مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 27 (2)،56- 71 ،2014

استخلاص وتنقية انزيم الكولاجينيز من مخلفات امعاء بعض الاسماك

ام البشر حميد جابر الموسوي و وسن كاظم عبد الرزاق

قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة، العراق

المستخلص: استعملت مخلفات امعاء خمسة انواع من الاسماك البحرية والنهرية شملت الكارب كبير الراس *Aristichthys nobilis* والكارب *Hypophthalmichthys molitrix* و الصبور *Tenualosa ilisha* والبياح *Liza carinata* والضلعة *Scomberoides commersonianus* باستعمال اربعة محاليل تضمنت الماء المقطر و محلول كلوريد الصوديوم بتراكيز 2 و 5 و 7 % ومحلول دارئ Tris – HCL بتركيز 0.05 مولاري وبدوال حامضية 7 و 7.5 و 8.5 ومحلول دارئ الفوسفات الصوديوم بتركيز 0.05 مولاري وبدوال حامضية 5 و 6.5 و 7 لغرض تحديد افضل نوع من الاسماك وافضل محلول استخلاص وقد وجد ان اسماك الكارب كبير الراس كانت افضل مقارنة بالاسماك الاخرى وان محلول دارئ فوسفات الصوديوم وبتركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 6.5 هو افضل محلول استخلاص اذ اعطى اعلى فعالية للانزيم والتي بلغت 220.45 وحدة / ملغم بروتين . اضيفت كبريتات الامونيوم للمستخلص الانزيمي بنسبة تشبع 20 – 80 % كخطوة اولى من خطوات التنقية ، اذ بلغت الفعالية الانزيمية والنوعية 718.67 وحدة / مل و 659.33 وحدة / ملغم بروتين على التوالي وبحصيلة انزيمية بلغت 22.56 % وبعدد مرات تنقية مقدارها 4.44 مرة ، بعدها مرر المستخلص الانزيمي المركز على عمود كروموتوكرافيا التبادل الايوني DEAE – Sephadex A-50 ، واسفرت عملية التبادل الايوني عن ظهور صورتين للانزيم W و C ، اذ بلغت الفعالية النوعية لكلا الصورتين 140.22 و 359.40 وحدة / ملغم بروتين وبحصيلة انزيمية 10.56 و 36.56 % وعدد مرات تنقية 1.57 و 4.75 مرة على التوالي ، خضعت الصورتان W و C لخطوة تنقية اضافية تمثلت بخطوة الترشيح الهلامي باستعمال عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 فبلغت الفعالية النوعية لكلا الصورتين W و C 139.19 و 350.21 وحدة / ملغم بروتين وبحصيلة انزيمية 5.77 و 22.43 % وبعدد تنقية 4.26 و 19.68 مرة على التوالي ، بينت نتائج تحديد نقاوة صورتي الانزيم المذكورتين بظهور حزمة بروتينية واحدة لكل منهما عند استعمال الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بغياب العوامل الماسخة .

المقدمة تعرف الانزيمات على انها عوامل مساعدة بايولوجية ذات طبيعة بروتينية في داخل الكائن الحي اذ تعمل على تسريع التفاعلات الكيموحيوية

