Purification , characterization of chitinase produced from *Bacillus subtilis* and inhibitory activity on some fungi

تنقية وتوصيف انزيم الكايتينيز المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* و تأثيره التثبيطي على بعض الفطريات

علاء جبار عبد آل منهل
قسم علوم الاغذية /كلية الزراعة / جامعة البصرة
البصرة – العراق

الخلاصة

اختيرت عزلات عدة من بكتريا *Bacillus* sp. المعزولة من التربة لتحديد كفاءتها في انتاج انزيم الكايتينيز وشخصت العزلة الأكثر إنتاجا" فظهرت على أنها نوع *Bacillus subtilis* , إذ أنتجت الكايتينيز عند الزرع في الوسط الحاوي على مسحوق المخلفات البحرية كمصدر رئيس للكربون , نقي انزيم الكايتينيز باستعمال التبادل الايوني والترشيح الهلامي وبحصيلة انزيمية 33.18 % وعدد مرات تنقية 11.06 ، ووجد ان وزنه الجزيئي 37 كيلو دالتون و درجة الحرارة المثلى للنمو 55 م ورقم هيدروجيني امثل للنمو 6.5 وللثباتية 5.5 -8 , ووجد أن نمو بعض الفطريات قد ثبطت بنسبة 100 % بعد الحضن لمدة ساعتين مع محلول الأنزيم المنقى .

الكلمات المفتاحية : بكتريا *Bacillus subtilis* , الكايتينيز , تنقية , تثبيط الفطريات

Abstract

Bacillus subtilis with highest production of chitinase was selected among other Bacillus sp. Chitinase was extracted from culture media contain shrimp and fish-shell powder as the major carbon.

Enzyme was purified by anion exchanger (DEAE) and Sephadex G-50 Gel filtration with yield and Purification fold, 33.18% and 11.01 respectively.

Optimum PH for activity and stability was 6,5 and 5.5-8 respectively, The purified enzyme had Mw. 37 Kd. Inhibitory activity was 100% against some molds after incubation for 2h with sterilized chitinase solution (Unit).

Key words: *Bacillus subtilis* , chitinase , purification , fungal lysis

المقدمة

الكايتين سكر متعدد ذو وزن جزيئي عالي وغير قابل للذوبان ،يأتي بعد السليلوز من حيث تواجدة في الطبيعة وهو بشكل بوليمر عضوي مكون من وحدات متشابهة من N-acetylglucosamine الاحادية المرتبطة مع بعضها بواسطة اواصر كلايكوسيدية من نوع β(1-4) ،كما ان تركيبة مشابه جدا للسليلوز إذ يحتوي في موقع الكربون C_2 على مجموعة acetylamino بدلا من مجموعة الهيدروكسيل[1] ، وهو يتواجد في كائنات مختلفة تتضمن النباتات الراقية واللافقريات البحرية والحشرات والقشريات والفطريات والطحالب [2] . الكايتين يتحلل أما كيميائيا بواسطة الحوامض والقواعد القوية وهذا له مساوئ من حيث التسمم والتأكل الحامضي ،وصعوبة السيطرة على ظروف التفاعل كذلك يتطلب سحب الاملاح الناتجة عن التركيز العالي للوصول الى حالة التعادل وغيرها ،او ان يتحلل بواسطة انزيم الكايتينيز وهو من انزيمات التحلل المائي (3.2.1.14) يعمل على تحلل الكايتين عشوائيا الى وحداته الاولية [3].

اصبح العديد من الاحياء الممرضة مثل البكتريا والفطريات مقاومة للمضادات الحيوية و الادوية الكيمياوية حتى ان بعضها يقاوم كل المضادات الحيوية المستعملة ،اذ اشارت الاحصاءات الى ان اكثر من مليون طن من المضادات اطلقت خلال الخمسين سنة الماضية وهذا ادى الى تدفق كبير للجينات في عالم الميكروبات مما ولد لديها مقاومة ضد مدى واسع من المضادات [4] .لذلك اتجهت الدراسات الحديثة الى انتاج الكايتينيز من مصادر مختلفة وبالاخص الاحياء المجهرية بهدف الاستفاده منه في تحلل الكايتين والذي ينتج عنه سكريات متعددة قصيرة السلسلة ذات الاهمية الصحية فضلا عن الاهمية التثبيطية للفطريات, فقد قام (Wang)وجماعته [5] بانتاج الكايتينيز من بكتريا *Bacillus subtilis* المنماة على صدف الاسماك كمصدر وحيد للكربون ,كذلك عمل [3] على انتاج وتنقية الكايتينيز من بكتريا *Cellulosimicrobium cellulaus* 191 ودراسة تأثيره التثبيطي, اما [6] فقد انتج الكايتينيز الخارجي من بكتريا *Bacillus* sp. المحبه للحرارة العالية.

وعلى هذا الاساس جاءت هذه الدراسة لانتاج انزيم الكايتينيز من بكتريا *Bacillus* sp. للاستفادة منه في تحلل الكايتين المحضر من مصادر رخيصة ومتوفرة واستعمالة في تثبيط الفطريات .

