Purification of algnic acid by Local isolate of *Azotobacter Vinelandii*

J.I.Mahdi,M.R.Ali, H.M.Hamza*
Foundation of Technical Education , Technical Medical Instute Al-Mansour
***Univarsity of Arbil**

Abstarct

The bacteria *Azotobacter Vinelandii* was taken from a central research in Baghdad, The purification of alginic acid which produced from the bacteria by several steps starting with precipitation with isopropanol (3:1) v/v , Washing by ppt with 100ml of isopropanol : distilled water (3:1) v/v , then the ppt was dissolved in warm distilled water and dialysis against distilled water from 24 h/s .

To Complete the purification , gel filtration chromatography was conducted on sephacryl s-100 column followed by ion – exchange chromatography . Using DEAE cellulose column .

The molecular Weight of purified al ginic acid was higher than that of blue dextran 2000,It was more than (2) millions Dalton .

تنقية حامض الالجينك من عزلة محلية لبكتريا *Azotobacter Vinelandii*

جندي علك مهدي، محمد رفيق علي، حيدر موسى حمزة*
هيئة التعليم التقني،المعهد الطبي التقني المنصور
***جامعة أربيل**

الخلاصه

أخذت عزلة محلية من أحد المراكز البحثية والمشخصة على أنها *Azotobacter Vinelandii* ثم تمت تنقية حامض الالجنيك المنتج منها بعدة خطوات تضمنت الترسيب بالكحول الايزوبروبيلي بحجم يعادل ثلاثة أضعاف حجم المستخلص ١:٣ وغسل الراسب بحجم ١٠٠ مللتر من خليط ١:٣ (ايزوبروبانول : ماء) ثم أذابة الراسب بالماء المقطر الدافئ والديلزة حيال الماء المقطر مدة ٢٤ ساعة .

استكملت التنقية بكروماتوغرافيا التبادل الايوني بوساطة عمود DEAE-Cellulase ، وكان حامض الالجينك ذا وزن جزيئي أكبر من ٢,٠٠٠,٠٠٠ دالتون ، عند مقارنته بالدكستران الازرق ٢٠٠٠ .

المقدمة

تعد خطوة التنقية واحدة من الخطوات المهمة والاساسية في أنتاج المواد الحيوية ، وفي حالة السكريات المتعددة الخارجية التي تقل فيها مشاكل العزل اذ استعملت طرائق النبذ بعمليات الفصل ، ولكن المشكلة الرئيسة لهذه المركبات هي اللزوجة العالية التي تعيق أزاحة الخلايا (1) .

أن أستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion-exchange chromatography لتنقية السكريات المتعددة كأعمدة DEAE-Cellulose يعمل على أمتصاص هذه السكريات، وأن أستخدام الكروماتوغرافيا يقود في كثير من الحالات الى فصل الكثير من المواد المرتبطة مع السكريات المتعددة عند أستخدام عمود DEAE-Cellulase، اذ وجد أن في السلاسل المتماثلة ذات التركيب الخيطي (Linear) يكون أرتباط المواد ذات الوزن الجزيئي الواطئ أقل من المواد ذي الوزن الجزيئي العالي (2) .

وللأهمية العالية لحامض الالجنيك ودخوله في صناعات متعددة مثل : الصناعات الغذائية والصيدلانية (3) ،اذ أن له أستعمالات صناعية عديدة اذ يستخدم مجلتنا" (Gelling agent) ، مثخنا" (Thickening) ، مثبتا" (Stabilising) أو حاجزا" للماء في مجالات مختلفة (4) ، ولوحظ بالدراسات الحديثة أن لحامض الالجنيك أستعمال طبي مهم هو حماية محتويات المعدة من الالتهابات وسوء الهضم والعمل على أيقاف النزف من خلال مركبات الجينات الكالسيوم (5) . وكذلك يستخدم في حشوات الأسنان (6) .

يستعمل في أفلام التصوير ايضا" ومعالجة المياه وبتقييد الأنزيمات (8) .ولهذا البولمر أهمية في فصل وأستخلاص العديد من الأيونات الفلزية عند أستعماله كمبادلا" أيوني (Ion-exchange) (8) .