وتخفض من طاقة التنشيط اللازمة للحصول على نواتج التفاعل دون ان تتغير ، يمارس الانزيم تاثيره من خلال اتحاده مع المادة المتفاعلة مكون معقدا مع المادة الخاضعة Substrate ثم الحصول على نواتج التفاعل بعد انفصال الانزيم ، يتميز كل انزيم بدرجة معينة من التخصص للمادة الخاضعة التي يعمل عليها فبعض الانزيمات ذات تخصصية شاملة وانزيمات تخصصية لنوع معين من التفاعلات وهنالك انزيمات ذات تخصص مطلق (1 ; 8) . تعد البروتيزات واحدة من اهم الانزيمات المستعملة في مجال الاغذية باختلاف مصادرها (2) اذ يعد انزيم الكولاجينيز Collagenase enzyme واحدا من البروتيزات ذات التخصصية المطلقة ، استعمل هذا الانزيم في مجال الاغذية والصحة وعزل هذا الانزيم من مصادر حيوانية (فقرية ولافقرية) وميكروبية اذ تعد بكتريا *Clostridium histolyticum* اول مصدر لعزل هذا الانزيم (5 ; 15). يتواجد الكولاجينيز بهيئتين السيرينية Serine Collagenase لوجود الحامض الاميني السيرين في الموقع الفعال أما الهيئة الثانية فهو الكولاجينيز المعدني Metal Collagenase اذ يعد من البروتيزات المعدنية التي تحتاج الى عنصر الزنك كعامل مساعد في التفاعلات ويفقد الانزيم فعاليته عند مسكه من قبل العوامل الكلابية . تعتمد طريقة استخلاص الانزيم على طبيعة المادة الاولية التي تستعمل كمصدر للانزيم وهي اما انسجة حيوانية او كائنات مجهرية لذا فان الطرق المستعملة في الاستخلاص يجب ان تصمم بحيث يتم تحطيم اغلب الخلايا لغرض تحرير كل مكوناتها وبذلك تكون عملية الاستخلاص سهلة (13). تم استخلاص انزيم الكولاجينيز من قبل Kim واخرون(11) و Lee واخرون(13) من سمك التونة (*Katsuwonus pelamis*) باستعمال دارئ Tris – HCL وبتركيز 0.02 مولاري وبدالة حامضية 7.5 وحصلوا على فعالية نوعية 12.772 وحدة / ملغم بروتين. أما Murado *et al*. (17) فقد تمكنوا من استخلاص انزيم الكولاجينيز من مخلفات سمك Ray Fish (*Raja clavata*) وحصلوا على فعالية انزيمية 2590 وحدة / مل. اجريت عدة خطوات لتنقية الانزيم من قبل Park *et al*. (18) منها الترسيب بالاسيتون البارد ثم التجزئة باستعمال المبادل الايوني DEAE – Sephadex A50 تلتها خطوة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G75 وقد حصلوا على فعالية نوعية للانزيم 652.1 وحدة / ملغم بروتين وبحصيلة انزيمية 0.1% وعدد مرات تنقية 39.5 مرة .

لذا هدفت هذه الدراسة الى :-

المواد و طرائق العمل

الاسماك

تم الحصول على الأسماك البحرية الصبور *Tenualosa ilisha* و أسماك الضلعة *Scomberoides commersonianus* واسماك البياح *Liza carinata* من قضاء الفاو في محافظة البصرة، أما الأسماك النهرية الكارب الفضي *Hypophthalmichthys molitrix* والكارب الفضي كبير الرأس *Aristichthys nobilis* فقد تم الحصول عليها من مربي الأسماك في محافظة البصرة. حفظت الأسماك في صندوق حاوي على مجروش الثلج Ice Box حتى وصولها إلى المختبر، تم فتح الاسماك ونزع احشائها الداخلية ثم عزلت الأمعاء الدقيقة لأجراء عملية الاستخلاص.

استخلاص أنزيم الكولاجينيز

استخلص الأنزيم من الامعاء الدقيقة الأسماك المذكورة سابقا باستعمال المحاليل التالية :-

استخلاص انزيم الكولاجينيز من مخلفات انواع مختلفة من الاسماك (البحرية و النهرية) وباستعمال محاليل استخلاص مختلفة ثم تنقيته بطرق التنقية المعروف

1 – الماء المقطر

2-محلول كلوريد الصوديوم NaCl تركيز 2% W/V .( )

3- محلول كلوريد الصوديوم NaCl تركيز 5% W/V .( )

4-محلول كلوريد الصوديوم NaCl تركيز 7% W/V .( )

5-محلول فوسفات الصوديوم الدارئ تركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 6.5.

