مجلة ام سلمة للعلوم **مجلد 6(1) 2009**

تنقية وتوصيف انزيم البيتالاكتميز المنتج من العزلة المحلية *K. pneumoniae*

عصام فاضل الجميلي* ***زهير شفيق الطائي****
منتهى عبد الكريم الصفار**

تاريخ قبول النشر 2008/1/18

الخلاصة

نقي البيتالاكتميز المنتج من العزلة المحلية *K. pneumoniae* بثلاث خطوات شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم عند نسبة اشباع 20–40% والتبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني DEAE وعمود السيفاكريل S-200 بعدد مرات تنقية وحصيلة بلغت 32.66 و 47.04% على التوالي .

بينت نتائج توصيف الانزيم ان الوزن الجزيئي 40000 عند تعينه بطريقة الترشيح الهلامي وان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم (7) بينما كان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم عند المدى 6.5–7.5 ، في حين بلغت اقصى فعالية للانزيم عند درجة حرارة 35 ° م , ولوحظ احتفاظ الانزيم 72% من فعاليته عند خزنه بدرجة (–20 م) ولمدة 28 يوماً مقارنه ب 20% عند خزنه بدرجة حرارة 4 ° م وللمدة نفسها .

كلمات مفتاحية: انزيم البيتالاكتاميز، الترشيح الهلامي، توصيف الانزيم، الفعالية الخزنية.

المقدمة

تعود معظم البيتالاكتميز في هذه المجموعة من البكتريا الى عائلة بروتيزات السيرين الواسعة (superfamily of serine proteases) الرقم التصنيفي له (EC.3.5.2.6) ، وتعرف البيتالاكتميز بأنها انزيمات بكتيرية متغايرة تقوم بتحليل حلقة البيتالاكتام في البنسلينات والسيفالوسبورينات مؤدية الى كسر حلقة البيتالاكتام في مضاد الحيوية ، وتوجد في انواع كثيرة من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام [1] .

ان آلية عمل البيتالاكتميز تقوم على اساس تنشيط عملية تكوين جدار البكتريا من مجموعة مضادات البيتالاكتام اولا . اذ تقوم مضادات البيتالاكتام بمنع حدوث الارتباط(Cross linkages) بين السلاسل (الاحماض الامينية) المتقاطع وذلك بتكوينها آصرة تساهمية مع PBPs لينتج معقداً يعرف Acyle –enzyme complex [2و3]. ويؤدي تعطيل عمل PBPs الى تخليق جدار خلوي ناقص التكوين غير متماسك مما يجعل البكتريا حساسة للضغط الاوزموزي مما يؤدي الى موتها [4] .

تم انتاج البيتالاكتميز من العزلة *Clostridium butyricum* وتنقيته باستخدام تقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephacryl S-200 وتنقية كروموتوغرافيا التبادل الايوني والمبادل Mono Q وكانت عدد مرات التنقية والحصيلة الانزيمية هي 121 و 825 مرة و 68.5 و 29.4 على التوالي [5] .

* معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا –جامعة بغداد
** معهد التقني الطبي / بغداد

لقد وجد بان هنالك تشابهاً كبيراً في تسلسل الاحماض الامينية في الموقع الفعال للبيتالاكتميز والبروتينات المرتبطة بالنبسلين (PBPs) وعلى وفق هذا فان من الممكن ان تكون البكتريا قد طورت انزيمات (PBPs) لمصلحتها وانشات البيتالاكتميز لحماية خلاياها [7,6].

تهدف الدراسة الحالية الى تنقية و توصيف البيتالاكتميز المنتج من العزلة المحلية *K pneumoniae* والمعزولة من اشخاص مصابين بالتهاب المجاري التنفسية .