المواد وطرائق العمل

- **تحضير مسحوق المخلفات البحرية** : حضر في المختبر وحسب طريقة [7] وذلك بمعاملة المخلفات (قشور الروبيان وصدف الاسماك) مع الماء المغلي بعدها جفف في فرن بدرجة 60 م وطحن ونخل في منخل بقطر mesh (100-140) .

- **عزل البكتريا** : 8 عينات من التربة الموجودة قرب محلات الاسماك في اسواق العشار والبصرة و5 ميل والجمهورية ,حيث اخذ 10 غم من كل عينة ووضعت في فلاسك حاوي على 90 مل من ماء الببتون المعقم (0.1%) والتسخين في حمام مائي بدرجة 70 م لمدة 30 دقيقة ,ثم حضرت التخافيف العشريه الاخرى , بعدها اخذ 0.1 مل من كل تخفيف ونشر على طبق يحتوي على وسط Nutrient Agar والحضن بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة [8] .

- **الغربلة والانتاج :** استعمل وسط التخمر المكون من (غرام /لتر) K_2HPO_4 , 0.7 ;KH_2PO_4, 0.3 ; $MgSO_4$, 0.5;$FeSO_4$, 0.01; $ZnSO_4$,0.01; $MnCl_2$, 0.01; $(NH_4)_2SO_4$,0.25; Yeast extract ,0.2 مع اضافة 10 غرام من مسحوق المخلفات المحضر (قشورالروبيان والصدف بنسبة 1:1) و 15 غرام اكارعند رقم هيدروجيني 7 [9] . وحضن بدرجة 30 م لمدة 3 ايام , العزلات غربلت اعتمادا" على قطر الهالات المتكونه clearing zones(cz) [10] , اذ نقلت العزلات الجيدة الى وسط الانتاج المحتوي على نفس المكونات اعلاه عدا استبعاد الاكار منه وتمت باستعمال فلاسك سعة 250 مل حاوي على 100 مل من الوسط السائل ووضع في حاضنه هزازة بدرجة 30 م وبسرعة 150 دورة / دقيقة ولمدة 96 ساعة, قدرت الفعالية الانزيمية حسب طريقة (Lee) [6] ،باستعمال الكايتين الغروي كمادة اساس وعرفت الفعالية الانزيمية على انها كمية الانزيم اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من N-acetyl glucoseamine لكل دقيقة تحت ظروف التجربة .

- **تحضير الكايتين الغروي** : حضر في المختبر وحسب طريقة [6] وذلك بطحن 1 غم من رقائق الكايتين ليكون بشكل مسحوق واضيف اليه 20 مل من حامض HCl المركز ووضع على خلاط مغناطيسي لمدة ليلة كاملة بدرجة 4 م , واضيف للمعلق 200 مل من الايثانول المبرد (95 %) مع التحريك السريع لمدة (12) ساعة، بدرجة 25 م ،جمع الراسب باستعمال النبذ المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة ثم غسل باستعمل ماء مقطر لجعل الكايتين الغروي يصبح متعادل (pH 7) وجفف ليصبح بشكل مسحوق وخزن بدرجة 4 م لحين الاستعمال .

- **تقدير تركيز البروتين** : قدر حسب طريقة [11] .

- **التشخيص:** شخصت العزلة المنتجة للانزيم اعتمادا على الفحوصات المظهرية والكيموحيوية [12] .

- **دراسة الظروف المثلى لأنتاج الانزيم** : درست نسب الاضافة من مسحوق المخلفات الى وسط النمو عند0 10, 15, 20 , 25 ,5, غرام /لتر عند درجات حرارة 30 ,35 ,37 م ورقم هيدروجيني 6 ,6.5 ,7 ,8,7.5 على هزاز بسرعة 150 دورة /دقيقة لمدة 24،36،48،72،96 ساعة [10] .

- **تنقية الانزيم** : نقي الانزيم من راشح المزرعة بعد انتهاء مدة الحضن وباستعمال النبذ المركزي بسرعة 12000xg لمدة 20 دقيقة , تم تركيز الراشح باستعمال كبريتات الامونيوم عند نسبة تشبع 20-90 % بدرجة 4 م بعدها اجريت ديلزة ضد دارئ فوسفات الصوديوم (50,pH 6 ملي مولاري) .نقي الانزيم بعد ذلك بوساطة التبادل ألايوني باستخدام المبادل DEAE Sephadex A-50(2.5×45cm وبمعدل جريان 30 مل / ساعة وبواقع 5 مل/جزء). تلاه الترشيح الهلامي G-100 (80×1.5سم وبواقع 5 مل/جزء), جمعت الأجزاء الحاوية على قمة الفعالية الانزيمية وركزت باستعمال جهاز التجفيد [13] .

-**تقدير الوزن الجزيئي :** قدر حسب طريقة [14] بوجود SDS-PAGE .

