إستخلاص انزيم الكيراتينيز من العزلة المحلية *Bacillus licheniformis* وتنقيته جزئياً وتوصيف

Extruction of keratinase from the local isolate *Bacillus licheniformis* and partially purified and characterized

رشا طالب عبدالله　　عبدالكريم جاسم هاشم　　جاسم محمد كرحوت*

قسم التقنيات الاحيائية/ كلية العلوم / جامعة بغداد
* كلية الطب /جامعة بغداد

Rasha T. Abdullah　　Abdulkareem J. Hashim　　JASIM M. Karhout*

Biotechnology dept./ College of science/ University of Baghdad
* College of medicine / University of Baghdad

المستخلص

هدف البحث الى تنقية انزيم الكيراتينيز والمنتج من العزلة المحلية *Bacillus licheniformis* بخطوتين تضمنت التركيز بكبريتات الامونيوم بنسبة تشبع 40 % ، وتقنية كروموتوغرافيا التبادل الايوني بأستعمال المبادل CM-Cellulose ، وكان عدد مرات التنقية 12.6 بحصيلة انزيمية مقدارها 17 % . وقد حددت الخصائص الكيموحيوية للانزيم : الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الكيراتينيزهو 7.5 وللثبات تراوح بين 6-9.5 ، و بلغت درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم 50 م والثبات الحراري عند 25-45 م . اظهر الانزيم فعالية إتجاه مواد تفاعل مختلفة هي : الكازائين ، والبومين المصل البقري ، والجيلاتين ، والاضلاف ، وشعر الانسان ، وريش الدجاج ، والصوف ، فوجد أن الانزيم امتلك ميلاً كبيراً اتجاه الكازائين اذ بلغت الفعاليةالانزيمية 0.6 وحدة\ مليلتر . وثبط الانزيم بوجود مادة PMSF وبعض الايونات المعدنية مثل ايونات الزئبق والحديد والنحاس والمنغنيز ، ونشطت فعالية الانزيم بوجود ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم والزنك والالمنيوم .

Abstract

The keratinase produced from local isolate *Bacillus licheniformis* was purified by two steps included precipitation by ammonium sulphate with 40% saturation; followed by ion exchange using CM-Cellulose column. The enzyme was purified to 12.6 times in the last step with an enzyme yield of 17%. Enzyme characterization results indicated that: The optimal pH for enzyme activity was 7.5 and it was stable at 7-9.5. The optimal temperature for enzyme activity was 50°C and it was stable for 30 min at 25-45 °C. Substrate specifity was tested using casein, Bovine serum albumin, gelatin, hooves, human hair, chicken feathers and wool; higher specifity was recorded using casein gave 0.6 unit /ml. The enzyme was inhibited by PMSF and metal ions like Hg^{+2}, Fe^{+2}, Cu^{+2} and Mn^{+2}, and activated by Ca^{+2}, Mg^{+2}, $Zn^{+2}$and Al^{+3}.

المقدمة:

يعد الكيراتين البروتين الاوفر في تركيب الخلايا الطلائية للفقريات ، ويمثل المكون الرئيسي للجلد وملحقاته مثل : الأظافر والشعر والريش والصوف . ترتبط حزم البروتين ارتباطاً وثيقا للحلزون الفا (α-helix) مكونة البروتين (α-keratin) او في تركيب بيتا مكونة الكيراتين بيتا (β-keratin) ، ان التركيب المستقر للكيراتين الخيطي يعود الى درجة عالية من الترابطات العرضية والمتمثلة بالاواصر الكبريتية الثنائية والاواصر التساهمية والتداخلات الكارهة للماء [1] ؛ لذلك فان المواد الكيراتينية تكون غير ذائبة بالماء وتكون مقاومة لفعل الانزيمات المحللة للبروتين مثل : التربسين والببسين والبابايين .

ان مجموعة البروتييزات التي لها القدرة على تحلل الكيراتين غير الذائب تحللاً مائياً بفعالية اكبر من البروتييزات الاخرى تسمى بالكيراتينيزات (Keratinases) [2] . وتصنيف الكيراتينيز الكيميائي هو (Ec. 3.4.99.11) [3] .

ومعظم خصائص الكيراتينيزات تكون مشتركة على الرغم من اختلاف مصادرها ، حيث تعود بصورة رئيسة للانزيمات الخارج خلوية لمجموعة بروتييزات السيرين (serine proteases) ، ماعدا الكيراتينيزات المنتجة من الخمائر حيث تعود الى مجموعة البروتييزات الاسبارتيلية (aspartic proteases) [4] ، ان الوزن الجزيئي للانزيم يتراوح بين (20-60) كيلو دالتون. وتزداد فعالية الكيراتينيز في البيئات القاعدية وعند درجات الحرارة العالية اكثر من 50م ، ويكون ثابتاً بدرجة حرارة 85 م [5] .

للانزيم تطبيقات كثيرة في مجال التقنيات الاحيائية من خلال قدرته على تحلل الكيراتين مائياً مثلاً : في مجال الدباغة وانتاج الاحماض الامينية و الببتيدات و صناعة المنظفات و الانسجة و التحول الحيوي (Bioconversion) والطب وانتاج الغاز السائل و مواد التجميل [6 ، 7] ، ونظراً لأهمية الكيراتينيز في المجالات الطبية والاقتصادية هدفت الدراسة الى تنقية انزيم الكيراتينيز المنتج من العزلة محلية *B.licheniformis* ودراسة بعض خصائصه الكيموحيوية .

