تنقية وتوصيف إنزيم *Endoglucanase* من العزلة المحلية *Aspergillus flavus*

عصام فاضل الجميلي** فيحاء مقداد خليل *

استلام البحث 30،ايار ، 2012
قبول النشر 9، كانون الاول، 2012

الخلاصة

تمت تنقية انزيم الاندوكلوكاينيز endoglucanase المنتج من العزلة المحلية *Aspergillus flavus* بإستعمال الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 25 % ثم التبادل الايوني بإستعمال المبادل الأيوني DEAE -Bio gel اذ بلغت الحصيلة الانزيمية 51.32 %وبفعالية نوعية 377.35 وحدة / ملغرام بروتين ، بعدها اجريت خطوة الترشيح الهلامي بإستعمال هلام Sepharose- 6B بفعالية نوعية بلغت 400 وحدة/ملغرام بروتين والحصيلة انزيمية 48 % . درست بعض الخصائص المهمة للانزيم المنقى وظهر إنَّ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية endoglucanase هو 7 ، في حين كان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم هو 4.5 . واظهر الانزيم ثباتا حراريا عند درجة حرارة 40 مْ مدّة ساعة وكانت درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم هي 40 مْ .

الكلمات المفتاحية: Endoglucanase , *Aspergillus flavus* , purification , characterization

المقدمة

تحتل أنزيمات السليليز Cellulases بوصفها مجموعة من الانزيمات القادرة على تحليل الاصرة الكلايكوسايدية O-glycoside Hydrolase (EC 3.2.1) وهي مجموعة انزيمية واسعة الانتشار قادرة على تحليل الاصرة الكلايكوسايدية بين اثنين او اكثر من الكاربوهيدرات او بين جزء كاربوهيدراتي وجزء غير كاربوهيدراتي[1]. يعد انزيم الاندوكلوكاينيز Endoglucanases (EG,1,4-B-D-glucan glucanohydrolase: EC3-2-1-4) إحد اصناف انزيمات السليليز التي تنتج من الفطريات الخيطية الرمية Saprophytic Filamentous Fungi التي يكون لها الفعل التحللي للسليلوز الى كلوكوز [2]. وتستعمل الانزيمات المحللة المنتجة من الفطر *Aspergillus flavus* ومن الفطريات الاخرى في الصناعات الغذائية والصيدلانية وصناعة النسيج والورق والبيرة فضلا عن صناعات كيميائية اخرى [3]. حدثت تطورات كبيرة على مستوى المواد المستعملة والأجهزة مما سهل عملية فصل وتنقية البروتينات بشكل عام والأنزيمات بشكل خاص . إذ تتبع طرائق عديدة لانجاز عملية الفصل والتنقية تشمل طرائق الترسيب بالأملاح خصوصا كبريتات الامونيوم وكذلك الترسيب بالكحول والاسيتون . فقد استعملت العاني [4] الترسيب بكبريتات الامونيوم لترسيب إنزيم Hydrocellulase بنسبة اشباع 40%. واتبعتها خطوة الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-200 تلتها طريقة كروموتوغرافي التبادل ألايوني بإستعمال المبادل DEAE Sephadex A50 لفصل السليليزات المنتجة من الـ *Aspergillius* . إما Immanuel [5] فقد استعمل طريقة الترسيب بالكحول بنسبة اشباع 50% وكذلك استعمل Gueguen وجماعته [6] طريقة التبادل الايوني بإستعمال المبادل Q-sepharose تلاها الترشيح الهلامي بإستعمال هلام Sephacryl S-300 لتنقية β-glucosidase المنتج من *Leuconostoc mesenteroides* .

بيّن Witkowska [7] بأنّ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية endoglucanase المنتج من *Trichoderma viride* يقع ضمن المدى الهيدروجيني (5 -5.5) . كما اوضح Nipa وجماعته [8] ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية CMCase المنتج من *Aspergillus humicola* كان 5.5 . تختلف قيم الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيمات cellulases بأختلاف مصادرها ونوعياتها. كما ذكر Chen وجماعته [9] انّ الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات CMCase المنتج من *Sinohizobium fredii* يقع ضمن المدى الهيدروجيني 6 – 9 .

تختلف درجات الحرارة المثلى لفعالية السليليز بأختلاف نوع الكائن المجهري المنتج . بيّن Soni وجماعته [10] بأنّ درجة الحرارة 60 م ْ هي درجة الحرارة المثلى لفعالية endoglucanase المنتج من *Aspergillus terreus* . كما اوضح Akinyosoy وجماعته [11] بأنّ درجة الحرارة المثلى لفعالية cellulase

**معهد الهندسة الوراثية والتقينات الاحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد
* قسم الكيمياء / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد

المنتج من *Aspergillus niger* هي 45 مْ . أشار Sakamoto وجماعته [12]الى انّ درجة الحرارة المثلى لثبات Hydrocellulase المنتج من *Aspergillus aculeatus* تقع ضمن المدى الحراري (30 – 50) مْ . تهدف الدراسة الحالية الى أستعمال عزلة محلية من نوع *Aspergillus niger* لأنتاج انزيم endoglucanase (Carboxymethyl cellulase) وتنقيته باستعمال طرائق الكروموتوغرافيا المختلفة وتوصيفه .