-**دراسة تأثير الحرارة والرقم الهيدروجيني في الفعالية الانزيمية :** درست حسب طريقة [6] باستعمال درجات حرارة تراوحت بين 35-80 م في دارئ الفوسفات (50 ملي مولاري pH 7),الثباتية الحرارية للانزيم قدرت بالاعتماد على الفعالية المتبقية بعد الحضن بمدى من 50-70 م لمدة 60 دقيقة , كذلك قدرت الفعالية على ارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (4-9) .

- **دراسة افضل مادة اساس** : الانزيم المنقى حضن مع مواد اساس مختلفة (1%) مكون من الكايتين الغروي , مسحوق المخلفات البحرية , الكايتوسان , كاربوكسي مثيل سيليلوز CMC , والنشا الذائب في 50 ملي مولاري من دارئ فوسفات الصوديوم عند رقم هيدروجيني 6.5 ودرجة حرارة 55 م لمدة 45 دقيقة [6] .

- **دراسة تأثير الايونات المعدنية على الفعالية الانزيمية** : درس اضافة الايونات Na^+, Fe^{+2}, Mg^{+2}, Ca^+, Cu^{+2}, Zn^{+2} , K^+ وبتركيز 4 ملي مولاري الى خليط التفاعل [6] .

- **تطبيق الانزيم المنقى في تحلل جدران الفطريات وتثبيطها** : استعملت الفطريات التالية بعد عزلها من التربة وتشخيصها اعتمادا على المفاتيح التصنيفيه المعتمدة في [15, 16] وهي *Rhizopus* sp. , *Mucor* sp. , *Penicillium* sp. , *Fusarium* sp., *Aspergillus niger* , *Trichoderma* sp. واعتمدت طريقة [3] لمعرفة تثبيطها باستعمال الانزيم المنقى وذلك بتنمية كل فطر على حده في في طبق حاوي على وسط PDA لمدة 7 ايام بدرجة 28 م , بعد تكون الابواغ لقح الوسط الزرعي بالابواغ والمكون من (غرام/لتر) نشأ ذائب, 10 ; كازين, 0.3 ; KNO_3, 2 ; NaCl, 2 ; $MgSO_4.7H_2O$, 0.05 ; $FeSO_4.7H_2O$, 0.01 ; $CaCO_3$, 0.02 باستعمال فلاسك سعة 100 مل حاوي على 50 مل من الوسط اعلاه بدرجة حرارة 28 م وبسرعة 150 دورة / دقيقة لمدة 20 ساعة , اجريت عملية نبذ مركزي بسرعة 3000xg لمدة 6 دقائق بدرجة 5 م , المايسيليوم غسل ثلاث مرات مع الماء المقطر وعلق في دارئ الفوسفات (0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 5.8) , بعدها نقل 0.5 مل من المعلق الفطري

وخلط مع 182 وحدة من الانزيم المنقى (معلق/ مل) حضن بدرجة 50 م لمدة 2 ساعة وحرك في فترات منتظمة , الخلايا المتحللة لوحظت تحت المجهر , حيث استعمل المعلق بدون الانزيم للمقارنة .

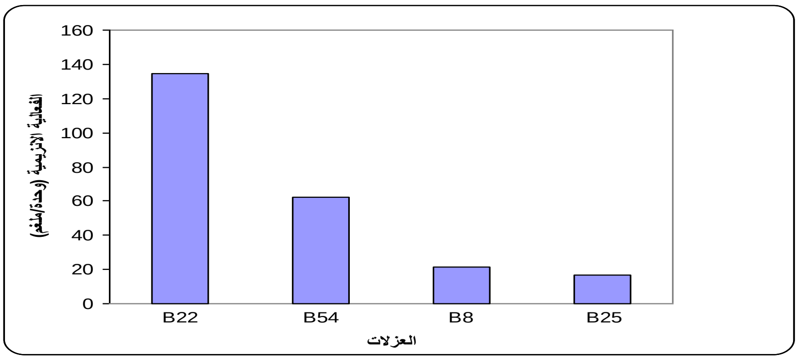
النتائج والمناقشة

العزل والغربلة: اجريت عملية عزل لبكتريا *Bacillus* من التربة ولأماكن مختلفة من خلال تسخين العينات على درجة 70 م للقضاء على الاحياء المجهرية التي لاتتحمل الدرجات الحرارية العالية [8] , بعدها غربلت البكتريا المعزولة لتحديد كفائتها في انتاج الانزيم من خلال تنميتها على الوسط الصلب الحاوي على مسحوق المخلفات الغني بالكايتين والذي يعتبر مصدر كربوني فضلا عن كونه مادة حاثة لانتاج الانزيم وهذا ماكدته العديد من الدراسات [7,10,17] اذ لوحظ ظهور الهالات حول بعض المستعمرات دلالة على قدرتها على تحلل الكايتين , حيث ظهرت 46 مستعمرة نامية على الوسط 11 منها فقط اعطت هالات , هذه العزلات والمسماة B_1 الى B_{46} صنفت اعتمادا على قطر الهالات كجيدة كونها اكبر من 1 او ضعيفة كونها اصغر من 1 وكما هو مبين في جدول (1) كانت العزلات B_8 , B_{22} , B_{25} , B_{34} افضلها والتي نقلت الى الوسط السائل .

