جامعة الفيوم

كلية الزراعة

دراسات على إنتاج انزيم البروتييز

بواسطة الكائنات الحية الدقيقة

رسالة مقدمة

من

إسراء أحمد إسماعيل حسن

بكالوريوس العلوم الزراعية (علوم وتكنولوجيا الأغذية)

كلية الزراعة، جامعة الفيوم، ٢٠١١

كجزء من المتطلبات للحصول على درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية (الميكروبيولوجيا الزراعية)

كلية الزراعة

جامعة الفيوم

مصر

٢٠١٦

المستخلص

أنزيمات البروتييز المنتجة بواسطة الميكروبات المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة تتميز بأنها تتحمل درجات الحرارة العالية وهذا ملائم لبعض الصناعات وقد دعى ذلك لعزل سلالات مختلفة من البكتريا المتجرثمة المحبة لدرجات الحرارة العالية من التربة والتى لها المقدرة على انتاج الانزيم حيث تم عزل ١٦ عزلة واختبرت القدرة الانزيمية لهذه العزلات لانتخاب أقواها من حيث انتاج الانزيم ووجد أن العزلات رقم ٥ ، رقم ٨ ، رقم ٩ هم أكفأ الميكروبات المنتجة للانزيم وذلك بطريقة المزرعة المغمورة وقد تم دراسة الصفات المورفولوجية والمزرعية والفسيولوجية والوراثية لهذة العزلات التى أعطت أعلى نشاط للانزيم وتم تصنيفهم على أنهم على التوالى

Brevibacillus panacihumi S–٥ ، *Bacillus aerius* S–٨، *Bacillus aerius* S – ٩

وكذلك استخدم فى هذه الدراسة سلالة معرفة (كمرجع) وهى *Bacillus stearothermophilus* ATCC٩٧٥٣ ولقد تم دراسة تأثير الظروف البيئية لمعرفة أنسب الظروف الملائمة لانتاج أعلى انتاجية من الانزيم مثل تأثير درجة pH وحرارة التحضين و مدة التحضين ومصادر الكربون والنيتروجين المختلفة وكذلك بعض المخلفات الزراعية (مصاصة القصب وقش الأرز) وقد أوضحت النتائج أن درجة pH ٧للبيئة التخميرية أعطى أعلى انتاجية للانزيم للسلالة *B. stearothermophilus* ATCC٩٧٥٣ ~*Brevi. panacihumi* S–٥،بينما كانت درجة pH ٨ لكلا من السلالتين*B. aerius* S–٨،*B. aerius* S–٩.

واتضح من النتائج أيضا أن لدرجة حرارة التحضين وكذا مدة التحضين أثر واضح على معدل إنتاج الإنزيم للسلالات المختبرة حيث يعتبر الإنتاج أعلى مايمكن عند استخدام درجة حرارة ٥٠ م° لفترة تحضين تصل الى ٧٢ ساعة .

يعتبر الجلوكوز افضل مصدر للكربون يلية الدكسترين يليه السكروز والمالتوز ثم الجليسرول لكل من السلالات *B.stearothermophilus* ATCC٩٧٥٣ ، *B. aerius* S – ٩ ، *B. aerius* S – ٨, بينما أعطى الدكسترين والجلوكوز أعلى إنتاجية للسلالة *Brevibacillus panacihumi* S–٥ .أما بالنسبة لمصادر النيتروجين فقد اعطى تركيز ١،٥% تربتون أعلى إنتاجية لكل السلالات المختبرة بينما تركيز ١% مستخلص الخميرة أعطى اعلى أنتاجية للسلالتين

Brevi. panacihumi S–٥، *B.stearothermophilus* ATCC٩٧٥ ، بينما الكنترول (٥و%مستخلص خميرة) كان مناسبا لكل من السلالتين *B. aerius* S – ٨، *B. aerius* S – ٩. وأوضحت النتائج أن قش الأرز كان أفضل من مصاصة القصب لكل من السلالات المستخدمة.

وقد درست أيضا إستخلاص الإنزيم باستخدام بعض المذيبات العضوية المختلفة (الأسيتون –الإيثانول – الإيزوبروبانول) وملح كبريتات الأمونيوم بتركيزات مختلفة تتراوح ما بين ٣٠–٨٠%. وا ٍتضح من النتائج أن كبريتات الأمونيوم اعطت افضل أستخلاص عند تركيز يتوا ح ما بين ٧٠–٨٠% بينما التركيز ٨٠% أعطى أعلى استخلاص وكذلك نشاط نوعى لكل السلالات المختبرة . وقد تم معرفة الوزن الجزيئى لبروتين الإنزيم بواسـطة

التفريد الكهربى بطريقة SDS–PAGE لكل السلالات المختبرة وكانت النتائج وجود أربع حزم من البروتين مختلفة الأوزان الجزيئية تتراوح ما بين ٢٠–٧٥ كيلو دالتون ، وكانت الأوزان الجزيئية للحزم متباينة (٣٠،٤٨،٦٣، ٢٥ كيلودالتون).

و أوضحت النتائج أيضا أن درجة الحرارة المثلى لنشاط الإنزيم كانت ٧٠ م° للسلالات المختبرة واعلى نشاط على درجة pH ٧ للسلالة *B. stearothermophilus* ATCC٩٧٥٣ , درجة pH ٨ للسلالات الثلاث الأخرى المختبرة.

وعند دراسة درجة ثبات الإنزيم وجد ان ايون الكالسيوم حسن من نشاط الانزيم حيث لم يظهر أى فقد فى نشاط الإنزيم (١٠٠%) حتى ٤٥ دقيقة للسلالة *Bacillus aerius* S–٨ ، ٣٠ دقيقة لكل من ال سلالات الثلاث الاخرى المختبرة .

الكلمات الدالة : البكتريا المحبة للحرارة - الإنزيمات المحللة للبروتين – الظروف البيئية – استخلاص الإنزيم - خواص الإنزيم