المواد وطرائق العمل:

تم استعمال العزلة المحلية من الفطر *Aspergillus flavus* المعزولة من عينات التربة والمشخصة من الدكتور خالد عبدالرزاق حبيب –جامعة بغداد كلية العلوم للبنات – قسم علوم الحياة وفقا للمفاتيح التصنيفية المذكورة في [13] باستعمال المجهر الضوئي المركب، لانتاج انزيم الاندوكلوكاينيز وبطريقة تخمرات الحالة السائلة ، إذ تمت تنميتها على الوسط الغذائي الانتاجي czapek dox المحور (وذلك باستبدال المصدر الكاربوني) المتكون من 2% كاربوكسي مثيل سليلوز (CMC) وفوسفات الامونيوم الثنائية بتركيز 0.2% وكبريتات الامونيوم المائية 0.5% وفوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين 1% و كلوريد البوتاسيوم 0.5% وكبريتات الحديد المائية 0.01% وبرقم هيدروجيني 5 ودرجة حرارة 30 م وحجم لقاح 10^6 بوغ /100 مليليتر ولمدة 8 ايام. تم أستخلاص الإنزيم وذلك بنبذه مركزياً بسرعة xg 5000 مدّة 20 دقيقة في درجة حرارة 4 م . بعدها قدرت كمية البروتين بطريقة Bradford,1976 [14]. اما الفعالية الانزيمية فقدرت على وفق طريقة Mandels *et al.*,1976 [15] وذلك بحضن 0.1 مليليتر من الانزيم مع 0.9 مليليترمن مادة التفاعل كاربوكسي مثيل سليلوز (CMC) بتركيز (1%) ، وعرفت الفعالية الانزيمية بانها كمية الانزيم اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من السكريات المختزلـــــة (كلوكوز) في الساعة الواحدة تحت ظروف التجربة.

تنقية الانزيم :-

الترسيب باملاح كبريتات الامونيوم

اجريت عملية ترسيب لإنزيم endoglucanase وذلك بترسيبه بكبريتات الامونيوم بنسب اشباع بلغت 0-25% و25-50% و50-75 % ثمّ اجري نبذ مركزي مبرد بسرعة 10000 دورة/دقيقة ، وذوب الراسب باستعمال دارئ الفوسفات 0.01 مولار ورقم هيدروجيني 6 وقّدرتركيز البروتين والفعالية الانزيمية كما ذكر سابقا .

كروموتوغرافيا التبادل الايوني باستعمال المبادل (DEAE- Bio gel)

حضّر المبادل الايوني وفق تعليمات الشركة المجهزة **Bio Red** وطبقا للطريقة الموصوفة من Kaur وجماعته[16]واضيف محلول الانزيم من الخطوة السابق بعد عملية الديلزه الى عمود المبادل بابعاد (10×1.5) سم الذي سبق موازنته بداري فوسفات الصوديوم بتركيز 0.01 مولار ورقم هيدروجيني 7 ، استرددت البروتينات المرتبطة بالعمود باستعمال دارئ الفوسفات بتركيز 0.01 مولار ورقم هيدروجيني 7 بتدرج ملحي كلوريد الصوديوم(0-1) مولار وجمعت الاجزاء بواقع 3 مليليتر / جزء و بسرعة جريان 30 مليليتر/ساعة . وتمّت متابعة تركيز البروتين في الاجزاء المتجمعة بقراءة الامتصاص على طول موجي 280 نانوميتر. تم تقدير الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في الاجزاء المنفصلة.

كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي Sepharose- 6B

تمت اضافة الانزيم المركز من الخطوة السابقة الى عمود الترشيح الهلامي السيفاروز- 6B المحضرعلى وفق تعليمات الشركة المجهزة Pharmacia Fine Chemical بابعاد (74 × 1.5) سم طبقا للطريقة الموصوفة من Bakareوجماعته[17]، بسرعة جريان 60 مليليتر / ساعة واسترد الانزيم بوساطة محلول دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7 ، بعدها تم قياس الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في الاجزاء المنفصلة.اضيف بعد ذلك محاليل البروتينات القياسية واضيفت الى سطح الهلام لكل منها بشكل مستقل واستردت في ظروف الاسترداد نفسها وتمت متابعة تركيز البروتين في الاجزاء المفصولة وتحديد قمة كل بروتين وقياس (Ve) لكل منها لغرض استعمالها في تقدير الوزن الجزيئي لـ Endoglucanase.

دراسة بعض صفات إنزيم Endoglucanase:

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية:

تمّ قياس فعالية الإنزيم عند قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني هي (4 و 4.5 و 5 و 5.5 و 6 و 6.5 و 7 و7.5 و 8) وذلك بإستعمال محلول دارئ يحتوي على السترات والفوسفات وبتركيز 0.1 مولاري ، ثم مزج كل من هذه المحاليل مع محلول مادة التفاعل (CMC) وحضنت بدرجة حرارة 30 م لمدة 10 دقائق وقدرت الفعالية الانزيمية.

