قياس نشاط انزيم الألفا أميليز النقي المعزول من بعض الفطريات

خلود صالح ثابت

إشراف

أ.د. نيفين صالح جويلي

د. صالحة يحيى العقيلي

المستخلص

في هذا البحث تم إنتاج وإستخلاص وتنقية إنزيم الألفا أميليز خارج الخلوي من بعض الفطريات المعزولة من خمسة عينات مختلفة من التربة في المملكة العربية السعودية. تم عزل ستة أجناس من الفطريات وهي (اسبرجلس فلافس، اسبرجلس نايجر، اسبرجلس تيروس، كلادوسبوريوم هيباريوم، كاننجاميللا اكنيولاتا و بنيسيليوم اتاليكوم) والتي تحتوي على ٢٦ مستعمرة فطرية من خمسة عينات من التربة. أوضحت النتائج أن الراشح الفطري لجنس اسبرجلس نايجر هو أقوى الأجناس المعزولة إحصائياً من حيث القدرة على إنتاج إنزيم الألفا أميليز (٦٤،٧٨ وحدة /ملل). وتم دراسة تأثير العوامل الغذائية والفيزيائية في بيئة النمو الأساسية وذلك للحصول على أعلى إنتاج لإنزيم الألفا أميليز خارج الخلوي لفطرة اسبرجلس نايجر. وكان أفضل إنتاج للإنزيم (٥٦،٧٤ و ٦٣،٧٦ وحدة / ملل) باستخدام الفركتوز كمصدر كربوني متبعا بالنيتروجين غير العضوي وهو نترات البوتاسيوم. كما أن أفضل رقم هيدروجيني وأفضل درجة حرارة لتحسين إنتاج إنزيم الألفا أميليز في البيئة هما ٧ و ٢٠ م° على التوالي. تم تنقية الإنزيم المنتج من أقوى الأجناس المنتجة له وهو فطرة الاسبرجلس نايجر لدرجة التجانس باستخدام كبريتات الأمونيوم متبعا بالفصل الغشائي ثم الدمج بين كروماتوجرافيا الترشيح الهلامي باستخدام السيفاديكس ج-١٠٠ وبين كروماتوجرافيا التبادل الايوني بإستخدام الداي ايثيل امينو ايثيل سيفاديكس. وقد كانت النتيجة النهائية لتنقية انزيم الالفا اميليز هي تضاعف درجة التنقية فوق مستوى الإنزيم الخام بمقدار ٥٩،١ ضعف، بينما ارتفع النشاط النوعي للإنزيم الى ٦١،٣٧٧ وحدة / ملل وكان بنسبة ٠٧،٩٥ % . تم اختبار درجة تنقية الإنزيم وذلك بإستخدام تقنية الهجرة الكهربائية (صوديوم دوديسيل سلفات بولي اكريلامايد جل الكتروفوريسيس) حيث أوضحت الدراسة ظهور الإنزيم النقي على شكل بقعة بروتين واحدة. وتم دراسة العوامل المؤثرة على نشاط إنزيم الألفا أميليز النقي حيث كانت درجة الحرارة المثلى لأقصى نشاط للإنزيم (٢٧،٦١ وحدة /ملل) عند ٣٠ م°. و كانت درجة ثبات الإنزيم النقي لمدة ساعة كاملة عند درجة الحرارة ٣٠ م°. وقد كان الوسط المتعادل بدرجة حموضة (٧) هوالوسط الأمثل لأفضل إنتاج لإنزيم الألفا أميليز النقي (٧٩،٩٤ وحدة /ملل).

Measurement of the activity of the purified Alpha-amylase produced by some fungal species

Khulood Saleh Thabit

Supervised By

Prof. Dr. Neveen Saleh Geweely
Dr. Saleha Yehya Alakilli

Abstract

The production, extraction and purification of extracellular α-amylase enzyme from some fungal species isolated from five different soil sites in Saudi Arabia. Six fungal species (*Aspergillus flavus, A. niger, A. terreus, Cladosporium herbarum, Cunninghamella echinulate* and *Penicillium italicum*) constituting 26 colonies were isolated from the five tested soil samples. The highest significant value of extracellular α-amylase (64.78 unit/ml) was showed in the culture filtrate of the *A. niger*. Optimization of some nutritional and physical factors in the basal medium in order to intensify the production of *A. niger* extracellular α-amylase was carried out. The highest productivity of *A. niger* α-amylase (74.56 and 76.63 unit/ml) occurred on fructose and potassium nitrate as carbon and inorganic nitrogen sources, respectively. The optimum pH and temperature for the maximum productivity of extracellular α-amylase activities were 7.0 and 20 °C, respectively. The enzyme was purified to homogeneity from the most efficient α-amylase producing organism (*A. niger)* by salting out with ammonium sulfate, dialysis and combination of gel filtration chromatography (Sephadex G-100) with anion exchange chromatography (Diethylaminoethyl Sephadex). The final purified α-amylase resulted in 1.59 fold of purification over the crude extract, exhibited a specific activity of 377.61 unit/ml with the recovery of 59.07 %. Test for the purity by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis technique (SDS-PAGE) resulted in a single protein band of the pure α-amylase. Studying the factors affecting the activity of the purified α-amylase was carried out. The optimum reaction temperature for maximum purified α-amylase activity (61.27 unit/ml) was 30 °C. Thermostability of the purified *A. niger* α-amylase showed that stable after 60 minutes incubation time at 30 °C. Neutral pH (7) was optimum for the maximum productivity (79.94 unit/ml) of the purified α-amylase enzyme.