المواد وطرائق العمل

تم انتاج البيتالاكتميز من العزلة المحلية من بكتريا *K pneumoniae* المعزولة من اشخاص مصابين بالتهاب المجاري التنفسية ، نميت العزلة على وسط المرق المغذي الحاوي على مضاد الامبسلين بتركيز 100 مايكروغرام / مليليتر ،ثم لقحت في دوارق حاوية على وسط مرق لوريا بروتوني L.B. broth وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة . جرت عملية نبذ مركزي الدوارق للوسط بسرعة 5000دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق . اهمل الراشح واخذ الراسب (الخلايا) وعلق بمحلول دارئ الفوسفات ،وأستخدم المازج لتعليق الخلايا واعدادها لعملية التكسير بجهاز الامواج فوق الصوتية لتحطيم الخلايا لمدة خمس دقائق على شكل أوقات متقطعة ، ثم نبذ عالق الخلايا المتكسره بجهاز المنبذه المبرد بدرجة حرارة 4 ° م بسرعة 1000xg[8].

قياس فعالية البيتالاكتميز :

اتبعت الطريقة الموصوفة من [9] المحورة عن طريقة [10] وذلك باضافة 1 مليليلر من محلول اليود – النشأ الى 0.025 مليليتر من محلول النبسلين –جي و 1 مليليتر من دارئ الفوسفات و 0.2 مليليتر من محلول النشأ مع 0.1 مليليتر من الانزيم الخام ثم قيست الامتصاصية الاولية على طول موجي 620 نانوميتر ثم حضنت الانابيب بدرجة 37 ° م لمدة 5 دقائق ثم قيست الامتصاصية النهائية. وتعرف وحدة الفعالية الانزيمية بانها كمية الانزيم اللازمة لتحليل 1 مايكرومول من مادة الاساس في الدقيقة تحت ظروف القياس .

تركيز البروتين :

استخدمت الطريقة الموصوفة من Bardford [11] في تقدير تركيز البروتين في المحلول الانزيمي .

تنقية الانزيم :

الخطوة الاولى : الترسيب بكبريتات الامونيوم

اضيف وزن معين من بلورات كبريتات الامونيوم الى المستخلص الانزيمي الخام للحصول على نسبة اشباع 20–40% باستخدام دارئ الفوسفات بتركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7 في اذابة الراسب ، ثم عملية الديلزة حيال المحلول نفسه وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في الانموذج .

الخطوة الثانية : كروموتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل (ثنائي أثيل امينواثيل – سليلوز DEAE-Cellulose)

حضر المبادل DEAE -Cellulose على وفق الطريقة الموصوفة من قبل [12] ، أضيف المحلول البروتيني المركزالناتج من خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم (10) مليلتر بعد ديلزته الى عمود المبادل بابعاد (1.5 X 15) سم الذي سبقت موازنته بدارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7 . أستردت البروتينات المرتبطة بالعمود

باستخدام دارئ الفوسفات مع متدرج ملح كلوريد الصوديوم من 0–1.5 مولار وجمعت الاجزاء بواقع 5 مليليتر / جزء وتمت متابعة تركيز البروتين وفعالية الانزيم في الاجزاء المنفصلة.

الخطوة الثالثة : كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي Sephacryl S-200

تم اضافة الجزء الفعال المركز من الخطوة السابقة الى عمود الترشيح الهلامي السيفاكريل اس–200 المحضر بحسب لتعليمات الشركة المجهزة (Pharmacia Fine Chemicals) بابعاد (1.5 x 85) سم، بسرعة جريان 1 مليليتر / دقيقة و استرد الانزيم بوساطة دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7 ، قيست الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في الاجزاء المنفصلة .

الصفات الكيموحيوية للانزيم :

*** تعيين الوزن الجزيئي**

اتبعت طريقة الترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S-200 في تقدير الوزن الجزيئي لانزيم البيتالاكتميز باستعمال بروتينات قياسية ومن خلال رسم العلاقة بين لوغارتيم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية وحجم الاسترداد لكل بروتين قياسي الى حجم استرداد الدكستران الازرق (V_e / V_o) تم استخراج الوزن الجزيئي للانزيم .

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية :

مزجت حجوم متساوية من المحاليل الدارئة وبارقام هيدروجينية تتراوح بين (4 و 5 و6 و7 و 8 و 9) مع مادة التفاعل ووضعت الانابيب بحمام مائي بدرجة حرارة 30 م لمدة 10 دقائق ثم اضيف محلول الانزيم وحضن لمدة 5 دقائق وقدرت الفعالية الانزيمية .