طرائق العمل:

استخلاص وتنقية انزيم الكيراتينيز

استخلاص الانزيم:

إستخلص انزيم الكيراتينيز من العزلة المنتخبة *B. licheniformis* في دراسة سابقة [8] بعد تنمية العزلة في الظروف المثلى لانتاج الانزيم . واجراء عملية الحصاد للخلايا باستخدام النبذ المركزي بسرعة 6000 دورة \دقيقة لمدة 20 دقيقة ، وأخذ المحلول الرائق وأجريت عليه خطوات التنقية اللاحقة .

تقدير فعالية انزيم الكيراتينيز

قدرت الفعالية الانزيمية على اساس تحلل بروتين الكيراتين وتحرر الاحماض الامينية مثل التايروسين بفعل الانزيم وحسب الطريقة الموصوفة من قبل [7] بعد اجراء بعض التحويرات . وذلك باضافة 0.5% مسحوق كيراتين الاضلاف (0.5 مسحوق الكيراتين في 100 مليلتر من 0.028 مولار دارئ فوسفات البوتاسيوم عند الرقم الهيدروجيني 8) الى 0.5 مللتر من محلول الانزيم والحضن عند درجة ْ45م لمدة 30 دقيقة . ثم اوقف التفاعل باضافة 1 مليلتر من محلول حامض الخليك ثلاثي الكلور 10% Trichloro acetic acid (TCA) .

اما طريقة تقدير البروتين فقد قدرت على وفق الطريقة الموصوفة من قبل [9] . وتعرف وحدة الفعالية الانزيمية بانها كمية الانزيم اللازمة لزيادة الامتصاص بمقدار 0.1 عند طول موجي 280 نانوميتر تحت ظروف القياس .

تنقية الأنزيم:

الترسيب بكبريتات الامونيوم

استعملت كبريتات الامونيوم بنسب اشباع مختلفة (20, 40, 60, 80, 90) % إذ اختيرت هذه النسب المختلفة كلاً على حدة لحين الحصول على نسبة الاشباع الافضل وتم تقدير الفعالية وتركيز البروتين فيه .

كروموتوغرافيا التبادل الأيوني

حضر المبادل الايوني كاربوكسي مثيل سيليلوز على وفق ما ذكره [10] . اضيف 5 مليلترات من المستخلص المركز الناتج من خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 40% الى عمود المبادل الايوني بابعاد (15 x 2.5) سم التي تقدر كمية البروتين فيها 0.2 ملغم \مللتر ثم غسل العمود بدارئ الفوسفات 25 ملي مولار ذي الرقم الهيدروجيني 5.8 بسرعة جريان 0.6 مللتر \دقيقة وجمع المحلول النافذ باجزاء حجم كل منها 3 مللترات ،

تمت متابعة البروتين في الاجزاء النافذة بقراءة الامتصاص على طول موجي 280 نانوميتر كما قيست الفعالية فيها وجمعت الاجزاء المحتوية على الفعالية الانزيمية، وتم تركيزها بوساطة انابيب الديلزة مع السكروز .

توصيف انزيم الكيراتينيز:

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم

حضر محلول مادة التفاعل (مسحوق كيراتين الاضلاف) بتركيز 0.5 % عند قيم من الرقم الهيدروجيني (4-11) ، وقدرت الفعالية الانزيمية في كل محلول من محاليل المادة الاساس ذات القيم المختلفة من الرقم الهيدروجيني .

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم

مزجت حجوم متساوية من محلول الانزيم مع المحاليل ذات الارقام الهيدروجينية المختلفة تراوحت بين (4-11) وحضنت المحاليل بدرجة حرارة 37م لمدة 30 دقيقة . ثم وضعت في حمام ثلجي بعدها قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم

حضن محلول الانزيم مع محلول المادة الاساس بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25-70) م لمدة 30 دقيقة ، ثم أوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية .

تعيين الثبات الحراري للأنزيم

حضن 0.5 مليلتر من محلول الانزيم المنقى جزئياً بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25-85) م لمدة 30 دقيقة بعدها مباشرة وضعت في حمام ثلجي ، ثم قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية % .

تخصص الكيراتينيز تجاه مواد اساس مختلفة

حضرت محاليل الكازئين والبومين المصل البقري والصوف وشعر الانسان والجيلاتين والاضلاف بتركيز 0.5 % بمحلول دارئ الفوسفات pH=7.5 . ومزجت بحجوم متساوية من محلول الانزيم المنقى جزئيا وحضنت لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 50 م ، ثم قدرت الفعالية الانزيمية .

تأثير مادة الـPMSF والعوامل المختزلة و الكلابية في فعالية الأنزيم.

حضرت مادة الـPMSF بتراكيز نهائية (5و10و100) ملي مولار بإذابتها في الكحول الاثيلي ، ثم حضن الانزيم مع محلول الـPMSF بنسبة (جزء من الانزيم الى جزئين من المحلول المثبط) بدرجة 37 م لمدة 30 دقيقة ، ثم قدرت النسبة المئوية للفعالية المتبقية للانزيم بالمقارنة مع فعالية الانزيم غير المعامل (معامل السيطرة) .

وحضرت محاليل 2- مركبتوايثانول (2-Mercaptoethanol) و Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) و Sodium dodycyl sulphate (SDS) بتراكيز نهائية (5و10و100) ملي مولار ، حضنت حجوم متساوية من الانزيم والعوامل الكلابية والمختزلة بدرجة 37م لمدة 30 دقيقة . ثم قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية% .