المواد وطرائق العمل

- الترسيب بالكحول الايزوبروبيلي

رسب حامض الالجنيك حسب الطريقة الموصوفة من (Jarman… etal)(9) بأضافة الكحول بحجم يعادل ثلاثة أضعاف حجم العينة مع الرج الشديد ثم الترشيح بعد مرور ١٠ دقائق بورق ترشيح Whtman No.1 ، غسل الراسب بمحلول ١٠٠ مللتر من خليط (٣:١) ماء : ايروبروبانول وجفف الانموذج بفرن حراري ٢٥م لمدة ٢٤ ساعة

– الديلزة

أذيب الراسب (٥ غرام) في ٢٠ مللتر ماء مقطر دافئ (٤٥م°) مع التحريك المستمر ثم أجريت عملية الديلزة حيال الماء المقطر بعدة تبديلات خلال ٢٤ ساعة وبدرجة ٤ – ٦م° ثم سحب الرائق بجهاز(Lyophilizer) وحفظ لحين الأستخدام (10) .

– كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography

تم تهئية عمود الترشيح الهلامي بأبعاد X٢,٢ ٧٦ سم وتمت موازنته بمحلول الخلات الداريُ بسرعة جريان ٣٠ مللتر/ساعة ثم أضيفت عينتان قياسيتان هما الدكستران الأزرق Blue Dextrant 2000 بوزن جزيئي ٢,٠٠٠,٠٠٠ دالتون والدكستران T-70 بوزن جزيئي ٧٠,٠٠٠ دالتون بأضافة ٣ مللتر من الدكستران الازرق والدكستران T-70 كلاً على حده لسطح الهلام بهدوء بشكل متجانس وشطف بالمحلول الدارئ بسرعة جريان ٣٠ مللتر/ساعة .

جمع المحلول النافذ أسفل العمود وقرأ الأمتصاص بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي ٦٠٠ نانوميتر ، أما الدكستران T-70 فقرأ الأمتصاص له على طول موجي ٤٩٠ نانوميتر .

أضيفت عينة من حامض الالجنيك القياسي شركة BDH بواقع ٥ ملغرام/مللتر وبحجم ٥ مللتر وعينة حامض الالجنيك المحلية بالتركيز والحجم نفسيهما .تمت متابعة الأجزاء النافذة بقراءة الأمتصاص الضوئي ٤٩٠ نانوميتر ثم رسم منحني الأمتصاص الضوئي .

– كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion-exchange chromatography

المحاليل المستعملة :

أ – محلول الفوسفات الدارئ بتركيز ٠,٠٠٥ مولاري وبرقم هيدروجيني ٧,٥ .

ب – محلول الاسترداد والمحضر بأضافة ٠,٥٧ مللتر من حامض الخليك الى ٨٠ مللتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني وأكمل الحجم الى ١٠٠ مللتر بالماء المقطر .

جـ – محلول حامض الهيدروكلوريك ٠,١ مولاري .

د – محلول فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين .

هـ – محلول ٠,٢٥ مولاري كلوريد الصوديوم –٠,٢٥ مولاري هيدروكسيد الصوديوم .

و – محلول ٠,٢٥ مولاري حامض الهيدروكلوريك .

تهيئة العمود

وزن ٤٠ غرام من DEAE Cellulose ونشط حسب طريقة (wbitaker)(11)، ثم علق بالماء المقطر بأسطوانة مدرجة بحجم ٥٠٠ مللتر، ثم علق بمحلول ٠,٢٥ مولاري كلوريد الصوديوم – ٠,٢٥ مولاري هيدروكسيد الصوديوم بواقع ٥٠٠ مللتر لكل ٢٥٠ غرام من مسحوق المبادل، ثم رشح تحت التفريغ على ورق ترشيح، ثم غسل مرتين بالماء المقطر،

ثم غسل بمحلول ٠,٢٥ مولاري حامض الهيدروكلوريك ثم غسل بعدها أكثر من مرة بالماء المقطر ثم علق بمحلول الفوسفات الدارئ و عدل الرقم الهيدروجيني المطلوب ٧,٠ بمحلول حامض الهيدروكلوريك ٠,١

مولاري وعلق بداري الموازنة وأجريت له عملية أزالة الفقاعات الهوائية (Degassing) بوساطة مضخة تفريغ مختبرية (Vaccum pump)، ثم عبئ العمود بأبعاد ١X٢٥ سم، ثم غسل بدارئ الموازنة (محلول الأسترداد) وبسرعة جريان ٣٠ مللتر/ساعة .