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم :

تم تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل بعد تثبيت الظروف كافة من تركيز الانزيم ودرجة الحرارة وتركيز مادة التفاعل وذلك باضافة 25 مايكروليتر من الانزيم المنقى الى محاليل دارئة وبرقم هيدروجيني بين (4 و 4.5 و5 و5.5 و 6و6.5 و 7 و 7.5 و 8 و 8.5 و 9) وحضنت بدرجة 37 ° م لمدة 5 دقائق وقيست الفعالية الانزيمية .

تاثير درجة الحرارة في فعالية الانزيم :

حضن محلول مادة التفاعل مع 25 مايكروليتر من الانزيم المنقى لمدة نصف ساعة عند درجات حرارية مختلفة (20 و25 و30 و 37 و40 و45 و50 و55 و60) ° م وقيست الفعالية الانزيمية وحددت العلاقة بين درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم مع الفعالية الانزيمية المتبقية (%) .

تاثير الثبات الخزني في فعالية البيتالاكتميز :

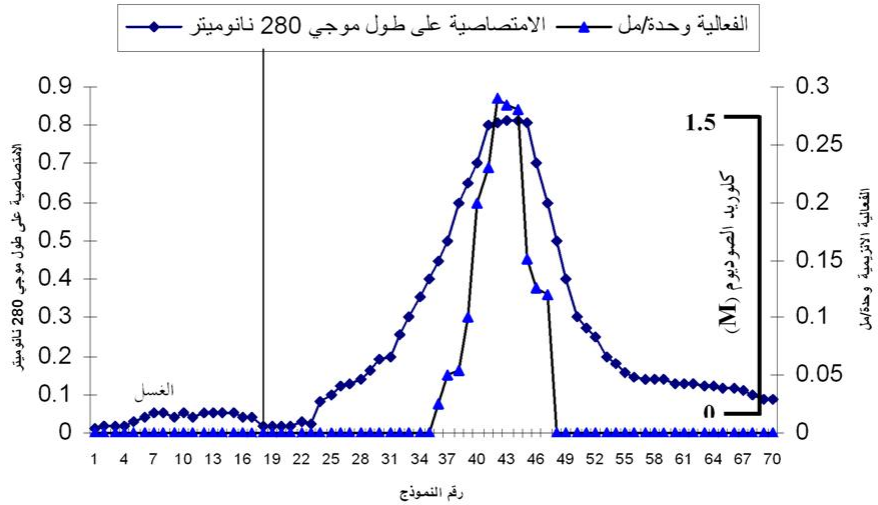
خزن الانزيم المنقى بدرجة حرارة الثلاجة (4) ° م درجة حرارة المجمدة (–20) ° م .وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية كل اسبوع لمدة شهر ونصف.

النتائج والمناقشة

تم تنقية البيتالاكتميز من بكتريا *K . pneumoniae* بثلاث خطوات (جدول 1) بأستخدام كبريتات الامونيوم لترسيب الانزيم من المستخلص الخام وبنسبة اشباع 20–40% أذ اعطت اعلى فعالية نوعية بلغت 0.804 وحدة / مليغرام بروتين وبعدد مرات تنقية 1.105 مرة وحصيلة انزيمية 75.24 % ، وكانت هذه النتائج متفقة مع ما توصل اليه Dale and Smith [8] من ان فعالية البيتالاكتميز المستخلص من البكتريا

K pneumoniae لم تتاثر وصولا الى 25% أشباع حيث بلغت الحصيلة الانزيمية72.5%.