تأثير الأيونات الفلزية

حضرت محاليل كلوريدات الفلزات الاتية بتركيزين 2.5 و5 ملي مولار بصورة منفصلة لكل ملح من الاملاح المستعملة $CaCl_2$ و $MgCl_2$ و $ZnCl_2$ و $NaCl$ و KCl و $MnCl_2$ و $HgCl_2$ و $FeCl_2$ و $LiCl_2$ و $CuCl_2$ و $AlCl_3$ حضرت المحاليل السابقة باذابتها بمحلول الفوسفات الدارئ 50 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 ، حضنت حجوم متساوية من الانزيم ومحاليل كلوريدات الفلزات بدرجة 37م لمدة 30 دقيقة . ثم قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية % .

النتائج والمناقشة:

استخلاص الأنزيم وتنقيته:

انتج انزيم الكيراتينيز من بكتريا *B. licheniformis* في الوسط الإنتاجي عند الظروف المثلى ، وتم استخلاصه من المزروع البكتيري بوساطة النبذ بمنبذة مبردة ، تم الحصول على فعالية نوعية للمستخلص الخام بلغت 3.3 وحدة \ملغم بروتين .

الترسيب بكبريتات الامونيوم.

استعملت كبريتات الامونيوم بنسب اشباع مختلفة وتم تعيين نسبة الاشباع 40% لترسب المستخلص الانزيمي الخام ، اذ بلغت الفعالية النوعية 9 وحدة \ملغم بروتين وبعدد مرات تنقية 2.7 مرة وحصيلة انزيمية 78.1 %

(الجدول 1) . وتعد كبريتات الامونيوم من اكثر الاملاح استعمالاً في تركيز الانزيمات لذائبيتها العالية وقلة كلفتها ، قياساً مع المذيبات العضوية الاخرى وانعدام تأثيرها في الرقم الهيدروجيني و ثبات الانزيم ، ولاتسبب تغيرا في تركيب الانزيم . ويعتمد التركيز بكبريتات الامونيوم على مبدأ معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والاخلال بطبقة الماء المحيطة به ، مما يؤدي الى ترسيبه بتأثير مايعرف بالتمليح الخارجي Salting out. ونسبة التشبع هذه مشابهة لما ذكره [11] فقد ركز الانزيم المنتج من البكتريا *B. licheniformis* بنسبة اشباع مماثلة 40% . واشارت الدراسة [12] ان نسبة الاشباع المثلى لكبريتات الامونيوم 70 % لتركيز الكيراتينيز من الفطر *T.rubrum* ، وتم الحصول على عدد مرات تنقية 3.2 مرة وحصيلة انزيمية مقدارها 58.5% .

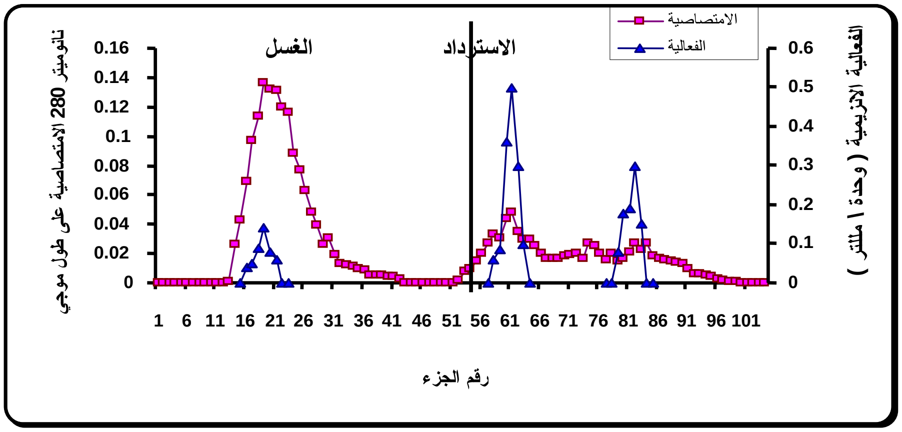
كروموتوغرافيا التبادل الأيوني

تبين نتائج التبادل الايوني ظهور قمة واحدة للبروتين من (16-21) في خطوة الغسل بفعالية قليلة نسبياً كما مبين في الشكل (1) ، بينما انفصلت ثلاث قمم بروتينية عند استرداد البروتينات المرتبطة مع ظهور الفعالية الانزيمية عند الاجزاء المستردة للقمتين الاولى والثالثة ، فظهرت الفعالية الانزيمية للقمة الاولى من (58-63) ، والقمة الثانية (80-83) ، وجمعت الاجزاء التي تمتلك فعالية انزيمية لكل قمة ، وركزت الاجزاء والجدول (1) يوضح قيمة الفعالية للقمة الاولى لخطوة الاسترداد .

ان ظهور ثلاث قمم للفعالية لأنزيم الكيراتينيز يمكن ان يعود الى كون هذه الانواع تعود للمتناظرات الانزيمية لهذا الانزيم . في دراسة اخرى لتنقية الكيراتينيز من بكتريا *B. licheniformis* بطريقة المبادل الايوني (CMC) تم الحصول على عدد مرات تنقية بلغت 41 مرة [11] . اما في دراسة للبكتريا نفسها ايضا استخدم المبادل الايوني ذاته بعد خطوة التركيز بوحدة الترشيح الفائق ، حيث تم الحصول على حصيلة انزيمية 99% وبعدد مرات تنقية بلغت 43 مرة [13] .

