إنتاج إنزيم البروتييزالقلوي والمحب للملوحة من سلالة محبة للملوحة وعرفت ك

Halobacterium salinarum

رسالة مقدمة من

إبراهيم محمد إبراهيم إبراهيم

بكالوريوس العلوم الزراعية (علوم وتكنولوجيا الأغذية) - كلية الزراعة - جامعة الفيوم - 2008

للحصول على

درجة الماجستير

في العلوم الزراعية

(الميكروبيولوجيا الزراعية)

قسم الميكروبيولوجيا الزراعية

كلية الزراعة, جامعة الفيوم,

جمهورية مصر العربية

2012

الملخص العربى

تتضمن هذة الرسالة 6 نقاط بحثية كما يلي:

1- النقطة البحثية الاولي

إجريت بغرض عزل وحصر الميكروبات المحبة للملوحة (بدرجات متفاوتة) والمنتجة لإنزيم البروتييز Proteases, حيث جمعت عشرة عينات من الملح الصلب والطمي الملحي ومحاليل ملحية من أحواض التجفيف الشمسي لشركة إميسال علي بحيرة قارون بمحافظة الفيوم بجمهورية مصر العربية. ثم تم تلقيح العينات الصلبه منها والسائله في بيئة ال S-G المدعمة 2,5 % لبن فرز بودرة وكذلك 5 او 10, 15, 25 % ملح كلوريد الصوديوم وذلك لزياده اعداد الميكروبات المحبه للملوحه والمنتجه لإنزيم البروتييز Proteases وتم العزل بإستخدام أيضا بيئة الS-G Medium ودعمت بتركيزات ملح مختلفة 5 و 10 و 15 و 25 %وكذلك دعمت 2,5 % لبن فرز (Skim milk)

وأسفرت النتائج عن عزل 33 عزلة علي الدرجات الملحية المختلفة ومنتجة لإنزيم البروتييز. ثم تم دراسة ال33 عزلة جزئيا من حيث خصائصها الموفولوجية والفسيولوجية. وبناءا علي النمو علي تركيزات ملح مختلفة قسمت العزلات الي أربع مجاميع (G(I) ينمو علي تركيز 25 % ملح (9عزلات) و(II) G علي تركيز 15 % (6 عزلات) و(III) G علي تركيز 10 % (9 عزلات) و(IV) G علي تركيز 5 % (9 عزلات)) وكان من بين هذة العزلات 26 عزلة G^+ و7 عزلة G^- .

2- النقطة البحثية الثانية

تضمنت دراسة مبدئية للخصائص المورفولوجية والفسيولوجية لأفضل ثلاثة عزلات ممثلة لدرجات الملوحة المختلفة ($HP25^{(1)}$ و$HP10^{(6)}$ و$HP5^{(1)}$) وتمت دراسة الخصائص الفسيولوجية بأستخدام نظام API System الطرق السريعة للتصنيف بعد التعديل الملحي لها (إستخدم API 20 E وAPI 50 CH بعد إضافة التركيز الملحي المناسب للبيئة الخاصة به).

ووجد أن العزلة $HP25^{(1)}$ أكثر نشاطا نسبيا من العزلات الاخري ($HP10^{(6)}$ و$HP5^{(1)}$) من حيث النشاط الإنزيمي وإستخدام مصادر الكربون المختلفة, أيضا تم دراسة الثلاث عزلات من حيث قدرتهم علي النمو علي تركيزات ملح مختلفة ووجد أن العزلة $HP25^{(1)}$ لا تستطيع النمو علي تركيز ملحي أقل من 25 % ملح بالبيئة وهذا يدل علي أنها Extremely Halophiles , أما العزلة $HP10^{(6)}$ إستطاعت النمو علي تركيزات الملح (صفر% و5% و10% و15%) ولم تستطع النمو علي تركيز 25 % ملح وهذا يشير الي أنها Moderately Halophiles , أما العزلة $HP5^{(1)}$ تسطيع النمو علي مدي واسع من التركيز الملحي وإن كان بدرجات متفاوتة لّذلك يكمن إعتبارها Facultative Halophiles.

3- النقطة البحثية الثالثة

تضمنت الدراسة الفسيولوجة والوراثية لأكثر العزلات الواعدة وهي HP25[(1)] , حيث إختيرت من بين العزلات الثلاثة لتعريفها وتصنيفها ومقارنتها بأقرب العزلات لها والمنشورة من جنس ال *Halobacterium* .

أظهرت النتائج أن العزلة HP25[(1)] تتشابه مع العزلة المرجعية المنشورة *Hbt. Salinarum* (DSM3754) في معظم صفاتها ولكن كانت تختلف فسيولوجيا مع العزلات المرجعية المنشورة الاخري, كما وجد أنها تختلف مع العزلة *Hbt. Salinarum* (DSM3754) في الصبغة المنتجة وإستخدام ال Inulin و ال D-Mannose. وبناءا علي درجة التشابة في 16srDNA gene sequence, وجد أن العزلة HP25[(1)] قريبة جدا من العزلات *Halobacterium salinarum* JQ015374 بنسبة (100 %) , *Halobacterium pascisalsi* HPC1-2 بنسبة (98 %), *Halobacterium jilantaiense* strain NG4 بنسبة (98 %), *Halobacterium noricense* strain A1 (97 %). وفي النهاية بعد دراسة الصفات الفسيولوجية والمورفولوجية وجد أن العزلات HP10[(6)] وHP5[(1)] تتبع جنس *Halobacillus sp.*, بينما العزلة HP25[(1)] فسيولوجيا ووراثيا تصنف علي أنها *Halobacterium salinarum*.

