مجلــة الكوفــة للعلــوم الزراعيـــة 8 (2) : (238– 256) 2016

توصيف إنزيم البولي كالاكتيورونيز Polygalacturonase المنتج من العزلة المحلية B_{36} لبكتريا *Bacillus megaterium*

آمال كاظم غضبان الأسدي قيثار رشيد مجيد *صلاح ناجي عزيز الخيون

قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة البصرة / الجمهورية العراق

المستخلص

تـمت دراسة صفات أنزيم البولي كالاكتيورونيز المنقى والمنتج من العزلة المحلية (B_{36}) لبكتريا *Bacillusmegaterium* والتي انتخبت كأفضل عزلة محلية لبكتريا *Bacillus*ssp. لإنتاج الأنـزيم إذ أعطت أعلى فعالية أنزيمية باستعمال المزارع المغمـورة.كان الـوزن الجزيئـي للإنـزيم65 كيلودالتـون باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكريلامايد بوجود SDS ،أما الدالة الحامضية المثلى لفعالية أنزيم البولي كالاكتيورونيز فكانت 7.0إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1639.256 وحدة/مل، والدرجة الحرارية المثلى للفعالية كانت 50م وقد أعطت فعالية مقدارها 1619.673 وحدة/مل. أما ثباتية إنزيم البولي كالاكتيورونيز فكانت الدالة الحامضية المثلى لها(6.5 – 7.5) في حين الدرجة الحرارية المثلى لها تراوحت بين(0 – 50) م لمدة 30 دقيقة. كما درس تأثير بعض الايونات والمركبات الكلابية والمختزلة في ثباتية الأنزيم والتي شملت Mn^{2+}وFe^{3+}وCa^{2+} التي زادت من فعالية الأنزيم عند تركيز 5 ملي مولاري فبلغت115% و105% و110% على التوالي ، بينما عملت أيوناتCu^{2}على تثبيط فعالية الإنزيم بنسبة 10% عند تركيز 1 ملي مولاري وازداد التثبيط للإنزيم عند تركيز 5 ملي مولاري وبنسبة 50% إماMg^{2+}فقد زادت من الفعالية بنسبة 110% عند تركيز 1 ملي مولاري وازدادت الفعالية لتصل إلى 130% عند تركيز5ملي مولاري ، ولم تظهر كل من اليوريا وEDTAتأثيراً في الفعالية الأنزيمية عند تركيز 1 ملي مولاري ولكنهما ثبطا الفعالية بنسبة 30% و60% على التوالي عند تركيز 5 ملي مولاري. وانتركيز 0.1% (وزن/حجم) من مادة SDS قد ثبط10% من الفعالية الأنزيمية. بلغت الثوابت الحركية للأنزيم 3.125%لقيمةK_mفي حين بلغت السرعة القصوى 0.043V_{max}وحدة/ملي مولاري،وكانت قيمة طاقة التنشيط للتفاعل الأنزيمي هي 38.613 كيلو سعره/مول.

الكلمات المفتاحية: بكتريا*Bacillus megaterium*، إنزيم البولي كالاكتيورونيز، الوزن الجزيئي،الصفات

*البحث جزء من رسالة ماجستير للباحث الثالث

المقدمة

تعود إنزيمات البولي كالاكتيورونيز إلى إنزيمات البكتينيز المحللة مائياً للسلاسل البكتينية فهي قادرة على تحلل البكتين أو الحامض البكتيني وهنالك نوعان من البولي كالاكتيورونيز حسب طريقة عملها على سلسلة حامض الكالاكتيورونيك احدهما يهاجم حامض الكالاكتيورونيك بطريقة عشوائية وهو البولي كالاكتيورونيز الداخلي (EC 3.2.1.15) والأخر يهاجم الأطراف وهو البولي كالاكتيورونيز الخارجي (EC 3.2.1.67) (23).

تقسم إنزيمات البكتينيز حسب متطلبات الدالة الحامضية على إنزيمات حامضية وأخرى قاعدية وأن القليل من الأنزيمات المحللة للبكتين القاعدية والمنتجة منميكروبات مختلفة قد تم تنقيتها ودراسة صفاتها وعموماً فأن البكتيريا تنتج بشكل رئيسي إنزيم البولي كالاكتيورونيز القلوي والثابت حرارياً ، بينما الفطريات تعد المنتج الرئيسي لأنزيم البولي كالاكتيورونيز الحامضي (16,15, 6) .

إن دراسة صفات أنزيم البولي كالاكتيورونيز لها أهمية كبيرة لأنها تحدد مدى فعالية الأنزيم في العمليات التصنيعية اذ ان للأنزيم أهمية تجارية في مجالات مختلفة مثل استخلاص وترويق العصائرِ ونبيذِ الفاكهةِ ،وكذلك تليين ألياف المنسوجات وانحلال الخضارِ والثمارِ لتَسهيل انتزاع الزيوتِ الأساسيةِ ومعالجة المواد الصمغية أو اللاصقة من الألياف الخشنة في النبات ومعالجة المواد البكتينية في مياه الفضلات وإنتاجِ أغذية الأطفال الرضع واستخلاص القهوة والزيوت والنكهات والصبغات من النباتات (13).

إن فهم خصائص الأنزيمات المحللة للبكتين يعد أمراً ضرورياً لاستعمالها بشكل صحيح في مجالات التقانات الاحيائية، فقد لاحظTari وآخرون (38) أن الدالة الحامضية لفعالية أنزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من عفن *Aspergillussojae*كانت 5 في حين أوضحSakamoto وآخرون (33) ان درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم المنتج من*A.niger*هي 50°مو بينKapoor وآخرون (12) ان الإنزيم المنتج من بكتيريا *Bacillus* spp. يحتفظ بنصف فعاليته عند درجات حرارة 60 و70و80 م ولمدة 112 و118و20 دقيقة على التوالي.

هدفت الدراسة الى توصيف الأنزيم المنقى المنتج من العزلة المحلية(B_{36}) لبكتيريا *Bacillus megaterium* مثل افضل درجة حرارة ودالة حامضية لفعاليته وكذلك الثبات الحراري والدالة الحامضية لثباتيته وأهم المركبات المنشطة والمثبطة لفعالية الأنزيم للأجل تحديد المجالات التطبيقية له.

المواد وطرائق العمل

أستعمل أنزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من العزلة المحلية (B_{36}) لبكتيريا *Bacillus megaterium*والتي كان مصدرها التفاح واعتمدت كأفضل عزلة لإنتاج الأنزيم بعد أن أختبرت العديد من العزلات المحلية التابعة لبكتيريا .*Bacillus* spp، ثم نقي الأنزيم باتباع الترسيب بالاسيتونبنسبة 3:1(أنزيم:أسيتون) والتبادل الأيوني باستعمال DEAE-sephadex A-50 والترشيح الهلامي باستعمال sephadex

G-100 . أجريت جميع الخطوات التي ورد ذكرها في الرسالة التي استل منها البحث.

تقدير فعالية أنزيم البولي كالاكتيورونيز:

قدرت فعالية الإنزيم حسب طريقةMiller (24)باستعمال 3,5-dinitro salcylic acidاذ قدرت السكريات المختزلة (حامض الكالاكتيورونيك)بفعل إنزيم البولي كالاكتيورونيز تجاه المادة الاساس حامض البولي كالاكتيورونيك عند دالة حامضية 6.5.

وحدة فعالية أنزيم البولي كالاكتيورونيز (U) : كمية الأنزيم اللازمة لتحرير 1مايكرومول من حامض الكالاكتيورونيك في 30 دقيقة تحت الظروف المعتمدة.

توصيف أنزيم البولي كالاكتيورونيز

تقدير الوزن الجزيئي للإنزيم بطريقة الترحيل الكهربائي باستعمال هلام متعدد الاكريلأمايد بوجود SDS

أجرى الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلأمايد بوجود SDS تبعاً لطريقة Laemmli (19) والموصوفة من قبل Garfin (8).