أضافة النماذج والأسترداد

أضيفت عينة حامض الالجنيك القياسي شركة BDH بعد أذابتها بدارئ الموازنة بتركيز ٥ ملغرام/مللتر وبحجم ١٠ مللتر الى سطح المبادل بوساطة ماصة وبهدوء ثم جمعت الأجزاء المتدفقة من العمود بواقع ٦ مللتر لكل جزء .

جرت عملية الأسترداد (Elution) وفحصت النماذج بطول موجي ٤٩٠ نانوميتر.

أضيفت عينة حامض الالجنيك المدروسة التركيز والحجم نفسيهما وتحت الظروف نفسها ثم رسم منحني الأمتصاص الضوئي عند طول موجي ٤٩٠ نانوميتر .

النتائج والمناقشة

تضمن البحث تنقية حامض الالجنيك باستعمال كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography وكروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion-exchange chromatography ، وكانت أولى خطوات التخلص من الجزئيات الصغيرة هي الديلزة (Dialysis) حيال الماء المقطر لأكمال التنقية وأعطاء صورة تقريبية عن الوزن الجزيئي لحامض الالجنيك المنتج من بكتريا *Azotobacter Vinelandii* بالمقارنة مع مركبات معروفة الوزن الجزيئي بوساطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي ، ثم أمرار عينة حامض الالجنيك من خلال عمود Sephacryl-s-1000 بينت النتائج بالشكل (١) كبر الوزن الجزيئي له بالمقارنة مع الوزن الجزيئي للدكستران الازرق ٢٠٠٠ والذي يبلغ ٢,٠٠٠,٠٠٠ دالتون حيث ظهرت القمة عند حجم أسترداد ٢٨٥ مللتر أما الدكستران T-70 عند ٤١٠ نانوميتر فظهرت القمة لحامض الالجنيك عند حجم أسترداد ٢٥٢ مللتر .

يشير شكل رقم (٢) الى أن الوزن الجزيئي أكبر من ٢,٠٠٠,٠٠٠ دالتون وقد أشار (cohen and johnstone)(12) الى أن الوزن الجزيئي لحامض الالجنيك المنتج من بكتريا Azotobacler -Vinelandii أكبر من ٢٠٠,٠٠٠ دالتون وعند ملاحظة شكل (٢) نجد أن الوزن الجزيئي لحامض الالجنيك القياسي أكبر من الوزن الجزيئي للانموذج البكتري اذ بلغ حجم الأسترداد له ٢٠٣ مللتر .

لقد بين (penman and sanderson)(13) أن حامض الالجنيك النتج من بكتريا Azotobacler -Vinelandii يحتوي على نسبة متغيرة من التتابعات المتجانسة (Homopoly meric) مقارنة مع الالجنيات المنتجة من الطحالب ، كما أن الالجنيات تكون فيها نسبة حامض المانيرونيك أكبر من حامض الكوليرونيك مقارنة مع الالجنيات الطحلبية (14) .

لقد أستخدم هلام سيفاكريل أس –١٠٠٠ بسبب صفاته المتميزة من أبرزها القدرة على فصل الاوزان الجزيئية العالية أعلى من (٢٠ X ١٠ دالتون) (15) .

أستعملت كروماتوغرافيا التبادل الأيوني خطوة أضافية أخرى لتنقية حامض الالجنيك بوساطة عمود DEAE Cellulose وأظهرت النتائج أنفصال أربع قمم عند الأسترداد بمحاليل متدرجة من الرقم الهيدروجيني شكل (٣) ، بينت النتائج أنفصال القمم الأربعة لانموذج الالجينات القياسية والالجينات المنتجة من هذا البحث ولقد كانت أعلى قمة عند