جدول(1) الغربلة الاولية للعزلات البكتيرية لتحديد كفائتها في انتاج انزيم الكايتينيز

الانتاج	تصنيف العزلات	قطر الهالة الشفافة(سم)
ضعيف	B_1	0.56
	B_3	0.71
	B_9	0.54
	B_{27}	0.99
	B_{31}	0.83
	B_{40}	0.82
	B_{42}	0.77
جيد	B_8	1.24
	B_{22}	2.31
	B_{25}	1.94
	B_{54}	2.28

وقدرت الفعالية النوعية للعزلات التي اعطت افضل انتاجية للانزيم فظهرت ان افضل عزلة هي B_{22} بفعالية نوعية 134.64 وحدة/ملغم مقارنة مع العزلات الاخرى وكما هو مبين في شكل (1) .

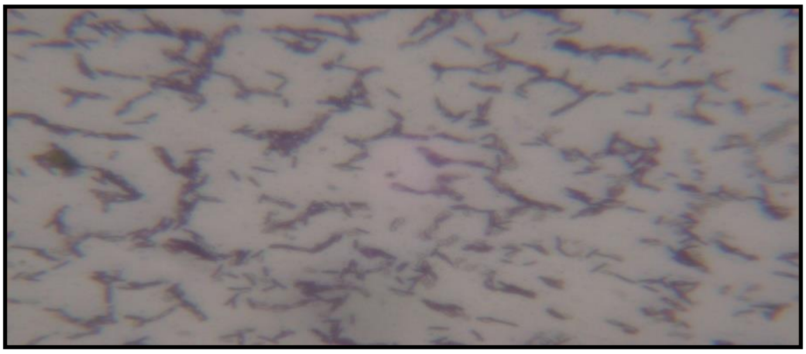


شكل (1) كفاءة العزلات في انتاج انزيم الكايتينيز من بكتريا *Bacillus* sp.

وعلى هذا الاساس اعتمدت العزلة وشخصت استنادا الى الصفات المبينة في جدول (2) فظهرت على انها بكتريا *Bacillus subtilis* وكما هو موضح في شكل (2) .

جدول (2) الفحوصات المضهرية والكيموحيوية لبكتريا *Bacillus* sp. لتشخيص نوعها

ت	الصفات	النتائج	ت	الصفات	النتائج
1	صبغة كرام	+	11	انتاج الاندول	-
2	تحلل النشا	+	12	تكوين السبورات	+
3	اختبار الفوكس	+	13	الحركة	+
4	تحلل الجيلاتين	+	14	الكلوكوز	+
5	استهلاك السترات	+	15	مانوز	+
6	اختزال النترات	+	16	رافينوز	-
7	انتاج الغاز	-	17	فركتوز	+
8	انتاج الكاتليز	+	18	كالاكتوز	+
9	فحص الاوكسديز	+	19	سكروز	+
10	الفينايل النين	-	20	دكسترين	+