الدالة الحامضية المثلى لفعالية الإنزيم المنقى

قدرت الفعالية الإنزيمية مع استعمال المحاليل الدارئةالآتية بدلاً من محلول خلات الصوديوم الدارئ بدالة حامضية 6.5 لتعيين أفضل دالة حامضية لفعالية الأنزيم :-

1-المحلول الدارئ خلات الصوديم تركيز0.2 مولاري وبدالة حامضية 3 و3.5 و4 و4.5و5 و5.5 و6 و6.5

2-المحلول الدارئ فوسفات الصوديوم تركيز0.2مولاري وبدالة حامضية 7 و7.5و8 و8.5 .

3- المحلول الدارئ Tris–HCl تركيز0.2 مولاري وبدالة حامضية 9 و9.5و10 (3) .

درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم المنقى

قدرت فعالية الإنزيم على مديات مختلفة لدرجات حرارة وهي 10 و20 و25 و30 و35 و40 و45 و50و55و60 و65و70م لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم(3) .

الدالة الحامضية المثلى لثبات الإنزيم المنقى

أ- المحاليل :

أ- استعملت المحاليل الدارئة التي سبق ذكرها في تحديد أفضل دالة حامضية للفعالية.

ب- طريقة العمل :

مزجت حجوم متساوية من محلول الإنزيم المنقى مع المحاليل الدارئة المحضرة وبمديات مختلفة للدالة الحامضية 3 ، 3.5 ، 4 ، 4.5 ، 5 ، 5.5 ، 6 ، 6.5 ،7 ، 7.5 ، 8 ، 8.5 ، 9 ، 9.5 ، 10 وحضنت على درجة الحرارة 45 م لمدة 30 دقيقة حسب الطريقة التي ذكرهاDeshmukh و Shankar(3) ثم بردت النماذج الإنزيمية وقدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية (%) لتحديد الدالة الحامضية المثلى لثبات الإنزيم .

الثبات الحراري لأنزيم البولي كالاكتيورونيز

حضن 1 مل من الأنزيم المنقى بدرجات حرارية مختلفـــــــــــــة 20 و 25 و30و35و 40و 45و50و55و60 و65 و70و75م لمدة 30 دقيقة ، بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي ثم قدرت الفعاليـة الإنزيميـة المتبقيـة (%) لتحديـد الدرجـة الحرارية المثلى لثباتية الإنزيم .

تــأثير بعــض الايونــات والمركبــات الكلابيــة والمختزلة في ثباتية الأنزيم

أ- المحاليل المستعملة

حضـرت كـل مـن المحاليـل الأيونيـة والمركبـات الكلابية والمختزلة بتركيزين 1 ، 5 ملي مولاري لكـل مـن كلوريـد المنغنيـز $MnCl_2$ وكلوريـد النحـاس $CuCl_2$ وكلوريـد المغنيسـيوم $MgCl_2$ وكلوريـد الحديـدوز$FeCl_2$ وكلوريـد الكالسـيوم $CaCl_2$ واليوريـا و EDTA و0.1% مـن SDS إذابتها في الماء المقطر.

ب- طريقة العمل :

حضن 1 مل من الأنزيم المنقى مع 1 مل من تراكيـز المحاليـل الملحيـة والمركبـات المختزلـة والكلابيـة بصـورة منفصـلة عنـد درجـة الحـرارة المثلى لثبات الأنزيم لمدة 30 دقيقة، ثم سحب 1 مل من المزيج لتقدير الفعالية الإنزيمية المتبقية (%) .

تعيــين الثوابــت الحركيــة لإنــزيم البــولي كالاكتيورونيز

حضرت تراكيز مختلفة من المادة ألخاضعة لحامض البولي كالاكتيورونيك تراوحت بين 0-0.5–1–1.5–2-2.5 % فــي محلــول خــلات الصـوديوم الـدارىء تركيـز 0.2مـولاري بدالـة حامضـية 6.5 قـدرت قـيم ثابـت ميكـالسK_m والسرعة القصوى V_{max} من رسم العلاقة بين مقلـوب السـرعة الأوليـة V_o وتراكيـز المـادة الأسـاس [S] حسـب طريقـة لاينـويفر- بيـرك Lineweaver-Burk reciprocal plot الــواردة فــي Segel(36) وقــدرت الفعاليــة الإنزيمية مع استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة في مزيج التفاعل خلال التقدير

تقدير طاقة التنشيط وطاقة مسخ إنـزيم البـولي كالاكتيورونيز

قـدرت طاقـة التنشيط لتحويـل مـادة التفاعـل إلـى الناتج Transformation energy (Ea)وطاقة مسخ الأنزيم(Ea) Denturation energy عن طريق رسم العلاقة بين لوغارتمV_{max} المقدرة في مدى من درجات حرارة تراوحت بين 10 و 70 م وبفـارق خمـس درجـات مقابـل مقلـوب درجات الحرارة المطلقة (Kº) وبالأسلوب نفسهِ في تقدير فعالية الإنزيم وتم حساب طاقة التنشيط وطاقة المسخ للانزيم من انحدار Slope حسب العلاقة الناتجة وفق Segel(36) وهي:

$$Slope = \frac{-Ea}{2.3\ R}$$

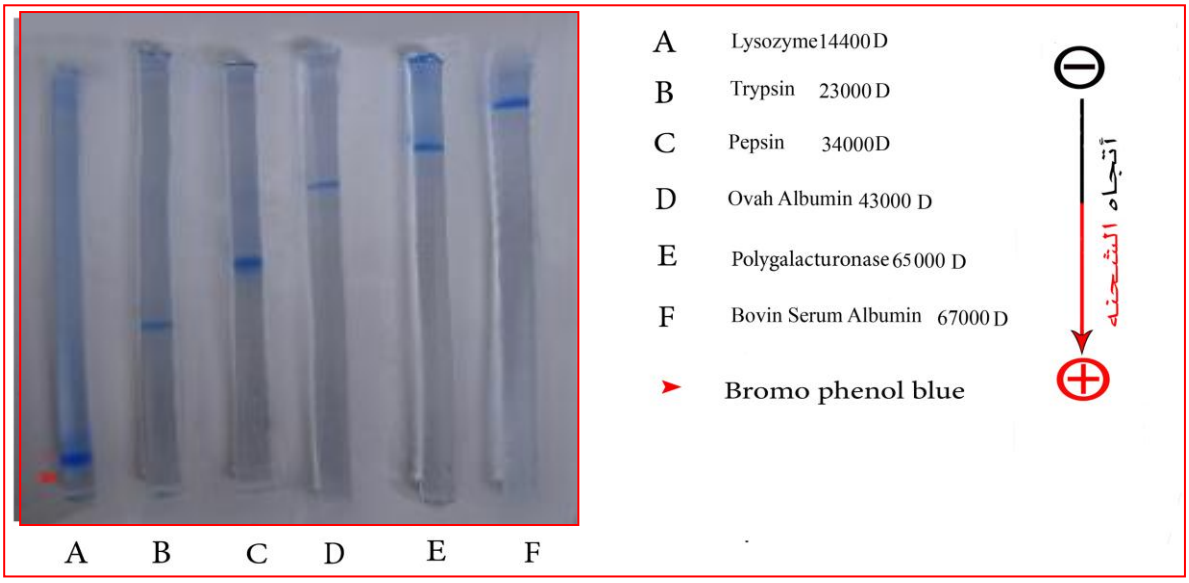
Ea : طاقة التنشيط للانزيم (كيلو سعرة/مول)

R : ثابت الغاز 1.98 كيلو سعرة/مول/درجة حرارة مطلقة (كلفن) K°

النتائج والمناقشة

الوزن الجزيئي

اجري الترحيل الكهربائي باستعمال هلام متعدد الأكريلامايد وبوجود SDS لتقدير الوزن الجزيئي لأنزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من العزلة المحلية(B_{36}) لبكتريا *Bacillus megaterium* بعد التأكد من نقاوته ، وقد تم احتساب الوزن الجزيئي بالاستعانة بالمنحني القياسي الذي يمثل العلاقة بين لوغارتم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية والحركة النسبية لها Relative mobility(Rm) وكان الوزن الجزيئي 65 كيلو دالتون كما في الشكل (1).



