جامعة الفيوم
كلية الزراعة

قسم الميكروبيولوجيا الزراعية

البحث الخامس	منشور (مشترك)	Journal of Extremophiles	Impact Factor: 2.306

عنوان البحث والمجلة:

Purification and characterization of halo-alkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt. Extremophiles (2015) 19:763–774

تنقية وتوصيف إنزيم البروتييز المحب للملوحة والقلوية والحرارة المعزول من نوع جديد من البكتيريا المحبة للملوحة *Halobacterium* sp. والتى عزلت من الملح الخام من بحيرة قارون بجمهورية مصر العربية.

Khaled Elbanna[1,2], Ibrahim M. Ibrahim[1], Anne-Marie Revol-Junelles[3]

[1] Department of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Fayoum University, Fayoum, Egypt.
[2] Department of Biology, Faculty of Applied Sciences, Umm Al-Qura University, Makkah, Kingdom of Saudi Arabia.
[3] Institut National Polytechnique de Lorraine (ENSAIA-INPL), 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

الملخص العربى:

تضمنت هذه الدراسة نقطتين بحثيتين كما يلى:
النقطة البحثية الأولى: عزل وتصنيف البكتيريا المحبة للملوحة والمنتجة لإنزيمات البروتييز ذات الخصائص الغير عادية.
النقطة البحثية الثانية: فصل و تنقية إنزيم البروتييز ذات الخصائص الغير عادية كإنزيم محب للملوحة ومحب للقلوية ومحب للحرارة.

- **ففى النقطة البحثية الأولى**، تم عزل وتصنيف البكتيريا المحبة للملوحة ذات الخصائص الغير عادية والمنتجة للبروتييز ذات الخصائص الغير عادية من عينات الملح الخام بإستخدام بيئة متخصصة تحتوى على 25% NaCl والمدعمة بالكازين كمصدر محفز لإنتاج البروتييز وقياس قطر الهالة الرائقة بعد فترة التحضين المناسبة على درجة الحرارة المناسبة. وبعد العزل والتنقية تم إختبارقدرة جميع العزلات على النمو على مستويات ملوحة مختلفة ودرجة حرارة ومدى مختلف من الـ pH لتحديد أفضل ظروف نمو لها. وتم إختيار أفضل العزلات وتعريفها تعريفا كاملا بتحديد تتابعات القواعد الوراثية لجين 16s rRNA الى جانب الخصائص المورفولوجية والفسيولوجية بإستخدام API kits مع تعديل البيئة لتناسب نمو هذه البكتيريا بإضافة 25% ملح الى البيئة المستخدمة.

وأسفرت هذه الدراسة إلى النتائج التالية:

- تم الحصول على 33 عزلة محبة للملوحة منتجة للبروتييز ووجد أنها تستطيع أن تنمو حتى تركيز ملح 30% NaCl ، واشارت نتائج تحديد التتابعات الوراثية لجين 16s rRNA الى أن العزلة HP25 كنوع جديد ينتمى إلى جنس *Halobacterium* بنسبة تشابه 97% و سميت كـ *Halobacterium* sp. وسجلت فى بنك الجينات تحت رقم
Genbank database under accession number: KJ011554.

- **النقطة البحثية الثانية:**

وفيها تم تنقية إنزيم البروتييز المحب للملوحة ذات الخصائص الغير عادية من هذه العزلة الواعدة ، وقبل إنتاج و تنقية الإنزيم تم دراسة أفضل الظروف لنمو الميكروب وإنتاج الإنزيم ، ثم تنميتها فى مخمر سعة ٢ لتر مع إستخدام بيئة متخصصة مدعمة بالكازين كمحفز لإنتاج البروتييز والتحضين تحت أفضل ظروف نمو وإنتاج الإنزيم. ثم حصاد الراشح بالطرد المركزى وإجراء تركيزة بجهاز أميكون Amicon ثم بالإثانول البارد ثم إجراء تنقية الإنزيم بواسطة Gel filtration (Superdex 200HR). تلى ذلك دراسة الخصائص المختلفة لإنزيم البروتييز الغير عادى من حيث تحديد أفضل تركيز ملحى يعمل فيه الإنزيم وكذلك

تحديد أفضل pH وأفضل درجة حرارة وتحديد الـــ Km value و أقصى سرعة للتفاعل Vmax.

وأسفرت نتائج هذه الدراسة الى ما يلى:

- أن أفضل ظروف لنمو العزلة المختارة (*Halobacterium* sp.) وإنتاج البروتييز منها كان عند NaCl 25% و pH 7.2 بعد فترة تخمير ٤ أيام على درجة حرارة $40^{o}C$.

وبدراسة خصائص هذا الإنزيم تم الحصول على النتائج الأتية:

- ان الإنزيم النقى اظهر وزن جزيئى 21 KD ، واظهر نشاط نوعى Specific activity حوالى 6350 U/ mg، كما أظهر نشاط فى مدى واسع من التركيز الملحى مابين 5-25% بنشاط أمثل عند 17% ملح NaCl ، رقم الحموضة pH 6-11 بنشاط أمثل عند pH 8.0 ، وأظهر نشاط فى مدى واسع من الحرارة مابين $30\text{-}60^{o}C$ بنشاط أمثل عند $60^{o}C$. هذا بالإضافة إلى أن قيمة الـــ K_m كانت 523 µg/ ml وأن أقصى سرعة للتفاعل Vmax كانت عند 2500 mg/min/ml.

- وبدراسة العوامل المؤثرة على درجة ثبات الإنزيم كالمذيبات ومنظفات الغسيل المختلفة وكذلك المثبطات المختلفة تبين ان هذا البروتييز أظهر درجة عالية من الثبات مع المذيبات كالإيثانول والميثانول والبروبانول والهكسان ، كما اظهر درجة ثبات عالية مع مساحيق الغسيل كالبرسيل والإيريل.

خلاصة هذه الدراسة: أن هذه الدراسة تعتبر من أولى الدراسات التى أجريت على بحيرة قارون والتى تم فيها فصل وتنقية إنزيم البروتييز ذات الخصائص الغير عادية كإنزيم محب للملوحة والقلوية ومحب للحرارة وثباته العالى فى المذيبات والمنظفات والذى تم إنتاجة من بكتيريا غير عادية فى خصائصها، يمكن من إستخدامة فى العديد من التطبيقات الهامة كتسوية الأسماك المملحة وبالتالى منع التسممات الناجمة عن الطرق التقليدية ، بالإضافة إلى إمكانية تطبيقة على نطاق واسع بإضافته إلى المنظفات ومساحيق الغسيل.