إنتاج وتنقية إنزيم اللايبيز Lipase من العزلات المحلية لبكتريا *Pseudomonas cepacia* ودراسة بعض الظروف المؤثرة في فعاليته.

علياء معن عبد الحميد* محمد خليفة خضير ** مينا صباح فرمان***

*مدرس- قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة ديالى . Alyaa.maan@homail.com
**أستاذ مساعد- قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة ديالى . Mohammad.k @yahoo.com
***مدرس - قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة الانبار . Menia_aljubory@yahoo.com

المستخلص

تم الحصول على 12 عزلة محلية بنسبة 34% لبكتريا الـ *Pseudomonas* من35 عينة بيئية مختلفة تضمنت المياه والتربة والنباتات الموجودة في الحقول الزراعية لقضاء المقدادية .اختبرت قابلية العزلات على انتاج انزيم اللايبيز lipase وانتخبت العزلة الأغزر إنتاجا وبمقارنتها مع عزلة قياسية شخصت على انها *Pseudomonas cepacia* .

درست الظروف المؤثرة في الإنتاج ولوحظ إن أفضل إنتاج كان عند استخدام الوسط الزرعي المضاف له 5% من زيت الكتان وبرقم هيدروجيني 7.5وبدرجة حرارة 40 م وبمدة حضن 18 ساعة في الحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة \ دقيقة ، تمت تنقية الانزيم بمرحلتين تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيوم وكروموتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني DEAE- Sephadex A25 فكانت الفعالية الانزيمية للايبيز 13 و 35 وحدة\ مل على التوالي ،درس تأثير بعض الايونات الفلزية والمذيبات العضوية في فعالية الإنزيم المنقى جزئيا ووجد ان ايون الكالسيوم Ca+ 2 بتركيز 10 ملي مولار اكثر تأثيرا على فعالية الانزيم حيث ارتفعت الفعالية الانزيمية الى 150% كما ادت معاملة الانزيم بمادة T ween80 بتركيز 20 ملي مولار إلى زيادة فعالية الانزيم حيث وصلت الى 145 % .

الكلمات المفتاحية : *Pseudomonas cepacia* ,Lipase enzyme ,Characterization, Inhibitors

المقدمة

تعتبر بكتريا *P. cepacia* عصيات سالبة لصبغة غرام يتراوح شكلها بين العصوي و العصوي القصير (1.5- 3) مايكرون طولا ، وتنمو بدرجة حرارة (25-37) م فيما تكون ضعيفة النمو في 45 م وهي متحركة باسواط قطبية هوائية المعيشة (Jewell ،2000) . اعيد تصنيف هذه البكتريا مع 6 انواع اخرى في جنس الـ *Pseudomonas* الى جنس جديد يسمى *Burkholderia* نسبة الى مكتشفها تتواجد هذه البكتريا في البيئة الطبيعية مثل التربة والانهار وسطوح النباتات وفي المياه المخزونة ومياه المجاري وقد ساهم هذا في انتشارها لقدرتها على النمو على مصادر غذائية بسيطة ومعقدة (Matthew واخرون ،2004)تعد بكتريا *P. cepacia* ممرضة غير شائعة اذ ان هناك بعض التقارير التي تشير الى انها تكون سبب لالتهاب شغاف القلب وتعفن الدم والالتهابات الجلدية والحروق وتعفن القدم(Selina واخرون، 2012) كذلك تعتبر احد العوامل الملوثة لمياه الفضلات وكعامل ممرض للنباتات خاصة النباتات الموجودة في البيوت الزجاجية وكذلك ممرضة لنبات البصل (Didier، 2010) كما تم عزلها من محلول صبغة Crystal violate (Jennifer و Doug ، 2001). تمتاز بكتريا *P. cepacia* بقابليتها على إنتاج العديد من الإنزيمات مثل Betalactimase و Lipase وLipaseAlginase و Protase وغيرها من الإنزيمات الخلوية والخارج خلوية(Wigfield وآخرون، 2002 ؛ Liew وآخرون ،2012). تمتلك أعدادا كبيرة من الأحياء المجهرية كالبكتريا

تاريخ استلام البحث 17 / 5 / 2012 .
تاريخ قبول النشر 12 / 12 / 2012 .

والخمائر والاعفان فعالية عالية لإنتاج إنزيم اللاييبز ، ولقد حظيت اللاييبزات البكتيرية بأهمية كبيرة في المجال الصناعي خاصة لما لها من علاقة مباشرة في ظهور النكهة المتزنخة للحليب التي استفيد منها في انضاج الاجبان . وكذلك استخدم هذا الانزيم في صناعة المنظفات وفي الصناعات الدوائية مثل تصنيع االقلويدات (Alkalods) و التربينات واستخدم اللاييبز المنتج من العزلة P. cepacia كعامل لتقليل الكوليسترول في الدم (Acikel وآخرون ،2011) .نظرا لأهمية الدراسات حول انزيمات اللاييبز المنتجة من سلالات بكتريا P. cepacia جاءت هذه الدراسة من اجل الحصول على عزلة منتجة للإنزيم وانتخاب الظروف المثلى المؤثرة على انتاجه ومعرفة تأثير بعض الظروف والايونات الفلزية والمواد الاخرى في فعالية الانزيم المنقى .

المواد وطرائق البحث

1- جمع العينات

جمعت 35 عينة بيئية تضمنت 15 عينة تربة (زراعية) من مناطق مختلفة في قضاء المقدادية في محافظة ديالى والتي يتوقع انها مصدر رئيسي لإصابة النباتات بهذه البكتريا واخذت العينات من عمق 15 سم من سطح الارض ونقلت العينات في اكياس بلاستيكية نظيفة ومعقمة، كذلك تم جمع 13 عينات من نباتات مختلفة تضمنت اوراق وجذور البصل والباذنجان والحنطة والشعير والذرة من مزارع وبيوت زجاجية تعود في نفس القضاء ووضعت في عبوات معقمة واخذت 7 عينات من المياه شملت مياه النهر (مهروت ، الهارونية ، ديالى) ومياه السواقي والقنوات ونقلت في قناني زجاجية نظيفة ومعقمة الى المختبر .