شكل (1) الترحيل الكهربائي باستعمال تقنية SDS-PAGEلتقدير الوزن الجزيئي لإنزيم البولي كالاكتيورونيزالمنتج من العزلة المحلية (B_{36}) لبكتريا *B.megaterium*

تباينت الدراسات في تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم البولي كالاكتيورونيز وتحديد عدد الوحدات المكونة له ومدى احتوائه على الأواصر ثنائية الكبريت للحامض الأميني السيستين وذلك تبعاً لاختلاف المصدر الإنزيميلذلك يعامل الإنزيم بإضافة 2- ميركابتوايثانول الذي يعمل على تكسير هذه الجسور وفصل الإنزيم إلى وحدات ثانوية ظهرت بوزن جزيئي اقل من الوزن الجزيئي الأساس للأنزيم .

و قيست الحركة النسبية Rmللانزيم ومن خلال القيمة المتحصل عليها أمكن تحديد الوزن الجزيئي ووجد انه يساوي 65كيلودالتون وهي مقاربة لما وجدهSchell وآخرون (35)لنوعين من أنزيمات البولي كالاكتيورونيز تنتجها بكتريا *E.coli* ووزنها الجزيئي 52 كيلو دالتون و45

كيلو دالتون على التوالي ومطابقة لما وجده Di Pietro وآخرون(4) بأن الوزن الجزيئي لأنزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي المنتج من العفن *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*هو 66 كيلو دالتون وبطريقة الترحيل الكهربائي .

بين Kumar و Palanivelu(18) ان الوزن الجزيئي للانزيم المنقى والمنتج من عفن *Thermomy ceslanuginosus* هو 59 كيلو دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي .

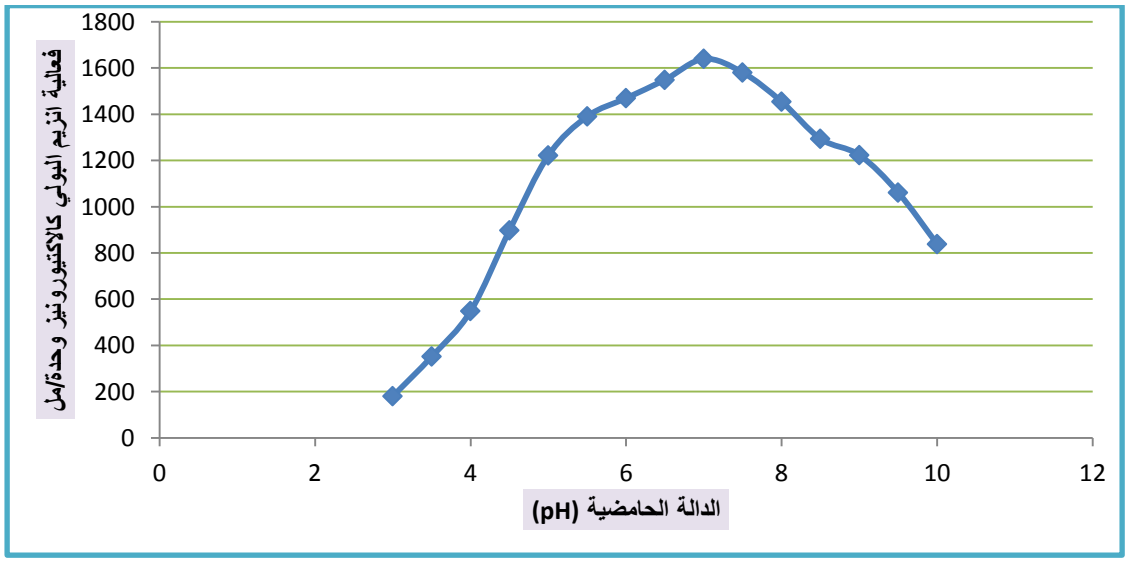
كما وجد Nasser وآخرون(26) ان انزيم بولي كالاكتيورونيز الخارجي المنتج من بكتريا *Erwinia chrysanthemi* كان وزنه الجزيئي 62 كيلو دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي .

ووجد Rha وآخرون(32) إن الوزن الجزيئي لانزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي المنتج من العفن *Botrytis* كان 66 كيلو دالتون بأستعمال طريقة الترحيل الكهربائي وبواسطة الترشيح الهلامي كان 64كيلو دالتون .

وتم تحديد ثلاث حزم انزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي من العفن *Aspergillussojae* تحتوي على الفعالية الأنزيمية وكان وزنها الجزيئي بطريقة الترحيل الكهربائي هي 36 و 53 و 68 كيلو دالتون على التوالي (38) .

كما لاحظ Taşkin و Stratilovă (39) ان انزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي المنتج من العفن *A.foetidus* كان وزنه الجزيئي 54 كيلو دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي .

كذلك وجد Thakur(40) بأن الوزن الجزيئي لأنزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي المنتج من العفن *Mucorcircinelloides*ITCC6025 كان 66 كيلو دالتون وبطريقة الترحيل الكهربائي وبوجود SDS .



شكل(2)تأثير الدالة الحامضية في فعالية انزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من العزلة المحلية(B_{36}) لبكتريا B.megaterium

الدالــة الحامضــية المثلــى لفعاليــة أنــزيم البــولي كالاكتيورونيز:

أظهرت النتائج إن7.0هي الدالة الحامضية المثلى لفعاليــة الأنــزيم قيــد الدراســة إذ بلغــت الفعاليــة الأنزيميــة 1639.256 وحــدة/مل ثــم انخفضــت بعدها الفعالية وكما في الشكل (2).

أن سبب انخفاض الفعالية عند المدى الحامضي القـوي والقاعـدي القـوي يعـود إلـى إن واحـداً أو أكثر من المجاميع الأيونيـة الموجـودة فـي الموقـع الفعال للأنزيم أو المادة الخاضعة أو كليهما يتـأثر وبسـبب تغيـر الدالــة الحامضــية ممــا يــؤثر فــي الحالـة الأيونية لهذه المجاميـع وانعكاس ذلك على قابليــة الإنزيـم للارتباط بالمادة الخاضعــة (2).

إن الدالــة الحامضــية تــؤثر فــي الحالــة الأيونيــة للإنزيمـــات مـــن خـــلال تأثيرهـــا فـــي سلاســـل الأحماض الامينية الجانبيـة التـي تكون ضـرورية للمحافظة على التركيب الثلاثي للإنزيم وقد يؤدي إلى تغيرالحالة الأيونية لمادة التفاعل، مما ينعكس ذلـك علـى فعاليــة الإنــزيم ، إذ أن ارتفــاع الدالــة الحامضية أو انخفاضـها عن حدود معينـة يحدث اختلافـاً فـي ترتيـب الشـحنات الموجـودة علـى السلاسل الطرفيـة المتأينـة لجزيئـه الإنـزيم بشـكل كبيـر مقارنــة بترتيـب الشـحنات تحـت الظـروف الاعتيادية ويترتب على ذلك تغير تركيب الشكل الربــاعي إلـى تركيب أكثـر عشـوائية إضـافة إلـى اختلاف التركيب الثلاثي للإنزيم (36,29).