6-محلول فوسفات الصوديوم الدارئ تركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 7

7-محلول Tris – HCl تركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 8.5

8-محلول Tris – HCl تركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 7.5

9-محلول Tris – HCl تركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 7

طريقة الاستخلاص

اتبعت طريقة Park et al. (18) لأستخلاص أنزيم الكولاجينيز مع اجراء بعض التحويرات عليها، اخذت الامعاء وازيل محتواها من الفضلات والطبقة الدهنية وغسلت بالماء المقطر البارد ، فرمت ومزجت مع محلول الاستخلاص المبرد مسبقا { الذي اعطى اعلى فعالية نوعية للأنزيم ، ونسبة خلط 1 : 2 (وزن / حجم)، جنست بخلاط كهربائي Blander لمدة 2 دقيقة ، وضع المستخلص على المحرك المغناطيسي لمدة 20 ساعة وبدرجة حرارة 4مْ واجري النبذ المركزي للمستخلص 7000 × g بدرجة حرارة 4 مْ / 20 دقيقة، جمع الراشح وأهمل الراسب.

تقدير الفعالية الانزيمية

قدرت الفعالية الانزيمية حسب طريقة Stain و Moore(**16**).

تنقية الانزيم

الترسيب بكبريتات الامونيوم

رسب الانزيم باضافة بلورات كبريتات الامونيوم الصلبة تدريجيا الى المستخلص الانزيمي الخام مع التحريك المستمر على المحرك المغناطيسي لحين الاذابة بدرجة حرارة 4 م لمدة 2 ساعة للوصول لدرجة تشبع (20 – 80) % ، اجريت عملية النبذ المركز ي 15000 × g / 20 دقيقة بدرجة حرارة 4 م ، قدرت الفعالية التحللية حسب الطريقة Moore and Stain (16) بعد كل مرحلة من مراحل الترسيب ، جمعت الرواسب وذوبت في حجم قليل من دارئ فوسفات الصوديوم تركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 6.5 ، اجريت عملية الديلزة ضد الماء المقطر باستعمال اكياس التنافذ الغشائي بدرجة حرارة 4 م لمدة 24 ساعة مع استبدال الماء كل 6 ساعات ، قدر حجم المحلول الناتج والفعالية الانزيمية و تركيز البروتين على التوالي.

كروموتوكرافيا التبادل الايوني

المحاليل المستعملة

1 – محلول 0.1 مولاري هيدروكسيد الصوديوم

2-محلول 0.1 مولاري حامض الهيدروكلوريك

3-محلول دارئ فوسفات الصوديوم تركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 6.5

4-محلول فوسفات الصوديوم الدارئ تركيز 0.05 مولاري بدالة حامضية 6.5 المحتوي على 1.5 مولاري كلوريد الصوديوم NaCl .

5- المبادل الايوني السالب DEAE – Sephadex A – 50

تنشيط المبادل وتحضير العمود

حضر المبادل الايوني (DEAE – Sephadex A- 50) Di ethyl aminoethyl sephadex تبعا لطريقة (21) Stoll and Blanchard و Bradford (7)، بتعليق 20 غم من المبادل في 500 مل من الماء المقطر وترك ليركد ثم سكب السائل العلوي وغسل المبادل عدة مرات بالماء المقطر الى ان اصبح السائل العلوي رائقا ثم رشح عبر قمع بخنر تحت التفريغ بورق ترشيح Whatman No. 1 وعلق في محلول رقم 1 وغسل عدة مرات بالماء المقطر ، علق المبادل بمحلول رقم 2 وغسل بالماء المقطر لعدة مرات ، رشح عبر قمع بخنر تحت التفريغ باستعمال روق ترشيح Whatman No. 1، ثم علق المبادل الايوني مع محلول رقم 3 وغسل مرات عدة بالمحلول نفسه، رشح مرة اخرى وكررت هذه الخطوة حتى الوصول الى الدالة الحامضية المطلوبة ، اجريت بعدها عملية ازالة الهواء Degassing للتخلص من الفقاعات الهوائية، ثم عبأ المبادل الايوني في عمود ابعاده (2.5 × 80) سم على الجدار الداخلي ، اجريت موازنة للعمود بالمحلول الدارئ رقم 3 بما يعادل ثلاثة امثال حجم الهلام في العمود وتضمنت سرعة الجريان بمعدل 30 مل / ساعة .