مرر البروتين المركز من خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم إلى عمود المبادل الايوني DEAE cellulose ، وقد بينت نتائج كروموتوغرافي التبادل الايوني شكل (1) ظهور قمة واحدة للبروتين واسعة في خطوة الغسل وانفصلت قمة بروتينية واسعة ومتداخلة عند استرداد البروتينات المرتبطة باستخدام محلول كلوريد الصوديوم (1) مولار مع ظهور الفعالية الانزيمية عند الاجزاء المستردة (42–48) مما يدل على ان البيتالاكتميز المنتج من العزلة المحلية يحمل شحنة سالبة معاكسة لشحنة المبادل الايوني. جمعت الاجزاء التي تمتلك

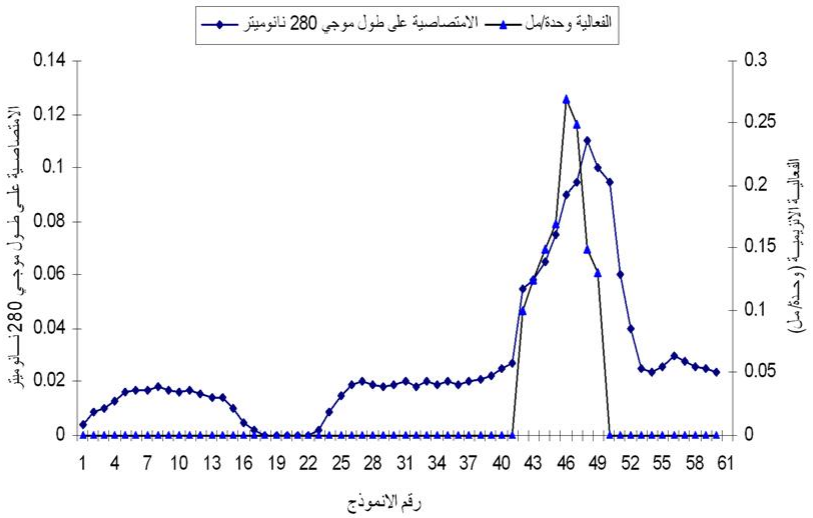


الشكل (1) : كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية البيتالاكتميز المستخلص من العزلة المحليةK *pneumoniae* باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-cellulose (2.5×15) سم الذي تمت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7 ، ثم الاسترداد بمحلول الدارئ نفسه مع متدرج ملح كلوريد الصوديوم من 0–1.5 مولار وبسرعة جريان30مليلتر/ساعة (حجم الجزء المسترد :5 مليلتر)

فعالية انزيمية وركزت وبلغت الفعالية النوعية 11.07 وحدة / مليغرام بروتين وبعدد مرات تنقية 15.23 مرة بحصيلة انزيمية مقدارها 49.50% (جدول 1) . استخدم [5] المبادل الايوني QAE Zetaprep 250 في عملية تنقية انزيم البيتالاكتميزالمعزول من بكتريا (*Clostridium butyricum*) اذ بلغ عدد مرات التنقية 19.4 مرة وباسترداد انزيمي 88.6% عند التدرج الملحي الخطي بوساطة كلوريد الصوديوم عند التركيز 0.3مولار ، واستخدم الباحث [5] تركيز الملح نفسه واسترد الانزيم المعزول من بكتريا *Acinobacter calcoaeticas* وبلغ عدد مرات التنقية 78 مرة .

استكملت عملية تنقية البيتالاكتميز باضافة خطوة الترشيح الهلامي وباستخدام عمود السيفاكريل (S-200) مرر المحلول الناتج من الخطوة السابقة بعد تركيزه في عمود الترشيح الهلامي ولوحظ وجود قمة للبروتين عند قياسها على طول موجي 280 نانوميتر تمتلك فعالية انزيمية تركزت في الاجزاء (42-49) الشكل (

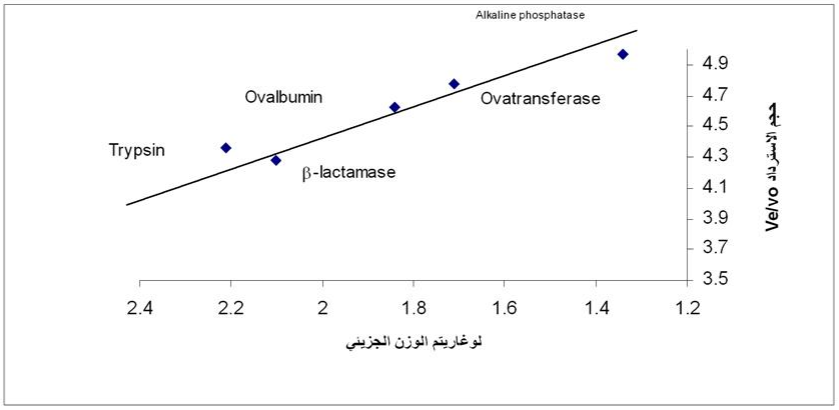
2) التي تم جمعها وتركيزها وكانت الفعالية النوعية لها 23.75 وحدة /مليغرام بروتين بعدد مرات تنقية 32.66 مرة وحصيلة انزيمية 47.04% ، أستخدم [5] كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي في تنقية البنسلينيز من بكتريا *E.coli* بعدد مرات تنقية 1.44 وباسترداد انزيمي 29% ، كذلك فان [6] استخدم هلام السيفاكريل (S-200) في تنقية البيتالاكتميز المستخلص من *Cl. butyricum* بعدد مرات تنقية 121 مرة باسترداد انزيمي مقداره 68.5%.