تباينـــت الدالـــــة الحامضيـــــة المثلـــــى لأنزيـــم البولــــي كالاكتيورونيــز وذلـك تبعـــاً للكائـــن الحــي المجهــري (بكتريــا، خميـرة ، عفن) فلكـل منها ظروفـه الخاصـة إضـافةإلى اختلاف الجنس والنــوع والعزلــة وقــد وجــدFanelli(5)إن الدالــة الحامضــية المثلــى لفعاليــة الأنــزيم المنــتج مــن عفـــن*Trichodermakoningii* كانـــت 5.0 ، إمـــاSchell وآخـــرون(35)فوجـــدوا ان الدالـــة الحامضية المثلى لفعالية الأنزيم المنتج من بكتريا *E.coli* كانت 5.7.

ذكرAksöz(1)إن الدالة الحامضية المثلى لفعالية الأنزيم المنتج من *Bacillus subtilus* هي 7.0 ، و بـــينKapoor وآخـــرون(12)إن الدالـــة الحامضــية المثلــى لفعاليــة الأنــزيم المنــتج مــن *Bacillus* sp. هـــي 10.0، بينمـــا وجـــدTari وآخـــرون(38)إن الدالـــة الحامضـــية المثلـــى لفعاليـــــة الأنزيـــــم المنتـــــج مـــــن العفـــــن *Aspergillussojae*هـــــــي5.0 بينمـــــــا وجـــدOdeniyi وآخـــرون(27) إن الدالـــــة الحامضـية المثلـى لفعاليــة الأنــزيم المنــتج مـــن بكتريـــا *Bacillus coagulans*strain PFH N7 كانت 7.0.

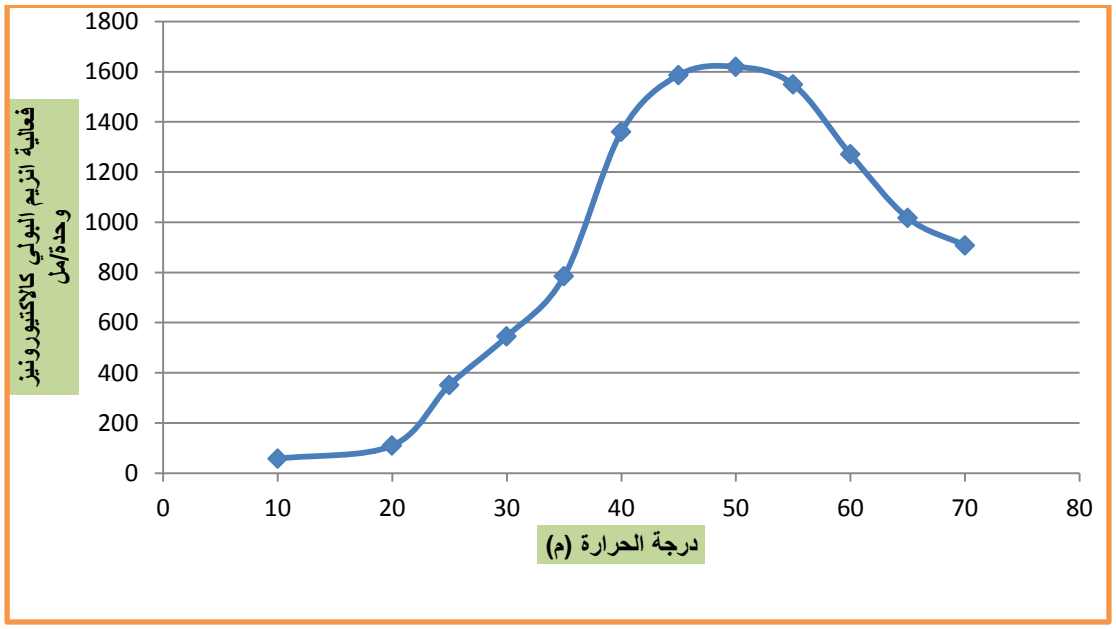
كـذلك وجـدThakur وآخـرون(40) بـأن الدالــة الحامضـــية المثلـــى لفعاليـــة أنـــزيم البـــولي كـــالاكتيورونيز الخـــارجي المنتـــج مـــن العفـــن *Mucorcircinelloides*ITCC6025 كانـــت 5.5.

درجــة الحــرارة المثلــى لفعاليــة أنــزيم البــولي كالاكتيورونيز

يوضــح الشـكل(3) أن الدرجـة الحراريــة المثلــى لفعاليــة الأنــزيم كانــت 50°م فقـد اعطـت فعاليــة مقـدارها 1619.673 وحــدة/مــل ، ان الفعاليــة الأنزيمية ازدادت مع ارتفاع درجة الحرارة لغاية

50 م ثم بدأت بالانخفاض لتصل إلى 908.027 وحدة/مل عند درجة حرارة 70 م .

يعزى سبب زيادة سرعة التفاعلات الأنزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة لحد معين إلى زيادة التصادمات بين جزيئات الإنزيم والمادة الخاضعة نتيجة زيادة الطاقة الحركية للجزيئات(36) ، فيما تسبب درجات الحرارة العالية انخفاض في الفعالية الأنزيمية في مسخ الإنزيم نتيجة تأثير الحرارة في تركيب الإنزيم وتغيير هيئة المواقع الفعالة مما يؤدي إلى فقدان الغالبية من الفعالية (22).



شكل (3) تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من العزلة المحلية(B_{36}) *B.megaterium*

تباينت النتائج مع ما توصل له الباحثون كما هو الحال مع الدالة الحامضية وللأسباب السالفة الذكر فقد وجد بعض الباحثين ان درجة الحرارة المثلى للفعالية هي45 م للأنزيم المنتج من بكتريا *E.coli*(35) ، في حين وجد Sakamoto وآخرون (33)إن درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم المنتج من عفن *Aspergillusniger* هي50 م .

ووجد Gewali وآخرون (9)إن درجة الحرارة المثلى للفعالية هي 40 م للأنزيم المنتج من العفن *Aspergillusflavus* كما وجد Taşkin وStratilovă (39)إن درجة الحرارة المثلى للفعالية هي 40 م للأنزيم المنتج من العفن *A.foetidus* .

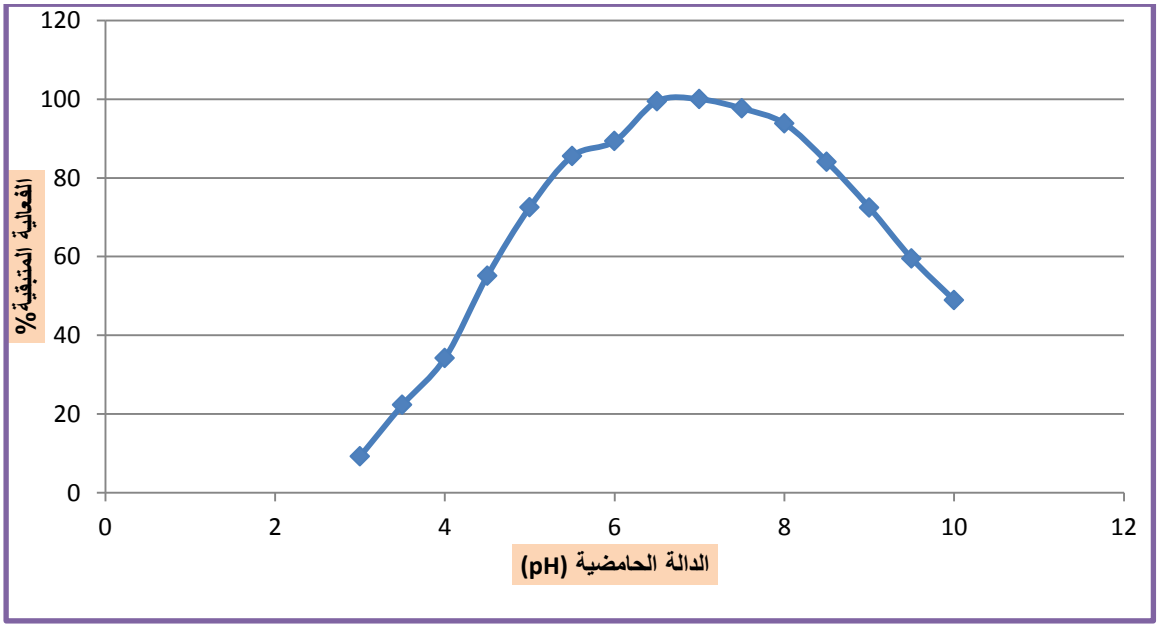
كذلك وجد Thakur وآخرون (40) بأن درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي المنتج من العفن

*Mucorcircinelloides*ITCC6025هــي 42 م.

