Suzuki *et al.* (6) إن الاكاريز المنتج من بكتيريا *Bacillus* sp. MKO3 بفعالية نوعية بلغت 0.11 وحدة/ملغم بروتين ووجد Kim *et al.* (3) ان الفعالية النوعية للاكاريز المنتج من بكتيريا *Bacillus cereus* ASK202 بلغت 120 وحدة/ملغم بروتين. لاحظ Dong *et al.* (16) إنخفاض في قيم الفعالية النوعية للاكاريز المنتج من بكتيريا *Vibrio* sp. PO303 لذلك تم كلونة الجين من هذه البكتيريا في بكتيريا *E. coli* إذ أرتفعت الفعالية النوعية إلى 63.6 وحدة/ملغم بروتين.

تحديد نوع ومادة التفاعل وتركيزها الأمثل لعمل الاكاريز

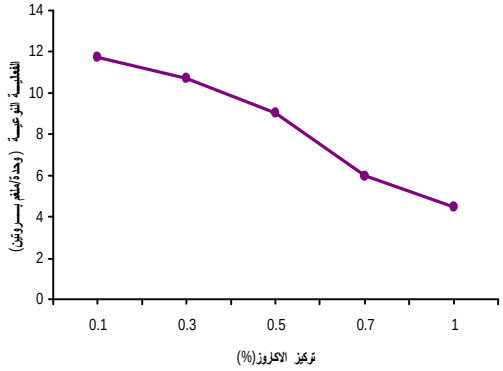
أستعمل كل من الآكار والاكاروز كمادتي تفاعل وبتراكيز مختلفة وأظهرت النتائج ميل الانزيم للتفاعل مع الاكار عند تركيز 0.5% اذ بلغت الفعالية النوعية 18.05 وحدة/ملغم بروتين (الشكل 2) بينما لوحظ إنخفاض في قيم الفعالية النوعية للاكاريز عند إستعمال الاكاروز كمادة تفاعل إذ بلغت الفعالية النوعية 9.02 وحدة/ملغم بروتين عند تركيز 0.5 % (شكل 3). جاءت هذه النتيجة مطابقة لما ذكره Morrice *et al.* (15) حول انزيم الاكاريز الذي يمتلك تخصصاً عالياً تجاه آواصر B-D-galactosidic linkage التي تربط الوحدات

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3,6-anhydro-L-galactose مع D-galactose المكونة للاكار وإن إستبدال هذه الوحدات مع مجاميع المثيل أو الكبريت يسبب اعاقة لعمل الانزيم، ولا يتمكن الانزيم من تحليل الآواصر القريبة منها لذلك تقل فعالية الانزيم تجاه المواد المحتوية عليها مثل الاكاروز ذو الانصهار الواطئ. أما بالنسبة للاكاروز فعند استبدال بعض وحداته مع مجاميع المثيل أو الكبريت يكون أقل ملائمة من الاكاروز ذي الانصهار الواطئ كمادة تفاعل للانزيم (18).



شكل(2): تأثير تراكيزمختلفة من الاكار في فعالية الاكاريزالمنتج من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12 المنماة في درجة حرارة 37 ْ م وبرقم هيدروجيني 7 لمدة 24 ساعة.



شكل(3): تأثير تراكيزمختلفة من الاكاروز في فعالية الاكاريزالمنتج من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp.H12 المنماة في درجة حرارة 37 ْ م وبرقم هيدروجيني 7 لمدة 24 ساعة.

تعيين الظروف البيئية المثلى لانتاج الانزيم

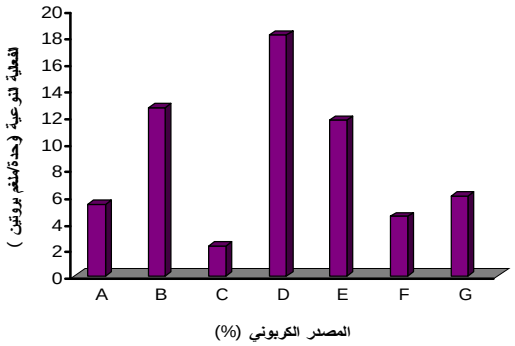
تحديد المصدر الكربوني الامثل لانتاج الانزيم