الرقم الهيدروجيني الامثل للثبات:

تمّ حضن الإنزيم مع الدوارئ السترات والفوسفات بتركيز 0.1 مولار وبالارقام الهيدروجيني (4 و 4.5 و 5 و 5.5 و 6 و 6.5 و 7 و7.5 و 8) مدّة ساعة في أنابيب اختبار

ووضعت هذه الأنابيب في حمام مائي بدرجة 35 °م ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي جرى بعدها تقدير الفعالية المتبقية للأنزيم .

الحرارة المثلى لفعالية الانزيم:

تمّ حضن الإنزيم مع المادة الفعالة كاربوكسي مثيل سليلوز (1%) وعند الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية بدرجات حرارة مختلفة وهي (60,55,50,45,40,35) °م مدّة ساعة بعدها تمّ تقدير الفعالية الانزيمية .

الحرارة المثلى لثبات الانزيم

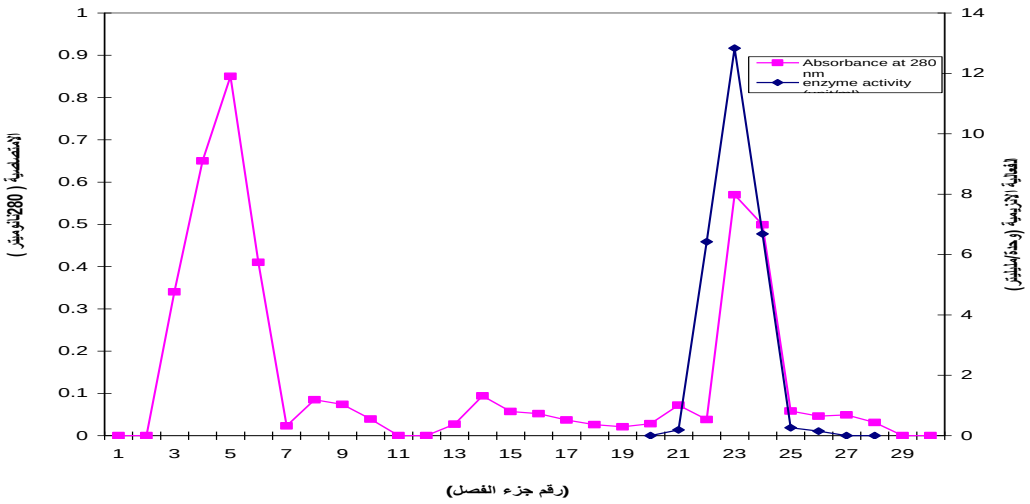
تمّ حضن الإنزيم بدرجات حرارة مختلفة وهي (60,55,50,45,40,35) °م مدّة ساعة بعدها بردت الانابيب وتمّ قياس الفعالية المتبقية للانزيم .

النتائج والمناقشة:

تم انتاج انزيم endoglucanase من العزلة المحلية *Aspergillus flavus* بأستعمال وسط الإنتاج السائل (czapek dox) بعد مرور 8 ايام حضن وتم فصله من المزرعة الفطرية بوساطة النبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4 مْ وكانت الفعالية النوعية للمستخلص الخام 53.57 وحدة/ مليغرام بروتين.

إستعملت كبريتات الامونيوم بنسب اشباع مختلفة لترسيب الانزيم من المستخلص الخام ، وتم تعيين نسبة الاشباع 0 - 25% لترسيب الانزيم الخام الذي اعطى اعلى فعالية نوعية بلغت 64.04 وحدة/مليغرام بروتين جدول (1)، اما بقية نسب الاشباع وهي - 50 25% و 50 - 75 % فلم تلاحظ اي فعالية انزيمية فيها ، بعدها تمت اذابة الراسب المستحصل عليه بكمية من المحلول المنظم (دارئ الفوسفات بتركيز 0.01 مولار ورقم هيدروجيني 7) تلتها عملية ديلزة للراسب تجاه المحلول الدارئ ليوم كامل بغية التخلص من الاملاح التي قد تؤثر في الفعالية الانزيمية .

