جامعة الموصل
كلية العلوم

# تنقية وتوصيف انزيم Mannanase من الفطر الشيتاكي *Lentinula edodes* ودراسة بعض تطبيقاته الحيوية

نور عامر محمد علي الشيخ حامد

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / علم النبات

بإشراف
الأستاذ المساعد
الدكتورة فاتن نوري عبد ملا عبد

1444هـ 2022م

**الخلاصة**

تم الحصول على 70 عزلة فطرية من الفطريات الكبيرة من مناطق مختلفة من مدينة الموصل وهي حدائق جامعة الموصل– ناحية الكبة – منطقة الرشيدية – محطة البستنة – غابات الموصل – منطقة الشلالات – ناحية الفاضلية – سد الموصل – ناحية بعشيقة –ناحية حمام العليل – ناحية النمرود فضلا عن العزلات الفطرية الجاهزة (*Lentinula edodes*، *Flammulina velutipes*، *Pleurotus djamor*، *Pleurotus citrinopileatus*، *Cautharellus cibarius*)،وخضعت لاختبارات الغربلة الاولية لانتقاء العزلة الأكفأ لانتاج انزيم Mannanase بدلالة قطر هالة التحلل الانزيمي وكانت أفضل العزلات Nq1 (للعزلة الفطرية القياسية *Lentinula edodes*) وN14 وN22 وN46 ونميت هذه العزلات على اوساط الغربلة الثانوية والمجهزة بمواد أساس مختلفة وكان أفضلهم العزلة Nq1 لانتاج انزيم Mannanase وبلغت الفعالية الانزيمية 2.38 وحدة/مل على الوسط السائل M1.واظهرت نتائج الغربلة الاولية والثانوية ان أفضل العزلات لانتاج الانزيم هو الفطر الشيتاكي او الأسم الشائع الياباني*Lentinula edodes* وهو احد فطريات العفن الأبيض ذي الأهمية الطبية والصناعية والمفرز للانزيمات المحللة للمانان.

أظهرت نتائج الظروف الزرعية عند تنمية الفطر في المزارع المغمورة التي اعطت اعلى فعالية انزيمية بعد 9 أيام من التحضين 2.94 وحدة/مل، وتعد هذه مدة التحضين المثلى في درجة حرارة 30م$^{o}$ و(Locust Bean Gum( LBG كمصدر كاربوني ، ومستخلص الخميرة Yeast extract وبتركيز 0.4 % كمصدر نيتروجيني، والأس الهيدروجيني 6، وبسرعة رج 150دورة/دقيقة، وأدّت اضافة بذور الاكاسيا إلى زيادة انتاج انزيم Mannanase بوصفه أحد المركبات الطبيعية، في حين شجع إضافة المركب الكيميائي $AL_2O_3$ بتحفيز وزيادة انتاج الانزيم.

تمت تنقية انزيم Mannanase من راشح المزرعة الفطرية واشتملت على سلسلة خطوات منها الترسيب بكبريتات الامونيوم ونسبة اشباع 80% وبلغت فيها الفعالية النوعية 2 وحدة/ملغم والحصيلة الانزيمية 80%، اعقبها ديلزة الانزيم ليوم كامل مما تسبب بزيادة الفعالية النوعية فيها إلى 3 وحدة/ملغم ووصل عدد مرات التنقية إلى 3 أضعاف وبلغت الحصيلة الانزيمية 71%، ويلاحظ من خطوة التبادل الايوني باستعمال DEAE-cellulose ان ارتفاع الفعالية النوعية وصلت إلى 10 وحدة/ملغم، وبلغت عدد مرات التنقية إلى 10 مرات وبحصيلة انزيمية بلغت 53%، وأجريت فيما بعد خطوة التنقية الأخيرة باستعمال كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي Sephadex G-150 فبلغت فيها الفعالية النوعية للانزيم 50 وحدة/ملغم ووصل فيها عدد مرات التنقية إلى50 مرة، و بحصيلة انزيمية 66.6%. تم حساب الوزن الجزيئي باستعمال الترحيل الكهربائي في هلام الاكريلامايد المتعدد فبلغ وزنه الجزيئي 58 كيلودالتون. و الأس الهيدروجيني الأمثل لفعاليته بلغ 6.5 في حين تراوح الأس الهيدروجيني لثبوت فعاليته مابين 7- 5.5. كانت درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم بلغت 60 م$^{o}$ في حين كانت درجة الثبات الحراري