اخذ 1 مل من عينات المياه و اغم من النباتات (بعد تقطيعها الى اجزاء صغيرة وتعليقها بالماء المقطر) و1 مل من عالق التربة (تعليق 1 غم تربة مع 9 مل ماء مقطر). رشحت العينات بورق ترشيح بقطر 0.45 مايكرو ميتر ثم اخذ 1 مل من الراشح وعلق مع 9مل من ماء البيتون المعقم لغرض تنشيط العزلات البكتيرية وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 35 م لمدة 18 ساعة .

2- تشخيص العزلات البكتيرية :

تم اجراء الفحوصات المجهرية والكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية اعتمادا على مصنف بيركي (Don وآخرون ،2005) ومقارنتها بالعزلة القياسية المشخصة التي تم احضارها من الجامعة المستنصرية\ كلية العلوم.

أ- دراسة الصفات المظهرية للبكتريا :

تضمنت حجم المستعمرات النامية ولونها وسطحها وحافاتها وقوامها على وسط Pseudomonas agar, والاكار المغذي واكار الدم ودراسة شكل الخلايا البكتيرية ,اصطباغها بصبغة كرام وقدرتها على النمو بدرجة 42 م° وفحص الحركة.

ب- الفحوصات الكيموحيوية :

تضمنت اختبار إنتاج إنزيم الكتاليز وإنتاج إنزيم الاوكسيديز والجيلاتينيز واستخدام العدة التشخيصية API 20 E المنتج من شركة Bio-Meraux .

3- غربلة العزلات على اساس انتاجها لإنزيم اللاييبز :

أ- الوسط المستخدم : استخدم وسط الانتاج الران السائل Rhan الموصوف من قبل Kazlauskas وBornsche (2006) عن قابلية العزلات على انتاج انزيم اللاييبز وحضر الوسط من مزج5غرام من K2HPO4 ،5 غرام من 3(NH4)1 PO4 غرام من 1 ، CaCl2.6 H2O غرام منMgSO4. 7H2O. 0.001غرام FeCl2.6H20 ، 0.001غرام من NaCl و5 مل من زيت الزيتون ,تذاب المكونات في لتر من الماء المقطر ويعدل الرقم الهيدروجيني الى 7 ثم يعقم بالموصدة .

ب- الغربلة شبه الكمية Semi quantitative assay: نشطت العزلات بتنميتها في وسط تربتكيز الصويا السائل وحضنت بدرجة حرارة 35م لمدة 24 ساعة ثم اخذ 0.1 مل من اللقاح وزرع على الوسط الصلب وقيس قطر منطقة الترسيب لملح الحامض.

ج- الغربلة الكمية لإنتاج الإنزيم : اجريت نفس الخطوات اعلاه باستثناء الزرع في وسط الران السائل ثم تم وضع الوسط في دوارق سعة 250 مل بكمية 50 مل لكل دورق .

د- اعداد المنحني القياسي للحامض الدهني :Stearic acid:

تم تهيئة المنحني القياسي للحامض الدهني تبعا للطريقة الموصوفة من قبل Kazlauskas وBornsche (2006) شكل (1) .

شكل 1. المنحنى القياسي لحامض ستيريك الدهني .

4 - تقدير فعالية الانزيم :

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل Kazlauskas وBornsche (2006) لتقدير الاحماض الدهنية طويلة السلسلة في المستخلص الإنزيمي الخام .

5 - تقدير البروتين وحساب الفعالية النوعية للإنزيم :

استخدمت طريقة Bradford (1976) لتقدير تركيز البروتين في المستخلص الأنزيمي الخالي من الخلايا , وتعرف فعالية الإنزيم في الملتر الواحد بأنها كمية الإنزيم التي تحرر 1 مايكرو مول من الحمض الدهني خلال 45 دقيقة تحت ظروف التجربة.

6- العوامل المؤثرة في انتاج اللايبيز :

ا- دراسة تأثير مدة الحضن :-

نشطت العزلة المنتخبة في وسط مرق تربتون الصويا بدرجة حرارة 35م لمدة 18 ساعة ثم لقح وسط الانتاج السائل وحضن بدرجة حرارة 35م لمدد زمنية مختلفة تراوحت بين (5-72) ساعة وبواقع مكررين ثم رسبت الخلايا وقيست الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين .

ب- دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في الانتاجية:

نشطت العزلة المنتخبة في وسط مرق تربتون الصويا بدرجة حرارة 35م لمدة 18 ساعة ثم حضر وسط الانتاجية بأرقام هيدروجينية مختلفة تراوحت (6-9.5) ولقحت الاوساط بالعزلة المنتخبة وبواقع مكررين وحضن بدرجة حرارة 35م لمدة 18 ساعة ثم رسبت الخلايا بالنبذ المركزي بسرعة 6000 دورة\دقيقة وقيست الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين.

ج- تأثير درجة الحرارة في الإنتاجية :

اتبعت الخطوات اعلاه مع حضن الوسط الانتاجي بدرجات حرارية تراوحت بين (55،45،50، 25،30،37،40)م وبواقع مكررين لمدة 18 ساعة ثم رسبت الخلايا بالنبذ المركزي بسرعة 6000 دورة\دقيقة وقيست الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين.

د- تأثير إضافة بعض الزيوت الى وسط الانتاج في الانتاجية :

حضر وسط الانتاج السائل (Rhan) كما ذكر سابقا مع استبدال زيت الزيتون بـ 5 مل من الزيوت التالية (زيت القطن,زيت عباد الشمس ، زيت الكتان ، زيت الذرة ، زيت الخروع ,زيت جوز الهند) لمعرفة الافضل في الانتاج مع ثبات بقية مكونات الوسط الانتاجي.

7- تنقية الإنزيم :

تمت تنقية الانزيم بخطوتين تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين (25-50)% ، حيث أضيفت أوزان معينة من كبريتات الامونيوم الى المستخلص الخام تدريجيا ابتداء من 25% ووضع في حمام ثلجي مع التحريك المستمر لمدة 30 دقيقة ثم نبذ المحلول بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة ربع ساعة وكررت العملية لتصل نسبة الاشباع الى 50% تحت الظروف نفسها وفي كل مرة تم قياس الفعالية الانزيمية ، ثم أجريت عملية الديلزة للمحلول الإنزيمي المأخوذ من عمليات الترسيب مقابل الماء المقطر وقيست الفعالية الانزيمية بعد ذلك ركز المحلول بالسكروز و مرر عبر عمود المبادل الايوني DEAE-Sephadex A25 والذي سبقت موازنته بمحلول الفوسفات الدارئ 0.02 مولار وبرقم هيدروجيني 8 وبسرعة جريان 30مل \ ساعة . جمعت اجزاء الفصل بواقع 5 مل لكل جزء ، و استردت البروتينات المرتبطة بالعمود باستخدام تراكيز ملحية متدرجة لملح NaCl تتراوح من (0.05-0.5) مولار وبنفس سرعة الجريان وتم متابعة تركيز البروتين وفعالية الانزيم في الاجزاء المنفصلة.