مرر الانزيم المديلز على عمود المبادل الايوني DEAE –Biogel وهو من المبادلات السالبة الذي سبق موازنته بمحلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.01 مولاري ورقم هيدروجيني 6 ، تم قياس الامتصاصية لاجزاء الغسل على طول موجي 280 نانوميتر وعند وصول الامتصاصية الى الخط الصفري (Base line) اجريت بعد ذلك عملية استرداد البروتينات المرتبطة بالمبادل باستعمال محلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.01 مولاري ورقم هيدروجيني 6 بتدرج ملحي من كلوريد الصوديوم 0-1 مولار. يبين الشكل (1) ظهور قمتين بروتينيتين في مرحلة الغسل، وانفصلت ثلاث قمم بروتينية عند استرداد البروتينات المرتبطة بأستعمال محلول كلوريد الصوديوم مع ظهور الفعالية الانزيمية عند الاجزاء المستردة (22-24) مما يدل على انّ انزيم endoglucanase المنتج من العزلة المحلية يحمل شحنة سالبة. جمعت الاجزاء التي تمتلك فعالية انزيمية وبلغت الفعالية النوعية 377.35 وحدة/مليغرام بروتين وبعدد مرات تنقية 7.04 وبحصيلة انزيمية 51.32 % (جدول 1).استعمل Kaur وجماعته [16] في تنقية انزيم endoglucanase المنتج من *Melanocarpus sp.* المبادل الايوني DEAE-Sepharose وقد بلغت الفعالية النوعية 7.48 وحدة/مليغرام بروتين وبحصيلة انزيمية 30.15 %، كما استطاع Bakare وجماعته [17] من تنقية انزيم السليليز المنتج من بكتريا *Psedomonas fluorescens* المطفرة بأستعمال المبادل الايوني DEAE-Sephadex A-50 بحصيلة انزيمية بلغت 44% وفعالية نوعية 3.15 وحدة / مليغرام بروتين.

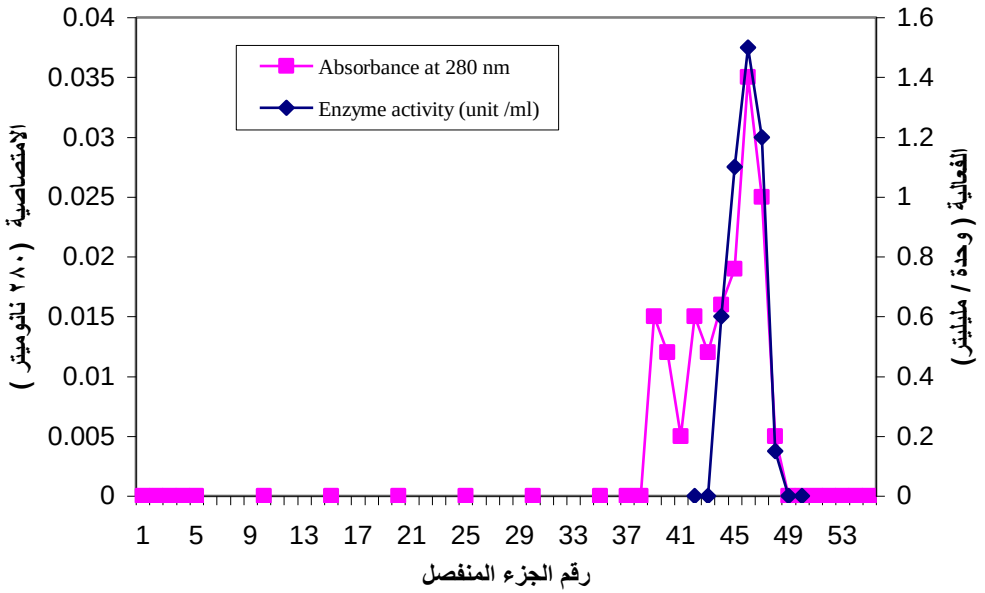


االشكل (1) كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية endoglucanase المستخلص من العزالة المحلية *A.flavus* بأستعمال عمود المبادل الايوني (1.5×10)سم DEAE – Bio gel الذي تمت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.01 مولاري ورقم هيدروجيني (7)، ثم الاسترداد بمحلول الدارئ نفسه مع تدرج ملح كلوريد الصوديوم من (0-1) مولاري وبسرعه جريان (30) ملليلتر/ساعة (حجم الجزء المسترد = (3) ملليلتر).

جدول (1) :خطوات تنقية انزيم Endoglucanase المنتج من العزلة المحلية *Aspergillus flavus*

خطوة التنقية	الحجم (ملليلتر)	الفعالية (وحدة/ملليلتر)	البروتين (ملغيرام/ملليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة/مليغرام بروتين)	االفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الأنزيمية (%)
الأنزيم الخام	50	4.50	0.084	53.57	225	1	100
كبريتات الأمونيوم نسبة اشباع 25%	10	16.01	0.25	64.04	160.10	1.2	71.15
التبادل الايوني باستعمال المبادل الايوني DEAE-Biogel	9	12.83	0.034	377.35	115.47	7.04	51.32
الترشيح الهلامي باستعمال عمود هلام السيفاروز 6B	15	7.20	0.018	400	108	7.5	48.00

مرر المحلول الناتج من الخطوة السابقة (التبادل الايوني) بعد تركيزه (بوساطة اكياس الديلزة ضد السكروز) في هلام Sepharose-6B) ، لوحظ وجود ثلاث قمم بروتينية عند قياسها على طول موجي 280 نانوميتروواحدة منها فقط تمتلك فعالية انزيمية تركزت في الاجزاء (45-48) الشكل (2) ، التي تم تجميعها وتركيزها وكانت الفعالية النوعية لها 400 وحدة/ملغيرام بروتين وبعدد مرات تنقية 7.5 وبحصيلة انزيمية 48 % .من خلال النتائج يظهر بأنّ هنالك كفاءة عالية في تنقية الانزيم بالطريقة الحالية وذلك للتخلص من اكبر عدد من البروتينات غير المرغوب فيها وهذا واضح من ارتفاع قيمة الفعالية النوعية التي تعد مؤشراً على نقاوة الانزيم .إستعمل Bakare وجماعته [17] هلام Sephadex G-100 لتنقية انزيم السليليز من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* بفعالية نوعية بلغت 6.77 وحدة/ملغيرام بروتين وحصيلة انزيمية 19%.

