استخلاص وتنقية انزيم اللاكيز المنتج من بعض الفطريات

شهيرة عباس حسوبه

د. نيفين صالح جويلي

المستخلص

تم دراسة انتاج و استخراج و تنقية إنزيم اللاكيز الخارج خلوي من بعض الفطريات المعزولة من عينات مختلفة من التربة في محافظة جدة – المملكة العربية السعودية. و قد تم عزل عشرة أجناس من الفطريات وهي (*Aspergillus* sp.1, *Alternaria* sp.1) *Aspergillus* sp.2, *Aspergillus* sp.3, *Botrytis* sp.1, *Fusarium* sp.1, *Penicillium* sp.1, *Penicillium* sp.2, *Penicillium* sp.3 (*Rhizopus* sp.1 تحتوي على ٢٠٢ مستعمرة فطرية من سبعة عينات من التربة اخذت من ثلاثة مناطق تقع في محافظة جدة، المملكة العربية السعودية. و قد تم اختبار وجود انزيم اللاكيز الخارج خلوي في الراشح للفطريات العشرة المعزولة من محافظة جدة وأوضحت النتائج أن فطرة ألترناريا نوع ١ هو أقوى السلالات المعزولة على الاطلاق احصائيا من حيث القدرة على انتاج انزيم اللاكيز (٠.٥٨unit/ml) . للحصول على أعلى إنتاج لإنزيم اللاكيز الخارج خلوي لفطرة ألترناريا ألترناتا تم دراسة تأثير العوامل الغذائية و الفيزيائية في بيئة النمو الأساسية. و كان أفضل إنتاج للإنزيم (٠.٧٤ unit/ml) مع استخدام السكروز كمصدر كربوني متبعا بالنيتروجين غير العضوي وهو كلوريد الأمونيوم. وقد كان أفضل رقم ايدروجيني و أفضل درجة حرارة لتحسين انتاج انزيم اللاكيزفي البيئة هما ٥ و٥٠ ° م على التوالي. وقد تم تنقية للانزيم وكانت أقوى السلالات المنتجة له هي فطرة ألترناريا ألترناتا لدرجة التجانس باستخدام كبريتات الأمونيوم لترسيب الانزيم وبعد ذلك تم عمل فصل غشائي ومن ثم تنقية الإنزيم باستخدام الفصل الكروماتوجرافى على سيفاديكس G-100 و DEAE- سيفاديكس. وقد تضاعفت نقاوة الإنزيم فوق مستوى الإنزيم الخام ثلاث مرات، بينما ارتفع النشاط النوعي للإنزيم الى ٦.٠ unit/ml وكان بنسبة ٣٧.٥ %. وقد تم اختبارنقاوة الإنزيم وذلك بواسطة الهجرة الكهربائية (الالكتروفوريسيس) حيث أكدت الدراسة أن الإنزيم نقي تماما وظهر على شكل بقعة بروتين واحدة. وتم دراسة العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم اللاكيز النقي حيث كانت درجة الحرارة المثالية لنشاط الانزيم (0.39 unit/ml) عند ٦٠ ° م و كانت درجة تركيز أيون الأيدروجين المثالي لأقصى نشاط للإنزيم النقي (0.94 unit/ml) هي ٥. وقد كانت درجة ثبات الانزيم عند درجة الحرارة العالية (٦٠ °م) لمدة ساعه كاملة.

Extraction and Purification of Laccase Enzyme Produced by Some Fungal Species

Shahira Abbas Hassoubah

Dr. Neveen Saleh Geweely

Abstract

The production, extraction and purification of the extracellular laccase enzyme produced from some fungal species isolated from different soil sites in Jeddah district, Saudi Arabia was studied. Ten fungal species (*Alternaria* sp.1, *Aspergillus* sp.1, *Aspergillus* sp.2, *Aspergillus* sp.3, *Botrytis* sp.1, *Fusarium* sp.1, *Penicillium* sp.1, *Penicillium* sp.2, *Penicillium* sp.3 and *Rhizopus* sp.1) constituting 202 colonies were isolated from seven soil samples located in three different sites in Jeddah district, Saudi Arabia. The highest significant value of extracellular laccase enzyme (0.58 unit/ml) was showed in the culture filtrate of the *Alternaria alternata*. Optimization of some nutritional and physical factors in the basal medium in order to intensify the production of *A. alternata* extracellular laccase was carried out. The highest productivity of *A. alternata* extracellular laccase (0.74 unit/ml) occurred on sucrose and ammonium chloride as carbon and inorganic nitrogen sources respectively. The optimum pH and temperature for extracellular laccase activities was 5.0 and 50°C, respectively. The enzyme was purified to homogeneity from the most laccase producing organism (*A. alternata*) by salting out with ammonium sulphate, dialysis and passage through chromatography resins (Sephadex G-100 column and Diethylaminoethyl sephadex column). The purified laccase enzyme resulted in 3.0 fold of purification over the crude extract, exhibited a specific activity of 6.0 unit/ml with the recovery of 37.5 %. Test for purity by Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis technique (SDS-PAGE) was resulted in a single protein band of the pure laccase. Studying factors affecting the activity of the purified laccase was carried out. The optimum reaction temperature and pH for maximum purified laccase activities (0.39 and 0.94 unit/ml) were 60°C and 5, respectively. Thermostability of the purified *A. alternata* laccase showed that it was stable for 1 h at 60°C.