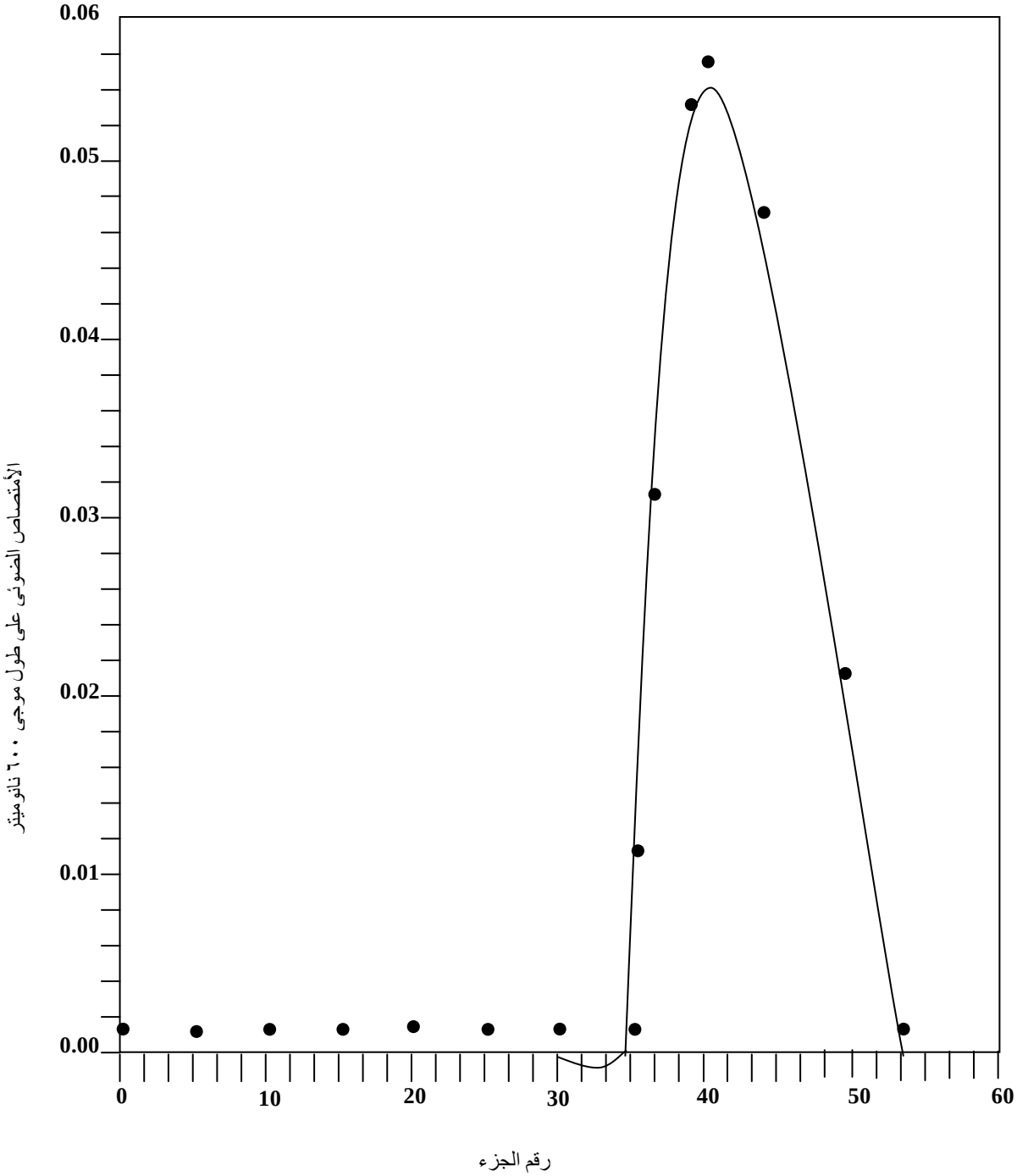
محلول الأسترداد المكون من حامض الهيدروكلوريك ٠,١ للانموذجين ، إذ بلغت قيمة الأمتصاص الضوئي ٠,٤٩ بالنسبة الى النموذج القياسي و ٠,٧٥ للانموذج البكتري ، وعند مقارنة قيم الأمتصاص الضوئي للقمم الأخرى نجد أن

