الملخص

تم عزل 37 عزلة من بكتريا Bacillus من عينات وأماكن مختلفة في مدينة البصرة والنجف وميسان وشخصت هذه العزلات بعد تنقيتها ودراسة صفاتها المظهرية وإجراء الفحوصات الكيموحيوية , وتبين أنها تعود إلى أنواع مختلفة من بكتريا Bacillus وهذه الأنواع هي عزلة واحدة لكل من بكتريا B.sterothermophilus وB.marinus وB.alvei و B.sphercusوعزلتان لبكتريا B.coagulans وثلاث عزلات لكل من بكتريا وB.megaterium و B.pumilusوثمان عزلات لكل من بكتريا B.lichniformis و B.cereus وتسع عزلات لبكتريا B.subtilis.

وأجريت الغربلة الأولية والثانوية لانتقاء العزلة الأكفأ إنتاجا لإنزيم البولي كالاكتيورونيز وكانت هي العزلة (B36) لبكتريا Bacillus megaterium التي تم عزلها من ثمرة التفاح.

درست الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البولي كالاكتيورونيز الخارجي من العزلة المحلية (B36) لبكتريا B.megaterium بطريقة المزارع المغمورة وتمثلت باستعمال 5 غم مهروس التفاح المجفف و0.16 غم كبريتات الامونيوم و 0.1 غم فوسفات البوتاسيوم و0.03 غم كبريتات المغنيسيوم لكل 100 مل من الوسط وبدالة حامضية ابتدائية 6.5 والحضن عند درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة وكان حجم اللقاح 1% .

نقي الإنزيم بعدة خطوات تضمنت الترسيب بالأسيتون البارد بنسبة 1 مستخلص : 3 اسيتون (حجم:حجم) ثم كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستعمال المبادل DEAE-Sephadex A-50اذ ظهرت قمتان لهما فعالية إنزيمية كانت الأولى في مرحلة الغسل والثانية في مرحلة الأسترداد عند تركيز ملحي 0.41 مولاري من كلوريد الصوديوم وكانت الفعالية الأنزيمية لهما 620.7147 و 996.9647 وحدة/مل على التوالي , واختيرت القمة الثانية لامتلاكها أعلى فعالية للمرحلة التالية من التنقية وهي كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-100 إذ ظهرت قمة واحدة وبفعالية إنزيمية مقدارها 905.923 وحدة/مل وبلغت الفعالية النوعية 36236.9 وحدة/ملغم وعدد مرات تنقيته 35.72 مرة وبحصيلة إنزيمية مقدارها 18.19 % .

بينت نتائج الكشف عن نقاوة الأنزيم عن وجود حزمة بروتينية واحدة للإنزيم عند الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد ثم درست صفات الأنزيم المنقى منها :

- الوزن الجزيئي للأنزيم كان 65 كيلو دالتون باستعمال طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS .
- الدالة الحامضية المثلى ودرجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم كانتا 7.0 و 50 م على التوالي.
- الدالة الحامضية المثلى ودرجة الحرارة لثباتية الانزيم كانتا 6.5 - 8 و (0 – 50) م .
- ارتفعت فعالية الإنزيم بنسبة 110% عند اضافة 1 ملي مولاري من كلوريد المغنيسيوم الى محلول التفاعل , وارتفعت الى 130% و105% و110% و115% عند إضافة 5 ملي مولاري من كلوريد المغنيسيوم وكلوريد الحديدوز وكلوريد الكالسيوم وكلوريد المنغنيز على التوالي , كما وجد إن إضافة 1% من مادة SDS (وزن/حجم) ثبط الإنزيم بنسبة 10% كما وثبط بنسبة 30% و 60% من فعاليته عند اضافة 5 ملي مولاري من اليوريا ومادة EDTA على التوالي .
- أظهرت دراسة الثوابت الحركية ان قيم ثابت ميكالس Km للإنزيم تجاه حامض البولي كالاكتيورونيك وقيمة Vmax هي 3.125 % و0.043 وحدة/ملي مولاري على التوالي

.

- بلغت طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الأساس حامض البولي كالاكتيورونيك إلى نواتجه 38.613 كيلو سعرة/مول , إما طاقة مسخ الإنزيم فكانت 56.245 كيلو سعرة/مول .

Abstract

Thirty seven local isolates of Bacillus were isolated from different samples in Basrah , Najaf and Misan governorates, The identification of the isolates was according to their morphological characteristics and biochemical tests .

One isolate was belonged to each of B.sterothermphilus, B.marinus, B.alvae and B.sphercus , two isolates for B.coagulans ,three isolates for each of B.megaterium and B.pumilus , eight isolate for each of B.lichniformis and B.cereus, and nine isolates for B.subtilis .

All isolates had been subjected to primary and secondary screening for their abilities for the best production of Polygalacturonase, A local isolate B.megaterium (B36) isolated from the apple , was the best for production exo-polygalacturonase .

The optimum conditions for production of exo- polygalacturonase by local isolate (B36) of B.megaterium using batch cultures were by using (50 g) the mashed dry apple , (0.16g) potassium phosphate, (0.03g) magnesium sulphate , pH was 7.0 , the incubation was at 37 Cº / 48 h and inoculum volume was 1% .

Purification of the crude enzyme was done by using precipitation by cold acetone using 1:3 (v/v) , then ion exchange chromatography using DEAE Sephadex A-50 with linear gradient of NaCl (0 – 1) M . Two peaks had enzymatic activity , the first was in washing step and the second was in the elution with 0.41 M of NaCl , The enzymatic activities were (620.7147 and 996.9647) U/ml for the first peak and the second peak respectively .

Gel filtration chromatography was used for the second peak using Sephadex G–100 , The specific activity , folds and the yield were 36236.9 U/mg , 35.72 and 18.19% respectively .

Results of Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme by revealed that only one band was detected in the gel .

The properties of exo-polygalacturonase were studied as :

- The molecular weight was 65 KD .
- Optimum pH and temperature for enzyme's activity were 7 and 50

ºC respectively .

- Optimum pH and temperature for enzyme's stability were 6.5–8 and.(0–50) ºC respectively .
- The remained of the enzyme activity was shown 110% with the addition of 1mM of magnesium chloride to the reaction solution and increased to 130% , 105% ,110% and 115% with the addition of 5mM of magnesium chloride , ferrous chloride,calcium chloride and manganise chloride respectively. While 10% , 30% ,60% of the activity was inhibited with 1% SDS (w/v) , 5 mM of urea and EDTA respectively .
- The kinetics properties of polygalacturonase showed that the Michaelis constant (Km) and (Vmax) were 3.125 % and 0.043 U/mM respectively .
- activation energy and denaturation energy were was 38.613 and 56.245 Cal./ mole respectively .