الشكل (2) :الترشيح الهلامي لتنقية البيتالاكتميز المستخلص من العزلة المحلية*K pneumoniae* باستعمال عمود هلام (Sephacryl S-200) (1.5×85) سم الذي تمت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7 ، وبسرعة جريان30مليلتر/ساعة (حجم الجزء المسترد :5 مليلتر)

جدول (1) مراحل تنقية البيتالاكتميز من العزلة المحلية *K pneumoniae*

مراحل التنقية	الحجم مليلتر	الفعالية الانزيمية وحدة /مليلتر	تركيز البروتين مليغرام/مليلتر	الفعالية النوعية وحدة / مليغرام	الفعالية الكلية وحدة	عدد مرات التنقية	الاسترداد %
المستخلص الخام	**20**	**0.30**	**0.42**	**0.73**	**6.06**	**1.000**	**100.00**
الترسيب بكبريتات الامونيوم 25%اشباع	**20**	**0.23**	**0.28**	**0.81**	**4.56**	**1.11**	**75.24**
التبادل الايوني بأستخدام المبادل الايوني السالب DEAE cellulose	**10**	**0.30**	**0.03**	**11.07**	**3.0**	**15.23**	**49.50**
الترشيح الهلامي باستخدام عمودSephacryl S-200	**10**	**0.28**	**0.01**	**23.75**	**2.85**	**32.67**	**47.04**



الشكل (3) :المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي للبيتالاكتميزالمنقى من العزلة المحلية *K. pnemoniae* بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود هلام السيفاكريل Sephacryl S-200.

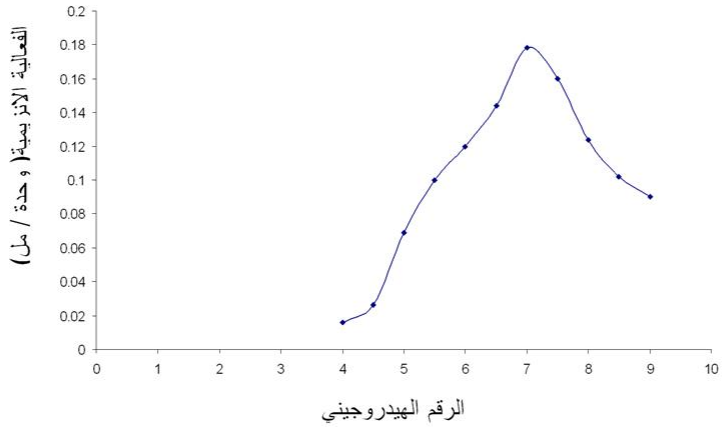
تعيين الوزن الجزيئي :

اتبعت طريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفاكريل S-200 في تقدير الوزن الجزيئي (الشكل 3) المنحنى القياسي للوغاريتم الوزن الجزيئي مقابل حجم الاسترداد / حجم الفراغ للبروتينات القياسية (Ve/Vo). من هذه العلاقة قدر الوزن الجزيئي للانزيم بـ 40000 دالتون ، بينما وجد Ogawara ومجموعة من الباحثيين [14] ان الوزن الجزيئي للبيتالاكتميزالمعزول من بكتريا *Streptomyces cacaol* بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة (34000 دالتون) ، واظهرت نتائج الدراسة التي اجراها Al-Taai [15] ان الوزن الجزيئي للبنسلينيز المنقى من العزلتين 20TF,4TF *Proteus mirabilis* بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sepharose 4B كان مساوياً لـ (35500 دالتون).