8- استخلاص الانزيم :

تم استخلاص الإنزيم حسب الطريقة المتبعة من قبل Gerba و Pepper(2004) حيث نشطت الخلايا للعزلة المنتخبة بوسط مرق تربتون الصويا ثم لقح وسط الانتاج المحضر برقم هيدروجيني 8 وبدرجة حرارة 25 م لمدة 18 ساعة ,بعد ذلك تم ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي المبرد بسرعة 10.000 دورة\ دقيقة لمدة 30 دقيقة واخذ الرائق وتم ترشيحه بدرجة حرارة 4 م بمرشح دقيق 0.2 مايكروميتر و تم قياس الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين للمنتج النهائي .

9- تأثير بعض المواد في فعالية إنزيم :

ا- تأثير بعض الايونات الفلزية في فعالية الانزيم المنقى :

حضر المحلول الخزين لكلوريدات الفلزات (Ni^{+2} ،K^{1} ، Ca^{+2} ، Mg^{+2} ، Zn^{+} ,Ba^{2+}) بتركيز20 ملي مولار ثم حضر منه التراكيز (10) ملي مولار بعد تخفيف المحلول الخزين ثم مزج محلول الانزيم المنقى مع محاليل المواد المذكورة اعلاه بنسبة (1:1)حجم\حجم وحضن لمدة ساعة بدرجة 25م في حمام مائي بعدها قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية.

ب - تأثير بعض المواد العضوية في فعالية الانزيم المنقى:

استخدمت المذيبات العضوية التالية (1-penatol, Aceton,n- Hexan ، Tween 80, DTT,EDTA) بتراكيز (10،20،30،40)% لكل منها ثم مزج كل مركب لكل تركيز مع المحلول الإنزيمي المنقى بنسبة (1:1) حجم\حجم وحضنت الانابيب بحمام مائي بدرجة 25م لمدة ساعة وبعد ذلك قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية .

النتائج والمناقشة

في هذه الدراسة تم انتقاء 12 عزلة من بكتريا *Pseudomonas* وكانت جميع هذه العزلات منتجة لإنزيم اللايبيز بنسب متفاوتة وانتخبت العزلة الاكثر انتاجا وشخصت بالاعتماد على Don واخرون(2005) فوجد انها بكتريا عصوية سالبة لصبغة غرام متحركة لها القابلية على النمو بدرجة

42م ، وتعمل على تحويل وسط *Pseudomonas. cepacia* agar الى اللون الاحمر بسبب قابليتها على استهلاك Sodium pyruvate وزيادة قاعدية الوسط وتحول الكاشف الفينول الاحمر الى اللون الاحمر(Tan وYu. ،2007) .وموجبة لفحص الاوكسيديز والكاتاليز والجيلاتينيز وتكون المستعمرات شاحبة اللون على وسط Pseudomonas مائلة الى اللون الرمادي (Wang، 2009) بينت النتائج ان هنالك اختلافا في قابلية العزلات على إنتاج اللايبيز ومن خلال قياس قطر التحلل للمستعمرات النامية على الوسط الانتاجي الصلب ,تم انتقاء العزلة الاكثر انتاجا وشخصت كما في اعلاه ومقارنة بالعزلة القياسية على انها *Pseudomonas. cepacia* واعطيت الرمز P5 .

الغربلة شبه الكمية والكمية Quantitative and semi quantitative assay :

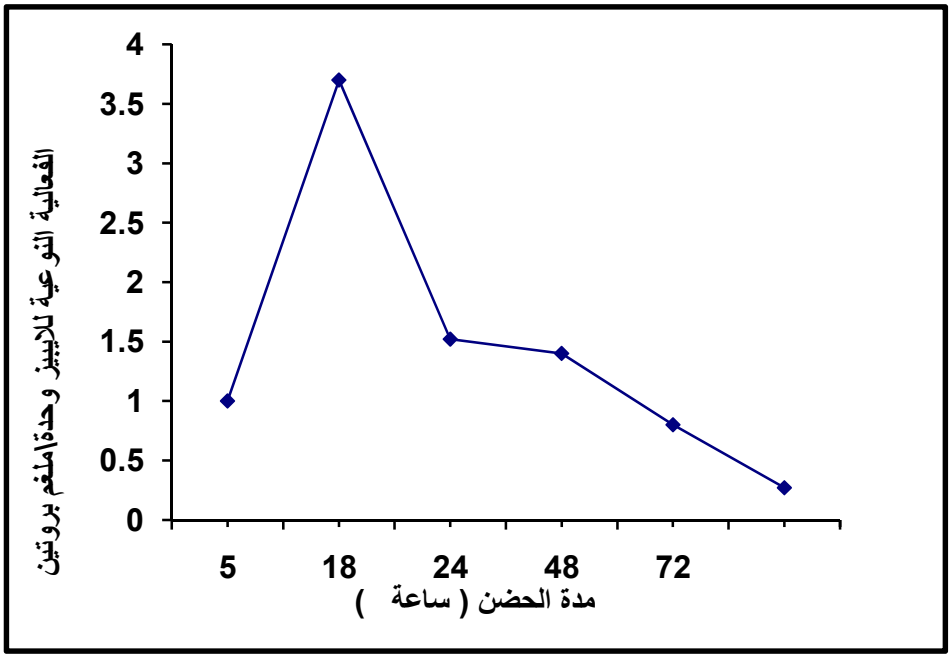
استنادا للقيم المستحصلة من قطر منطقة الترسيب المتكونة بفعل ملح الحامض الدهني تميزت اربع عزلات بإنتاجها العالي للإنزيم ، إذ أعطت أقطار ترسيب تتراوح بين (3-3.5) ملم وكانت العزلة P5 ذات اعلى قطر لمنطقة ا لترسيب (جدول 1) واخضعت هذه العزلات للغربلة الكمية وقدرت الفعالية النوعية للإنزيم المنتج من العزلة P5 بـ 5.8 وحدة\ملغم بروتين وكانت اعلى انتاجية مقارنة ببقية العزلات حيث اعطت فعالية نوعية للإنزيم تراوحت بين (2.5-3.2) وحدة\ملغم بروتين ,وفي ضوء هذه النتائج اعتبرت العزلة اعلاه اغزر انتاجية للإنزيم من بقية العزلات في الوسط الانتاجي السائل والصلب , يعتبر تفاوت انتاج الانزيم في الاوساط الانتاجية الى نوع ومكونات الغذاء الذي له اهمية كبيرة في انتاج الانزيمات كما تتأثر بعوامل بيئية مثل وجود مصدر الكربون ووجود السكريات المتعددة غير المتايضة والايونات (Jaeger و اخرون، 1999).