الجدول (1): خطوات تنقية انزيم الكيراتينيز المنتج من العزلة *B.licheniformis*

خطوات التنقية	الحجم (مليلتر)	الفعالية (وحدة / مليلتر)	البروتين (ملغرام / مليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغرام بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الأنزيمية (%)
المستخلص الخام المركز	100	0.53	0.16	3.3	53	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع 40 %	23	1.8	0.2	9	41.4	2.7	78.1
المبادل الأيوني CM-Cellulose	18	0.5	0.012	41.6	9	12.6	17

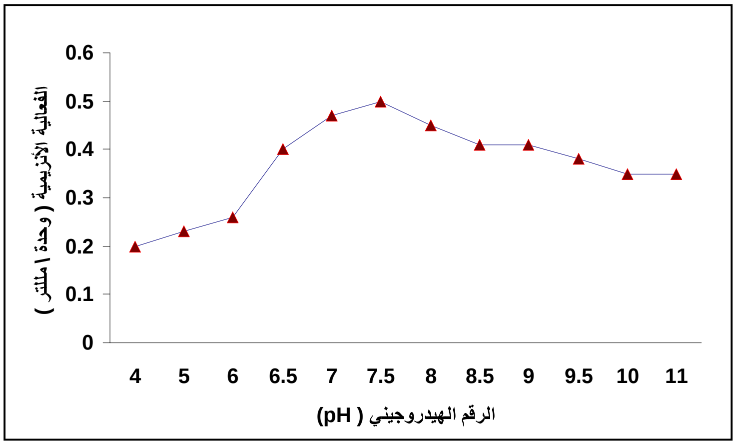


الشكل (1): كروموتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية انزيم الكيراتينيز المنتج من العزلة المحلية *B.licheniformis* باستخدام المبادل الايوني CM- Cellulose بابعاد (15 x 2.5) سم الموازن بمحلول الفوسفات الدارئ (25 ملي مولار ، pH=5.8) . تم الاسترداد بمحلول الفوسفات الدارئ بتدرج ملحي خطي من (0.1 – 1) مولار وسرعة جريان 0.6 مليلتر/ دقيقة وبواقع 3 مللتر/جزء

توصيف انزيم الكيراتينيز:

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم

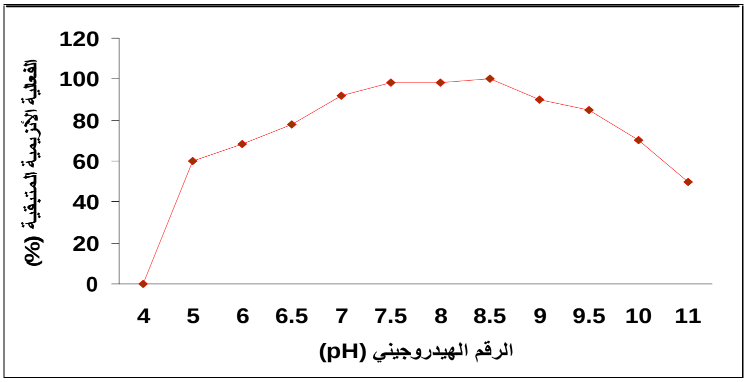
ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم هو 7.5 اذ اعطى اعلى فعالية بلغت 0.5 وحدة \مليلتر الشكل (2) . ولوحظ ايضاً انخفاض في الفعالية عند القيم الحامضية (4- 6) وانخفاض قليل نسبياً في القيم القاعدية (8- 11) . وهذه النتيجة متوافقة مع ما أشارت له البحوث من ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الكيراتينيز المنتج من العزلة *B.licheniformis* يتراوح بين (7- 11) ، فالرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الكيراتينيز المنتج من *B.licheniformis* هو 7.5 كما ذكره [1] . ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم يرتبط بنوع المادة الاساس المستعملة فقد وجد [15] ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الكيراتينيز المنتج من البكتريا نفسها اتجاه مادة الازو- كيراتين تكون 7.5 ، بينما يرتفع الرقم الهيدروجيني الامثل الى 9 واكثر عند استعمال الازو- كازائين ، وهذا التغير في قيمة الرقم الهيدروجيني يحسن من ذائبية الكازائين وارتباطه بالانزيم . كان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الكيراتينيز المنتج من بكتريا *Streptomyces sp.* هو 8.5 [16] ، وسجل بمقدار 10 لفعالية الانزيم من بكتريا *B. pumilis* [17] ، اما الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية يكون 11 للكيراتينيز المنتج من *B.licheniformis* [18] .



الشكل (2): فعالية انزيم الكيراتينيز (المنقى جزئياً) بارقام هيدروجينية مختلفة باستعمال الكيراتين 0.5 % مادة اساس للتفاعل بدرجة 45 م لمدة نصف ساعة

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم

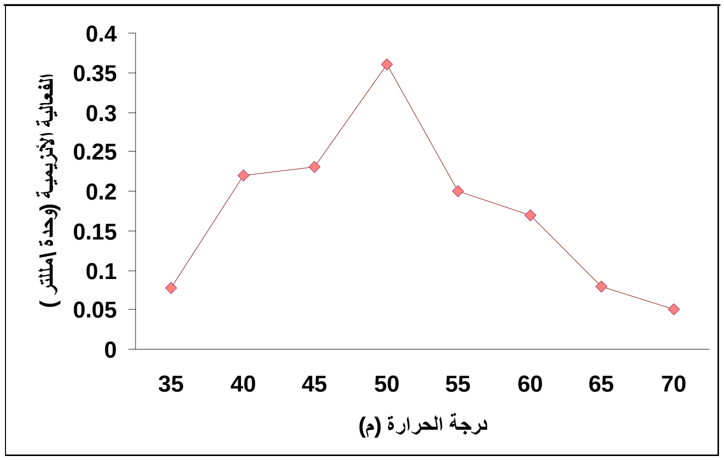
بينت نتائج هذه الدراسة ان الكيراتينيز المنقى جزئياً من العزلة *B.licheniformis* تمتلك ثباتاً تجاه الرقم الهيدروجيني عند القيم المتعادلة والقاعدية (6- 9.5) ، اذ احتفظ الانزيم باكثر من 90 % من فعاليته ، الا انه يفقد فعاليته تماماً عند الرقم الهيدروجيني 4، بينما احتفظ بـ50 % من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 11 ، الشكل (3) . أشار [11] الى ثباتية الكيراتينيز في المديات المتعادلة والقاعدية حيث أعلى ثباتية له كانت من (7-9) . في حين كان ثبات الكيراتينيز المنقى من الفطر *A. oryzae* ما بين 3.6-10.7 اذ احتفظ الانزيم بفعالية انزيمية حوالي (50-98) % من فعاليته الاصلية [19] .