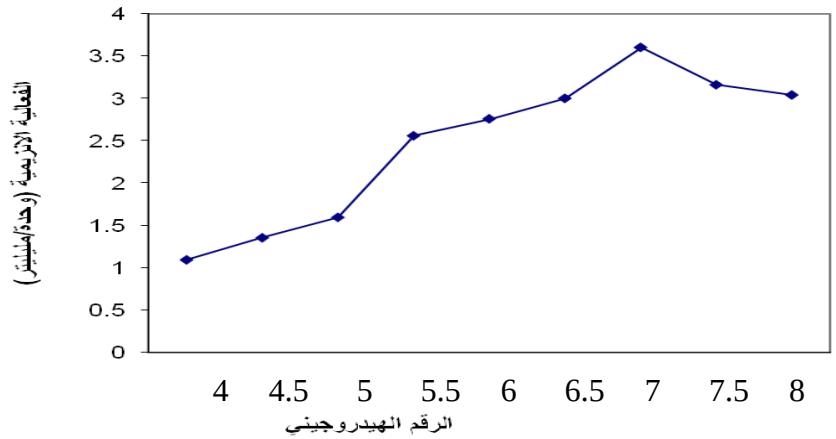


شكل (2) : الترشيح الهلامي لتنقية endoglucanase المستخلص من العزلة المحلية *A. flavus* باستعمال عمود هلام السيفاروز 6B بابعاد (74 × 1.5) سم الذي تمت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات 2.0 مولار ورقم هيدروجيني (8) ، بسرعة جريان 30 مليليتر / ساعة (حجم الجزء المسترد =5 مليليتر) .

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية الانزيمية

يلاحظ منّ الشكل (3) انّ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم endoglucanase كان 7 ويلاحظ الانخفاض التدريجي للفعالية الانزيمية عند الارتفاع والانخفاض عن الرقم الهيدروجيني 7.0 .

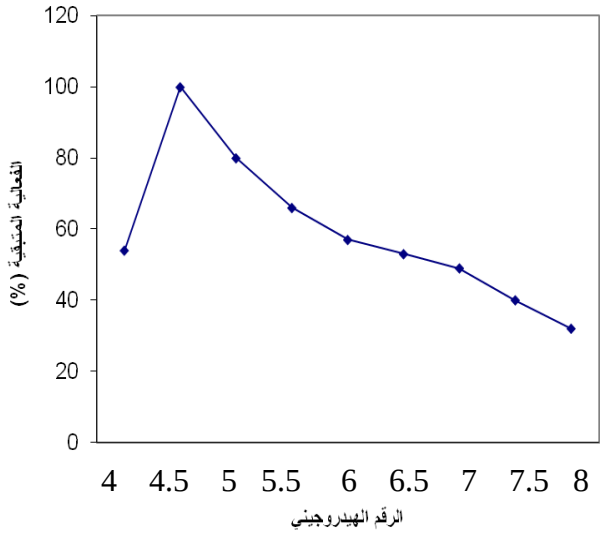
اوضح Immanuel وجماعته [5] انّ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم السليليز المنتج من *Aspergillus niger* هو 7 وهذا مايتفق مع النتيجة التي تم الحصول عليها في هذه التجربة. لقد بين Voget وجماعته [18] أنّ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم السليليز كان 6.5 بينما كان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية السليليز المنتج من *Alternaria alternata* المطفرة يقع ضمن المدى (5 -6) امّا انزيم β-glucosidase المنتج من الكائن نفسه فكان امثل رقم هيدروجيني لفعاليته يقع ضمن المدى 5-.45 [19] .وقد ذكر Akibaوجماعته [20] أن أمثل رقم هيدروجيني لفعالية انزيم CMCase المنتج من *A.niger* كان ما بين 6 - 7 .ولقد بيّن Coral وجماعته [21] ظهور قمتين للفعالية الانزيمية لانزيم CMCase المنتج من *A.niger z10* عند الارقام الهيدروجينية 4.5 و7.5.وكذلك ذكر McCleary [22] انّ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم CMCase المنتج من *A.niger* يقع بين 4 - 4.5 .اما Chen وجماعته [9] فقد بينوا انّ امثل رقم هيدروجيني لفعالية انزيم CMCase المنتج من *Sinorhizobium fredii* كان 7 .وكذلك بين Parry وجماعته [23] انّ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم CMCase المنتج من *Aspergillus fumigatus* يقع ضمن المدى 6 - 7 .كما بيّن Nipa وجماعته [8] انّ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم CMCase المنتج من *Aspergillus humicola* كان 5.5.