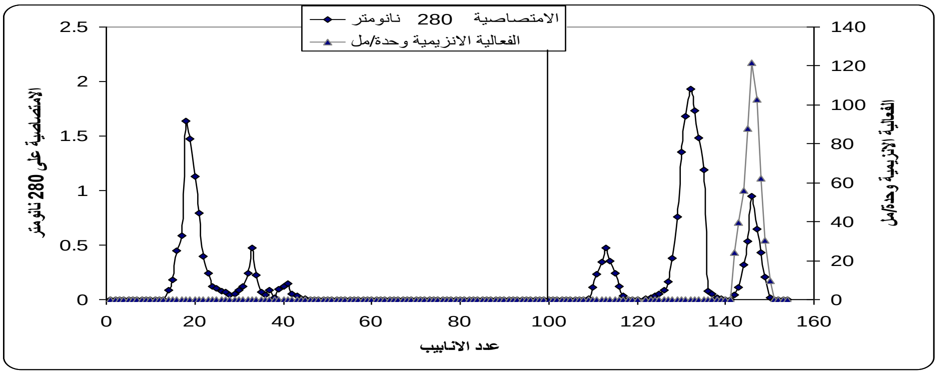


شكل(2) بكتريا ***Bacillus subtilis*** تحت المجهر وهي مصبغه بتصبيغ كرام

دراسة الظروف المثلى لأنتاج الانزيم

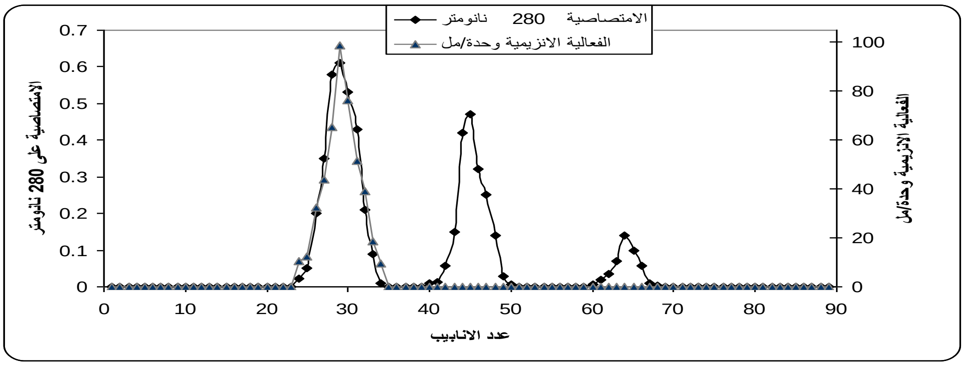
وجد ان افضل تركيز مضاف من مسحوق المخلفات هو 15 غرام/لتر بفعالية نوعية 147.31 وحدة/ملغم في حين ان عدم اضافة المسحوق لم تظهر اي فعالية انزيمية وهذا يدل على ان الكايتينيز هو من الانزيمات المستحثه وهذا ماالكده [5] عند دراستهم للانزيم المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis*, كما ان افضل درجة حرارة هي 35 م ورقم هيدروجيني 6.5 ولمدة 72 ساعة من الحضن والتي وصلت عندها الفعالية النوعية الى 168.46 وحدة/ملغم, وهذا مشابه لما وجده [7] اذ لاحظو زيادة انتاج الانزيم من بكتريا *Serratia marcescens* WF. مع زيادة تركيز مسحوق قشور الروبيان كما ان افضل انتاج كان عند رقم هيدروجيني 6.5 ودرجة حرارة 28 م ولمدة 72 ساعة من الحضن .

تنقية الانزيم : راشح المزرعة تم الحصول عليه باستعمال النبذ المركزي والذي يمثل المستخلص الانزيمي الخام , نقي باستعمال التركيز بكبريتات الامونيوم بنسبة تشبع 75 % ثم الديلزة للتخلص من الاملاح اذ وصلت الفعالية النوعية عندها الى 420.92 وحدة/ملغم عند استخدام المبادل الايوني السالب ،حيث ظهرت ثلاث قمم بروتينية في خطوة الاسترداد كانت القمة الثالثة تمثل انزيم الكايتينيز وكما هو مبين في شكل (3) والجدول(3) في حين لم تظهر اي فعالية انزيمية في خطوة الغسل .



شكل (3) كروماتوكرافيا التبادل الايوني لمستخلص الكايتينيز المنتج من العزلة المحلية B_{22} لبكتريا *Baciullus subtilis* باستعمال عمود DEAE Sephadex A-50 الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز0.01 مولاري ورقم هيدروجيني6 وتدرج ملحي 0-1 مولاري NaCl.

ظهرت ثلاث قمم بروتينية عند الترشيح الهلامي كانت القمة الاولى تمثل الانزيم اذ لوحظ تطابق الفعالية الانزيمية مع البروتين وهذا يدل على النقاوة العالية [18] ، كما مبين في شكل (4) والجدول(3).



شكل(4) كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي لمستخلص الكايتينيز المنتج من العزلة المحلية B_{22} لبكتريا *Bacillus subtilis* باستعمال عمود Sephadex G-100 الموازن بدارئ فوسفات الصوديوم بتركيز0.1 مولاري ورقم هيدروجيني 6

ان طرق التنقية لخصت في جدول (3) اذ بلغت عدد مرات التنقية 11.06 مرة مع حصيلة انزيمية كلية 33.18 % .

جدول(3) خطوات التنقية المتبعة لتنقية الكايتينيز المستخلص من بكتريا *Bacillus subtilis*

الخطوات	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية %
المستخلص الخام	100	52.14	0.31	168.19	5214	1	100
التركيز بكبريتات الامونيوم 75% مع الديلزة	28	113.65	0.27	420.92	3182.2	2.50	61.03
التبادل الايوني	44	67.18	0.09	746.44	2955.92	4.43	56.69
الترشيح الهلامي	31	55.82	0.03	1860.66	1730.42	11.06	33.18