أستعملت سبعة مصادر كربونية لدراسة تأثيرها في إنتاج الاكاريز وبتركيز 0.3% وأظهرت النتائج أن إحتواء وسط الانتاج على المصدر الكربوني الاكاروز هو الأفضل في انتاج الانزيم من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12، إذ بلغت الفعالية النوعية 18.14 وحدة/ملغم بروتين بوجود الاكاروزمصدراً وحيداً

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

للكربون(شكل4). يعتمد إفراز الاكاريز على وجود مادة تعمل على حث إنتاج الانزيم ويعد الاكاروز من المواد الحاثة لانتاجه وهذه النتيجة جاءت مشابه لما ذكره Suzuki *et al.*(15). إن أفضل مصدر كربوني لانتاج انزيم α-neoagarooligosaccharide hydrolase (α-NAOS) من بكتيريا *Bacillus* sp. MKO3 كان neoagarobiose وبتركيز 0.1%. أجريت دراسة حول إنتاج الاكاريز من بكتيريا *Agarivorans* sp.JAMB-A11 إن إضافة الآكار وبتركيز 0.15% هو الأفضل لانتاج الانزيم من تلك البكتيريا (19).

يؤدي وجود المصادر الكربونية السهلة الاستعمال مثل الكلوكوز والكالاكتوز يؤدي الى كبح الجينات المسؤولة عن انتاج الانزيم في آلية الكبح بمواد الهدم Catabolic Repression (20).

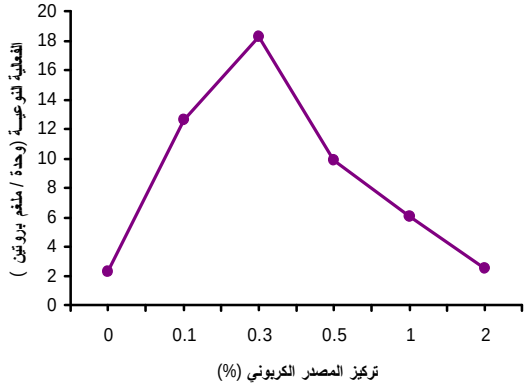


شكل(4): تأثيرمصادر كربونية مختلفة في انتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريـــا *Bacillus* sp.H12 وبتركيز0.3%. المنماة في درجة حرارة 37 °م وبرقم هيدروجيني 7 لمدة 24 ساعة.

A:fructose B:agar C:maltose D:agarose
E:low melting agarose F:sucrose G:glucose

أضيف الاكاروز إلى الوسط الانتاجي بتراكيز مختلفة بوصفه مصدراً كربونياً لانتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12 ولوحظ ان أفضل تركيز للاكاروز كان 0.3% اذ بلغت الفعالية النوعية 18.29 وحدة/ملغم بروتين(شكل 5)، ويعود انخفاض انتاجية الانزيم عند التراكيز العالية من الاكاروزالى عدم ملائمة هذه التراكيز لنمو البكتيريا وتحفيزها على انتاج الانزيم مع انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط الأنتاجي في مدة التخمير(21).

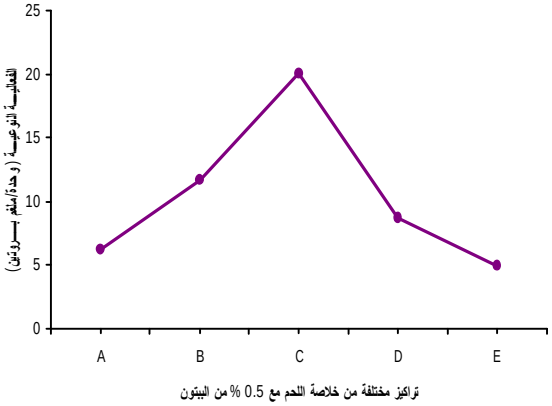
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شكل(5): تأثيرتراكيزمختلفة من الاكاروز في إنتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp.H12 المنماة في درجة حرارة 37°م رقم هيدروجيني 7 لمدة 24 ساعة.

تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لانتاج الانزيم

لأجل تحديد التركيز الأمثل للمصدر النيتروجيني (الببتون وخلاصة اللحم البقري) أضيفت الى الوسط الانتاجي بمزج تراكيز مختلفة من خلاصة اللحم البقري مع 0.5% من الببتون بوصفهما مصدراً وحيداً للنيتروجين لانتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12 ولوحظ إن أفضل تركيز لهذين المصدرين النيتروجينيين (الببتون وخلاصة اللحم البقري) عند إستعمال تركيز0.5% من الببتون وتركيز0.5% من خلاصة اللحم البقري عند مزجهما سوياً اذ بلغت الفعالية النوعية 20.05 وحدة /ملغم بروتين (شكل6).



شكل(6): تأثير تراكيزمختلفة من خلاصة اللحم البقري(0-1.0) مع 0.5% من الببتون لتحديد التركيز الأمثل لانتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus sp*.H12. المنماة في درجة حرارة 37°م رقم هيدروجيني 7 ولمدة 24 ساعة.

A : 0 % من مستخلص اللحم البقري مع 0.5 %من الببتون B :0.25% من مستخلص اللحم البقري مع 0.5 %من الببتون

C : 0.5 % من مستخلص اللحم البقري مع 0.5 %من الببتون D : 0.75%من مستخلص اللحم البقري مع 0.5%من الببتون

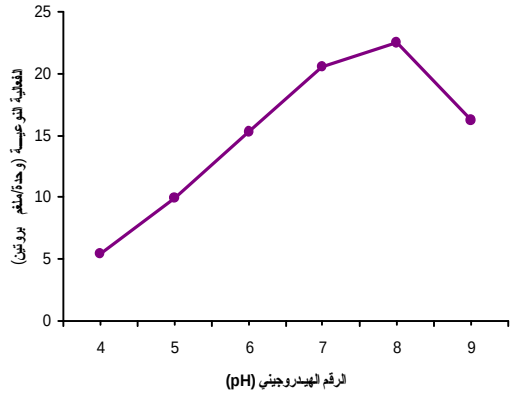
E : 1.0% من مستخلص اللحم البقري مع 0.5%من الببتون

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

لوحظ إن إستعمال مصادر النيتروجين العضوية مثل الببتون وخلاصة الخميرة وخلاصة اللحم البقري تعد الأفضل في إنتاج الانزيمات لانها تحافظ على ثبات المكونات الموجودة في الوسط الانتاجي(22). وأستعمل مزيج من الببتون بتركيز 0.5% وخلاصة اللحم البقري بتركيز 0.25% لانتاج الاكاريز من بكتيريا MKO3. *Bacillus* sp.(15) وبكتيريا *Vibrio* sp. AP-2(23). أستعمل كذلك مزيج من الببتون وبتركيز 0.5% ومستخلص الخميرة وبتركيز 0.5% لانتاج الانزيم من بكتيريا *Vibrio* sp. Strain JT0107(24) ومن بكتيريا *Vibrio* sp. PO-303(16). وأستعمل مزيج من نترات الامونيوم بتركيز 0.25% ومتحلل الكازائين بتركيز 0.5% ومستخلص الخميرة بتركيز 0.5% في وسط إنتاج الانزيم من بكتيريا *Alteromonase agarolyticus* GJIB (25).

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لانتاج الانزيم

أختبرت قابلية العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12 في إنتاج الاكاريز باستعمال الوسط الانتاجي بأرقام هيدروجينية مختلفة وأظهرت النتائج إن أفضل رقم هيدروجيني للانتاج هو 8 إذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم المنتج من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12 22.56 وحدة/ملغم بروتين (شكل7). لقد وجد Suzuki *et al.*(6) إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لانتاج الاكاريز من بكتيريا *Bacillus* sp. MKO3 هو 7.6. فضلاً عن ذلك فقد لاحظ Kim *et al.*(3) ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لانتاج B-agarase من بكتيريا *Bacillus cereus* ASK202 هو 7.8. ان دور الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط الانتاجي للانزيم يعود إلى تأثيره في ذائبية مكونات الوسط الغذائية وجاهزية هذه المكونات للبكتيريا، فضلاً عن تأثيره في تأين وثباتية المركبات الحيوية الناتجة من عمليات التخمير(25).