الشكل (3): تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4- 11) في ثباتية الانزيم المنقى جزئياً، والحضن بدرجة 45 م لمدة 30 دقيقة

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم

اظهرت النتائج المبينة في الشكل (4) ان اقصى فعالية للانزيم كانت عند درجة حرارة 50 م ، اذ بلغت الفعالية الانزيمية 0.36 وحدة \مللتر ، ثم انخفضت الفعالية للانزيم بزيادة درجة الحرارة اذ بلغت 0.05 وحدة \مللتر عند درجة 70 م . كذلك فإن دراسة [15] التي تناولت تأثير درجة الحرارة في فعالية الكيراتينيز المنتج من بكتريا *B.licheniformis* سجلت اعلى فعالية للانزيم المنقى عند درجة 50 م ، واشار [6] الى ان درجة الحرارة المثلى تكون ضمن مدى من درجات الحرارة (30-80) م ، وكانت اعلى فعالية للكيراتينيز المنتج من بكتريا *Streptomyces albus* تكون بين (40-80) م وان اقصى فعالية عند درجة 65 م [20] .

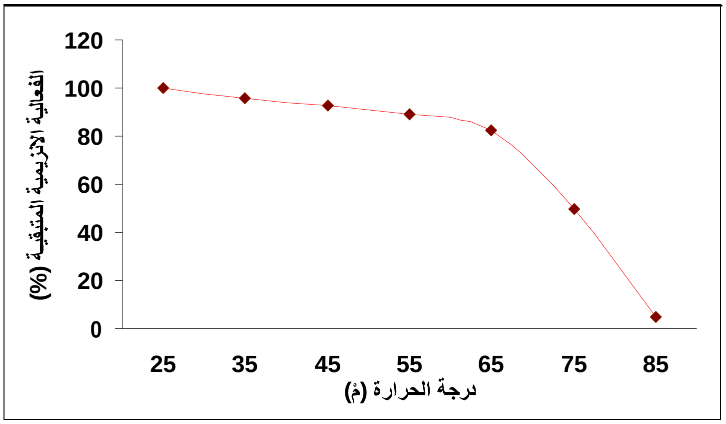


الشكل (4): تأثير درجة الحرارة في فعالية انزيم الكيراتينيز المنتج من العزلة المحلية *B.licheniformis* بحضنه بدرجات حرارية مختلفة لمدة نصف ساعة(pH 7.5)

تعيين الثبات الحراري للأنزيم

اظهرت نتائج هذه الدراسة (الشكل 5) احتفاظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه في درجات الحرارة (25-45) م ، ثم بدأت بعدها الفعالية الانزيمية بالانخفاض مع ارتفاع درجات الحرارة اذ إحتفظ الانزيم بـ89 % و 82.2 % عند حضنه بدرجة 55 م و65 م على التوالي . واحتفظ الانزيم بـ50 % من فعاليته عند 75 م ، وبلغت الفعالية ادنى مستوياتها عند درجة الحرارة 85 م اذ فقد الانزيم ما يقارب 95% من فعاليته. أشارت نتائج الدراسات السابقة ان الكيراتينيز الحر يكون ثابتاً الى حد ما اتجاه الحرارة العالية بغياب المادة الاساس [20] ، وتزداد ثباتيته عندما يكون مرتبطاً بالمادة الاساس اذ تقوم المادة الاساس بحماية الموقع الفعال للانزيم من التأثير المدنتر للحرارة العالية [11] .

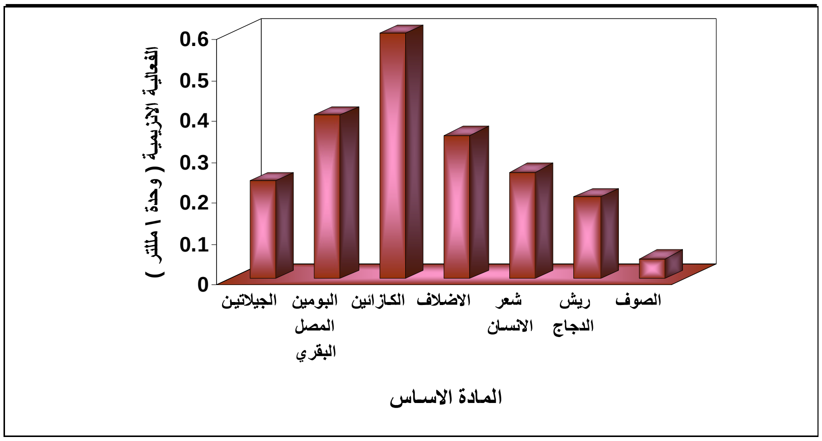
ان الثباتية الحرارية العالية للانزيم تسمح بأجراء التجارب عند درجات الحرارة تتراوح بين (65-70) م حيث تقلل من مخاطر التلوث الميكروبي [20] . وتختلف ثباتية الكيراتينيز لدرجات الحرارة العالية بأختلاف مصادر انتاج الانزيم ، اذ يكون الثبات الحراري للكيراتينيز المنقى من *Clostridium sporogenes* بمدى يتراوح بين (30-55) م لمدة 24 ساعة[6] . اما الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces sp.* فيمتلك ثباتاً عند درجات حرارية تتراوح بين (40-60) م [21] ، وقد احتفظ الانزيم بـ58% من فعاليته بدرجة حرارة 60 م لمدة 60 دقيقة للكيراتينيز المنتج من الفطر *A. oryzae* [19] .