طريقة العمل

مرر المستخلص الانزيمي المستحصل عليه من الخطوة السابقة على عمود المبادل الايوني واجريت خطوة الغسل Washing بمحلول الموازنة رقم 3 وبسرعة جريان 30 مل / ساعة وبمعدل 3 مل / انبوبة ، قرأت الامتصاصية بطول موجي 280 نانوميتر للاجزاء المفصولة بواسطة جهاز المطياف الضوئي ورسمت العلاقة بين الامتصاصية وعدد الاجزاء المفصولة وتم قياس الفعالية الانزيمية للقمم البروتينية كما تم قياس الفعالية الانزيمية في الاجزاء التابعة للقمة البروتينية التي اظهرت فعالية انزيمية ، رسمت العلاقة بين الفعالية الانزيمية وعدد الاجزاء ، جمعت الاجزاء التي اظهرت فعالية انزيمية وقيس حجمها وقدرت لها الفعالية الانزيمية ونسبة البروتين وسميت هذه القمة البروتينية بالصورة W ركزت وحفظت بالتجميد لحين الاستعمال في خطوة التنقية اللاحقة . اجريت عملية الاسترداد للاجزاء المرتبطة بسطح المبادل باستعمال التدرج الملحي الخطي Linear salt gradient (0 – 1.5) مولاري كلوريد الصوديوم وتمت متابعة الامتصاصية الضوئية للاجزاء المفصولة من العمود خلال عملية الاسترداد عند طول

موجي 280 نانوميتر ، رسم المنحنى لعدد الاجزاء المفصولة ازاء الامتصاصية وقدرت الفعالية الانزيمية للقمة البروتينية في الاجزاء المفصولة جمعت الاجزاء الفعالة وديلزت ضد الماء المقطر وقيس حجمها وفعاليتها فضلا عن تقدير البروتين لأستخراج الفعالية النوعية وسميت القمة الحاوية على الفعالية الانزيمية بالصورة C .

كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي

أ – المواد والمحاليل المستعملة

1 – محلول دارئ 0.05 مولاري فوسفات الصوديوم بدالة حامضية 6.5 .

2 – سيفادكس G100

ب – تحضير الهلام

حضر هلام السيفادكس بتعليق 20 غم من حبيبات السيفادكس في 500 مل ماء مقطر وذلك حسب تعليمات الشركة المجهزة BDH البريطانية ، مزج الخليط بهدوء وبعدها سخن بدرجة حرارة 90 م لمدة 5 ساعات لغرض تشرب وانتفاخ حبيبات السيفادكس ، ترك ليبرد ثم اضيف اليه 0.2% مادة Sodium azide لمنع النمو الميكروبي، ازيل الهواء منه Degassing وتم تعبئة العمود مباشرة وترك ما يقارب 7 ساعات لغرض الرص ليعطي هلام بأبعاد (2.5 × 80) سم واجريت الموازنة للعمود باستعمال المحلول الدارئ رقم 1 بما يعادل 3 امثال حجم الهلام في العمود ونظمت سرعة الجريان بمعدل 30 مل / ساعة.