الشكل (3) تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم endoglucanase المنتج من الفطر *A.flavus* .

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل للثبات الانزيمي :

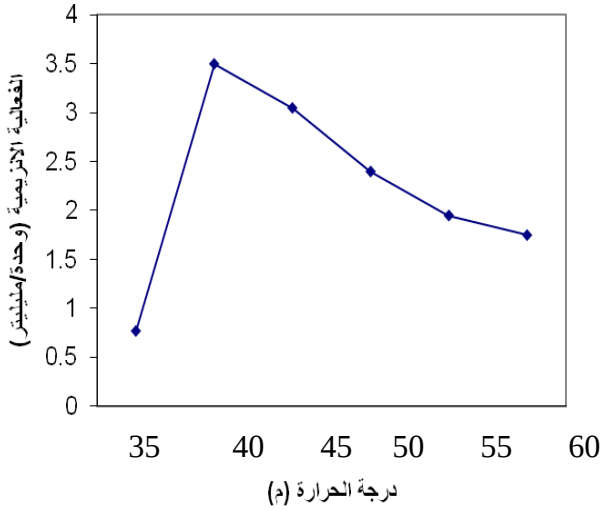
منّ الصفات المهمة جداً في تحديد ظروف حفظ الانزيم مدّة طويلة هو الرقم الهيدروجيني الامثل للثبات،اذ يلاحظ منّ الشكل (4) الذي يمثل منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم endoglucanase ،انّ الرقم الهيدروجيني الامثل هو4.5 بينما احتفظ الانزيم بـ 49.33% من فعاليته في الرقم الهيدروجيني 7 اما في الرقم الهيدروجيني القاعدي 8 فقد احتفظ الانزيم بـ 32% من فعاليته ، من هذا يتضح انّ الانزيم يظهر ثباتاً واضحاً في الاوساط الحامضية عنه في الاوساط المتعادلة والقاعدية إذ تتاثر ثباتية الانزيم سلبياً. تختلف السليليزات المنتجة من الاحياء المجهرية في مدى ثباتها تجاه الارقام الهيدروجينية بأختلاف السلالات المنتجة،اذ يلاحظ انّ الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم CMCase المنتج من *Sinohizobium fredii* يقع ضمن المدى 6 - 9 ولكن كانت اعلى ثباتية لفعالية الانزيم عند الرقم 7 اذ احتفظ ب 75 % من الفعالية الانزيمية [9] .وكذلك ذكر parry وجماعته [23] انّ الرقم الهيدروجيني الامثل لثباتية انزيم endoglucanase المنتج منّ *Aspergillus fumigatus* يقع في المدى من 4.5 -7.5 عند حضن الانزيم بدرجة حرارة 50 مْ ،وهذا قد يعود الى وجود اثنين من الانزيمات المتماثلة (Two isoenzymes) .بينما ذكر Mudau وجماعته [24] انّ المدى الهيدروجيني لثبات انزيم β-1,4-mannanase المنتج منّ *Scopulariopsis candida* كان يتراوح من 5 - 6.5 .



الشكل (4) تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم endoglucanase المنتج من الفطر *A.flavus* .

تحديد درجة الحرارة المثلى للفعالية :

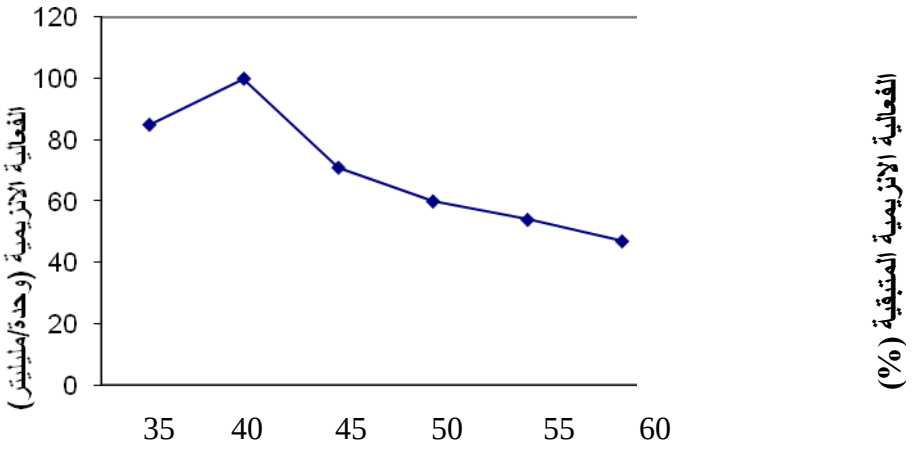
تتفاوت فعالية الإنزيمات تفاوتاً عاماً تجاه التغيرات في درجات الحرارة اي انّ درجة الحرارة تؤثر في زيادة الفعالية الانزيمية اوانخفاضها .اذ تمّ في هذه الدراسة تحديد مدى تأثير درجة الحرارة في الفعالية الإنزيمية لحضن الانزيم مع المادة الاساس (CMC) وعند الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية الإنزيمية بدرجات حرارية مختلفة مدّة ساعة بعدها تم قياس الفعالية الإنزيمية للنماذج المختلفة .يتضح من الشكل (5) انّ اعلى فعالية للانزيم كانت عند درجة الحرارة 40 مْ ،ولقد ذكر Chen وجماعته [9] انّ درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم CMCase المنتج من *Sinorhizobium fredii* كانت 35 مْ .بينما كانت امثل درجة حرارة لفعالية انزيم CMCase المنتج من *Aspergillus niger z10* هي 40 مْ [21] .ولقد بينAsad وجماعته [25] انّ درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم endoglucanase المنتج من *Neurospora sitophila* كانت 50 مْ. اما Bakare وجماعته [17] فقد بينوا انّ اعلى فعالية لانزيم السليليز المنتج من *Pseudomonas flurescens* كانت عند درجة حرارة 35 مْ .في حين بيّن Mudau وجماعته [24] انّ امثل درجة حرارة لفعالية انزيم B- mannanase 1,4- المنتج من *Scopulariopsis candida* كانت 50 مْ .اما Soni وجماعته [10] فقد بينوا انّ درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم endoglucanase المعزول من *Aspergillus terreus* كانت 60 مْ .بيّن Kotchoni وجماعته [26] ان امثل درجة حرارة لفعالية انزيم السليليز المنتج من *Bacillus BPCRI6 pumilus* كانت 50 مْ .