الشكل (5): تأثير درجة الحرارة في ثبات الكيراتينيز المنقى جزئياً عند حضن الانزيم بدرجات حرارية مختلفة لمدة 30 دقيقة عند رقم هيدروجيني 7.5، ثم قدرت الفعالية

تخصص الانزيم اتجاه مواد اساس مختلفة

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (6) ان الكيراتينيز المنقى جزئياً يمتلك مدى تخصص واسع على التحلل المائي للبروتينات الذائبة وغير الذائبة بالماء (مواد اساس) . واظهرت النتائج ان البروتينات الذائبة وهي: الكازائين والبومين المصل البقري تميزت بسهولة تحطيمها من قبل الانزيم ، اذ اعطى اعلى فعالية اتجاه الكازائين بلغت 0.6 وحدة \مللتر . بينما كانت البروتينات الغير ذائبة وهي كيراتين شعر الانسان ، والاضلاف ، والصوف ، وريش الدجاج اقل حساسيةً تجاه الانزيم ، اذ تراوحت نسبة الفعالية الانزيمية بين (58.3- 8.3)% . هذه النتائج متفقة مع نتائج الدراسات الاخرى للكيراتينيز المنتج من *B.licheniformis* [15] .



الشكل (6): فعالية الانزيم المنقى جزئياً على مواد اساس مختلفة بتركيز 0.5%، حضن الكيراتينيز بدرجة 50 م لمدة نصف ساعة عند رقم هيدروجيني 7.5

وفي دراسة تاثير مواد تفاعل مختلفة في فعالية الكيراتينيز المنتج من الفطر *A. oryzae* ، اذ تضمنت مواد التفاعل الكازائين ، والبومين المصل البقري ، وريش الدجاج ، وريش البط ، والصوف ، والكولاجين . اظهرت النتائج ان البومين المصل البقري هو افضل مادة للتفاعل من البروتينات الاخرى [19] .

أظهر الانزيم هضم جزئي لريش الدجاج والشعر وذلك لكون هذه المواد تحتوي على الاواصر الكبريتية والتي تعطي التركيب الصلب لبروتيناتها وهذه النتيجة تشير الى ان الانزيم لايستطيع كسر الاصرة الكبريتية بصورة كاملة (Sulphitolysis) ، لكن الانزيم ربما يقوم بكسر الاصرة الببتيدية فقط للمادة الاساس [11] . ان المعاملة المسبقة للمواد الاساس مثل : الريش والاظافر والشعر بالطرائق الفيزيائية او بأستعمال العوامل المختزلة او المنظفات اوتنشيط الانزيم بأضافة الاملاح المعدنية تكون ضرورية لتحسين تحطيمها [11] . وتشير هذه النتائج ان الكيراتينيز يعمل على تحطيم مواد بروتينية مختلفة تعود للانسان والحيوان ولهذه النتائج اهميتها في التطبيقات البيئية والطبية .

تأثير مادة PMSF و العوامل المختزلة والكلابية في فعالية الكيراتينيز

يلاحظ من الجدول (2) تأثر واضح في فعالية الانزيم بهذه المادة عند التراكيز 5 و10 و100 ملي مولار ، اذ لوحظ انخفاض سريع في الفعالية اذ بلغت الفعالية المتبقية بحدود 40 % عند تركيز 5 ملي مولار ، وانخفضت بشدة عند حضن الانزيم مع 10 ملي مولار اذ كانت 12 % ، ثم انخفضت حيث وصلت الفعالية الى 6 % عند تركيز 100 ملي مولار .

مما يدل على ان الكيراتينيز المنتج من العزلة *B. licheniformis* هو من البروتييزات السيرينية (Serine protease) التي تتصف بوجود مجموعة هيدروكسيل السيرين في موقعها الفعال وتثبط بمادة PMSF التي ترتبط مع مجموعة هيدروكسيل السيرين ومن ثم سوف تثبط هذه الانزيمات وتمنع ارتباط المادة الاساس بالموقع الفعال [22] . وتعد اغلب الكيراتينيزات من البروتييزات السيرينية كما أشارت الى ذلك العديد من الدراسات من مختلف الاحياء المجهرية منها [23] .

بينت احدى الدراسات ان الكيراتينيز المنتج من بكتريا *B.licheniformis* Fk14 يعود الى البروتييزات السيرينية وذلك لانه يثبط بوساطة الـPMSF عند حضنه بتركيز (1ملي مولار) لمدة 30 دقيقة بدرجة 30 م اذ فقد الانزيم 96% من فعاليته ، وكذلك لان الرقم الهيدروجيني الامثل يكون ضمن المديات القاعدية [11] . كما انخفضت الفعالية للكيراتينيز المنتج من الفطر *Scopulariopsis brevicaulis* عند تركيز 5 ملي مولار اذ اصبحت الفعالية المتبقية 5.2% . وأشار [24] ان الكيراتينيز المنتج من بكتريا *Bacillus sp.* يكون من بروتييزات السيرين الشبيهة بالسبتيليسين (Subtilisin –like serine protease) اذ ثبط تماماً بوساطة مادة الـ PMSF ومادة Pefabloc Sc ومادة NBS (N-bromosiccinamide) . اشارت الكثير من الدراسات الى ان بروتييزات السيرين تتأثر قليلاً بمثبطات البروتييزات المعدنية [11] . ولم تتأثر فعالية انزيم الكيراتينيز عند حضنه مع مركب 2- مركبتوإ يثانول (2-mercaptoethanol) بتراكيز (5 ، 10 ، 100) ملي مولار ، مما يدل على ان الكيراتينيز قيد الدراسة قد يحتوي على السستائين في الموقع الفعال او المواقع

