جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

إستخلاص وتنقية إنزيم التانيز Tannase من عزلة محلية جديدة للفطر *Helvella bachu* وتقييم بعض تطبيقاته البيئية والطبية

جهان موفق سعيد الراوي

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ

الدكتورة شمال يونس عبد الهادي

١٤٤٤هـ ٢٠٢٢م

الخلاصة

بعد إعتماد المشروع البحثي من قبل اللجنة العلمية ، وبما أن معرفتنا بتنوع الفطريات الكبيرة لا يزال غير مكتمل في ظل غياب الدراسات طويلة الأمد حول عدد الأنواع في موقع محدد، كانت أولى الرحلات المسحية في تشرين الثاني لسنة 2021 ولمدة خمسة أشهر وقد شملت مناطق مختلفة من مدينة الموصل والأقضية التابعة لها، وبإستمرار الرحلات كشف المسح الميداني عن توليفة فريدة متنوعة من الفطريات التي أعطت قدرات مختلفة بالغربلة الأولية عند الكشف عن إنتاج إنزيم التانيز، وبدأ واضحاً تفوق العزلة ذات الرمز J75 التي أعطت أعلى قطر لهالة التحلل بلغ 9.2 ملم في غضون 5 أيام. بعد استخلاص الحامض النووي من الخيوط الفطرية وإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل وتحليل التتابعات النيوكليوتيدية وإدخالها في موقع NCBI تبين بأنها تعود للنوع *Helvella bachu*، وبعد صبر وعمل جاد سجلت في بنك الجينات لأول مرة على مستوى العراق وبالمرتبة الثانية على مستوى العالم بعد العزلة الصينية بالرقم التسلسلي OL454919.1.

ومحاكاة للظروف الطبيعية التي تنمو فيها عزلة الفطر المنتخبة، تبين أن الظروف الزرعية المثلى تحققت عند اليوم التاسع على الحضن حيث بلغت الفعالية الإنزيمية 8.62 وحدة / مل، كما أعطى المصدر الكاربوني Tannic acid أعلى فعالية إنزيمية 8.76 وحدة / مل بينما وصلت الفعالية الإنزيمية الى 9.62 وحدة / مل بإستعمال نترات الصوديوم كمصدر نتروجيني، كما بلغت الفعالية الإنزيمية 8.57 و 8.75 و 8.61 وحدة / مل عند الأس الهيدروجيني 5 ودرجة حرارة 30 °م وسرعة رج 150 دورة / دقيقة على التوالي. أدى إضافة Triton-X100 وأملاح NaCl الى تحسين فعالية الإنزيم إذ بلغت 9.20 و 9.29 وحدة / مل على التوالي.

للرغبة في الحصول على إنزيم التانيز المستخلص من عزلة الفطر بصورة نقية اتبعت سلسلة من الخطوات المتعاقبة ومحاليل دارئة، بدأت بتركيز الإنزيم بكبريتات الأمونيوم وبنسبة اشباع 75 % أعقبها الديلزة لمدة 24 ساعة ثم كروماتوكرافيا المبادل الأيوني DEAE-Cellulose وأخيرا كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي باستعمال Cephadex-G150 التي حققت فعالية نوعية بلغت 95 وحدة / ملغم بحصيلة انزيمية 57 % وعدد مرات تنقية 23.75. سخرت تقنية الاليزا لتكون دليلا على استخلاص الإنزيم وتنقيته حد التجانس حيث بلغ تركيز الإنزيم المنقى 3050.16 نانوغرام / مل بالمقارنة مع تركيز الأنزيم الخام 460 نانوغرام / مل. أبرزت دراسة خواص الإنزيم عن وزن جزيئي بلغ 52 كيلو دالتون وتوفر 13 حامض أميني عند الكشف عنها بجهاز Amino acid analyzer. وأمتلك الانزيم المنقى فعالية إنزيمية بلغت 8.52 وحدة/ مل عند الأس الهيدروجيني الأمثل 6 في حين كان الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الفعالية يقع بين (5 – 6). وبدا واضحا أن درجة الحرارة 50 °م هي الأفضل حيث بلغت فعالية الإنزيم

8.60 وحـــدة / مـــل فـــي حـــين كانـــت درجـــة حـــرارة الثبـــات تقـــع بـــين 50 – 60 °م واحتفظ الإنزيم بفعاليته الإنزيمية 98.36 % عند إضافة ايونات الكادميوم بالتركيز 1.0 ملي مولر. وتبين إمكانية احتفاظ الإنزيم بفعالية إنزيمية بلغت 99.70 % و 99.23 % بعد مرور 30 و 45 يوما على التوالي عند الخزن بـ 4 °م. وأعرب الإنزيم المنقى عن الأحتفاظ بـ 92.5 % من فعاليته الإنزيمية عند التقييد بألجينات الكالسيوم.