عند محلول أسترداد ذو رقم هيدروجيني ٣,٠ كان ٠,٤٣، وعند رقم هيدروجيني ٤,٠ كان ٠,٤٢ وبلغت قيمة الأمتصاص الضوئي ٠,٠٧٤ عند أستعمال محلول أسترداد ذي رقم هيدروجيني ٥,٠ قد تعزى هذه النتيجة الى تفاوت كثافة الشحن الموجودة في تركيب الالجينات من ناحية حامضي المانيرونيك والكوليرونيك ونسبة المناطق المتبادلة (Alternating regions) قد يفسر سبب أنفصال أكثر من قمة وسبب تفاوت الشحنة السالبة بينهما ، فنجد أن محلولي الأسترداد (الخلات الدارئ ٠,١) ذا الرقم الهيدروجيني هو ٥,٠ و ٤,٠ أن القيم المنفصلة ذو تركيز قليل بملاحظة قيم الأمتصاص الضوئي ٠,٠٧٤ و ٠,٤٢ للنموذج القياسي و ٠,٠٢٦ و ٠,١٤٢ للانموذج البكتيري ، وقد تعزى هذه النتيجة الى التفاوت في محتوى مجاميع الكاربوكسيل للسلاسل المكونة للالجنيات المنتجة،اذ تنفصل ذا المحتوى الواطئ والأضعف في كثافة شحنتها من العمود في محاليل الأسترداد هذه، في حين كانت ذا المحتوى الأعلى من الكاربوكسيل الأقوى في كثافة الشحنة والأقوى أرتباطاً، لذا كانت هي الأخيرة في الأسترداد عند محلول ٠,١ عباري حامض الهايدروكلوريك .

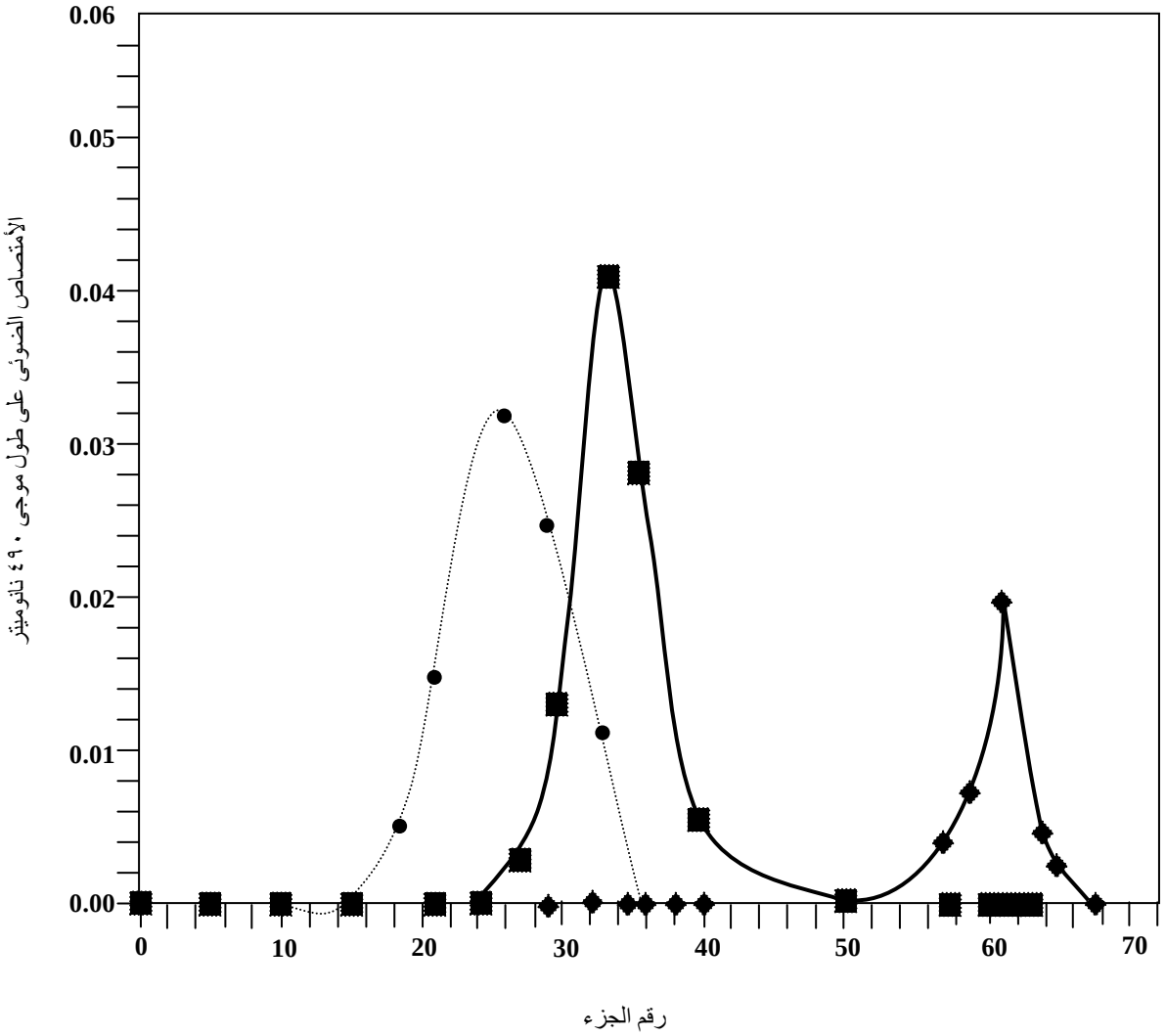
أن أستعمال محاليل أسترداد ذي أرقام هيدروجينية متدرجة في مثل هذا البحث لم تطبق سابقاً فأغلب الدراسات المتوافرة أستخدمت أعمدة التبادل الأيوني لفصل نواتج التحلل المائي الحامضي للالجنيات مما لا يسمح بالأستناد الى نتائجها للفارق الكبير بين أهداف أستعمال هذه التقنية وظروفها .