ج – طريقة العمل

مرر الانزيم المنقى جزئيا والمديلز للصورة W على الجوانب الداخلية للعمود وبالقرب من سطح الهلام ، اجريت عملية الاسترداد بالمحلول الدارئ نفسه وجمعت الاجزاء الناتجة من العمود في انابيب اختبار معدل 3 مل / انبوب وبمعدل جريان 30 مل / ساعة، قرأت الامتصاصية الضوئية لكل جزء من الاجزاء المفصولة عند طول موجي 280 نانوميتر ، قيست فعالية الانزيم في القمم المفصولة وذلك بعد رسم العلاقة بين عدد الاجزاء المفصولة والامتصاصية عند طول موجي 280 نانوميتر، جمعت الاجزاء التي احتوت على الانزيم واجريت لها ديلزة ضد الماء المقطر وحسب الحجم وقدرت الفعالية وتركيز البروتين، ركز الانزيم المنقى. اجريت عملية الترشيح الهلامي لأنزيم الكولاجينيز للصورة C بالأسلوب السابق وصفه في

فصل المحلول الانزيمي الصورة W وركزت القمة الحاوية على الفعالية الانزيمية باستعمال جهاز التجفيد Freeze Dryer.

تحديد نقاوة الانزيم

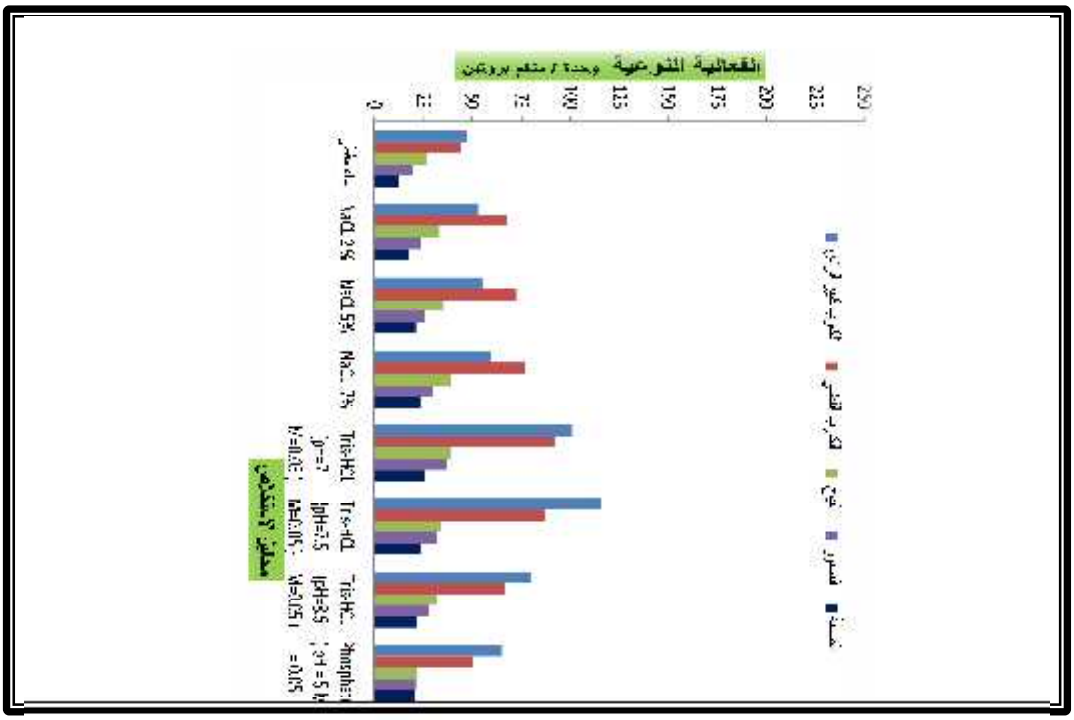
اتبعت تقنية الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بغياب العوامل الماسخة لتحديد نقاوة الانزيم Slab polyacrylamide gel electrophoresis تبعا لطريقة (12) Laemmli والموصوفة من قبل (9) Grafin في اختبار نقاوة الانزيم.