بهدف التقليل أو إيقاف التهديدات التي تتعرض لها الأنظمة البيئية، جاء في طليعة التطبيقات التي استغلت فيها الكتلة الحيوية للعزلة الفطرية المنماة على وسط اللكنين الصلب أحدثت إذابة كاملة لقطع الفحم المنخفض الجودة المنتشرة على سطح الوسط وحولتها الى قطيرات زيتية، وفي الأوساط المغمورة استطاعت الكتلة الحيوية إذابة قطع الفحم وتحويلها الى سائل اسود اللون وأحدثت تغيير في تركيب الفحم كما كشف عنها بطيف الأشعة تحت الحمراء وكروماتوكرافيا الغاز. وجاءت المعالجة الحيوية بأبهى صورها ودقة لم يسبق لها مثيل، إذ ازداد قطر مستعمرة النمو للعزلة الفطرية عند تنميتها على الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 1.5 % نفط خام حيث بلغ 10 ملم بعد 7 أيام على التحضين مقارنة بالتراكيز الأخرى وبلغت النسبة المئوية للتحلل أعلى قيمة 64.46 % بالتركيز أعلاه وبينت مخرجات التحلل بكروماتوكرافيا الغاز – مطياف الكتلة أهم المركبات الكيمياوية الناتجة من تحلل النفط الخام. نتج عن معاملة النفايات السائلة لمعاصر الزيتون إنخفاض في تركيز الفينول الكلي إذ بلغ 2.14 ملغم / 100 غم بعد مضي 30 يوماً على المعاملة بالتركيز 20 % من مياه الجفت. النسبة المئوية لإزالة اللون الأسود بلغت 64.39 % عند التركيز 10 % وبمدة تحضين 30 يوماً. تمكنت الكتلة الحيوية لعزلة الفطر من خفض متطلب الأوكسجين الحيوي بكلا التركيزين لماء الجفت المستخدم ومدة التحضين مع اختلاف الاستجابات.

استغل الإنزيم في مجموعة واسعة من التطبيقات، تمتع الإنزيم المنقى بقدرة على إختزال سم الأفلاتوكسين الأشد خطورة B1 حيث بلغت كميته 3.4 نانوغرام / مل و إنخفضت الى 1.2 نانوغرام / مل باستخدام الإنزيم الخام مقارنة بالأفلاتوكسين قبل المعاملة 1.32 مايكروغرام / مل. كما إستطاع الإنزيم الخام المضاف بمقدار 2 مل من إزالة بقع التانين من الإقمشة القطنية بعد 24 ساعة على المعاملة . وعلى نفس المنوال وبعد تجربة دامت 3 ساعات تمكن الأنزيم من إزالة تانين الشاي الأسود إذ بلغت النسبة المئوية لإزالة التانين 96.77 %. كما أتضح إمتلاك كل من الإنزيم الخام والمنقى القدرة على إعادة تدوير النفايات الورقية وتبييضها مع تفوق إنزيم المنقى بعد 24 ساعة من المعاملة . وتشير البيانات التي قدمتها تجربة إزالة العديد من الأصباغ الصناعية تمكن إنزيم التانيز من إزالة 100 % من لكل من صبغتي Reactive yellow و Indigo Carmina ونسب متفاوتة للصبغات الأخرى المستخدمة بعد 48 ساعة على المعاملة

بالإنزيم ولتلافي الرغوة والطعم القابض لبعض العصائر، تمكن أنزيم التانيز المنقى من ترويق كل من عصير السفرجل والتمر الهندي وتحسين المظهر العام بعد مرور 120 دقيقة على المعاملة بالإنزيم.

ولأن معظم الإهتمام في الوقت الراهن وجه مباشرة لإستخدام الفطريات في إنتاج مركبات ذات أهمية طبية، فقد إتضح أن إنزيم التانيز المنقى يتمتع بخصائص فعالة ضد العديد من الأنواع البكتيرية، إذ أعطى قطر هالة تحلل بلغت 30.5 ملم عند استخدامه بالتركيز 100 مايكروغرام / مل تجاه بكتريا *Klebsiella pneumonia*. كما أظهر تأثيراً مضاداً للأكسدة وقابلية على أكسدة الجذر الحر لمادة DPPH بلغت 80 % عند إستخدامه بالتركيز 500 مايكروغرام / مل. ولتلافي الإستخدام المرهق للأدوية الكيمياوية وفي ظل النقص الحاد لأدوية السرطان تبنت تجربة استخدام الإنزيم المنقى لعلاج سرطان القولون HT-29، أسفرت نتائج السمية الخلوية بإختبار MTT استهدافه للخلايا السرطانية بنسبة تثبيط بلغت 76 % عند التركيز 500 مايكروغرام / مل في حين لم يكن له تأثير على الخلايا الطبيعية مما يشرع نهجا جديدا لعلاج السرطان ويشكل بارقة أمل تلوح في صراعنا مع السرطان. وللتحري عن الموت الخلوي المبرمج لخط الخلايا السرطانية للقولون أستخدمت الصبغة الثنائية الأكردين اورنج – اثيديوم بروميد وتبين بعد مرور 24 ساعة على المعاملة بإنزيم التانيز قابليته على إحداث الموت الخلوي المبرمج عند فحص الخلايا بالمجهر المتفلور إذ اصطبغت الخلايا الميتة باللون الأحمر.