الدالــة الحامضــية المثلــى لثباتيــةأنزيم البــولي كالاكتيورونيز

يظهـر إن أفضـل دالـة حامضـية لثباتيـة فعاليـة الأنزيـم كانـت (6.5 – 7.5) ، إذ احـتفظ الإنـزيم بـأكثر من 98% من فعاليتـه عند هذه القيم بينما تسببت الـدوال الحامضـية المنخفضـة فـي خسـارة كبيرة للفعالية إذ احتفظ الأنزيم بحوالي 84%

مـن فعاليتـه عنـد الدالـة الحامضـية 4.0 وكـذلك الـدوال الحامضـية المرتفعـة إذ احـتفظ الإنـزيم بحـوالي 73% مـن فعاليتـه عند الدالـة الحامضـية 8.0 الأن الخسـارة كانـت اقـل ممـا فـي الدالـة الحامضية المنخفضة كما في الشكل (4) .



شكل(4) تـأثير الدالـة الحامضـية فـي ثباتيـةإنزيم البـولي كـالاكتيورونيز المنـتج مـن العزلـة المحليـة*B.megaterium* (B_{36})

قد يعزى سبب الانخفاض في الفعالية عند القيم الهيدروجينيـة الحامضـية والقاعديـة العاليـة إلـى حـدوث تغييـر فـي التركيـب الثـانوي والثلاثـي لجزيئه الإنزيم علاوة على تغيير الحالة الأيونية للموقع الفعال للأنزيم (20) ، كما تؤثر الطبيعة الكيميائيـة للمحلـول الـدارئ واخـتلاف مصـدر الإنزيم في تحديد الدالـة الحامضية المثلى لثبات فعاليـة الإنـزيم اضـافة الـى ان الدالـة الحامضـية الواطئة تؤثر في تركيب بروتين الإنزيمات وتأين المجاميع الموجودة في الموقع الفعال ، وان زيـادة الدالة الحامضية عن الحد الأمثل يؤدي إلـى مسخ البـروتين وتغيـر تركيـب الموقـع الفعـال وفقـدان فعالية الإنزيم (36).

عند مقارنة النتـائج مـع مـا ذكره البـاحثون يلاحظ هناك تباين بسبب اختلاف مصدر الأنزيم ونـوع المحلـــول الـــدارىء فقـــد ذكـــرKapoor وآخرون(12) إن الدالة الحامضية لثبات الأنزيم

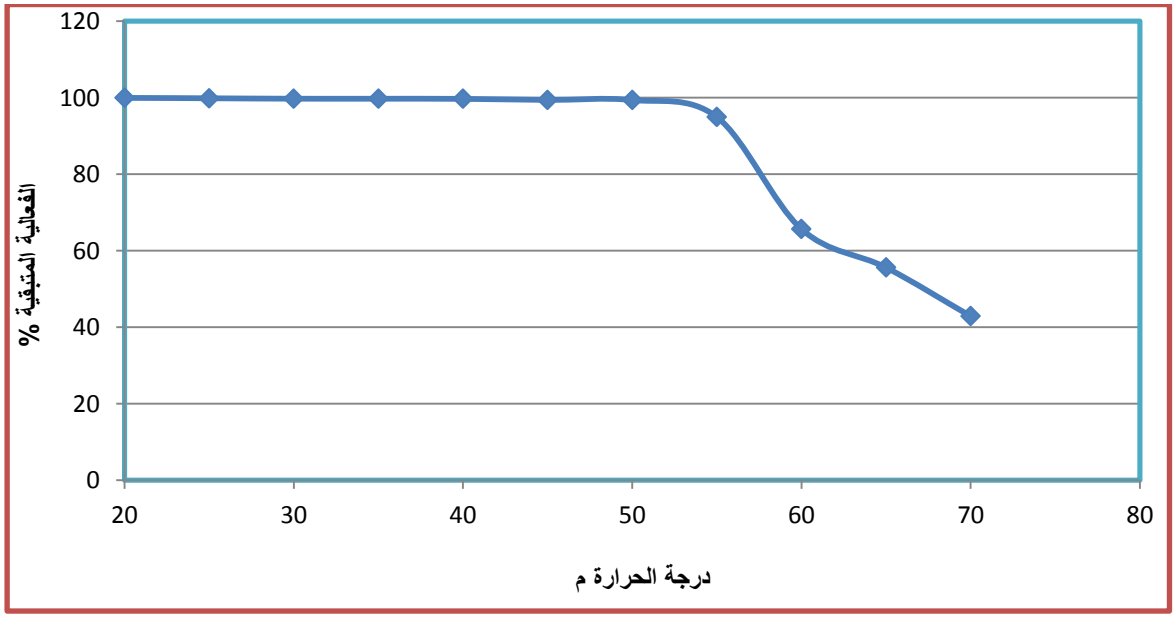
المنتج من بكتريا *Bacillus* spp. تراوحت بين 8.5–12 عند الحضن على درجة حرارة 60 م و7.5 – 12 عند الحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة وبلغت الفعالية المتبقة 80% عند الدالة 10.0.

بينما وجدKobayashi وآخرون (15)إن الدالة الحامضية المثلى لثبات فعالية الأنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus* كانت 7.5وكان الأنزيم ثابتاً في مدى من الدوال الحامضية8.0– 9.5 وفقد 80% من فعاليته عند الدالة الحامضية 9.0–11.0، إماSawada وآخرون(34) فوجد الدالة الحامضية لثبات الأنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis*كانت بين7.5–8.0

أشارGupta وآخرون(10)إن فعالية الأنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis*تبقى ثابتة 100% عند الدالة حامضية 8.0-10.5. بينما وجد Odeniyi وآخرون(27) ان ثباتية الدالة الحامضية كانت بين 7.0– 9.0لأنزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من بكتريا *Bacillus coagulans*strain PFH N7 ، كذلك وجدThakur وآخرون(40) بأن ثباتيةالدالة الحامضية لفعالية أنزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي المنتج من العفن *Mucorcircinelloides*ITCC6025 كانت 4.5 – 6.5 .

درجة الحرارة المثلى لثباتية أنزيم البولي كالاكتيورونيز

و يلاحظ من الشكل (5) إن الثبات الحراريللأنزيم يتراوح بين (0 – 50) م إذأعطىأعلى فعالية أما الدرجات الحرارية الأعلى فقد انخفضت الفعالية بشكل تدريجي مع ارتفاع درجة الحرارة .



شكل(5)تأثير درجة الحرارة في ثباتية انزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من العزلة(B_{36}) لبكتريا *B.megaterium*

أن انخفاض الثبات الحراري للأنزيم يعود إلى حساسية الأنزيمات تجاه درجات الحرارة المرتفعة لذا تزداد سرعة التثبيط للإنزيمات (31) .