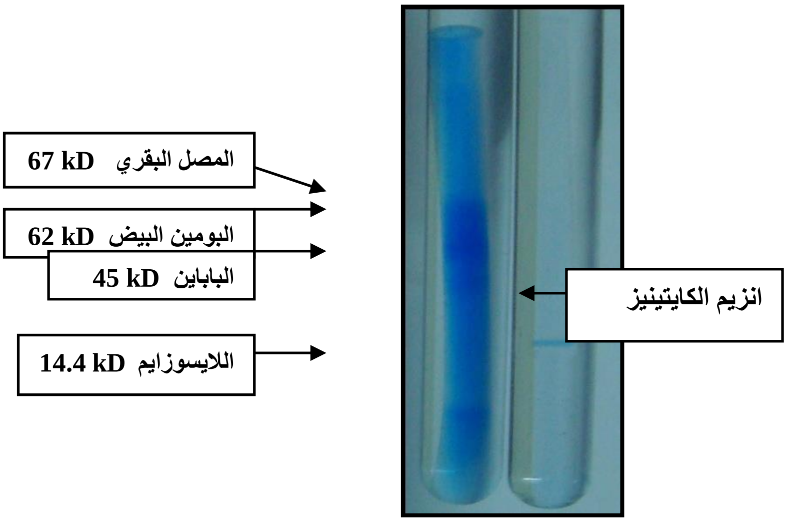
خصائص الانزيم

الخصائص العامة للانزيم المنقى والمبين في جدول (4) اظهر حزمة بروتينية منفردة وكما هو مبين في شكل(5) وهذا يعطي صورة واضحة على مدى كفاءة عمليات التنقية الهادفة للتخلص من كل البروتينات المرافقة للانزيم في المستخلص الخام والحصول عليه بشكل مفرد يدل على النقاوة العالية للانزيم [19] بوزن جزيئي 37 كيلو دالتون كما ان افضل درجة حرارة 55 م والتي عندها احتفظ الانزيم بكامل فعاليته ولمدة ساعة من الحضن الا انه فقد 47.32 % من فعاليته بعد مرور ساعتين من الحضن وهذا يعود الى تأثير الحرارة السلبي في مكونات التفاعل كون الجزيئات المتفاعلة تمتص طاقة عالية تؤدي الى تغيير التركيب الثلاثي للانزيم ومن ثم مسخه وفقدانه جزء من فعاليته [18] كما ان أفضل رقم هيدروجيني للفعالية كان عند 6.5 اذ وصلت الفعالية الى 182.11 وحده/مل، اذ ان للرقم الهيدروجيني تأثير في المجاميع القابلة للتأين الموجودة في الموقع الفعال او على المادة الاساس [19] .

وهذه النتائج جاءت متفقه مع دراسات مشابهه كالتي قام بها [13] اذ وجدا ان الوزن الجزيئي لانزيم الكايتينيز المنتج من بكتريا *Bacillus* sp. هو 35 كيلودالتون ،وهو دو سلسلة مفرده ،كذلك مع [6] الذي انتج الانزيم من بكتريا *Bacillus* sp. فكانت افضل درجة حرارة 60 م ورقم هيدروجيني 6.5 .

جدول(4) الخصائص العامة لانزيم الكايتينيز المستخلص من بكتريا *Bacillus subtilis*

الخصائص	النتائج
الوزن الجزيئي	37 kD
الحرارة المثلى	55 م
ثبات الحرارة	عند 55 م ثابت لمدة ساعة
الرقم الهيدروجيني	6.5
ثبات الرقم الهيدروجيني	8-5.5



شكل (5) الوزن الجزيئي لانزيم الكايتينيز المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis*

تم دراسة تخصص الانزيم تجاه المادة الاساس وكما هو مبين في جدول (5) اذ وجد ان افضل مادة اساس لعمل الانزيم هو الكايتين الغروي مقارنة مع المواد الكربوهيدراتية الاخرى يأتي بعده مسحوق المخلفات المستخلص وبفعالية متبقية 49.8% في حين لم يعمل الانزيم بوجود CMC والنشا وهذا يؤكد ان الانزيم هو الكايتينيز كونه يعمل على تحلل الاصرة الكلايكوسيدية بين N-acetylglucoseamine-وN-acetylglucoseamine وهذا ماأكدته الدراسات [6,13] , وكانت هذه النتائج مشابهه لما وجده [17] الذي استخدم عدة مواد كربوهيدراتية كمواد اساس كان افضلها الكايتين الغروي .

جدول (5) المواد الكربوهيدراتية المستعملة كمواد اساس لعمل انزيم الكايتينيز المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis*

المواد الاساس	الفعالية المتبقية %
الكايتين الغروي	100
مسحوق المخلفات	49.80
الكايتوسان	31.29
كاربوكسي مثيل سليلوز	0
النشأ الذائب	0

حدد تاثير بعض الايونات المعدنية على الفعالية الانزيمية والمبينة في جدول (6) حيث لوحظ انخفاض الفعالية الانزيمية بوجود ايونات النحاس والحديد في حين ازدادت بوجود كلا من المغنيسيوم والصوديوم والبوتاسيوم والخارصين والكالسيوم , ان الانخفاض الحاصل في فعالية الانزيم لايمكن تفسيره الا بتأثير هذه الايونات في تركيب الانزيم او في موقعه الفعال من جهه وفي المادة الاساس من جهه اخرى بتكوين معقدات تؤدي الى اعاقة ارتباط الانزيم بالمادة الاساس , وجاءت النتائج المشار إليها مشابهه لدراسات اخرى فقد اشار [6] الى ان اضافة الايونات ثنائية التكافؤ والتي تشمل Zn^{+2} و Fe^{+2} و Ca^{+2} و Mg^{+2} للانزيم المنقى من بكتريا *Bacillus* sp. قد ادت الى زيادة الفعالية وبنسب مختلفة في حين انخفضت بوجود ايونات النحاس , بينما لاحظ [2] عند دراستهم تاثير الايونات المعدنية بتركيز 5 ملي مولاري على فعالية الكايتينيز المنتج من بكتريا *Bacillus cereus* حصول تثبيط للانزيم باضافة Mg^{+2} و Cu^{+2} و Ca^{+2} في حين زادت الفعالية بوجود Zn^{+2} .