شكل(7) : تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني لانتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp.H12. المنماة في درجة حرارة 37ْم وبأرقام هيدروجينيه مختلفة لمدة 24 ساعة.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

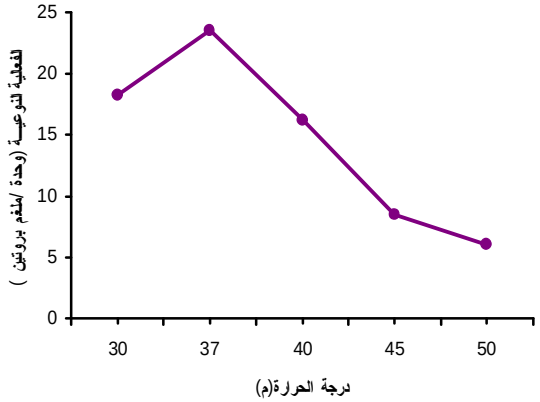
تعيين درجة الحرارة المثلى في انتاجية الانزيم

درس تأثير مديات من درجات الحرارة في إنتاج الاكاريزمن العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12 وبينت النتائج إن درجة الحرارة 37°م هي الأفضل لانتاج الانزيم إذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp.H12 23.56 وحدة/ملغم بروتين (شكل 8).

لوحظ ظهور فعالية انزيمية منخفضة عند الدرجات الحرارية المتطرفة (البعيدة عن 37°م) ، و يعزى ذلك لعدم ملائمة هذه الدرجات لنمو البكتيريا إذ يتباطأ النمو ويتأخر بناء الانزيم نتيجة لانخفاض وإرتفاع درجة الحرارة فضلاً عن دنترة (مسخ) الانزيمات عند إرتفاع درجة الحرارة عن حدودها المثلى.

إن درجة الحرارة لها تأثير مهم في إنتاج الانزيم من الأحياء المجهرية عن طريق تأثيرها في ذائبية الاوكسجين في الوسط الغذائي، وزيادة الطاقة الحركية للجزيئات، وسرعة التفاعلات الانزيمية في الخلية وينعكس ذلك سلباً أو إيجاباً في إنتاج الانزيم (26).

لقد وجد Kim *et al.* (3) إن درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم B- agarase من بكتيريا *Bacillus* sp. ASK202 هي 40°م. بينما وجد Aokie *et al.* (23) إن أفضل درجة حرارة لانتاج الاكاريز من العزلة *Vibrio* sp. AP-2 كانت 25°م. ووجد Ohta *et al.* (19) إن درجة الحراة المثلى لانتاج الانزيم من بكتيريا *Agarivorans* sp. JAMB-A11 هي 32°م بينما كانت درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم من بكتيريا *Alteromonas* sp. E1 هي 30°م (27).



شكل(8): تأثير درجات حرارية مختلفة في انتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp.H12 .المنماة في رقم هيدروجيني 8 لمدة 24 ساعة.

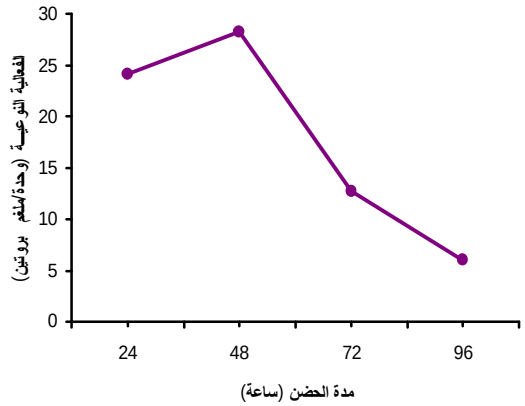
تحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج الانزيم

تم متابعة إنتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp. H12 في درجة الحرارة المثلى(37°م) لمدة زمنية مختلفة. وأظهرت النتائج إن الانزيم قد بدأ انتاجه بعد 24 ساعة من الحضن وإزداد تدريجياً للوصول إلى أعلى إنتاجه بعد 48 ساعة بفعالية نوعية بلغت 28.20 وحدة/ملغم بروتين (شكل9). إنخفضت بعدها

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الانتاجية حتى وصلت أدنى مستوياتها بعد 96 ساعة من الحضن إذ بلغت الفعالية النوعية 6.01 وحدة/ملغم بروتين. يعكس هذا تأثير طبيعة الوسط خلال هذه المدة في الانزيم المنتج أو في نمو البكتيريا والتغييرات الحاصلة عليه من نقص في العناصر الغذائية وتغير الرقم الهيدروجيني ووجود انزيمات آخرى محللة للبروتين (21).