أظهرت النتائج إن إنزيم اللايبيز يبدأ إنتاجيته بعد 2 ساعة من الحضن وكانت الفعالية النوعية للإنزيم 1.0 وحدة\ملغم بروتين وازدادت تدريجيا إلى أن بلغت أقصاها بعد 18 ساعة من الحضن حيث بلغت الفعالية النوعية للإنزيم 3.7 وحدة\ملغم بروتين ثم بدأت بالانخفاض بعد 72 ساعة من الحضن لتصل إلى 0.8 وحدة\ملغم بروتين (شكل2). إن اغلب الدراسات أشارت إلى أن الإنتاجية تحصل بعد أن يدخل الإنزيم طور الثبات إذ إن الجينات المسؤلة عن إنتاج الإنزيم تحفز بهذا الطور (Praveenو Yasuthisa،2011) وهذه النتيجة

جدول 1 . عزلات بكتريا *Pseudomonas sp.* المنتجة لإنزيم اللايبيز من مصادر مختلفة.

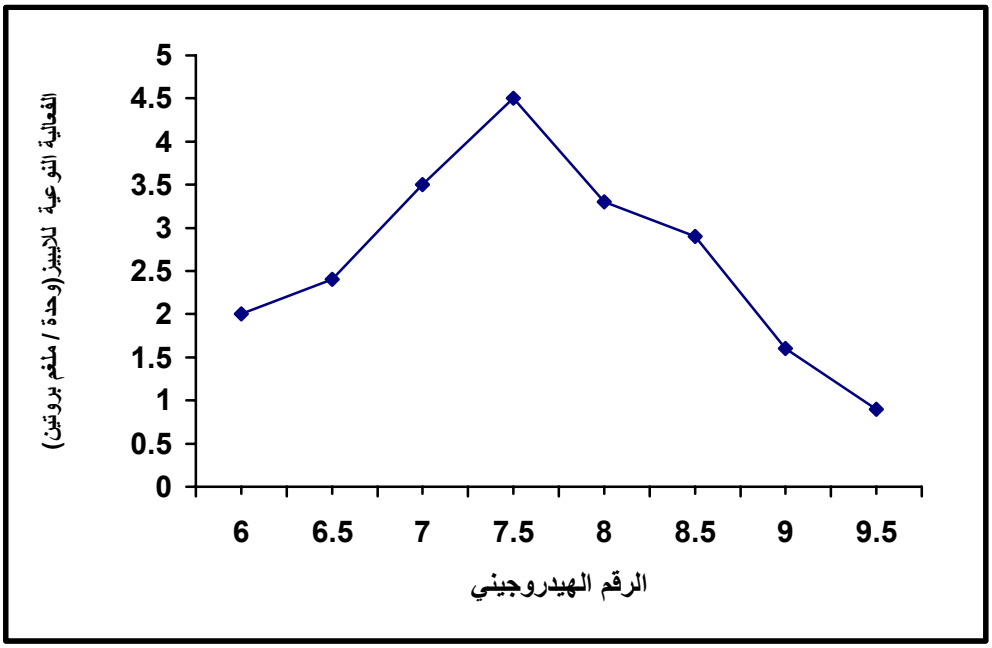
ت	رمز العزلة	الاسم العلمي	المصدر	اقطار مناطق الترسيب في وسط اكار Rhan(ملم)
1	P1	*Pseudomonas sp.*	تربة	2.5
2	P2	*Pseudomonas sp*	تربة	2.5
3	P3	*Pseudomonas sp*	نبات البصل	2.5
4	P4	*Pseudomonas sp*	تربة	3.0
5	P5	*Pseudomonas cepacia*	ماء	3.5
6	P6	*Pseudomonas sp*	نبات البصل	2.0
7	P7	*Pseudomonas sp*	تربة	2.0
8	P8	*Pseudomonas sp*	تربة	2.5
9	P9	*Pseudomonas cepacia*	ماء	2.0
10	P10	*Pseudomonas sp*	نبات الباذنجان (الثمرة)	2.0
11	P11	*Pseudomonas sp*	ماء	2.5
12	P12	*Pseudomonas sp*	اوراق الذرة	2.8

مقاربة لإنتاجية نفس الإنزيم من العزلة *Pseudomonas sp.* فكانت الفعالية النوعية له 3.0 وحدة \ملغم بروتين بعد 18 ساعة من الحضن (Lee وآخرون ، 2001).



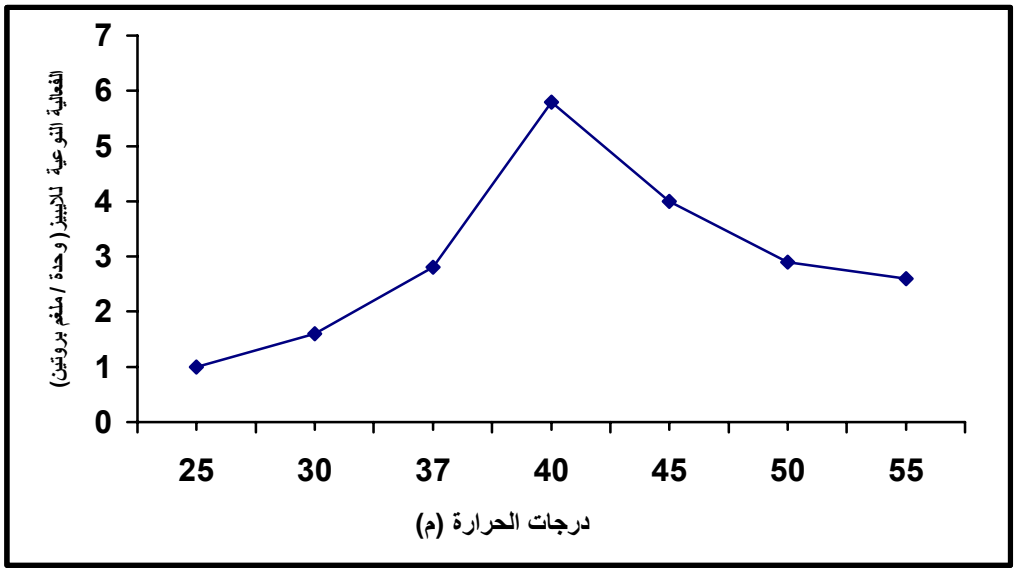
شكل2 . تأثير مدة الحضن في أنتاج اللايبيز من بكتريا P5 *Pseudomonas cepacia*

