جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

استخلاص وتنقية انزيم Laccase من عزلة الفطر *Ganoderma resinaceum* ودراسة تطبيقاته البيئية

ورقاء خلف حسين

رسالة ماجستير
علوم الحياة

بإشراف
الأستاذ المساعد
الدكتور شمال يونس عبدالهادي

1442هـ 2020م

الخلاصة

استُحدثت الدراسة العلمية بالحصول على 65 عزلة فطرية انطلاقاً من 5 مناطق زراعية مختلفة شملت (الرشيدية , الكُبة , سد الموصل , غابات الموصل وبعشيقة) وتشير النتائج إلى أن منطقة الرشيدية أكثر غناً في التنوع البايولوجي من غيرها, أمكن بنجاح اتباع طريقة الغربلة الأولية تقييم نشاطها على إنتاج انزيم Laccase في بيئة النمو بدلالة حساب مؤشر قطر هالة التحلل الانزيمي إذ سجلت سيادة ثلاث عزلات رُمز لها G1 , G2 و31 . تم إنماء العزلات المنتخبة من الغربلة الأولية على أوساط مجهزة بمواد أساس مختلفة حققت خلالها العزلة G2 إنتاجية عالية بلغت (14.6) ملم على الأوساط الصلبة و(4.75) وحدة / مل بالوسط السائل المجهز بمادة كوايكول . دلت نتائج التشخيص المظهري عائدتيها إلى الجنس *Ganoderma* وكشفت هويتها الكاملة بالدليل الجزيئي بتقانة Polymerase Chain Reaction (PCR) والتتابع النيوكليوتيدي على أنها من النوع *resinaceum* والتي تعد أحد فطريات التعفن الأبيض المفرزة للانزيمات المحللة للكنين وشُخصت في هذه الدراسة لأول مرة في مدينة الموصل , من خلال بناء شجرة التقارب الوراثي للعزلة المنتخبة مع عزلات مرجعية تابعة لنفس الجنس وتبين أنها تقع ضمن نفس العنقود والأقرب للنوع *G. lucidum* بنسبة تطابق (98.59) % بالاعتماد على برنامج Mega 6 .

أظهرت نتائج التحكم في توليفة الظروف الزرعية عند إنماء الفطر المنتخب في مزارع مستمرة والتي وفرت المعلومات عن إحتياجاته الغذائية وتمثلت في مجملها 12 يوم مدة التحضين المثلى ,الكلوكوز مصدر كاربوني , مستخلص الخميرة بالتركيز (4)% مصدر نيتروجيني ,الأس الهيدروجيني 6 و درجة الحرارة 30°م . ونتج عن إمداد وسط الإنتاج بكبريتات النحاس بالتركيز 30 ملي مول زيادة في كمية الانزيم المستخلص وصلت الى (13.93) وحدة/ مل كذلك شجع Iso propanol بالتركيز 4% كمية الانزيم المنتج (9.85) وحدة/ مل .

نقي انزيم Laccase من راشح المزرعة الفطرية بسلسلة من الخطوات اشتملت على الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 75 % والتي تسارعت فيها الفعالية النوعية للانزيم وبلغت (17.18) وحدة / ملغم بحصيلة انزيمية بلغت (46.14 %) وعدد مرات تنقية (2.63) ضعف , أعقبها ديلزة الانزيم لمدة 24 ساعة وتمخضت عن زيادة الفعالية النوعية الى (34.44)

وحدة / ملغم وعدد مرات التنقية وصل إلى (5.28) مرة وبحصيلة انزيمية بلغت (40.12)% , وحققت خطوة التبادل الأيوني باستعمال DEAE-cellulose فعالية نوعية (143.46) وحدة / ملغم وعدد مرات التنقية بلغ (22) مرة وبحصيلة انزيمية (34.82)% , أما خطوة التنقية الأخيرة التي جرت بتقنية كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-100 فازدادت فيها الفعالية النوعية للانزيم وبلغت (406.28) وحدة / ملغم وعدد مرات التنقية وصل الى (62.31) ضعف وبحصيلة انزيمية (30.67)% . وأسفرت نتائج تحديد خواص الانزيم المنقى من الحصول على حزمة واحدة ذات وزن جزيئي (52) كيلودالتون عند الترحيل الكهربائي على هلام Poly Acrylamide , كما أثمرت عملية الكشف عن نقاوة الانزيم من الحصول على حزمة واحدة مفردة للانزيم المنقى من خطوتي التبادل الايوني والترشيح الهلامي والتي عدت دليلاً على تنقية الانزيم لدرجة التجانس . تبين أن الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الانزيم 6 في حين كان الأس الهيدروجيني لثبوت فعالية الانزيم بمدى يتراوح بين (5-7) . أما درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم فكانت عند 60 °م في حين تراوحت درجة الثبات الحراري بين (20-60) °م . وظهر من خلال الدراسة أن الانزيم له القابلية على الاحتفاظ بـ (98) % من فعاليته الأصلية عند الخزن بدرجة حرارة المختبر لمدة 7 يوم .