كما كشف التدفق الخلوي بإستخدام الصبغة المتالقة Rh-123 عن حدوث خلل في غشاء المايتوكندريا عند المعاملة بأنزيم التانيز بالمقارنة مع الخلايا الطبيعية. وأفضى التحري عن الفعالية المضادة للإلتهاب بطريقة الإمتزاز المناعي المرتبط بإنزيم التانيز وبتتبع تراكيز الأنترلوكين IL-1 و IL-6 في مصل المرضى المصابين بمرض اللوكيميا عن قابلية إنزيم التانيز على خفض مستوى الحركيات الخلوية إذ بلغت 142.0 و24.67 بيكوغرام/مل .

أتاح لنا هذا العمل التعرف على عالم الفطريات عن كثب ونأمل أن ما حقق من إنجاز علمي في مهمة شاقة قد يظن الكثيرون انها أقرب الى المستحيل يمثل خطوة رائدة يضاف للنهر الجارف المتجدد يومياً من الإكتشافات العلمية الحديثة املاً أن تساهم هذه الرؤية في تسهيل العمل للباحثين الاخرين.

Summary

After the approval of the title of the research project by the scientific committee and the issuance of the administrative order in a few days, and since our knowledge of the diversity of large fungi is still incomplete in the absence of long-term studies on the number of species in a specific site. The first survey trips were launched on the morning of the twenty-second of January of the year 2021, which lasted five months and included different areas of the city of Mosul and many of its districts. With the resumption of flights. The field survey revealed a unique and diverse combination of fungi that gave different responses by the initial screening when detecting the production of tannase enzyme. It became clear the superiority of the isolate with the symbol J75, that gave the biggest diameter of the decomposition halo reached 9.2 mm within 5 days. After extracting DNA from the fungal hyphae, conducting the polymerase chain reaction and analyzing the nucleotide sequences and inserting it into the NCBI website, it was found that it belongs to the serial number. OL454919.1 .

Simulating the natural conditions in which the selected mushroom isolate grows, it was found that the optimum planting conditions were achieved on the ninth day on the incubation, where the enzymatic activity reached 8.62 units/ml, and the carbon source Tannic acid gave the highest enzymatic activity 8.76 units/ml, while the enzymatic activity reached 9.62 units. /ml using sodium nitrate as nitrogen source. The enzymatic activity was 8.57, 8.75 and 8.61 units/ml at conditions pH 5, temperature 30°C and shaking speed of 150 rpm, respectively. The addition of Triton-X100 and NaCl salts improved the enzyme activity, reaching 9.20 and 9.29 units/ml respectively.

In order to obtain the enzyme tanase extracted from the isolate of the fungus in a pure manner, a series of successive steps and buffer solutions were followed, starting with a concentration of the enzyme with ammonium sulfate at saturation rate of 75%, followed by dialysis for 24 hours. Then chromatography of the ion exchange DEAE-Cellulose, and finally the chromatography of gel filtration using Cephadex-G150. It achieved a specific efficacy of 95 units/mg with an enzymatic yield of 57% and a number of purification times of 23.75. The ELISA technique was harnessed to be evidence of enzyme extraction and purification to the point of homogeneity, where the concentration of the purified enzyme reached 3050.16 ng/ml compared to the concentration of the crude enzyme 460 ng/ml. The study of the properties of the enzyme revealed a molecular weight of 52 kDa and the availability of 13 amino acids when detected by an amino acid analyser. The purified enzyme had an enzymatic activity of 8.52 units/ml at the optimum pH of 6, while the optimum pH for the stability of the activity was between 5-6. It was clear that the temperature of 50 °C was the best, as the enzyme activity reached 8.60 units/ml, while the stability temperature was between 50-60 °C. The enzyme retained its activity of 98.36% when cadmium ions were added at a concentration of 1.0 mmol. It was shown that the enzyme could retain an enzymatic activity of 99.70% and 99.23% after 30 and 45 days, respectively, as stored at 4°C. The purified enzyme retained 92.5% of its activity when immobilized by calcium algenate.