ان النتائج الموضحة في الشكل (3) اظهرت ان اعلى انتاجية للإنزيم كانت عند الرقم الهيدروجيني 7.5 اذ بلغت الفعالية النوعية له 4.5 وحدة \ملغم بروتين . يؤثر الرقم الهيدروجيني في انتاج الانزيمات بسبب دوره في ذائبية المواد الغذائية في الوسط وتأثيره في الحالة الايونية للمادة الاساس وجاهزيتها للكائن النامي . فضلا عن تأثيره في ثبات الانزيمات المنتجة ، وتأثيره في نمو البكتريا وانتاجها للإنزيمات (Sharma ، 2001). تتفق النتيجة التي حصلنا عليها مع الصفار (2003), حيث كان الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج اللايبيز من بكتريا *Serratia odorifera* هو 7.5 . كان الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج اللايبيز من العزلة *P. fluorescens* 7.3 (Gatti وآخرون ،2010) والرقم الهيدروجيني الافضل لفعالية الانزيم المنتج من *Staphylococcus sp.* يتراوح بين 8.0-8.5 وان الانزيم يمتلك فعالية تجاه مدى واسع من الارقام الهيدروجينية (7-12)(Christophe وآخرون ،2000).



شكل 3 . تأثير الرقم الهيدروجيني في أنتاج اللايبيز من *Pseudomonas cepacia* P5.

كما أظهرت النتائج في الشكل (4) ان فعالية انتاج الانزيم تزداد بزيادة درجة الحرارة حيث كانت اعلى انتاجية له عند درجة 40 م اذ بلغت الفعالية النوعية للإنزيم 5.8 وحدة \ملغم بروتين وكانت هي الدرجة المثلى للإنتاجية ثم انخفضت تدريجيا بزيادة درجة الحرارة الى ان وصلت 2.5 وحدة \ملغم بروتين عند درجة 55 م. ان زيادة درجة الحرارة عن 8 مئوية لها تأثير مثبط في انتاجية ا نزيم اللايبيز المنتج من *Ps. fluorescens* و *Ps. fragi* ، في حين يكون التثبيط سريعاً لأنزيم اللايبيز بوجود انزيم البروتييز(Subtitles) المنتج من *B. subtilis* عند درجة 20 درجة مئوية (Saxena وآخرون ،1999 ; Brainو Boris ،2010). مما يتضح أن أنزيم اللايبيز البكتيري يثبط بوجود انزيمات البروتييزات ويزداد التأثير عند ارتفاع درجة الحرارة الى (30-40) مئوي(Claiver و Gregory،2001) ان انخفاض الفعالية النوعية للإنزيم ربما يعود الى عدم ملائمة درجة الحرارة لنمو البكتريا وانتاج الإنزيم.حيث إن لدرجة الحرارة دور مهم في إنتاج الإنزيم من الأحياء المجهرية عن طريق تأثيرها في ذائبية الاوكسجين والطاقة الحركية للجزيئات ,مما يؤدي الى زيادة الطاقة الحركية للإنزيم والمادة الأساس ويزيد من سرعة التفاعل الكيميائي لكن زيادتها عن الـ 50م يؤدي الى تحطيم الاواصر التساهمية للشكل الثلاثي للإنزيم وبذلك يفقد قابليته على الارتباط بالمادة الاساس ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج اللايبيز من العزلة . *Bacillus stearothermophilus* هي 50 م (Lee و Deininger ، 2001).



شكل 4. تأثير درجات الحرارة المختلفة في إنتاج اللايبيز من العزلة *Pseudomonas cepacia* P5 .

بينت النتائج جدول (2) الى ان افضل انتاجية للايبيز من العزلة *Pseudomonas cepacia p5.* تكون عند اضافة 5% من زيت الكتان الى الوسط الزرعي حيث بلغت الفعالية النوعية للإنزيم 5.5 وحدة\ملغم بروتين ، إن توفر المواد المغذية الاساسية في الوسط وجاهزيتها للايض يؤدي الى الاسراع في النمو (الخفاجي ،1987) . ولكي تستطيع خلايا الاحياء المجهرية الاستفادة من المواد الغذائية المعقدة فإنها تقوم بإنتاج العديد من الانزيمات المحللة لكي تتمكن الخلايا من النمو (ساجدي والباقر،1987)، تتأثر إنتاجية إنزيم اللايبيز بعدة عوامل بيئية منها (مصادر الكاربون ووجود السكريات المتعددة غير المتايضة والايونات)(Jaeger وآخرون ،1999) لقد أظهرت الزيوت النباتية (زيت الزبد و زيت الذرة وزيت الزيتون) دور في تثبيط اللايبيز المنتج من *B. licheniformis* و *Staphylococcus* sp. في حين تحفز ثلاثي الكليسريدات (زيت الزيوت وزيت بذور القطن)

جدول 2 . تأثير إضافة زيوت مختلفة الى وسط الران بدل زيت الزيتون على فعالية انزيم اللايبيز .