الشكل (5) تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم endoglucanase المنتج من الفطر *A.flavus*.

تحديد درجة الحرارة المثلى للثبات الانزيمي :

إنّ درجة الحرارة المثلى للثبات الانزيمي هي تلك الدرجة التي يحتفظ بها الانزيم بفعاليته ونشاطه عن غيرها من الدرجات التي قد تؤثر سلبا في نشاط الانزيم وفي ضوء ذلك يتم اختيار درجات الحرارة الملائمة لإستعمال الانزيم في التطبيقات العملية .يلاحظ منّ الشكل (6) الذي يمثل تحديد درجة الحرارة المثلى للثبات الانزيمي لانزيم endoglucanase انّ درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم كانت 40 مْ ، وقد احتفظ بـ 60 % من فعاليته بدرجة حرارة 50 مْ . اما في درجة الحرارة 60 مْ فقد احتفظ الانزيم بـ 47.14 % من فعاليته مما يدل على انه من الانزيمات غير المتحملة للحرارة وان فعالية وثبات الانزيم هي نفسها . ولقد تباينت النتائج فيما يتعلق بدرجة الحرارة المثلى للثبات الانزيمي فقد بيّن Voget وجماعته [18] انّ امثل درجة حرارة لثبات انزيم السليليز كانت 45 مْ بينما احتفظ بـ 76 % من فعاليته بدرجة حرارة 30 مْ واحتفظ بـ 89 % من فعاليته بدرجة حرارة 50 مْ .كذلك بيّن Nipa وجماعته [8] انّ درجة الحرارة المثلى لثبات انزيم CMCase المنتج من *Aspergillus humicola* كانت 40 مْ ، بينما احتفظ الانزيم بـ 82.8 % من فعاليته بدرجة حرارة50 مْ .



الشكل (6) تحديد درجة الحرارة المثلى لثبات انزيم endoglucanase المنتج من الفطر *A.flavus* .

المصادر:

1.Bourne,Y. and Henrissat,B. 2001 Glycosid hydrolases and glycosyl transferases : families and functional modules curr .Opin Struct . Boil . 11(5):593-600.

2. Teeri , T. 1997 .Crystalline Cellulose degrededation new insight into the function of cellobio-hydrolases. Tibtech .15(5):160-167 .

3.Sumanth, A. Szakacs, G. and Pandey, A. 2005 . Comparative evalution of neutral Protease production by ***Aspergillus oryzae*** in submerged and SSF, Process. Biochem. 40(8): 2689-2694.

4. العاني ، اسوان حمد الله عبود 2005 . انتاج السليوليزات من *Aspergillus sp.* المعزول محليا ودراسة بعض خصائصها واستعمالاتها التطبيقية . اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد .

5. Immanuel,G., Bhagarath,A.M.C., Raj,L.P., Esakkiraj,P. Palavesam,A. 2007 . Production and purification of cellulase by ***Aspergillus niger*** and ***Aspergillus Fumigatus*** fermented in coir waste and saw dust . The Int. J Microbiol . 3(1):1937 – 8289.

6. Gueguen,Y.;Chemardin,P.; Labrot, P.;Arnaud,A. And Galzy,P. 1997 . Purification and characteriztion of an intracellular B-glucosidase from anew Strain of ***Leuconostoc mesentroides*** isolated fron cassava .Journal of Applied Microbiology .82(4):-469 – 476 .

7. Witkowska , D. 1990 . Isolation and characterization of cellulases from culture filtrate of ***Trichoderma viride*** C-1.Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej Wroclawiu Technologia . (Poland) . 184: P.255 – 266.

8. Nipa, N.M. , Sultana, S. and Hakim, A.M. 2006 . Induction of cellulase bios-Ymthesis by cellobiose octaacetate in ***Aspergillus humicola*** .Bangladesh.J. Microbio. 23(2): 174 – 176 .