جدول(6) تاثير الايونات المعدنية على الفعالية الانزيمية لانزيم الكايتينيز

الايونات	الفعالية المتبقية %
Control	100
Mg^{+2}	112
Na^{+}	103
K^{+}	107
Fe^{+2}	92.34
Cu^{+2}	88.20
Zn^{+2}	125.43
Ca^{+2}	128.92

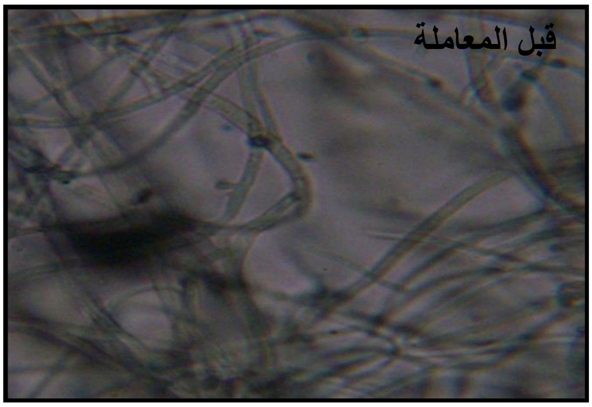
الفعالية التثبيطية

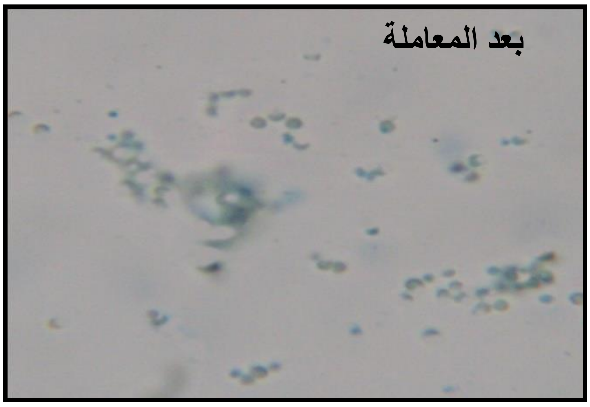
وجد ان للانزيم المنقى من بكتريا *Bacillus subtilis* القابلية في تثبيط 6 اجناس من الفطريات والتي لوحظت تحت المجهر اذ يبين شكل (6) تحلل جدارفطر *Rhizopus* sp. بواسطة الانزيم المنقى مقارنة مع السيطرة والذي وضع في البحث كنموذج للتوضيح, كانت نسبة التحلل عالية في فطر *Rhizopus* sp. و *Penicillium* sp. مقارنة مع الفطريات الاخرى حيث لوحظ اجزاء متحلله من المايسيليوم في الشرائح الزجاجية المفحوصة تحت المجهر الضوئي وبأشكال كروية ,اذ ان الانزيم المنقى جزء او حلل الكايتين او الكايتوسان الموجود في جدران خلايا الفطريات المختلفة وهذا يثبت القابلية الحيوية للانزيم في تثبيط الفطريات .

اما فطر *Aspergillus niger* فكان تأثير الانزيم فيه اقل من الفطريات الاخرى من حيث نسبة التحلل في تركيب جدران الخلايا بعد المعاملة مع الانزيم وهذا قد يعود الى الاختلافات في تركيب جدران الخلايا وهذا ربما اعاق عمل الانزيم , اذ ان لعملية التحلل وهظم المايسيليوم بفعل الكايتينيز ينتج عنه تحريرالبروتوبلاست الذي يكون واضحا في حالة *Rhizopus* sp. و *Penicillium* sp. وهو مهم في السلالة لتحسين المجموعة الوراثية وتطوير عملية التهجين للسلالة في الفطريات الخيطية كما ان كمية البروتوبلاست المتحررة تعتمد على تركيز الانزيم المضاف وعلى كمية الخيوط الفطرية (المايسيليوم) [17].

اتفقت هذه النتائج مع دراسات مختلفة اكدت على اهمية الكايتينيز كمثبط للفطريات , فقد لاحظ [20] التاثير التثبيطي للكايتينيز ضد مدى واسع من الاعفان والخمائر وهي , *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus* , *Aspergillus niger* *Aspergillus foetus* , *Candida tropicalis* , *Candida albicans* , *Rhizopus arrhizus* , *Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani* , *Phytophthora infestans* , *Fuusarium oxysporum* and *Phanerochaete chrysosporium* .