جاءت نتائج التطبيقات الصديقة للبيئة بآمال كبيرة إذ تغلبت الكتلة الحيوية للفطر بوضوح تام خالف قوانين الطبيعة على مشكلة التلوث بالبلاستيك حيث ترتب على معاملة حبيبات Polyvinyl Chloride(PVC) بنوعيها الناعم والخشن ولمدة 90 يوم تدهور كبير كشف على أعقابه فقدان في الوزن بلغ (60) %, (42.5) % للنوعين الناعم والخشن على التوالي في نجاح يعد الأول في هذا الإتجاه . كما أثبتت الكتلة الحيوية للفطر قدرتها على تحلل اللكنين كما جاء في النتائج الأولية بكروماتوكرافيا السائل فائق الأداء High Performance Liquid Chromatography(HPLC) حيث ألهبت الكتلة الحيوية الفطرية للكنين بسياطها وكانت نواتج التحلل بعد 30 يوما من المعاملة هي Tanic acid , Gallic acid , Cinamic acid , Vanillic acid في حين كشفت نواتج كروماتوكرافيا Gas Chromatography (GC) أن نواتج التحلل شخصت المركبات الآتية , Isopropanol , Formic acid , Phenol Guaiacol على التوالي ولكل من الخشب الصميمي للعرموط والزيتون . ووفق ما ورد من نتائج

التشخيص الكروماتوكرافي تبين قدرة الفطر على تحليل Bisphenol وكأنه ضالتها المنشودة الى مركبين جديدين بزمن إحتجاز (4.24) و (4.83) دقيقة على التوالي .

استطاع انزيم Laccase تحطيم وإزالة سمية Aflatoxin B1 كما كشفت نتائج التشخيص الكروماتوكرافي وتجزئته الى مركبين جديدين بزمن إحتجاز (7.49 و9.25) دقيقة على التوالي . كما ثبت في جعبة الانزيم قدرة فائقة على إزالة أنواع عديدة من الأصباغ الصناعية خلال مدد تحضين مختلفة إذ بلغت النسبة المئوية لإزالة كل من الصبغات , Bromocresol Purple, Neolan yellow, Phenol red, Congo red Methyle red 100% بعد 72 ساعة من التحضين . وأسفرت معاملة أوراق الجرائد القديمة بالانزيم عن إدمصاص الصبغة وقصرها بعد 24 ساعة من المعاملة الانزيمية . كما أظهر الانزيم المنقى قابلية تثبيطية عالية تجاه أنواع عديدة من البكتريا المرضية وكانت بكتريا *Escherichia coli* و *Klepsiella pneumoniae* و *Bacillus cereus* أكثرها حساسية بقطر تثبيط (60,57,58) ملم على التوالي .

الكلمات المفتاحية : انزيم Laccase – فطريات التعفن الابيض – *Ganoderma resinaceum* – PVC – اللكنين – الافلاتوكسين – Bisphenol – الأصباغ الصناعية.

Abstracte

The scientific study was born by obtaining 65 fungal isolates based on 5 different agricultural origins, including (Rashidieh, Kubba, Mosul Dam, Mosul forests and Bashiqa). The results indicate that Rashidieh region is richer in biological diversity, By using the preliminary screening method, it was possible to assess its activity on the production of the enzyme laccase in the growth environment in terms of calculating the diameter of the aura of enzymatic decomposition index, as three isolates were recorded with a symbol for G1, G2 and 31. The isolates selected from the initial screening were grown on mediums equipped with different basic materials, during which the isolate G2 achieved a high yield of (14.6) mm on solid media and (4.75) units / ml in liquid medium prepared with goaicol. The results of the phenotypic diagnosis indicated that it belonged to the genus *Ganoderma*, and its full identity was revealed by the molecular evidence by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technology and the nucleotide sequence as the *resinaceum*, which is one of the white rot fungi secreting the enzymes that degrade lignin and was diagnosed in this study for the first time in Mosul, By constructing the genetic affinity tree of the selected isolate with reference isolates belonging to the same genus, it was found that they are located within the same cluster and closest to *G. lucidum* with a match ratio of 98.59%, depending on the Mega 6 program.