عند مقارنة النتائج مع ما توصل إليه الباحثون وجد ان هناك تبايناً تبعاً لاختلاف مصدر الأنزيم وظروف التجربة فقد أوضحSoares وآخرون (37)إن فعالية الأنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus* كانت ثابتة عند مدى حراري 50 – 60 م لمدة ساعة. ذكر (12)إن الأنزيم المنتج من بكتريا .*Bacillus* sppيحتفظ بنصف فعاليته عند درجة حرارة 60م و70 م و80 م ولمدة 112 و118 و20 دقيقة على التوالي.

إماParisot وآخرون (28) فقد ذكر إن الأنزيم المنتج من *Thermotogamaritime*فقد 50% من فعاليته عند حضنه على درجة حرارة 90 م لمدة 30 دقيقة وتثبط كلياً في حالة ارتفاع درجة الحرارة عن 90 م .

وجد Gupta وآخرون(10) إن فعالية انزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من بكتريا *Bacillus*.sp تكون ثابتة 100% في درجات حرارية حتى اعلى من 60 م ولمدة ساعة ونصف .

بينما وجدTari وآخرون (38)إن الحرارة المثلى لثبات الأنزيم المنتج من عفن *Aspergillussojae* كانت 55 م وفقد 20% من فعاليته عند درجة حرارة 65 م لمدة ساعة .

إماOdeniyi وآخرون(27) فقد ذكر إن الأنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus coagulans*strain PFH N7 فقد احتفظ بفعاليته عند حضنه على درجة حرارة 60 م لمدة 60 دقيقة وانخفضت الفعالية انخفاضاً حاداً عند الحضن على 70 م لمدة 15 دقيقة وتثبطت عند درجة حرارة 80 – 100م.

تأثير بعض الايونات والمركبات الكلابية والمختزلة في ثباتيةالأنزيم

وجد من خلال النتائج ان كل منMn^{2+} وFe^{3+} وCa^{2+}لاتؤثر على الفعالية الإنزيمية عند تركيز 1 ملي مولاري بينما ازدادت الفعالية الانزيمية بنسب 115% و105% و110% على التوالي عند تركيز 5 ملي مولاريوتسبب النحاسCu^{2+}في تثبيط الإنزيم بنسبة 10% عند استعمال تركيز 1 ملي مولاري وازداد التثبيط للإنزيم عند تركيز 5 ملي مولاري وبنسبة 50% اما أيونات Mg^{2+} فقد زادت الفعالية الانزيمية بنسبة 110% عند تركيز1 ملي مولاري وازدادت الفعالية لتصل الى 130% عند تركيز 5 ملي مولاري ، ولم تظهركل من اليوريا و EDTA عند تركيز 1 ملي مولاريأي تأثير الا انهما ثبطا الفعالية بنسبة 30% و60% على التوالي عند تركيز 5 ملي مولاري . وعند استعمال0.1% (وزن/حجم) من مادة SDS قد ثبط 10% من الفعالية الأنزيمية.

هذا يطابق مع ما ذكره الباحثون إذ وجد Kimura وآخرون (14) أنإضافة1 ملي مولاري من الأيونات المعدنية Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Ag^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, M n^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, $A1^{3+}$, Fe^{3+}, Sn^{4+} يثبط الفعالية الأنزيمية

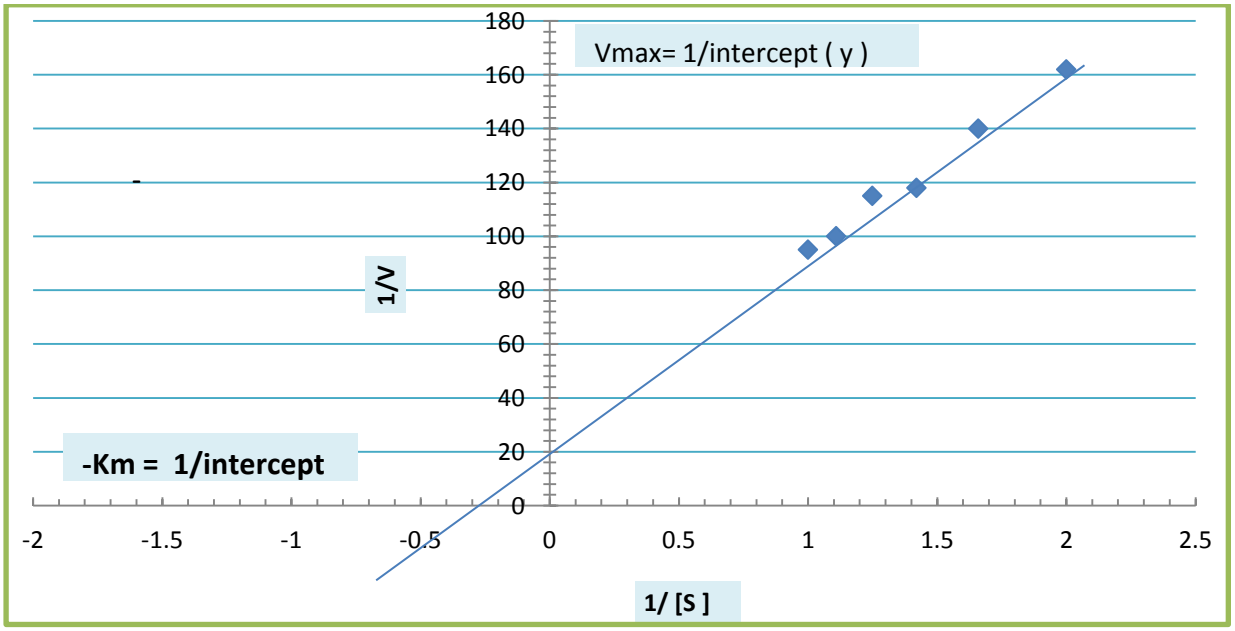
كما بين Konno و Tsumuki(17)إن حضن الأنزيم مع تركيز 1 ملي مولاري من الأيونات المعدنية Ca^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} , Ba^{2+} بتركيز 1 ملي مولاري لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 30م قد تسبب في انخفاض

الفعالية مقدار 17 – 54% إما Hg^{2+} فقد سبب تثبيطاً كلياً للفعالية ، إن سبب انخفاض الفعالية الأنزيمية للأنزيم أو تثبيطها يعود إلى تغليف المادة الخاضعة مما يمنع ارتباطها بالأنزيم او العكس اي تغليف الأنزيم أو المواقع الفعالة وبالتالي منع ارتباطه بالمادة الخاضعة (7).

كما وجد Thakur وآخرون (40) بأن فعالية أنزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي المنتج من العفن *Mucorcircinelloides*ITCC6025 قد ثبطت بنسبة 5–15%عند إضافة1ملي مولاري من الأيونات Mn^{2+} وCo^{2+}وMg^{2+}الى المحلول الانزيميبينما سبب الأيونانZn^{2+}و Fe^{3+} نقصان الفعالية بنسبة 27و31%على التوالي .

تعيين الثوابت الحركية للأنزيم :

أوضحت النتائج أن معدل قيم K_m قد بلغ 3.125% وتدل هذه القيمة على تراكيز المادة الأساس عندما تبلغ سرعة التفاعل نصف السرعة القصوى وتكون مؤشرا لمدى ألفة الإنزيم باتجاه المادة الخاضعة إذ كلما كانت قيمة K_m واطئة كلما كانت ألفة الإنزيم عالية للارتباط بالمادة الخاضعة (36) إما قيمة السرعة القصوى V_{max} فقد بلغت 0.043 وحدة/ملي مولاري .



شكل (6) منحنى لينويفر- بورك Lineweaver-Burk Reciprocal Plot لقياس الثوابت الحركية لأنزيم

أن تباين قيم الثوابت الحركية لا يعود إلى نوع الإنزيم ومصدره فحسب وإنما إلى ظروف تقدير الفعالية أيضا (عند استعمال الإنزيم من المصدر ذاته) كالدالة الحامضية ودرجة حرارة التفاعل

فضلا عن نوع المحلول الدارئ والقوة الأيونية مع الاختلاف في الطرائق المستعملة للحصول على قيم هذا الثابت.