4- النقطية البحثية الرابعة

تتضمن هذة النقطة البحثية دراسة العوامل المؤثرة علي نمو وإفراز انزيم ال Halophilic Protease من العزلة HP25[(1)] لتحديد أفضل الظروف حيث تم دراسة, مدة التخمير, التركيزات الملحية المختلفة من صفر الي 30 %, قيمة ال pH من 5 الي 9, درجات الحرارة من 25 الي 55 م°. وذلك بعد الخلايا الحية وتقدير النشاط الإنزيمي لل Supernatant الخالي من الخلايا .

حيث كانت مدة التخمير المثلي للنمو وإفراز الإنزيم 4 أيام, بدأازدهار النمو من 15% تركيز ملح وازداد النمو بالتوازي مع إزدياد تركيز الملح حتي 30% وكانت اعلي إنتاجية للإنزيم عند 25% ملح, وكان أفضل نمو وانتاجية للإنزيم عن ال pH 7,0, وأقصي إنتاجية للإنزيم ونمو العزلة علي درجة الحرارة 40 م° ولكن انخفض النمو وإنتاجية الإنزيم عند درجة الحرارة 55 م°.

5- النقطة البحثية الخامسة

تتضمن هذة النقطة البحثية إنتاج وتنقية إنزيم ال Halophilic Protease من العزلة HP25[(1)]. حيث تم تنقية الإنزيم 2 لتر من ال Supernatant من عزلة ال HP25[(1)] النامية في بيئة ال S-G Medium المحتوية علي 25 % ملح كلوريد الصوديوم و2,5 % لين فرز بودرة وتم التحضين علي درجة حرارة 40 م° لمدة 4 أيام وتم الانتاج في مخمر حيوي صغير Bioreactor ADI 1030 وبعد نهاية مدة التخمير, تم عمل طرد مركزي للسائل علي 10000 لفة / دقيقة ثم تم تنفيذ التنقية علي ال Supernatant الناتج.

تمت التنقية في ثلاث خطوات أساسية متتابعة, الترشيح الفوقي بأستخدام ال Amicon, ال Dialysis بعد الترسيب بالكحول, ثم تبع بال Gel Filtration بأستخدام ال Superdex Protease. وأدت تنقية ال Halophilic Protease بواسطة ال Gel Filtration الي Specific Activity 6350 وحدة / ملليجرام (Fold 167) و 31% Yield.

6- النقطة البحثية السادسة

تتناول هذة النقطة البحثية دراسة خصائص ال Halophilic Protease وذلك بدراسة العوامل المؤثرة علي نشاط الانزيمات (تركيز ملح كلوريد صوديوم من صفر الي 30 %, قيمة ال pH من 4 الي 12, درجة الحرارة من 5 الي 100 م^{o}). أيضا تم دراسة المواد المثبطة لنشاط الانزيمات وكذلك التعرف علي الوزن الجزيئي للإنزيم المنقي ودرجة نقاوته بأستخدام SDS Page.

وسجلت النتائج أن أعلي نشاط كان في المدي من 10-15 % ملح كلوريد الصوديوم وأقصي نشاط كان عند 15%. بالإضافة الي المدي الذي يعمل الإنزيم فية من ال pH من 5 الي 11 وأقصى نشاط عند ال pH 8, كما أن أقصى نشاط وجد عند درجة حرارة 60 %. وبالنسبة لمثبطات النشاط الإنزيمي وجد أن ال SDS أدي الي فقد معظم النشاط ثم يتبعه PMSF 87,5 % واليوريا 69,5 % وال EDTA 66,8 % و ال $FeCl_2$ 44,2 %. ويعني التثبيط بال EDTA أن الإنزيم يتطلب بعض أيونات المعادن كمساعدات إنزيمية لنشاطة. كما لوحظ أن النشاط الإنزيمي هبط بشدة مما يعني أن الإنزيم ينتمي الي ال Serine Protease, أما ال β-Mercaptoethanol (0,1 %) كعامل مختزل أدي الي تثبيط متوسط 20% من النشاط الإنزيمي. كما وجد أن الوزن الجزيئي للبروتين الإنزيمي بأستخدام ال SDS Page 21 ± 0,5 كيلو دالتون.

أهداف الدرسة :-

أ- عزل وحصر الميكروبات المحبة للملوحة والمنتجة لإنزيم البروتييز في أحواض التجفيف الشمسي بشركة الاميسال ببحيرة قارون , محافظة الفيوم, جمهورية مصر العربية.

ب- لتعريف وتصنيف أكثر العزلات أنتاج لإنزيم البروتييز.

ج- لتحديد أفضل ظروف النمو للميكروب وأنتاج الإنزيم.

د- لتنقية وتحديد خصائص ال Halophilic Protease من أكثر العزلات إنتاجا.