مابين20-80 م° و خلال الدراسة تبين دور كلوريد الكالسيوم والكادميوم عند اضافتهما للوسط واحتفاظ الانزيم بأغلب فعاليته الانزيمية وبلغت95.5 و 97.3% على التوالي، وقد تم تحيد 12 حامضاً امينياً موجوداً في انزيم Mannanase تشمل الأسبارتك ،الكلوتامك،ا لأسبيرجين، السيرين، الهستيدين، الكلايسين،التايروسين،الالنين،المثيونين،الفالين،الفينايل النين فضلاً عن اللايسين، وقد أظهر طيف الرنين النووي المغناطيسي لانزيم Mannanase برتونات مختلفة واهمها بروتونات مجموعة الهيدروكسيل والبروتونات الأخرى، في حين كشف طيف الامتصاص للاشعة تحت الحمراء بوجود قمة امتصاص عند التردد 3440سم.

نتائج التطبيقات مكنت الكتلة الحيوية للفطر على التغلب على المشاكل البيئية بحل مشكلة معالجة مياه معاصر الزيتون بإزالة الفينول من مياه معاصر الزيتون وخفض التركيز من 23.58 في عينة السيطر إلى 15.25 ملي غرام/مل بعد 15 يوماً من التحضين،وإلى 11.66 ملي غرام/مل بعد 30 يوماً من التحضين. و تمكن الفطر من خفض نسبة COD في مياه معاصر الزيتون وبتركيز 10% ووصل الانخفاض إلى 67% بعد 15 يوم من التحضين، و الانخفاض بعد 30 يوم من التحضين إلى 82%. في حين كانت نسبة( Chemical Oxygen Demand (COD لمياه معاصر الزيتون وبتركيز 20% وبعد 15 يوم من التحضين وصل الانخفاض إلى 62% وزداد الانخفاض بزيادة فترة التحضين إلى ان وصلت بعد 30 يوم من التحضين إلى 77%، ولقد اثبتت الكتلة الحية قدرتها على تحلل المركبات الهيدروكاربونية للنفط على الوسطين الصلب والسائل، بواسطة الانزيم تمت إزالة الحبر من اوراق الجرائد القديمة بعد 24 ساعة من المعاملة بالانزيم،وإزالة الدم من الأقمشة القطنية و بقع ايس كريم الشوكولاته والسلطة والطين من الأقمشة القطنية.وبينت نتائج استعمال تخمرات الحالة الصلبة لكل من مسحوق لب جوز الهند ونبات الكلغان وبذور الحلبة وبذور الكتان ونشارة الخشب ومسحوق اوراق نبات العرموط، كبديل لنظام التخمرات الصلبة وقابليتها على انتاج انزيم Mannanase، وأظهر الانزيم الخام والمنقّى قابليةً عالية لتثبيط انواع من البكتريا المرضية وهي *Staphylococcus epidermidis*، *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus scuri*، *Klebsiella neumoniae*، *E.coli*، *Proteus mirabilis*، وبقطر تثبيط 5,22,17 ,6،19 ,18 ملم للانزيم الخام على التوالي،وتمكن انزيم Mannanase وبتطبيق السمية الخلوية لانزيم Mannanase (MTT) -3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenil Tetrazolium من خط سرطان القولون وكذلك استعمل انزيم Mannanase كمركب مضاد للالتهابات.

**Abstract**

Seventy (70) isolates from big fungi were obtained from difference locations: the gardens of Mosul University – AlGubbah neighborhood – AlRashedeyyah neighborhood – AlBastana station – AlGhabat area – AlFadhileyyah – Mosul dam area – Bashiqah – Hamam Al Aleel sub-district and AlNarmud sub-district, in addition to the available fungi isolates *(Lentinula edodes ,Flammulina velutipes, Pleurotus djamor, Pleurotus citrinopileatus* and *Cautharellus cibarius*) and they were all subjected to the preliminary screening tests to select the most efficient isolate in terms of producing the Mannanase enzyme by the diameter of the enzyme decomposition halo. The best isolate was Nq1 (for the standard isolate *Lentinula edodes* and N14, N22 and N46. These isolates were grown on the secondary screening media, which are provided with various base materials and the best was the isolate Nq1 that produces mannanase and the enzymatic activity was 2.38 unit/ml on the liquid medium M1. The results of the primary and the secondary screening that the best isolates is the shiitake fungus or the common Japanese name *Lentinula edodes* , which is one of fungus that belongs to the white Rot Fungi, which has medical and industrial importance and which produces the enzymes that decomposes the mannan.