النتائج والمناقشة

استخلاص الانزيم

توضح النتائج في الشكل (1) وجود فعالية نوعية للانزيم في جميع الاسماك المدروسة لكنها متفاوتة حسب نوع السمك والمحلول المستعمل في الاستخلاص فقد كانت الفعالية النوعية للانزيم عند الاستخلاص بالماء المقطر اقل مقارنة مع الفعالية النوعية عند الاستخلاص مع المحاليل الاخرى اذ تراوحت من 22.33 – 50.32 وحدة/ ملغم بروتين وقد يعود سبب ذلك الى عدم امتلاك الماء المقطر قوة ايونية تمكنه من فك ارتباط الانزيم من الانسجة كما انه لا يمتلك سعة بفرية تمكنه من الحفاظ على الدالة الحامضية المناسبة لثبات الانزيم، اما عند الاستخلاص بالمحلول الملحي فقد لوحظ ان الفعالية النوعية للانزيم تزداد تدريجيا بزيادة تركيز الملح اذ تراوحت من 14.12 – 68.30 وحدة / ملغم بروتين للتركيز 2 % و 14.28 – 72.49 وحدة / ملغم بروتين للتركيز 5 % اما التركيز 7 % من كلوريد الصوديوم فبلغت الفعالية النوعية للانزيم 16.44 – 77.29 وحدة / ملغم بروتين ولجميع الاسماك المستعملة في الدراسة وقد يعزى سبب ذلك الى ان التراكيز الملحية الواطئة تؤدي الى زيادة في ذوبان اكبر كمية من البروتينات في الراشح وبالتالي تعطي زيادة في تركيز البروتين مما ادى الى انخفاض قيمة الفعالية النوعية للانزيم (3) وقد كانت قيم الفعالية النوعية للانزيم عند استخلاصه بمحلول دارئ Tris – HCL اعلى في جميع الاسماك المدروسة لكنها اقل من قيم الفعالية النوعية للانزيم المستخلص بمحلول دارئ الفوسفات الذي اعطى اعلى فعالية نوعية عند استعماله في الاستخلاص ولجميع الاسماك اذ كانت اعلى فعالية عند الدالة الحامضية 6.5 فقد تراوحت قيم الفعالية النوعية من 24.12 – 220.45 وحدة / ملغم بروتين، ان وجود هذا

الاختلاف في قيم الفعالية النوعية للانزيم من معاملة الى اخرى قد يعود الى اختلاف ذائبية البروتينات الموجودة في هذه الانسجة باختلاف محاليل الاستخلاص والتي انعكست على تركيز البروتين مما اثر في الفعالية النوعية للانزيم كما ان عملية الاستخلاص اجريت بدرجة حرارة 4 م وهي الدرجة التي يتم فيها استخلاص وتنقية جميع الانزيمات من مصادرها الخام حيث ان الاستخلاص في هذه الدرجة الحرارية يقلل من فقدان الفعالية للانزيم الى اقصى حد وبالتالي المحافظة على الانزيم باعلى فعالية (3). من خلال قيم الفعالية النوعية للانزيم التي تم الحصول عليها عند استخلاصها بمحاليل مختلفة ومن اسماك مختلفة وجد ان محلول دارئ فوسفات الصوديوم بدالة حامضية 6.5 كانت افضل محاليل الاستخلاص وقد كانت اعلى فعالية للانزيم المستخلص من سمك لكارب كبير الرأس *Aristichthys nobilis* اذ وصلت الى 220.45 وحدة / ملغم بروتين لذلك تم اختيار هذا المحلول في الاستخلاص اذ ان اختيار المحلول الدارئ المناسب له اهمية كبيرة في المحافظة على الدوال الحامضية دون التاثير على الانزيم والتداخل مع طريقة تقدير فعالية الانزيم قيد الدراسة (21).



شكل (1) : الفعالية النوعية لأنزيم الكولاجينيز المستخلص من الاسماك البحرية والنهرية باستعمال محاليل مختلفة.