أختلفت الادبيات العلمية في تحديد المدة المثلى لانتاج انزيم الاكاريز من الأحياء المجهرية، فقد حددها كل من Suzuki *et al.* (6) بـــ 48 ساعة لبكتيريا *Bacillus* sp. MKO3 بينما حددها Kim *et al.*(3) بـــ 24 ساعة لبكتيريا *Bacillus* sp. ASK202. وجد أن أفضل انتاج للانزيم يكون بعد 24 ساعة من الحضن من العزلة *Alteromonas* sp. E-1 (27) ومن العزلة *Vibrio* sp. Strain JT0107 (24). بينما أنتج الانزيم بعد 4 أيام من الحضن من العزلة *Vibrio* sp. AP-2 (23).



شكل(9): تطور انتاج الاكاريز من العزلة المحلية لبكتيريا *Bacillus* sp.H12 المنماة في درجة حرارة 37 ْم برقم هيدروجيني 8.

المصادر

1- Shipkowski, S . and Brenchley, J. E.(2005). Characterization of an unusual cold. active B-Glucosidase belonging to family 3 of the glycoside hydrolase from the psychrophilic isolate *Paenibacillus* sp. Strain C7. *Appl. Environ. Microbiol*., 71(8): 4225-4232.

2- Ma, C.; Lu, X.; Shi, C.; Li , J.; Gu , Y.; Ma, Y .; Chu, Y.; Han, F.; Gong, Q. and Yu, W. (2007). Molecular cloning and characterization of a novel B-agarase, AgaB from marine *Pseudoaltermonas* sp. *CY24*, 282(6):3747-3754.

3- Kim, B.J.; Kim, H.J.; Ha, S.D.; Hawang, S.H.; Byun, D.; Lee, T.H. and Kong, J.Y. (1999). Purification and characterization of B-agarase from marine bacterium *Bacilluscereus*ASK202. *Biotechnol. Lett*.**,** 21 :1101-1105.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4- Stanier, R.Y. (1941). Studies on marine agar-digesting bacteria. M.Sc. thesis, University of California at Los Angeles.
5- Bibb, M.J.; Jones, G.H.; Joseph, R.; Butter, M.J. and Ward, J.M.(1987). The agarase gene (dag A) of *Steptomyces coelicolor* A3(2):Affinity purification and characterization of the cloned gene product. *J. Gen. Microbiol*., 133: 2089-2096.
6- Suzuki, H.; Sawai, Y.; Suzuki, T. and Kawai, K.(2003). Purification and characterization of an extracellular B-agaras from *Bacillus* sp. MKO3. *J. Biosci. Bioengin*., 95(4):328-334.
7- Ohta, Y.; Nogi, Y.; Miyazaki, M.; Li, Z.; Hatada, Y.; Itos, S. and Horikoshi, K. (2004). Enzymatic properties and nucleiotide and amino acid sequences of a thermostable beta- agarase from the novel marine isolate, JAMB- A94. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 68(5):1073-1081.
8- Ohta, Y.; Hatada, Y.; Miyazaki, M.; Nogi,Y.; Itos, S. and Horikoshi, K.(2005) . Purification and characterization of a novel alpha-agarase from a *Thalassomonas* sp. *Curr. Microbiol*., 50(4): 212- 216.
9- Jean, W.D.; Shieh, W.Y. and Liu, T.Y.(2006). *Thalassomonas agrivorans* sp. Nov., A marine agarolytic bacterium isolation from shallow coated water of An-Ping Harbour, Taiwan, and emended description of the genus *Thalassomonas*. *Intern. J. Syc. Evol. Microbiol*., 56: 1245-1250.
10- Lee, D.G.; Park, G.T.; Kim, N.Y.; Lee, E.J.; Jang, M. K.; Shin,Y.G.; Park, G . S.; Kim, T.M.; Lee, J.H.; Lee, J.H.; Kim, S.J. and Lee, S.H.(2006). Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 50 B-agarase from a marine *Agarivorans* isolate. *Biotechnol. Lett*., 28: 1925-1932.
11- Bradford, M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using principles of protein–dye binding. *Anal. Biochem*., 72: 248-254.
12- Hosada, A. and Sakai, M.(2006). Isolation of *Asticacaulis* sp.SArad7, a novel agar-degrading alpha *Proteobacterium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 70(3):722-725.
13- Zhang, W. and Sun, L.(2007). Cloning, characterization and molecular application of a beta- agarase gene from *Vibrio* sp. V134. *Appl. Environ. Microbiol*., 73(9) : 2825-2831.
14- Meskiene, R.; Casaite, V.; Macinkeviciene, L.; Bachmatova, I. and Meskys, R . (2003). Cloning analysis of agarase-encoding gene from *Paenibacillus* sp. *Biologia*., 1: 55-57.
15- Suzuki, H.; Sawai, Y.; Suzuki., T. and Kawai, K.(2002). Purification and characterization of an extracellular α-neoagarooligosaccharide hydrolase from *Bacillus* sp. MKO3. *J. Biosci. Bioengin*., 93(5): 456-463.
16- Dong, J., Tamaru; Y. and Araki, T.(2007). Molecular cloning, expression and characterization of a B-agarase gene, agaD, from a marine bacterium *Vibrio* sp. strain PO-303. Biosci. *Biotechnol. Biochem*., 71(1): 38-46.
17- Morrice, L.M.; McLean, M.W.; Williamson, F.B. and Long, W. F.(1983). Beta-agarase I and Π from *Pseudomonas atlantica*. Purification and some properties . *Eur. J. Biochem*., 135: 553-558.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