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية :

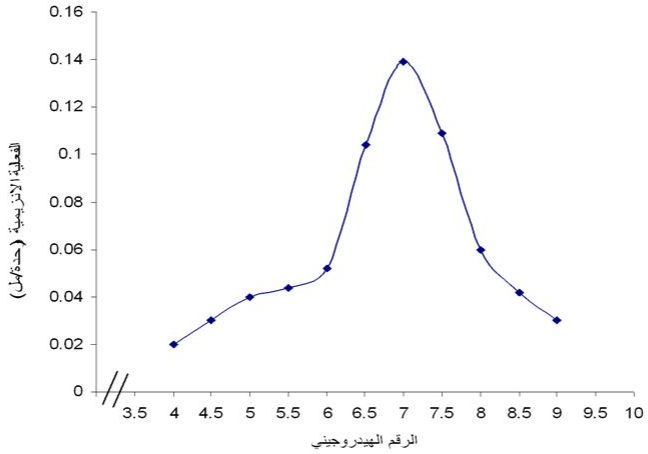
تمت دراسة تاثير الرقم الهيدروجيني على فعالية البيتاالاكتميزالمنقى عند قيم ارقام هيدروجينية تراوحت بين(4-9) فوجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم هو(7) اذ اعطى فعالية أنزيمية بلغت 0.178وحدة/ مللتر الشكل(4) .

ولوحظ ايضا حدوث انخفاض في الفعالية عند القيم القاعدية والحامضية وهذه النتيجة تتوافق مع ما اشارت أليه البحوث من ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البيتالاكتميز المنتج من سلالة *K. pneumonia* يتراوح بين (6.5-7.5) [16] . يؤثر الرقم الهيدروجيني في الحالة الايونية للانزيم من خلال اذابة المواد الغذائية في الوسط ومن خلال تاثيره في سلاسل الاحماض الامينية الجانبية التي تكون ضرورية للمحافظة على التركيب الثلاثي للانزيم [17] .



الشكل(4): تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البيتاالاكتميز المنقى من العزلة المحلية *K. pneumonia*

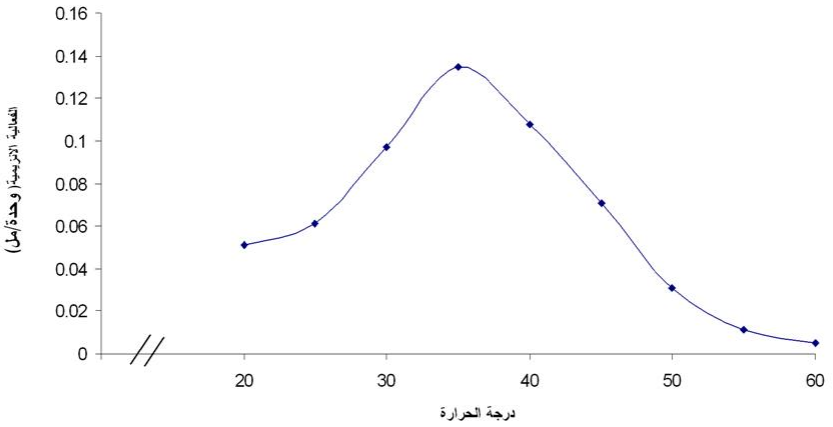
تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم :- يوثر الرقم الهيدروجيني على ثبات الانزيمات المنتجة فقد بينت نتائج هذه الدراسة أن البيتاالاكتميزالمنقى من العزلة المحلية *K. pneumonia* يمتلك ثباتا تجاه الرقم الهيدروجيني عند القيم (7.5-6.5) اذ احتفظ الانزيم 82% من فعاليته الانزيمية عندالقيمة(6.5) و75.% من الفعالية الانزيمية عند القيمة (7.5) الا انه فقد بحدود 83% عند الرقم الهيدروجيني (4) بينما احتفظ بـ 26% من الفعالية عند الرقم(9) (شكل 5) ويمكن إن يعزى سبب انخفاض فعالية البيتاالاكتميزفي الارقام الهيدروجينية الحامضية القليلة إلى تاثير حموضة الوسط في تركيب بروتين الانزيم وتاين المجاميع الموجودة في الموقع الفعال [17].