اسم الزيت المضاف للوسط الزرعي	الكمية (مل)	الفعالية النوعية للايبيز وحدة \ ملغم بروتين
زيت الزيتون Olive oil	5	4.5 عينة سيطرة
زيت القطن Cotton oil	5	2.1
زيت عباد الشمس Sunflower oil	5	3.6
زيت الكتان Linseed oil	5	5.5
زيت الخروع Castor oil	5	1.9
زيت جوز الهند Coconut oil	5	2.9
زيت الذرة Corn oil	5	4.3

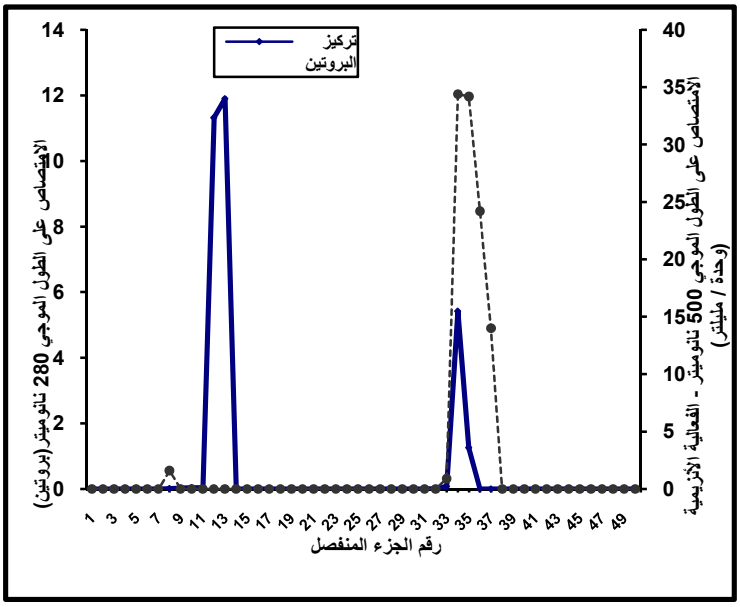
والأحماض الدهنيــة (الاوليك واللينوليك واللينولنيك) اللايبيز المنتج من *Ps. mephitica* في حين كان زيت النخيل وزيت الزيتون الأفضل في إنتاجية اللايبيز من بكتريا*Bacillus stearothermophilus* وأعطى الأول إنتاجية أفضل من الثاني (Lee و Deininger 2001). اعتبر وجود زيت الخردل في وسط الإنتاج الأفضل في إنتاج اللايبيز من بكتريا *pseudomonas sp* حيث أعطى فعالية إنزيمية مقدارها 11.4 وحدة\ملغم بروتين. حيث يوفر الظروف الملائمة لإنتاج اللايبيز(Rathi ، 2000) كما استخدم زيت الكتان وزيت الخردل وزيت جوز الهند وزيت الخروع وزيت النخيل وزيت عباد الشمس وزيت فول الصويا لإنتاج اللايبيز من بكتريا *Pseudomonas cepacia* وأعطى زيت الخردل أعلى فعالية للإنزيم يليه زيت فول الصويا (Syed وآخرون ،2010).

بينت النتائج في جدول (3) ان الترسيب بكبريتات سجل فعالية انزيمية مقدارها 13 وحدة\ مل وبحصيلة انزيمية مقدارها 40.8% وبعدد مرات تنقية 2.9 مرة . استخدمت هذه الخطوة كخطوة اولية لتنقية اللايبيز من العزلة البكتيرية *Pseudomonas cepacia* وتلت هذه الخطوة عملية الديلزة ثم التركيز بالسكروز واستكملت عملية تنقية الانزيم بإضافة خطوة الترشيح الهلامي باستخدام عمود DEAE- Sephadex A25 ونتج عن هذه الخطوة قمتان للبروتين (شكل 5) حيث تركزت الفعالية الانزيمية في القمة الثانية اذ بلغت 35 وحدة \ مل وبعدد مرات تنقية 7.9 مرة وبحصيلة انزيمية 36.6% . ان هذا يدل على ارتباط الانزيم الذي يحمل شحنة سالبة بالمجاميع الموجبة للمبادل الايوني ، ولقد استخدم هذا المبادل لما يمتلكه من قدرة عالية على الفصل ولسهولة تحضيره (Kazluskas و Bornscheuer،2006) ولقد أستخدمت عدة طرائق لتنقية أنزيم اللايبيز من مصادر مختلفة وبالأخص من البكتريا ، تضمنت استخدام كل من كروماتوغرافيا التبادل الايوني DEAE-Cellulose والترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephadex G-150 .(Budhiraja ،2004) .

يبين جدول(4)عند حضن الإنزيم مع تراكيز معينة من ايونات لفلزات مختلفة، لوحظ تفاوت في تأثيرها في فعالية الإنزيم المنقى من العزلة*Pseudomonas cepaciaP5* حيث أشارت النتائج إلى تباين تأثير الايونات في فعالية الإنزيم ، و لوحظ إلى أن ايونات Mg^{+2}، Ca^{+2} ، Ba^{+2} أدت إلى زيادة الفعالية الإنزيمية بنسبة 130% ، 150% ، 135% على التوالي بينما أدت ايونات K^{+} و Zn^{+2} وNi^{+2} إلى تثبيط الفعالية الإنزيمية إلى 10% و25%و 5% على التوالي مقارنة مع عينة السيطرة .ويمكن أن يعزى الانخفاض في فعالية اللايبيز إلى تأثير الايونات الفلزية المكونة للملح كالخارصين(Zn^{2+})والبوتاسيوم (K)، في تركيب الإنزيم إذ تتفاعل الايونات الموجبة الثقيلة مع مجاميع السلفهايدرل الحرة (-SH) ومجاميع الاميدازول والكاربوكسيل في الموقع الفعال للإنزيم مما ينتج عنه فقدان الإنزيم لنشاطه (Budhiraja ، 2004) .

جدول 3 . خطوات تنقية أنزيم اللايبيز المنتج من خلايا العزلة المحلية *Pseudomonas cepacia* .

خطوة التنقية	الحجم (مللتر)	الفعالية الأنزيمية وحدة/مل	تركيز البروتين ملغم/مللتر	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الأنزيمية (%)
المستخلص الأنزيمي الخام	90	4.4	12	53	4770	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم (55 %)	30	13	5	65	1950	2.9	40.8
كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام DEAE Sephadex A25	13	35	2	50	1750	7.9	36.6



شكل5 . كروماتوكرافيا التبادل الأيوني لتنقية أنزيم اللايبيز من بكتريا *Pseudomonas cepaciaP5* باستخدام عمود التبادل الأيوني DEAE sephadex A25 (15 × 1.5) سم الذي تمت موازنته بمحلول (0.02) مولر دارئ الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني (8.6) ثم الاسترداد بمحاليل متدرجة القوة الأيونية 0.05، 0.1، 0.2،0.3، 0.4) بطريقة الـ Step wise مولر برقم هيدروجيني (8.6) , سرعة الجريان 30 ملليتر / ساعة . (حجم الجزء: 5 ملليتر) .