القريبة منه ، ولا يحتوي على مجموعة ثنائية الكبريت . بينما يتأثر الانزيم المنتج من الفطر *S. brevicaulis* تأثراً بسيطاً بالمركب المختزل عند تركيز 5 ملي مولار اذ كانت الفعالية المتبقية 89.7 % [23] . وان وجود هذا المركب في محيط التفاعل بين الانزيم والمادة الاساس ساعد الانزيم في اختزال الاواصر الكبريتية الثنائية الموجودة في تركيب الكيراتين اذ زادت الفعالية قليلا عند تركيز 100 ملي مولار حيث بلغت الفعالية المتبقية 109 % ، جدول (2) .
كذلك لوحظ عدم تأثر الانزيم بأستعمال احدى المنظفات وهي مادة سلفايت دوديسيل الصوديوم (SDS) بتراكيز (5 و 10 و 100) ملي مولار ، حيث كانت الفعالية المتبقية 98 % بتراكيز 5 و 10 ملي مولار وارتفعت قليلاً اذ بلغت 105 % عند تركيز 100 ملي مولار . يعد SDS من المنظفات المدنترة للبروتين ويحتوي في تركيبه على الذيول الكارهة للماء التي تتداخل مع السلاسل الجانبية الداخلية للبروتين وتؤدي الى انفتاحه واعطائه شحنة سالبة للبروتين المدنتر ، وكان تأثير المنظفات (SDS) مثبطاً لفعالية الانزيم بنسبة 59 % عند تركيز 5 ملي مولار [25] . كما لم يتأثر الانزيم بوجود مادة الـEDTA التي تعد من العوامل المخلبية (Chelating agents) التي تقوم بسحب ايونات المعادن ثنائية الشحنة الموجودة في تركيب الانزيم او وسط التفاعل ، مما يؤكد عدم انتماء الانزيم قيد الدراسة الى مجموعة البروتييزات المعدنية ضمن الظروف والتراكيز المستخدمة للمادة الكلابية .

جدول (2) تأثير مادة الـPMSF في فعالية الكيراتينيزالمنقى جزئياً من العزلة المحلية *B.licheniformis*

المادة	التركيز (ملي مولار)	الفعالية المتبقية %
سيطرة	**-**	**100**
PMSF	5 10 100	40 12 6
2-mercaptoethanol	5 10 100	90 94 109
SDS	5 10 100	98 98 105
EDTA	5 10 100	97 93 90

تأثير الأيونات الفلزية في فعالية الانزيم

توضح النتائج الواردة في الجدول (3) تبايناً واضحاً في تأثير بعض الايونات الفلزية في فعالية الكيراتينيز ، إذ أدت أضافة كلوريدات الكالسيوم والمغنيسيوم والزنك الى محلول التفاعل تنشيط الانزيم حتى بلغت الفعالية المتبقية حوالي (116.6 و 120.3) % عند حضن (2.5 و 5) ملي مولار على التوالي من كلوريد الكالسيوم في محلول التفاعل . أحتفظ الانزيم بفعاليته تقريباً (90-100)% عند حضنه مع 2.5 و 5 ملي مولار من كلوريدات الصوديوم والبوتاسيوم ، وكان تأثير كلوريدات الالمنيوم الثلاثية وكلوريد الليثيوم ضعيفاً في تنشيط الانزيم اذ بلغت الفعالية المتبقية حوالي 104 و 108 عند حضن الانزيم بتركيز 2.5 و 5 ملي مولار على التوالي من كلوريد الالمنيوم ، اما بالنسبة لتأثير كلوريد النحاس والمنغنيز لوحظ تأثر قليل في فعالية الانزيم مؤدياً الى خفض قيم الفعالية بنسبة (20-22)% عند حضنه مع 2.5 و 5 ملي مولار .
لوحظ تأثر واضح في فعالية الكيراتينيز عند حضنه مع كلوريدات الزئبق والحديد ادى الى خفض قيم الفعالية المتبقية وصولاً الى 10.8 و 5.9 % لكل من 2.5 و 5 ملي مولار من أيونات الزئبق ، و 40 و 10 % لكل من 2.5 و 5 ملي مولار من أيونات الحديد على التوالي .

يعود سبب الانخفاض الملحوظ في فعالية الانزيم عند حضنه مع كلوريد الزئبق والحديد الى تأثير الأيونات المعدنية الثقيلة في تركيب الانزيم وفي موقعه الفعال فأيونات المعادن الثقيلة مثل الزئبق والحديد لها تأثيراً مثبطاً لاتنافسياً لبعض الانزيمات او يقوم بأكسدة مجاميع الثايول (SH-) في الموقع الفعال او المواقع القريبة منه [26] .

ان بعض الايونات الثنائية تنشط الفعالية الانزيمية للكيراتينيز المنتج من *B.licheniformis* وخاصة ايونات الكالسيوم التي تعمل على تنشيط بروتييزات السيرين [11] . ان زيادة الفعالية بوجود ايونات الكالسيوم التي تلعب دوراً مهماً في تنظيم الشكل الفراغي للانزيم نحو الشكل الفعال ؛ وبهذا تزداد الفعالية الانزيمية لتحلل الكيراتين [19] .