شكل (5) : تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات البيتاالاكتميز المنقى من العزلة المحلية *K. pneumonia*

تأثير درجة الحرارة على فعالية الانزيم

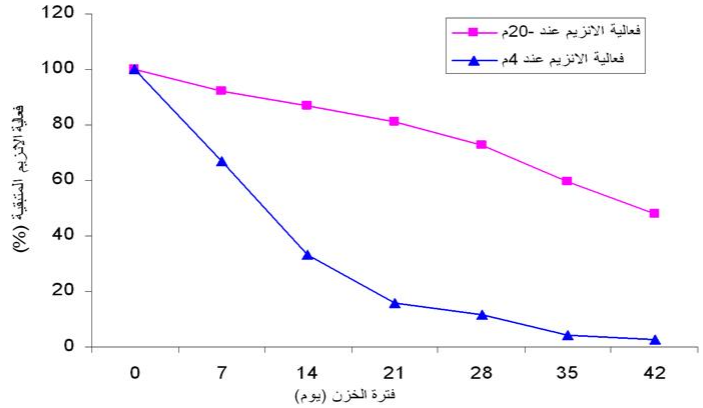
تمت دراسة تأثير درجة الحرارة في فعالية البيتالاكتميز المنقى من العزلة *k.pemomina* باستعمال درجات حرارة مختلفة تراوحت بين (20 و 30 و40 و 50 و 60) م وقد اظهرت النتائج المبينة في الشكل (6) ازدياد فعالية الانزيم مع زيادة درجة الحرارة حتى بلغت اقصاها عند 35 ° م إذ كانت 0.138 وحدة /مليلتر ، ثم انخفضت تدريجياً حتى وصلت الفعالية الانزيمية الى 0.005 وحدة /مليلتر بدرجة حرارة 60 ° م .



شكل (6) : تأثير درجات الحرارة على فعالية البيتالاكتميزالمنقى من العزلة المحلية *K. pneumonia*

تأثير الثبات الخزني في فعالية البيتالاكتميز :

نظراً لتأثر معظم الانزيمات عند خزنها بدرجات حرارة مختلفة وخصوصا المنقاة منها ، فقد تمت دراسة الثبات الخزني للبيتالاكتميز المنقى من العزلة المحلية *K pneumoniae* عند درجتي حرارة (4 ° م)و(−20 ° م)وقد اظهرت النتائج المبينة في الشكل (7) ان الانزيم قد احتفظ بـ (72%) من فعاليته عند خزنه بدرجة حرارة(−20 ° م) ولمدة 28 يوماً مقارنةً بـ20% عند خزنه بدرجة حرارة (4 ° م) وللمدة نفسها في حين فقد فعاليته بعد مرور 42 يوما عند درجة حرارة(4 ° م) واحتفظ بـ50% عند خزنه بدرجة حرارة (−20 ° م) وللمدة نفسها . ومن النتائج السابقة نستنتج ان خزن الانزيم بدرجة حرارة (− 20 ° م) تعد افضل طرائق الخزن ، علماً بأن عملية التجميد والاذابة المتكررة قد تسبب تغيرا في تركيب الانزيم [17] .



شكل (7) : تأثير مدة الخزن على فعالية البيتالاكتميز المعزول والمنقى من بكتريا*K. pneumonia* عند درجتي حرارة (−20) ° م و(4) ° م