البولي كالاكتيورونيز المنتج من العزلة المحلية (B_{36}) لبكتريا *B.megaterium*

عند مقارنة النتائج مع ما توصل إليه الباحثون وجد أن هناك تبايناً في قيم K_mو V_{max}تبعاًلاختلافظروف تقدير الفعالية كما ذكر أعلاه ، إذ استطاعNakagawa وآخرون (25) من دراسةK_mلأنزيم البولي كالاكتيورونيز من *Cystofilobasidiumcapitatum*باستعمال درجات حرارة مختلفة اذ بلغت قيمة K_m1.12 ملغم/مل عند درجة حرارة 45 م وبدأت بالتناقص عند خفض درجة الحرارة فبلغت 0.66 ملغم/مل عند درجة حرارة صفر مئوي.

قامLi وآخرون (21)بتقدير قيمة K_m لأنزيمات البولي كالاكتيورونيز من بكتريا *B. gibsonii* وكانت 1.2 ملغم/مل عند درجة حرارة 60 م و0.9 ملغم/مل عند درجة حرارة 55 م.

كذلك استطاع Jacob وآخرون (11) من حساب الثوابت الحركية K_m و V_{max} لأنزيم البولي كالاكتيورونيز ألمنتجَ مِن البكتريا الخيطية *Streptomyces lydicus* باستعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة 0.09–0.5% وكانا بواقع1.63 ملغم/مل و 677.8مايكرومول /دقيقة/ملغم على التوالي .

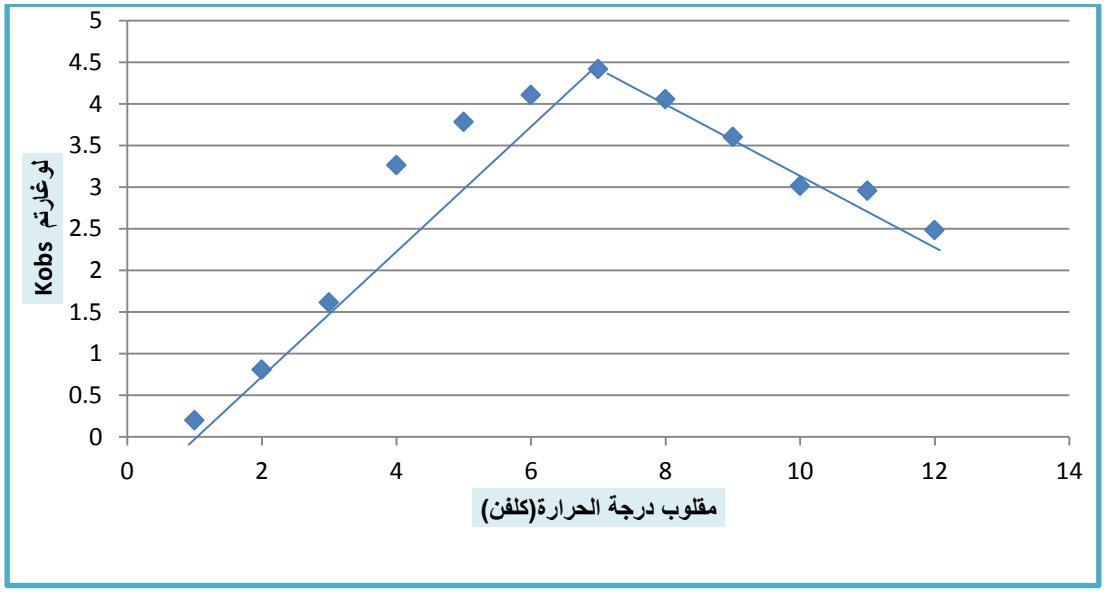
كما قامThakur وآخرون (40)بتقدير الثوابت الحركية K_m و V_{max} لأنزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي المنتج من العفن *Mucorcircinelloides*ITCC6025 وكانا 2.2ملي مولاري و 4.81وحدة/مل باستعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة 0.1 % و 0.5% وبطريقة Lineweaver-Burk Reciprocal Plot .

طاقة التنشيط لأنزيم البولي كالاكتيورونيز: Activation Energy of Polygalacturonase

يبين الشكل (7) العلاقة بين لوغارتم سرعة التفاعل لإنزيم البولي كالاكتيورونيز ومقلوب درجة الحرارة المطلقة (كلفن) طبقا لمعادلة ارينيوس وقد اتضح أن قيمة طاقة التنشيط للتفاعل الأنزيمي كانت 38.613 كيلو سعره/مول وتقع هذه القيمة ضمن مدى طاقة التنشيط لمعظم التفاعلات الأنزيمية والتي تتراوح بين (–2.5 168) كيلو سعره/مول .

كما احتسبت الطاقة اللازمة لمسخ الإنزيم وكانت 56.245كيلو سعره/مول وتعطي هذه القيمة فكرة عن مدى حساسية الإنزيم بدرجات الحرارة العالية فكلما كانت هذه القيمة عالية كان الإنزيم أكثر ثباتا اتجاه الحرارة والعكس صحيح وتتراوح الطاقة اللازمة لمسخ الإنزيم لمعظم التفاعلات الأنزيمات بين(40–150) كيلو سعره/مول.

وقد تباينت النتائج مع ما بينه Quiroga وآخرون (30) من إن طاقة التنشيط لأنزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من *Pycnoporussanguineus* هي 5.352 كيلو سعرة/مول .



شكل(7)منحنى ارينيوس لتقدير طاقة التنشيط لأنزيم البولي كالاكتيورونيز المنتج من العزلة *B.megaterium*(B_{36})

المصادر:

1. Aksöz , E.1990. Production of polygalacturonase by *Bacillus subtilis* cultured with waste and residues as carbon sources. Mikrobiyol. Bul.,24(3):262-271.
2. Crabb, W. D. and J. K. Shetty. 1999. Commodity scale production of sugar from starches. Current Microbiol., 2: 252 - 256.
3. Deshmukh, S. S. and V. Shankar.1996. Glucose isomerase from thermophilic *Streptomyces thermonitrificans*: Purification and characterization. Biotechnol. Appl. Biochem., 24: 65-72.
4. Di Pietro; A.; Roncero, M. and Isabel, G. 1996. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*.sp. lycopersici . FEMS. Microbiol. Lett.,145: 295-299.
5. Fanelli ,C.; M. G. Cacace and Cervone ,F.1978. Purification and Properties of Two Polygalacturonases from *Trichoderma koningii*. J. Gen.Microb.,104: 305-309.
6. Favela-Torres, E; T. Volke-Sepúlveda, and Viniegra-González ,G.2006.Production of hydrolytic depolymerizing pectinases. Food Technol. Biotechnol., 44 (2): 221–227.

Streptomyces lydicus .Bioresource Technol.,99:6697 – 6701.