وتختلف الآلية التي تعمل بها الايونات الموجبة والسالبة المنشطة للإنزيم ، فالايون قد يغير من الاتجاه الفراغي للبروتين لكي يسمح للارتباط الصحيح بين مادة الا ساس والانزيم (المنسي والشريدة ، 2000) . إن فعالية أنزيم اللايبيز المنتج من *Ps. aeruginosa* المحلل لزيت الخردل تزداد بمقدار اربع مرات بوجود ايون الكالسيوم (Syed واخرون، 2010) .لقد ادت ايونات Ba^{+2} الى زيادة الفعالية الانزيمية لإنزيم اللايبيز المنقى من العزلة *Burkholderia* sp على حين ادت ايونات Zn^{2+} Cu^{+2} الى تثبيط فعالية اللايبيز المنقى من العزلة *Pseudomonas* sp. (Diaz و Armk ، 2003).

جدول 4 . تأثير الأيونات الفلزية في فعالية االلايبيز المنقى جزئيا من العزلة *Pseudomonas cepacia P5* .

المادة	التركيز (ملي مولار)	الفعالية المتبقية %
$MgSO_4$	10	130
$BaCl_2$	10	135
$CaCl_2$	10	150
KCl	10	10
$ZnSO_4$	10	25
$NiCl_2$	10	5

وتبين نتائج الجدول (5) انخفاض فعالية انزيم اللايبيز قيد الدراسة عند حضنه مع مركب pentanol وAcetone, DTT بتركيز 20 ملي مولاري الى (10.2و10و35)% على التوالي

بينما احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه مع 20 ملي مولار من EDTA و n-Hexan على حين زادت فعاليته الى 145 % عند حضنه مع نفس التركيز من مركبTween80 . ويمكن تفسير تأثير العوامل المختزلة في فعالية الانزيم من خلال اختزالها للأواصر ثنائية الكبريتيد (S-S) وذلك عن طريق كسرها وتغير تركيب الانزيم وبالتالي فقدان فعاليته (Budhiraja، 2004) . أن عدم تأثير الإنزيم عند معاملته بالـ EDTA يؤكد أنه ليس من الانزيمات الفلزية (metalloenzyme) والتي تمتاز بأن أيون الفلز يشكل مركبا أساسياً في الموقع الفعال للإنزيم يعتمد عليه في فعاليته ، حيث تقوم العوامل الكلابية عند اضافتها بتكوين معقدات مع ايون الفلز وازالته مما يؤدي الى تثبيط فعالية الانزيم.(Colla وآخرون ،2009)،لقد توصل Tan و Yu (2004) إلى أن اللايبيز المنتج من بكتريا *Staphylococcus aureus* لا تتأثر فعاليته عند اضافة EDTA الى وسط التفاعل تدل هذه النتائج على أن الانزيم يحتوي على مجموعة السلفهايدريل (-SH) ولتأثره بالمواد المختزلة أي انه من أنزيمات اللايبيزات الثايولية (Thio Lipases) . وقد أثبتت دراسات أخرى تأثر إنزيمات اللايبيزات المنتجة من *Staphylococcus. aureus* بالعوامل المختزلة مثل (مركبتوأيثانول والسستاين والكلوتاثيون) عند استخدامها بتركيز 5% (Tembhurkar وآخرون ،2012) .

جدول 5 . تأثير بعض العوامل الكلابية والمختزلة في فعالية الانزيم المنقى حضن الانزيم مع محلول مادة التفاعل بدرجة 40 مئوي لمدة 20 دقيقة وقدرت الفعالية تجاه زيت الكتان .

المادة	التركيز (ملي مولر)	الفعالية الانزيمية ا لمتبقية%
DTT	5	80
	10	45.4
	15	28.8
	20	10.2
EDTA	5	100
	10	100
	15	98
	20	100
Tween80	5	100
	10	112
	15	122
	20	145
Pentanol	5	50
	10	30
	15	12
	20	10
n- Hexane	5	88.2
	10	100
	15	95
	20	100
Acetone	5	50
	10	33
	15	40
	20	35

المصادر

الخزرجي ، سندس لطيف .1997 . تطوير أنتاج الدكستران من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* المعزولة محلياً . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد .

الخفاجي ، زهرة محمود . 1987 . الفعاليات الحيوية للبكتريا . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي . جامعة بغداد.

الصفار ، منتهى عبدا لكريم . 2003 .ا نتاج وتوصيف انزيم اللايبيز من عزلات محلية لبكتريا *Serratia odoriferia* .اطروحة دكتوراه .كلية العلوم . جامعة بغداد.

ساجدي ، عادل جورج و الباقر ، علاء يحيى . 1987 . المايكروبايولوجي الصناعي (الجـزء الاول) أساسيات التخمرات الصناعية . مطبعة جامعة البصرة .

المنسي ، عرسـان ارشد والشريدة ، محمد شريف . 2000 . مقدمة في الكيميـــاء الحيوية (1). وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . مطبعة جامعة الموصل.

Adham.M.A.2003.Purification and partial characterization of psychotrophic *Serratia marcescens* lipase .*Diary Science* . 70:248-250.

Acikel,U.M. , M. and M. Ersan.2011.Effects of composition growth medium and fermentation conditions on producer lipase by *Rizopus delemar* .*Turk Biol*. 35:33-45.

Bradford ,M.M. 1976 . A rapid and Sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding . *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Brain,W. and,H. Boris .2010. Colorimetric quantitative of lipid from algal culture .*Microbiol .methods 80:(3).262-266.*

Bornsche,T and J Kazlauskas.2006. Hydrolyses in organic synthesis 2nd ed .*Wiley-VC verlag .ISBN.*-527-531.

Budhiraja,R.P.2004.*Separation chemistry ,New age international(P) Ltd.ISBN.13:978-98* .

Christophe,M., M. Angela and T. Keith. 2000. Identification of second lipase gene in *E.coli* and *Staphylococcus epidermidis* .*Microbio.*146(6): 1419-1427.

Claivre ,V. and,Z. Gregore, . 2001. Hyper thermophilic enzymes :source, uses and molecular mechanisms for thermo stability .*Microbiol. and Molecular.* 65(1):1-43.