9. Chen,J.P.; Wei, C.T.; chang ,T.Y. and Lin ,P.L. 2004 . Purification and characterization of Carboxmethyl cellulose from ***Sinorhizobium fredii.***Botanical Bulletin of Academia Sinica .45(2):111-118 .

10. Soni , R. , Nazir , A. , Chadha , S. B. and Saini , S. H. 2008 . Novel sources of fungal cellulases for efficient deinking of composite paper waste . Bioresources . 3(1): 234 – 246 .

11. Akinyosoye , F.A. , Arotupin , D.J. and Akinyanju , J.A. 1995 . Cellulolytic activity at afresh isolate

of ***Aspergillus niger*** from sawdust . Bioscience Research Communications .7: 25 – 29.

12. Sakamoto , R.,M. And Murao, S. 1984 . Enzymatic properties of Hydrocellulase from *Aspergillus aculeatus* . *J. Ferment* . *Technol.*, 62(6):561 – 567.

13.Harrigan,W.F. and McCance,M.E. 1976 .Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. London, NewYork.Academic Press.

14. Bradford, M. 1976 . A rapid and sensitive method for the quantitation of Microgram quantities of protein utilizing the principle protein. Analytical Biochemistry. 72(1-2): 248 – 254.

15. Mandels,M., Andreotii,Roche,C. 1976 . Measurment of saccharifying cellulase . Biotechnol. Bioeng. Symp. 6:21 – 23.

16. Kaur ,J., Chadha,S.B., Kumar, A.B., Kaur, S.G., and Saini, S.H. 2007 Purification and characterization of B-glucosidase from ***Melamocarbus sp***. MTCC 3922. Elect. J. Biotechnol. .10(2): 260 – 270 .

17. Bakare,K.M. Adewale,O.I., Ajayi,A. Shonukan, O.O. 2005 Purification and Characterization of cellulase from the wild –type and two improved mutants of ***Pseudomonas fluorescens*** .African journal of Biotechnology .4(9):898 - 904.

18. Voget. S. , Steele. L.H. And Streit, R.W. 2006 . Characterization of ametagenome - derived halotolerant cellulase. J. Biotechnol. 126(1): 26 – 36.

19. Macris, B.J. 1984 . Production and characterization of cellulase and B-glucosidase from amutant of Alternaria alternata . Applied and Envronmental Microbiology 47(3): 560 -565.

20. Akiba , S. , Kimura , Y. And Kumagai , H. 1995 . Purification and characterization of protease resistant cellulase from ***Aspergillus niger*** . J. Ferment . Bioeng . 79(2): 125 – 130.

21. Coral G., Arikan B., Unaldi ,M.n and Guvenmez, H. 2002 . Some properties of crude carboxy methylcellulose of ***Aspergillus niger Z10*** wild-type strain **.**Turkey J.Biology , 26:209-213.

22. McCleary , B.V. and Glennie – Holmes , M. 1985. Enzymatic quantification of (1-3) (1-4) – B- D-glucan in barley and malt . J. Inst . Brew . 91 : 285 – 295 .

23. Parry J.B. , Stewart J.C. and Heptinstall , J. 1983. Purification on the major endoglucanase from Aspergillus fumigatus frecius. Biochem . 2131: 437 – 444.

24. Mudau; Maria M., Setati, and Evodia, M. 2008. Partial purification and Characterization of endo-B-1,4-Mannanases from Scopulariopsis candida Strains isolated from solar salterns. African J. Biotech. 7(13): 2279-2285.

25.Asad, M. , Asghar, M., Sheikh, A.M. and Sultan, I.J. 2005. Purification and characterization of endoglucanase from ***Neurospora sitophila*** . The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 24: 56 – 66.

26. Kotchoni,O.S., Shonukan,O.O. and Gachomo,W.E. 2003 .***Bacillus pumilus BPCRI6*** ,apromising candidate for cellulase production under conditions of Catabolite repression .African J. Biotech 2(6):140-146.

Purification and Characterization of Endoglucanase from local isolate of *Aspergillus flavus*

Essam F. Al-Jumaily ** ***Fayhaa Muqdad Khaleel*** *

**Biotechnology Dept. Engineering Genetic and Biotechnology Institute for post graduate studies- Baghdad University
* Chemistry Dept. College of Science for Women- Baghdad University

Abstract:

Endoglucanase produced from *Aspergillus flavus* was purified by several steps including precipitation with 25 % ammonium sulphate followed by Ion – exchange chromatography, the obtained specific activity was 377.35 U/ mg protein, with a yield of 51.32 % .This step was followed by gel filtration chromatography (Sepharose -6B), when a value of specific activity was 400 U/ mg protein, with a yield of 48 %. Certain properties of this purified enzyme were investigated, the optimum pH of activity was 7 and the pH of its stability was 4.5, while the temperature stability was 40 °C for 60 min. The enzyme retained 100% of its original activity after incubation at 40 °C for 60 min; the optimum temperature for enzyme activity was 40 °C.