كذلك تمكن [17] من تثبيط اربعة اجناس من الاعفان وهي *Fusarium moniliforme, Aspergillus niger, Mucor rouxi* and *Rhizopus nigricans* باستعمال انزيم الكايتينيز المنقى من بكتريا *Enterobacter* sp. NRG4 , استطاع [5] من تثبيط عفن *Fusarium oxysporum* بنسبة 100 % عندالحضن مع الكايتينيز المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* ولمدة يوم واحد , كما ان هناك دراسات عملت على تحلل جدران الفطريات باستخدام الانزيم التجاري المحلل وهو Novozyme 234 [3,21] .





شكل (6) نموذج يوضح فطر *Rhizopus* sp. قبل المعاملة وبعد المعاملة بانزيم الكايتينيز المنقى من بكتريا *Bacillus subtilis*

الاستنتاجات

يستنتج من الدراسة الحالية امكانية الحصول على الانزيم بشكله النقي من عزلة بكتيريه محلية منماة باستعمال مصدر كربوني رخيص ومتوفر على مدار السنة كما اثبت الانزيم مداه التثبيطي الواسع ضد مختلف الفطريات وبالتالي يمكن الاستفاده منه في التطبيقات المختلفة .

المصادر

1-Kurita, K.(2001). Controlled functionlization of the polysaccharide chitin . *Pro.polym. sci*.,26:1921-1971.

2-Wang, S.L. ; Chao , H. ; Liang , W. and Chen , C. (2009). Purification and Characterization of Protease and Chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and Conversion of Marine Wastes by These Enzymes. *Mar Biotechnol* , 11:334–344.

3-Fleuri , L.F.; Kawaguti, H. Y. and Sato, H. (2009). Production , Purification and Application of Extracellular Chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191 .*Brazilian Journal of Microbiology* , 40: 623-630

4- الخفاجي, زهرة محمود (2008). التقنية الحيوية الميكروبية. دار الكتب والوثائق .جامعة بغداد.736 صفحة.

5-Wang , S.L.;Lin, T.U.;Yen,Y.H.;Liao,H. and Chen, Y.J.(2006) . Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Research* , 341: 2507–2515.

6-Dai, h.; Hu, L. , Huang , G. and Li , W. (2011). Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. *African Journal of Biotechnology*, 10(13): 2476-2485.

7- Saulés , J. E. Mejía , Waliszewski , K. N. (2006). The Use of Crude Shrimp Shell Powder for Chitinase Production by *Serratia marcescens* WF. *Food Technol. Biotechnol.*, 44 (1) :95–100.

8-Benson,(2001). Microbiological application :Laboratory manual in general Microbiology.(8th Edition).The McGrow-Hill Companies.

9-Khiyami , M. and Masmali, I. (2008). Characteristics of Thermostable Chitinase Enzymes of *Bacillus licheniformis* Isolated from Red Palm Weavil Gut. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(4): 943-948.

10- Faramarzi,M.A.;Fazeli,M.;Yazdi,M.T.;Adrangi,S.;Alahmadi,K.J.; Tasharrofi N. and Mohseni, F.A.(2009). Optimization of cultural conditions for production chitinase by a Soil isolate of Massilia timonae. *Biotechnology*, 8(1) : 93-99.

11-Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein 173easurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

12-Buchanan,R.F.andGibbonsN.F.(1974). Bergeys Manual of Determinative Bacteriology 8th ,William And Wilkinsco Baltimore.

13-Woo ,C. and Park, H. (2003). An extracellular *Bacillus* sp. Chitinase for the production of chitotriose as a major chitinolytic product. *Biotechnology Letters* 25: 409–412.

14-Laemmli , U . K . (1970) . Cleavage of structural proteins during the assembly of the Head of bacteriophage T4 . *Nature* , 227 : 680 – 285 .

15-Hoog, G.S.; Guarro, J. ; Tan, C.S. ; Wintermans, R.G.F. and Gene , J.(1995). Atlas of clinical fungi . Centraabureau voor Schimelcultures ,Netherlands. 707p.

16-Pitt, J.I. and Hocking , A.D. (2009). Fungi and food spoilage. Blackie Academic Professional. New York , 519 p .

17- Dahiya, N.R.; Tiwari , R.P. and Hoonda , G.S. (2005). Production of an antifungal chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4 and its application in protoplast production . *World Journal of Microbiology & Biotechnology* , 21:1611–1616

18-Whitaker, J.R. (1972). Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker. Inc. New York, USA.

19-Segel, I. H. (1976). Biochemical Calculations. 2nd Edition, John Wiley and Sons, Inc. New York.

20-Bhushan, B. (2000). Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp.BG-11. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 800–808.

21- EL-Bondkly, A. M. and Talkhan , F.N. (2007). Intra-strain crossing in Trichoderma harzianum via protoplast fusion to enhance chitinase productivity and biocontrol activity. Arab J. Biotech., 10, No. (2)):233-240.