Colla, M.,C.S.Rezzadori, J.Debon,M.Tibolla and J.Costa .2009. A solid state bioprocess for selection lipase- producing filamentous fungi .*National institute of health Pup- med .Index of medline.*

David,N. and,C Mechael. 2004. Principle of biochemistry 4th ed .*Prentice Hall .New York.*

Didier ,R. 2010. Cltematic bainical microbiology and infection. *Microbiol.* 17(107).

Diaz,B .and ,J.P. Arm.2003. Several other types of lipase activities exist in nature .*Enzymology* .531(2):38-46.

Don,J.B.,R.K.,Noel and T.S. James. 2005. Berge's manual of systematic *bacteriology 2nd ed Press Hall .New York.*

Dura, M.A.,M.Flores and F. Toldera.2002.Purification and characterization of glutaminase from *Debaromyces* sp. J. *Food Microbiology.*76:117-126.

Gatti,L.P.,A.R. Natalello and M. Lotti .2010. Evolution of stability in ocold – active enzyme elitics specificity relaxation and high lighted substrate related effects on temperature adaptation .*Bacteriology. and Bioscience* .2(1):212-216.

Gerba,C.P. and I.L .Pepper. 2004. Environmental microbiology. MICR Press.USA.

Jan,W.,F.A.Simons and H.Adams .2004. The lipase from *Staphylococcus aureus* .*Biotechnol.*242(3): 760- 769.

Jennifer, L.P. and G.S .Doug . 2001. Diversity of the *Burkholderla cepacia* complex and implications for flask assessment of biological control strains . *J.annurev.phyto.*39:225-258.

Jewell,S. N. 2000 . Purification and characterization of novel protease from *B urkholderia* strain 2.2Nmaster thesis submitted to the department of biology,state university ,Blacksburg,VA .

Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra and M.T. Reetz. 1999 . Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology., Three Dimensional Structure and Biotechnological Applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol*. 53: 315-351 .

Kulkarni, N. and R.V. Gadre.1999 . A novel alkaline . thermostable, protease . free lipase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters.* 21(10): 897-899.

Lee ,J.and R.A .Deininger.2004.Rapid detection microbes methods in beach water .*J. Luminescence*.19:31-36.

Matthew,A.R.,C.Wolfgang and J.J. Mekalanos. 2004.Effect of metabolic of. imbalance on gene type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa J.Infection and Immunol*.72(3):1383-1390.

Praveen,K.and A.Yasuthisa.2011.Strategies for discovery and improve of enzyme function :state of art and opportunities *J.Microbiol.Technol.5(33):1-18.*

Rathi,P., R.K.Saena, R.Gupta . 2001 . Ahyperthermostable ,alkaline lipase from lipase from *Pseudomonas cepacia* with the property of thermal activation . *Biotechnol*..Lett.22:495-498.

Saxena, R.K., P.K., R. W. , Davidson, S. Bradoo and R. Gulati. 1999 . Microbial Lipases: Potential Biocatalysts for the future industry. *Current Science*. 77(1): 101-151.

Selina,S.C.,M.D. Chen and W.Russell .2012. *Pseudomonas* sp. infection. *Microbiol.*18(20).

Sharma, S. and Gupta, M.N. 2001 . Alginate as a macroaffinity ligand and an additive for enhanced activity and thermostability of lipases. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 33(part 3): 161-165.

Singer,B.G. and ,P.M Skarina. 2008 . Functional and structure characterization of four Glutaminase from *E coli* and *Bacillus subtilis*. *J.Chem.Biol*.1:75-86.

Syed,M.N., S.B. Iqbal,S.,Bano,S.Khan and A.Shah .2010. Purification and characterization of 60 KD lipase linked with chaperonin from *Pseudomonase aeruginosa* BN-1. *African* J. *Biotehnol*. 9(45):7724-7732

Tan T. and M. Yu . 2007 . Purification and characterization of extracellular lipase Lip2 from*Yarrowia lipolytica .Process Biochemistry* . 42(3):38-391.

Tembhurkar,V.R.,M.B. Kulkarni . and S.A. Peshwe . 2012 . Optimization of lipase production by Pseudomonas spp. Submerged batch process in shake *flask culture. Since .Research report .2(1):46-50.*

Venil,C.K.2009. Statistical optimization on medium component for the producer of lipase by *Serratia marcescens Microbiol.*7(1)498-506.

Wang X, Yu X ,Xu .2009 . Homologous expression ,purification and characterization of novel high alkaline and thermal stabile lipasefrom *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 .J.*Enzmol Microbiol.Technol.*45(2):94-102*)*

Wigfield ,S.M., G.P.Rigg,M.Kavari, . andJ.P. Burine 2002 . Identification of immunodominat Drug efflux pump in *Pseudomonas cepacia .J.Antimicrob.AGE.Chem.49:619-62.*

Yuan,L.,I.Kurek, J.Engilish and K.Robert .2005. Laboratory directed protein evolution .*Microbiol.anaMolecul.69(3):373-392.*

PRODUCTION AND PURIFICATION OF EXTRA CELLULAR LIPASE FROM *PSEUDOMONAS CEPACIA* AND STUDY THE PARTIALCHARACTERIZATION .

Alyaa M.Abdelhameed* Mohamed K. Kither * Minna.S.Farmman**

*Biology Dept. - College of Science - University of Diyala- Republic of Iraq.
**Biology Dept. - College of Science - University of Anbar - Republic of Iraq.

ABSTRACT

Twelve isolates of Pseudomonas were obtained from thirty five(34%) from different species soil ,plants and river s water in al Muqdadia fields .Ability of lipase production by these isolates was screened *Pseudomonas* P5 was highest lipase producer identified as *Pseudomonas cepacia* .

Lipase production conditions were studied .the highest production of lipase was observed when mineral medium containing 5% linseed oil inculcated with bacterial cells e ,ph 7.5 and incubated at40 c in shaking incubator120 r.p.m for 18 hr.

Lipase was purified from bacterial cells by two steps including precipitation with ammonium sulfate and Ion exchange chromatography by DEAE- Sephadex-A25, fold of purification was 35 U\ml with 36.5% enzyme recovery .

The effect of some metal ions on lipase activity was studied .The Ca^{+2} increased lipase activity to 150%.

The effect of specific substances on enzyme activity was investigated ,The result showed that Tween80 raised lipase activity to 145%.

Key words : Inhibitors *Pseudomonas cepacia* ,Lipase enzyme ,Characterization,