18- Duckworth, M. and Turvey, J. R.(1969). The action of a bacterial agarase on agarose, Porphyran and alkali-treated porphyran. *Biochem. J.*, 113: 687-692.
19- Ohta, Y.; Hatada, Y.; Ito, S. and Horikoshi, K.(2005). High-level expression of a neoagarobiose–producing beta-agarase gene from *Agarivorans* sp. JAMB-A11 in *Bacillus subtilis* and enzymic properties of the recombinant enzyme. *Biotechnol. Appl. Biochem*., 41: 183-191.
20- Parro, V. and Mellado, R.P.(1994). Effect of glucose on agarase over production by *Streptomyces*. *Gene*., 145: 49-55.
21- Santos, E.D. and Martins, M.L.L.(2003) .Effect of the medium composition on formation amylase by *Bacillus* sp. Brazil. *Arch. Biolo. Technol*., 46 (1):129-134.
22- Aiyer, P.V.D.(2004). Effect of C: N ratio on alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* sp.T27. African. *J. Biotechnol*., 3(10): 519-522
23- Aokie, T.; Araki, T. and Kitamikado, M.(1990). Purification and characterization of a novel beta-agarase from *Vibrio* sp. AP-2. *Eur. J. Biochem*., 187: 461-465.
24- Sugano, Y.; Nagae, H.; Inagak, K.; Yamamoto, T.; Terada, I. and Yamazaki, Y.(1995). Production and characterization of some new B-agarase from marine bacterium, *Vibrio sp*. Strain JT0107. *J. Ferment. Bioeng*., 79(6):549-554.
25- Potin, P.; Richard, C.; Rochas, C. and Kloareg, B.(1993). Purification and characterization of the alpha-agarase from *Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJIB. Eur. *J. Biochem*., 214(2): 599-607.
26- Bull, A.T. and Bushnell, M.E.(1976). Environmental controls of fungal growth. In: The filamentous fungi (eds. J. E. Smith and D. R. Berry).Vol. 2, pp.1-26
27- Kirimura, K.; Masuda, N.; Lwasaki, Y.; Nakagawa, H.; Kobayashi, R. and Usami, S.(1999). Purification and characterization of a novel B-agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1. *J. Biosci. Bioeng*., 87(4): 346-441.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com