جدول (3): تأثير الايونات المعدنية في فعالية انزيم الكيراتينيز المنقى من العزلة *B.licheniformis*

الفلزات	الفعالية المتبقية بالنسبة الى السيطرة (بدون معاملة) 100%	
	تركيز 2.5 (ملي مولار)	تركيز 5 (ملي مولار)
$CaCl_2$	116.6	120.3
$MgCl_2$	110	115
$ZnCl_2$	108.5	110
NaCl	98	100
KCl	90	98
$ALCl_3$	104	108
$LiCl_2$	100	104
$CuCl_2$	80	78
$MnCl_2$	83	87
$HgCl_2$	10.8	5.9
$FeCl_2$	40	10

المصادر:

1. Friedrich, A. and Antranikian, G. (1996). Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. Appl. Environ. Microbiol. 62:2875–2882.
2. Onifade, A. A; Al-Sane, N. A.; Al-Musallan, A. A. and Al-Zarban, S. (1998). A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Bioresour. Technol. 66:1–11.
3. Ramnani, P. and Gupta, R. (2004). Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. Biotechnol. Appl. Biochem. 40(11):191-196.
4. Lin, X.; Tang, J.; Koelsch, G.; Monod, M. and Foundling, S. (1993). Recombinant Canditropsin, an extracellular aspartic protease from yeast *Candida tropicalis*. J. Biol. Chem. 268:20143–20147.
5. Dozie, I. N. S., C. N. Okeke, and N. C. Unaeze. (1994). A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. World J. Microbiol. Biotechnol. 10:563–567.
6. Ionata, E. ; Canganellab, F. ; Bianconib, G. ; Bennod, Y. ; Sakamotod, M. ; Capassoa, A.; Rossia, M. and La Caraa F. (2006). A novel keratinase from

Clostridium sporogenes bv. pennavorans bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. Microbiol. Res. doi:10.1016/j.micres.2006.08.001

7. Gradisar, H.; Friedrich, J.; Krizaj, I. and Jerala, R. (2005). Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of Keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to Some Known Proteases. Appl. Environ. Microbiol. 71(7): 3420–3426 .
8. عبدالله، رشا طالب.(2008). تنقية وتوصيف انزيم الكيراتينيز من العزلة المحلية *Bacillus licheniformis*. رسالة ماجستير ، كلية العلوم ،جامعة بغداد.
9. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
10. Whitaker, J. R. (1980). Changes occurring in proteins in alkaline solution. In: Chemical determination of proteins, (eds . J. R. Whitaker and M. Fujimoki) pp. 115 – 155 . American Chemical Society. Washington.
11. Suntornsuk, W.; Tongjun1, J.; Onnim, P.; Oyama, H.; Ratanakanokchai, K.; Kusamran, T. and Oda, K. (2005). Purification and characterisation of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium. World J. Microbiol. Biotech. 21: 1111–1117.
12. Asahi, M.; Lindquist, R.; Fukuyama, K.; Apodaca, G.; Epstein, W. L. and McKerrow J. H. (1985). Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. Biochem. J. 232:139–144.
13. Lin, X.; Lee,C. G.; Casale, E. S. and Shih, J. C. H. (1992). Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. Appl. Environ. Microbiol. 58:327–3275.
14. Lin, X.; Kelemen, D. W.; Miller, E. S. and Shih, J. C. H. (1995). Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. Appl. Environ. Microbiol. 61:1469–1474.
15. Wang, J. J.; Swaisgood, H. E. and Shih, J. C. H. (2003). Production and characterization of bio-immobilized keratinase in proteolysis and keratinolysis. Enz. Microbial Technol. 32: 812–819.
16. Korkamaz, H.; Unaldi, M. N.; Aslan, B.; Coral, G.; Arikan, B.; Dincer, S. and Colak, O. (2003). Keratinolytic activity of *Streptomyces* strain BA_7, anew isolate from Turkey. Ann. Microbiol. 53: 85-93.
17. Huang, Q.; Peng, y.; Li, X.; Wang, H. and Zhang Y. (2003). Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus* . Curr. Microbiol. 46: 169-173.
18. Korkamaz, H.; Hur, H. and Dincer, S. (2004). Characterization of alkaline keratinase of *Bacillus licheniformis* strain HK-1 from poultry waste. Annals of Microbiology, 54(2): 201-211.
19. Farag, A. M., and Hassan, M. A. (2004). Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. Enzyme Microb. Technol. 34:85–93.

20. Esawy, M. A. (2007). Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a noval mesophilic *Streptonyces albus* AZA. Res. J. Agric. Biol. 3(6): 808- 817.
21. Tapia, D. M. T. and. Sim?es, M. L. G. (2008). Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater. Afr. J. Biotech. 7 (3): pp. 296-300.
22. Means, G. E. and Feeny, R. E. (1971). Chemical modification of proteins. Holden-Day Inc. San Francisco.
23. Anbu, P.; Gopinath, S. C. B.; Hilda, A. ; Lakshmi priya, T. & Annadurai,G.(2005) Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and stastical optimization of enzyme activity.Enzyme Microbiol. Technol. 36: 639-647.
24. Su, J. C. (2006). Studies on the purification and properties of keratinase from *Bacillus sp*. Master's Thesis, Food and Nutrition. China.
25. Bockle, B.; Galunsky, B. and Muller, R.. (1995). Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. Appl. Environ. Microbiol. 61:3705–3710.
26. الخفاجي ، زهرة حمود. (2008). التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزيئية). معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية . جامعة بغداد.