المصادر

1. **Frere**,J.M. 1995. β–Lactamases and bacterial resistance to antibiotics. Mol. Microbiol. 16 : 385-395.
2. **Neu**,H.C.1985 .Contribution of Beta-Lactamases to bacterial resistance and mechanism to inhibit Beta – Lactamases , The American Journal of Medicine 79(suppl 58):2-11.
3. **Koch,** A.L. 2000. Pencillin binding proteins β -Lactamase and Lactamases : offensive, Attacks and Detersive counter measures, Microbiol., 26(4):205-220.
4. **Spratt**, B. G. 1983. Penicillin-binding proteins and the future of β - lactamase antibiotics – J. of General Microbiology. 129: 1247-1260.
5. **Mathew,** M.;Harris, A.M.; Marshall, M. and Wross, G.W. 1975. The use of Analytical isoelectric focusing for detection and identification of β lactamases.J.Gen. Microb. 88:169-178.
6. **Kesado**, T. : Lindovist, L. ; Hedbergo, M. ; tuner, K. and Nord, C.E. 1989. Purification and characterization of new β - lactamase from *Clostridium butyricum.* Antimicrob . Agents and chemother. 33(8) : 1302-1307.
7. **Badarau,** A; Damblon, C. and Page, M.I. 2007. The activity of the dinuclear cobalt- β-lactamase from *Bacillus cereus* in catalyzing the hydrolysis of β -lactams. Biochem. J. 401. 197-203.
8. **Dale** , J. W . and Smith , J. T . 1971 . The purification and proprieties of β - lactamases specified by the resistance factor R- 1818 in *E. coil* and *Proteus mirabilis* . Biochem . J . 123:493-500 .
9. **Bhat** , K .; Hegde , B. K. and Shivananda , P.G.1994 , Effect of trace metals on production of exoprotein and β - lactmases by *Staphyllococcus aureus* . Indian J. experimental Biology .32(7):492-494.

10. **Novick,** R. P. 1962. Micro iodometeric assay for penicillinase . Biochemical J. 83: 236-239.
11. **Bradford** , M.M. 1976 .A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizating the principle of protein –dye binding . Analyt .Biochem . 72:248-255.
12. **Whitaker,** J. R. 1972. Principles of Enymology for the Food Science. (ed. Oen, R. F.) Marcel Dekker INC. ; New York .
13. **Bomeleit**, P.; Blechschmidt, B.and Kleber, H.P. 1992. Purification and character zation of an extracellular (ß-Lactamase produced by *Acintobacter calceticus*. J. of General Microbio.138: 1197—1202
14. **Ogawara** , H. , Kuma, K. and Mryata, T. 1993. Gene transfer of apart of ß- lactamase Gene. Microbiol. Immunol. 37 (5) : 399 - 403 .
15. **Al-Taai,** H. R. R. 2005. Bacteriological, Biochemical and molecular study of Proteus mirabilis isolated from urinary tract infections in some hospitals of Baghdad city. M Sc. Thesis. Al-Mustansiriya University.
16. **Inoue**, M. ; Maejima, T. ; Sanais, S. ; Okamoto, R. and Hashimoto, S. 1991 Purification and Properties of a chromosomal ß-Lactamase from *K. oxytota* . J. antibiot (Tokyo) ,April ,44 ;4: 435-440.
17. **Segel**, I.H. 1975 *Biochemical Calculation* 2nd edition Wiley Publication , p. 278.

Purification and Characterization β - lactamase produce from local isolate *Klebsiella pneumonia*

*Essam F. Al-Jumaily** *Zuher A. S. Al-Taeei**
*Munatha A. Al-Safar***

* Biotechnology Dept. Genetic Engineering and Biotechnology Institute for post graduate studies University of Baghdad.
** Institute of Technical Medicine / Baghdad

Abstract

Beta-lactamase was purified from local isola**te** ***K****lebsiella pneumonia* by several steps included precipitation with ammonium sulphate at 20-40% saturation, DEAE- ion exchange chromatography and gel filtration on Sephacryl S-200 column. The obtained purification fold and recovery were 32.66; 47.04% respectively.

The characterization of the purified beta-lactamase showed that the molecular weight was about 4000 daltons as determined by gel filtration.

Purified enzyme had an optimal pH of 7 for activity and an optimal stability between pH 6.5-7.5, results shows that the optimal temperature appear to be 35˚ C .

During storage the enzyme retained 72% at -20˚ C and retained 25% of the activity at the same period at 4 ˚ C.

Key Words: β-Lactamaiz, characterization Enzyme, get filtration, storage activity.