With the aim of reducing or stopping the threats to ecosystems, it came at the forefront of the applications in which the biomass of fungal isolates grown on the solid lignin medium was exploited. The coal was cut and converted into a black liquid and caused a change in the composition of the coal as revealed by infrared spectroscopy and gas chromatography. The biological treatment came in its best forms and

unprecedented accuracy. The diameter of the growth colony of the fungal isolate increased when grown on the prepared food medium with a concentration of 1.5% crude oil, reaching 10 mm after 7 days of incubation compared to other concentrations. The percentage of decomposition reached the highest value of 64.46% at concentration. Above, the decomposition outputs by gas chromatography-mass spectrometry showed the most important chemical compounds resulting from the decomposition of crude oil. The liquid waste treatment of olive presses resulted in a decrease in the total phenol concentration, which reached 2.14 mg (10.58 mg/100 gm) after 30 days of treatment with a concentration of 20% of peat water. The percentage of black color removal was 64.39% at 10% concentration and 30 days incubation period. The biomass of the fungus isolate was able to reduce the bio-oxygen requirement at both concentrations of the used peat water and the incubation period with different responses.

To bring the spirit back to scientific research, the enzyme was used in a wide range of applications. The extracted enzyme had the ability to reduce the most dangerous aflatoxin B1 toxin, as its quantity was 3.4 ng/ml and decreased to 1.2 ng/ml using the crude enzyme compared to the aflatoxin before treatment 1.32 µg/ml. In the same vein, the crude enzyme added by 2 ml was able to remove tannin stains from cotton fabrics after 24 hours of treatment. After 3-hour experiment, the enzyme was able to remove the tannins of black tea. As the percentage of tannin removal was 96.77%. It was also found that both the raw and purified enzyme had the ability to recycle and bleach paper waste with the superiority of the purified enzyme after 24 hours of treatment. The data provided by the experiment to remove several industrial dyes indicate that tannase was able to remove 100% of each of Reactive yellow and Indigo Carmina dyes, and varying percentages of other dyes

used after 48 hours of treatment with the enzyme. In order to avoid the foaming and astringent taste of some juices, the purified tanase enzyme was able to liquefy each of the quince and tamarind juices and improve the visual appearance after 120 minutes of treatment with the enzyme. Because we have a long legacy of pollutants, pollution will not be removed overnight, but change is coming, we are only at the beginning.

Because most of the attention at the present time is directed directly to the use of fungi in the production of compounds of medical importance, it has been shown that the purified enzyme tannase has effective properties against many bacterial species, as it gave a hydrolysis halo diameter of 30.5 mm when used at a concentration of 100 µg / ml against *Klebsiella pneumonia* . It also showed an antioxidant effect and the ability to oxidize free radicals of DPPH reached 80% when using it at a concentration of 500 µg/ml. In order to avoid the cumbersome use of chemical drugs and in light of the severe shortage of cancer drugs, the experiment was adopted to use the purified enzyme for the treatment of colon cancer HT-29 . The cytotoxicity results of the MTT test resulted in targeting cancer cells with an inhibition rate of 76% at concentration of 500 mg / ml, while it had no effect on normal cells, that initiates a new approach to cancer treatment and constitutes a glimmer of hope in our struggle with cancer. In order to investigate the programmed cell death of the colon cancer cell line, the dual dye acridine orange-ethidium bromide was used. After 24 hours of treatment with tannase, it was found that it was capable of causing programmed cell death when the cells were examined under fluorescence microscopy, as the dead cells were stained red.

Flow cytometry using Rh-123 fluorescent dye revealed a defect in the mitochondrial membrane when treated with tannase enzyme

compared to normal cells. Investigating the anti-inflammatory activity of tannase-associated immunosorption method and by tracking the concentrations of interleukin IL-1 and IL-6 in the serum of patients with leukemia revealed the ability of tanase enzyme to reduce the level of cytokines.

This work allowed to get acquainted with the world of fungi closely, and we hope that the scientific achievement that has been achieved in a difficult task that many may think is closer to the impossible represents a pioneering step in addition to the sweeping river that is renewed daily from modern scientific discoveries. I hope that this vision will contribute to facilitating the work of other researchers. .

University of Mosul
College of Education
for Pure Science

Extraction and Purification of Tannase Enzyme from A new Local Isolate of The Fungus *Helvella bachu* and Evaluation of Some of Its of Environmental and Medical Applications

Jehaan Mowafak Al-rawi

Ph.D. thesis

Biology

Supervised by

Prof.

Dr. Shimal Younis Abdul-Hadi

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