12. Kapoor, M; Q. K. Beg; B. Bhushan; K. S. Dadhich and Hoondal, G. S.2000. Production and partial purification and characterization of athermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. Process Biochem.,36:467–473.
13. Kaur, G. ; S. Kumar and Satyanarayana , T . 2004 .Production, characterization and application of a thermo stable polygalacturonase of a thermo philicmould *Sporotrichum thermophile* Apinis. Bioresource. Technol .,94:239–243
14. Kimura , H.; F, Uchino and Mizushtma, S.1973. Properties of a Polygalacturonase Produced by *Acrocylindrium,*. J. of G. Microbiol.,74:127-137.
15. Kobayashi,S.; N. Higak; A. Suzumatsu; K. Sawada; H. Hagihara; S. Kawai and Ito, S.2001a. Purification and properties of a high molecular weight, alkalineexo-polygalacturonase from a strain of *Bacillus* . Enzyme Microb. Technol.,29:70 – 75.
7. Filho, E. X. F.; J. Puls, and Coughlan, M. P.1993.Biochemical characteristics of two endo–b–1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum.* J. Ind. Microbiol.,11:171–180.
8. Garfin, D. E. 1990. Purification Procedures. electrophoretic methods. In: Methods in Enzymology (ed. M. P. Deutscher, Vol 182, p:459. Academic Press, San Diego.)
9. Gewali, M. B.; J. Maharjan; S. Thapa and Shrestha, J. K.2007 .Studies on polygalacturonase from *Aspergllus flavu*s . Scientific World,5(5):12 -22.
10. Gupta, S.; M. Kapoor; K. K. Sharma; L. M. Nair and Kuhad, R. C.2008. Production and recovery of alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid - state fermentation using statistical approach .Bioresource Technol., 99:937 – 945.
11. Jacob , N.; C. AshaPoorna, and Prema, P.2008. Purification and partial characterization of polygalacturonase from

16. Koboyashi, T.; N. Higaki; N. Yajima; A. Suzumatsu; H. Haghihara and Kawai, H. 2001b. Purification and properties of agalacturonic acid releasingexo-polygalacturonase from a strain of *Bacillus* .Biosci. Biotechnol. Biochem., 65:842–847.

17. Konno, H. and H. Tsumuki . 1991 .Anexo-Polygalacturonase from rice shoots .Phytochem., 30(7):2115-2118.,

18. Kumar, S. S. and P. Palanivelu. 1999. Purification and characterization of an exoplolygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomy ceslanuginosus*. World. J. Microbiol. Biotechnol.,15:643–646.

19. Laemmli , U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterio phage T4. Nature, 227: 680–685.

20. Lehmacher , A. and H. Bisswanger. 1990. Isolation andcharacterization of an extremely thermo stable D-glucose/xyloseisomerase from *Thermus aquaticus* HB8. J. Gen. Microbiol., 136: 679-686.

21. Li , Z.; B. H. Jin; Z. Bai ; W. Xue and Li, H.2008. Purification and characterization of three alkaline endopolygalacturonases from a newly isolated *Bacillus gibsonii*. Chinese J. of Process Engineer,8(4):768 – 773.

22. Maciunska , J.; B. Czyz and Synowiecki , J.1998.Isolation and some properties of B-galactosidase from the thermophilic bacterium . FAO.

23. Mahmoud,Doaa. A. R.; A. Mahmoud,Abeer. A. and Gomaa, A.M.2008.Antagonistic activities of potato associated bacteria via theirproduction of hydrolytic enzymes with special reference topectinases . Res. J. Agri. Biol. Sci.,4(5):575-584.

24. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for terminationof reducing sugar. Anal. Chem., 31:426-428.

25. Nakagawa, T; T. Nagaoka; T. Miyaji and Tomizuka, N.2005.Cold–active polygalacturonases from psychrophilicbasidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum*strain PPY-1.Biosci.

30. Quiroga, E. N.; M. A. Sgariglia; C. F. Molina; D. A. Sampietro; R. J. Soberon; A. Marta and Vattuone, M. A.2009. Purification and characterization of anexopolygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*. Mycological. Research, 113:14 0 4 –1 4 1 0.

31. Reeds, G.1975.Enzymes in food processing . 2nd Edition , (Chapter 10) . Academic Press. New York. USA.

32. Rha, E.; H. J. Park; M. O. K. Kim; Y. R. Chung; C. Lee, and Kim, J. W.2001.Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea* . FEMS Microbiology Letters, 201: 105-109.

33. Sakamoto, T.; E. Bonnin; B. Quemener and Thibault, J. F.2002. Purification and characterization of two exo-polygalacturonasesfrom *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan . Biochimicael. Biophysica. Acta, 1572:10– 18

34. Sawada, K.; A. Suzumatsu; T. Kobayashi and Ito, S.2001. Molecular cloning andsequencing Biotechnol. Biochem.,69(2):418 – 421.

26. Nasser, N.; V. E. Shevchik and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.1999 .Analysis of three clustered polygalacturonase genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937 revealed an anti-repressor function for the PecS regulator. Molec. Microbiol., 34(4): 641 – 650.

27. Odeniyi, O. A; A. A. Onilude and Ayodele , M. A.2009. Production characteristics and properties of cellulose, polygalacturonase by *Bacillus coagulans*strain from a fermenting palm-fruit industrialresidue. Afr. J. of Microbiol. Res.,3 (8):407-417.

28. Parisot, J.; V. Langlois; V. Sakanyan and Rabiller, C.2003.Cloning expression and characterization of a thermo stable exopolygalacturonase from *Thermoto gamaritima*. Carbohydr. Res.338: 1333–1337.

29. Price, N. and L. Stevens.1989.Fundamentals of Enzymology . 2ndEdition, .Oxford University press, Oxford, UK.

of the gene encoding an exopolygalacturonase of a *Bacillus* isolate and properties of its recombinant enzyme. Biochimicael. Biophysica. Acta,1568:162–170.

35. Schell, M. A.; D. P. Roberts and Denny, T. P.1988.Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonaseencoded by pglA and Its involvement in phytopathogenicity. J. of Bactriol., 170 (10):4501–4508.
36. Segel, I.H.1976.Biochemical calculations.2nd Edition,John and Sons. Inc. New York. USA.
37. Soares, M. M. C.N.; R. da Silva, and Gomes ,E. 1999 . Screening of bacterial strains for pectinolytic activity : characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. Revistade Microbiologia., 30:299-303.
38. Tari, C. ; N. Dogan and Gogus , N. 2008 . Biochemical andthermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. Food Chemistry, 111:824-829.
39. Taşkın,E . and E. Stratilová. 2008.Polygalacturonases produced under solid state and submerged fermentation conditions by two strains of *Aspergillus foetidus*. Tur. J. of Biochem.,33(4):190–196.
40. Thakur, A.; R. Pahwa; S. Singh and Gupta, R.2010.Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025 .Enzyme Research. Article ID 170549,7 pages.

Characterization of Purified Polygalacturonase Produced by The Local Isolate (B_{36}) of *Bacillus megaterium*

Amal Kadhim Ghadban AL -Asady ; Kithar Rasheed Majeed and *Salah NajiAzize Al-Khieun

Department of Food Science - College of Agriculture - University of Basrah – Republic of Iraq

Abstract

Characterization of the purified polygalacturonase which was produced by the local isolate (B_{36}) of *Bacillus megaterium* was studied. The isolate was gave maximum enzymatic activity by using submerged cultures. The molecular weight of the enzyme was 65kdalton by using SDS-PAGE, the optimal pH of the enzyme activity was 7.0, and the enzyme activity was 1639.256 unit/ml, the optimal temperature of the enzyme activity was 50C, and the activity was 1619.673 unit/ml.

The pH of polygalacturonase stability was between (6.5-7.5) but the thermo stability of the enzyme was between (0-50)ºC. The effect of some ions, chelating compounds and reducing agents onenzyme stability was also studied, Mn^{+2}, Fe^{+3} and Ca^{+2} were increased the enzymatic activity to 115%, 105% and 110% respectively at the concentration 5mM, but Cu^{+2} inhibited the enzymatic activity to 10% at 1mM and the inhibition was increased to 50% at 5mM, while Mg^{+2} increased the enzymatic activity to 110% at 1mM, and 130% at 5mM.

The urea and EDTA did not effect on activity at 1mM but inhibited the activity to 30% and 60% respectively at 5mM, also SDS inhibited the activity at 0.1%(wt/v). The kinetics constants of the enzyme were 3.125%for K_m and 0.043 unit/ml for V_{max}**.**The activation energy for the enzymatic reaction was 38.613 kcal/mole.

Key words: *Bacillus megaterium*, polygalacturonase, molecular weight and kinetic constants

*****Part of MSc thesis of the third author