The results of the culture, when it is cultured in the submerged cultures, showed that it gave the highest enzymatic activity after 9 days of incubation (2.94 unit/ml). this period of incubations is considered the optimum period in a temperature of 30 $C^o$ and LBG as a carbon source, Yeast extract with a (0.4%) as a nitrogen source, pH 6 and with a shaking velocity of 150 round per minute (RPM). The addition of Acacia seeds led to the increase of Mannanase enxyme production as one of the natural compounds, while adding $AL_2O_3$ resulted in activating and increasing the production of the enzyme.

The Mannanase was purified from the filtrate of the fungi cultures, which included several steps, including the precipitation with Ammonium Sulfate and a saturation percentage of 80%. The specific activity was 2 unit/mg, the enzyme outcome was 80%, followed by a dialysis for 24 hours and this resulted

increasing the specific activity to be 3 unit/ml. The times of were 3 times and the total outcome of the enzyme was 71%. It is observed from the ion exchange using DEAE-cellulose, that the specific activity reached to 10 unit/ml and the purification times were 10, with an enzyme outcome of 53%. The last purification was done using the chromatography of gel filtration Sephadex G-150, in which the enzyme activity was 50 unit/ml and the purification times was 50 times with an enzyme activity of 66.6%. The molecular weight was performed using the electrical relay in the multi acrylamide gel and the molecular weight was 58 kilo Dalton, the optimum pH of its activity is 6.5 while the pH of the stability of its activity ranged between 5.5 – 7, the optimum temperature of the enzyme activity was 60 $C^{o}$ and the thermal stability ranged between 20-80 $C^{o}$. During the study, the role of calcium and cadmium chlorides was obvious when adding them to the medium and the enzyme maintained most of its activity, which were 95.5 and 97.3 respectively. Moreover, 12 amino acid were identified as present in the Mannanase enzyme, which include: the aspartic, glutamic, Apergen, seren, hestidin, glycine, tyrosine, alanine, methionine, vallin, phenylalanine in addition to the lysine. The nuclear magnetic resonance spectrum of Mannanase showed various protons, most important of which are the protons of the hydroxyl group and other protons. From the other hand, the spectrum of infrared absorption in the presence of the absorption apex at the frequency 3440 cm.

The results of the applications enabled the biomass of the fungus to overcome the environmental problems by solving the problem of olive press by removing the phenol from the olive press water and decreasing the concentration from 23.58 in the control sample to 15.25 milligram/ml 15 days after incubation and to 11.66 milligram/ml after 30 days of incubation. The fungus could decrease COD percentage in the water of olive presses with a concentration of 20% and after 15 days of incubation the decrease amounted to 62% and this decrease became higher with the increase of the incubation period until this period reached 39 days and the percentage was 70%. The biomass proved its

ability to decomposing the hydrocarbon compounds of the oil on the solid and liquid media. By means of the enzyme the ink of the old newspapers was removed after 24 hours of the treatment with it, removing the blood stains from the cotton textiles and the ice-cream chocolate stains. Additionally, the results of the solid state fermentation of the coconut and Calghan core powder, fenugreek plant powder, sawdust and the powder of pear leaves can be used for the solid fermentation alternative and their ability to produce the Mannanase. The raw and the purified enzyme demonstrated a high capability of inhibiting the pathogenic bacteria *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus scuri*, *Klebsiella neumoniae, E.coli* and *Proteus mirabilis* with inhibition diameters of 22, 5, 19. 17, 6 and 18 mm respectively for the raw enzyme. The Mannanase, with the application of the cellular toxicity of Mannanase (MTT) could be active on the line of colon cancer and also it was used as an anti-inflammation compound.

**University of Mosul**

**College of Sciences**

# Purification and characterization of Mannanase from Shiitake (*Lentinula edodes* )and study some of Biological applications

**Noor Aamer Mohammed Ali Al-Sheikh Hamed**

Ph.D. Thesis

**Biology / Botany**

Supervised By

Assistant Professor

**Dr. Faten Noori Abed Mula Abed**

**1444 A.H.** **2022 A.D.**