The results of controlling the combination of cultivation conditions showed when the selected mushrooms were grown in continuous farms, which removed the veil from its nutritional needs and were in total 12 days, the optimum incubation period, glucose is a carbon source, yeast extract with a concentration of 4%, a nitrogen source, a pH of 6 and a temperature of 30°C. . Supplying the production medium with copper sulfate at a concentration of 30 mmol resulted in an increase in the amount of the extracted enzyme, which reached (13.93) units / ml. Also, isopropanol at a concentration of 4% encouraged the amount of the produced enzyme (9.85) units / ml.

The purification of the laccase enzyme from the fungal culture was carried out with a series of steps that included sedimentation with

ammonium sulfate at a saturation rate of 75%, in which the specific activity of the enzyme was accelerated and reached 17.18 units / mg with an enzyme yield of 46.14% and 2.63 times the number of purification times, followed by enzyme dialysis for 24 hours and resulted in an increase The specific activity reached 34.44 units / mg, the number of purification times reached 5.28, and the enzyme yield was 40.12%. The ion exchange step using DEAE-cellulose achieved a specific efficacy of 143.46 units / mg and a number of purification times of 22 times, with an enzyme yield of 34.82%. As for the last purification step that took place with the gel filtration chromatography technique using Sephadex G-100, the specific activity of the enzyme increased, reaching 406.28 units / mg, and the number of purification times reached 62.31 times, with an enzyme yield of 30.67%. The results of determining the properties of the purified enzyme resulted in obtaining one package with a molecular weight of 52 kilodalton upon electrophoresis on the polyacrylamide gel, and the detection process of the enzyme purity resulted in obtaining one single package of the purified enzyme from the two steps of ion exchange and gel filtration, which was considered evidence of purification. Enzyme to the degree of homogeneity. It was found that the optimum pH for the activity of the enzyme was (6), while the pH for the validation of the enzyme was found to be in a range between (5-7). As for the optimum temperature for the enzyme's activity, it was at (60) ° C, while the degree of thermal stability ranged between (20-60) ° C. It was revealed through the study that the enzyme has the ability to retain (98)% of its original activity when stored at laboratory temperature for a period of (7) days.

The results of environmentally friendly applications came with great hopes, as the biomass of the fungus completely overcame the problem of plastic pollution, in violation of the laws of nature, as the treatment of polyvinyl chloride (PVC) granules, both fine and coarse, for a period of 90 days resulted in a significant deterioration, which was followed by a weight loss of (60, 42.5) % For the soft and coarse types, respectively, in success, which is the first in this direction. How much biomass of mushrooms proved its ability to degrade lignin as stated in the preliminary results of High Performance Liquid Chromatography (HPLC), where the fungal biomass inflamed lignin with its flagellum, and the degradation products after 30 days of treatment were Cinnamic acid, Gallic acid, tannic acid, Vanillic acid, while the results of Gas

Chromatography (GC) revealed that the decomposition products identified the following compounds: (Butanol, Isopropanol, Formic acid, Phenol, and Guaiacol) respectively for each of the core wood of ammonia and olives. According to the results of the chromatographic diagnosis, the ability of the fungus to degrade Bisphenol, as if its desired target, into two new compounds with a retention time of (4.24 and 4.83) minutes, respectively.

The laccase enzyme was able to destroy and detoxify Aflatoxin B1. The results of the chromatography diagnosis and its fractionation into two new compounds with a retention time of (7.49 and 9.25) minutes, respectively, were revealed. The enzyme has been shown to have a superior ability to remove many types of industrial dyes during different incubation periods, as the percentage of removing each of the pigments (Congo red, Phenol red, Bromocresol Purple, Neolan yellow, Methyle red) was 100% after 72 hours of incubation. The enzyme treatment of old newspaper papers resulted in adsorption and shortening of the dye after 24 hours of the enzymatic treatment. The purified enzyme also showed a high inhibitory ability towards many types of pathogenic bacteria, and the bacteria *Escherichia coli*, *Klepsiella pneumoniae* and *Bacillus cereus* were the most sensitive ones, with an inhibition diameter (60, 58, 57) mm respectively. Glory to God Almighty, who endowed them with great capabilities that we must exploit for the purposes of life, and praise be to God for the blessing of Science and knowledge..

Key words: laccase - white rot fungi - *Ganoderma resinaceum* - PVC - lignin - aflatoxin - Bisphenol - textile dyes.

University of Mosul
College of Education
For Pure Science

Extraction and Purification of the laccase from *Ganoderma resinaceum* isolates and study of its environmentally applications

Warkaa Khalaf Hussein

Master Thesis

In Biology

Supervised by

Assist.Prof.

Dr. Shimal Younis Abdul-Hudi

1442 A.H. 2020 A.D.