المصادر

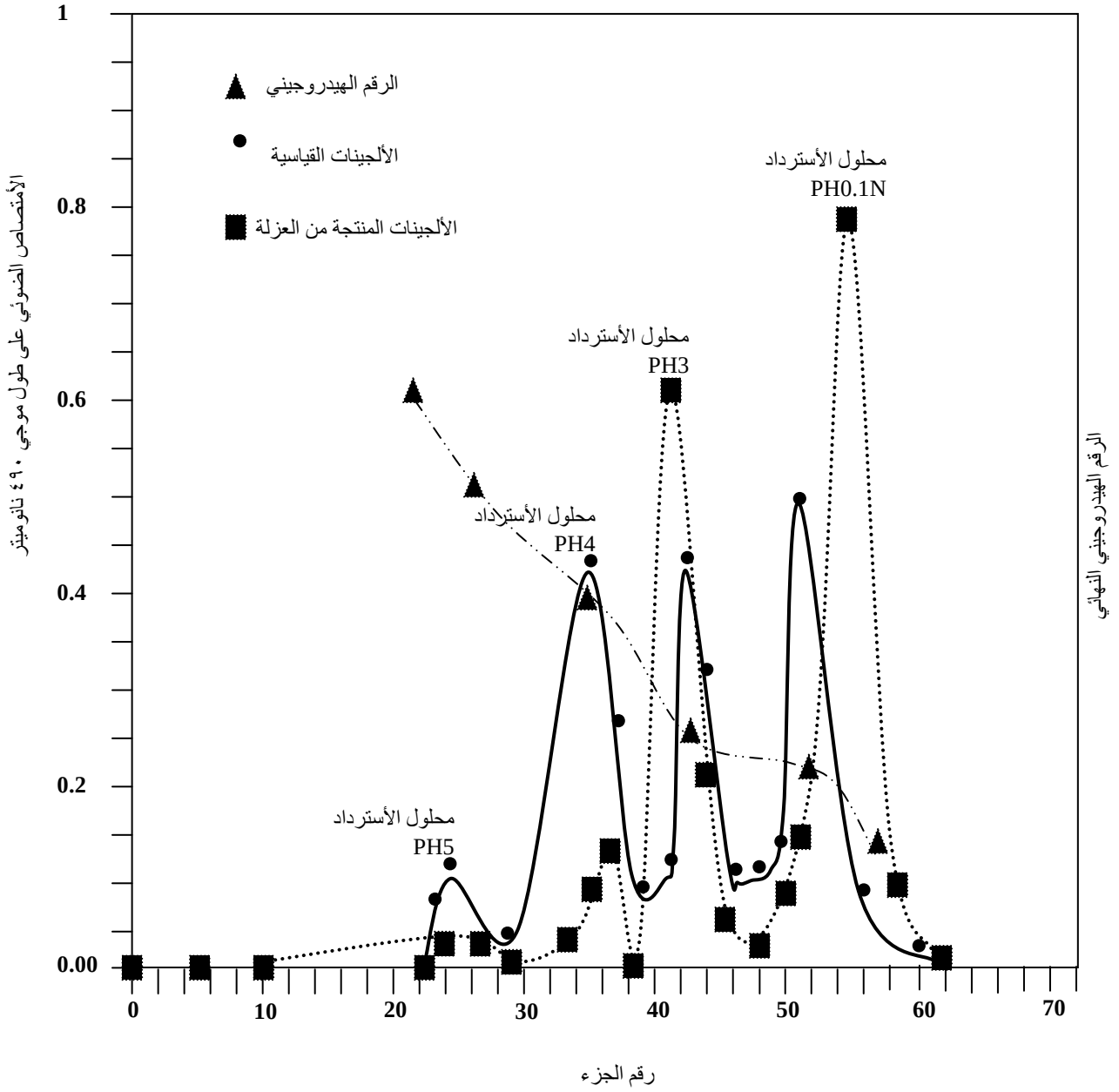
1 – Cerning , J. (1990) ,Microbio.revi., 87:113-130.
2 – Lourent , T.C.(1961). Arch . Biochem . Biophys ., 92: 224-230.
3 – Whistler, R.L. and Beriller, J.(1973) Industrial Gums" 2nd .ed.Acadmic press,New York
4 – Morris,V.J. (1987).New and Modified polysaccharides" . food Biotechnology 1 Elsevier Applied science . London pp.193-249-
5 – Colwell, R.R.(1985),Marine polysaccharides for pharmaceuticsl" and Micoobiological Application . In Biotechnology of Marine polysaccharides , Washinglon . New York , London . pp. 364-376 .
6 – Tyler , V.E. Brady,L.R. and Robbers , G.E. (1988) "Pharmacognosy" 9th edition . Lca and febiger Philadelphia
7 – Rosevear ,A., (1988)"Immobilized plant cell" . Food Biothechnology" . Elsevier Applied science pp.83-117,
8 – Kakino, K.; Mizuno, H.; saito T.(1980),Effect of M/G ratio on sdution properties of Alginic Acid" . Reports on progress in polymer physics in japan vol XXXIV
9 – Jarman , T.R.; Deavin,L. ; Slocombea, S. and Righetto, R.C. (1978). effect of. J.of Gen . Microblo . v.107 : 59-64
10- Anderson , A.J.,A.J.Hacking and E.A.Dawes ., (1987). "Alternative pathwags for Biosynthesis of Alginate from fructose and Glucose in pseudomonas mendocina and Azotobacter Vinelandii " J.Gene . Microbio 133:1045-1052 .
11 – Wbitaker , J.R. (1985). "Principle of enzymology for the food science" Marcel Dekker, Inc New York
12 – Cohen, G.H. and Johnstone ,D.B. (1964). j.bacteriolo . 88 :29-338 .
13 – Penman , A. and Sanderson ,G.R. (1972). Carbohyd . Res ,25 :273-282 .
14 – Haug , A. and Larsen , B.(1971) . Carbohyd . Res . 17: 297-308 .
15 – Pharmacia , fine chemicals .(1987) Sephacryl s-400, s-500, s-1000 super fine for the separation of very large molecule and small paiticles .



شكل :(١) الترشيح الهلامي للدكستران الأزرق ٢٠٠٠ في عمود سيفاكريل أس ـ١٠٠٠ (٢,٢ x ٧٦) سم تمت موازنته بمحلول الخلات الدارئ (٢,٠ مولاري) ذي الرقم الهيدروجيني ٦,٠ بسرعة جريان ٣٠ مللتر/ساعة (حجم الجزء ٥ مللتر)



شكل :(٢) الترشيح الهلامي للدكستران T-70(♦) وحامض الألجنيك القياسي (●) وحامض الألجنيك المنتج من العزلة المحلية (١) لبكتريا A.vinelanndii (■) في عمود سيفاكريل أس -١٠٠٠ (٢,٢ x ٧٦) سم تمت موازنته بمحلول الخلات الدارئ (٢,٠ مولاري) ذي الرقم الهيدروجيني ٦,٠ بسرعة جريان ٣٠ مللتر/ساعة (حجم الجزء ٥ مللتر)



شكل :(٣) التبادل الأيوني للألجينات القياسية والألجينات المنتجة من العزلة المحلية لبكتريا A. vinelandii في عمود DEAE-cellulose ، (٢٥X١) سم تمت موازنته بمحلول الفوسفات الدارئ (٠,٠٥ مولاري) ذي الرقم الهيدروجيني ٧,٠ . سرعة الجريان ٣٠ مللتر/ساعة (حجم الجزء ٥ مللتر)