تنقية الانزيم

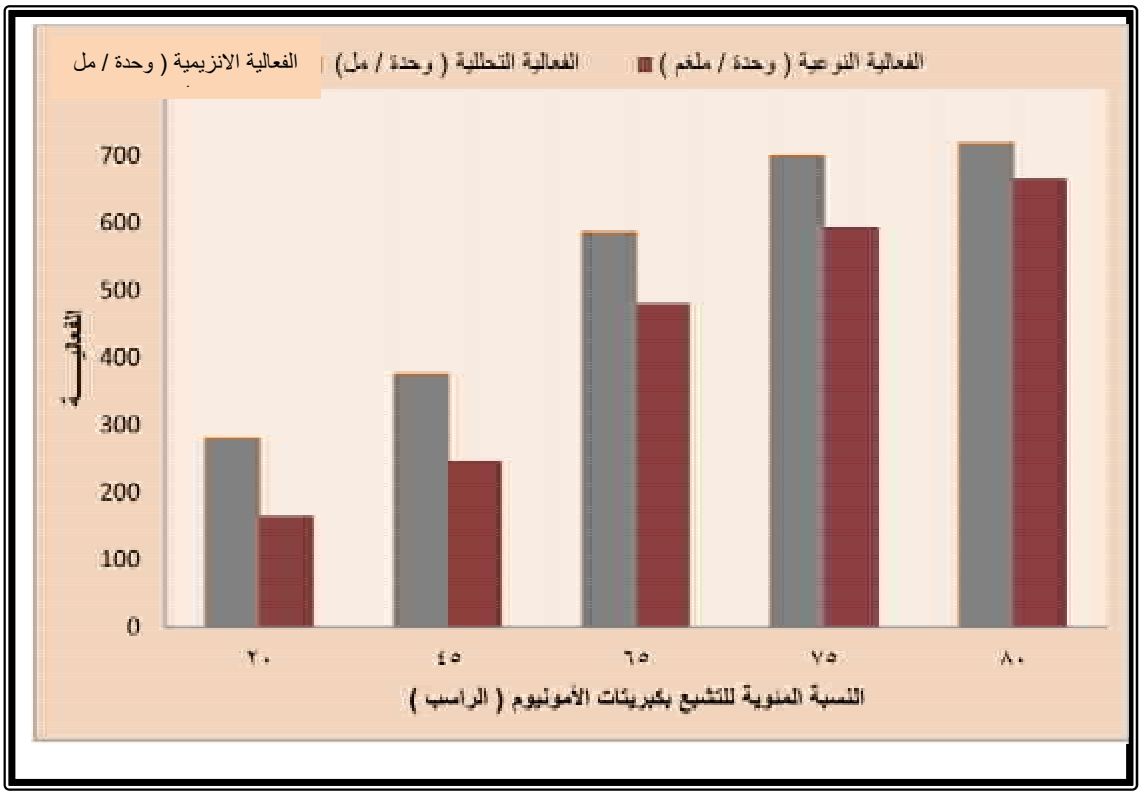
اتبعت عدة خطوات متعاقبة لتنقية الانزيم وذلك للتوصل الى افضل مرحلة في تنقية الانزيم والتخلص من اكبر كمية من المواد البروتينية وغيرها الموجودة في المستخلص الانزيمي بهدف الحصول على انزيم بنقاوة عالية ودراسة بعض صفاته وخواصه المهمة .

تركيز الانزيم باستعمال كبريتات الامونيوم

توضح النتائج في الشكل (2) خطوة الترسيب التدريجي للانزيم باستعمال نسب اشباع متدرجة من كبريتات الامونيوم من 20 – 80 %، اذ لوحظ ان هناك ارتفاع واضح بشكل تدريجي للفعالية الانزيمية والنوعية في الراسب الناتج لغاية نسب اشباع 80 % وقد اعطت هذه الخطوة فعالية انزيمية ونوعية مقدارها 718.67 وحدة / مل و 659.33 وحدة / ملغم بروتين على التوالي وبحصيلة انزيمية بلغت 22.56 % وبعدد مرات تنقية مقدارها 4.44 مرة ، جدول (1). ان ارتفاع الفعالية والحصيلة الانزيمية (%) في هذه الخطوة قد يعزى الى دور املاح كبريتات الامونيوم التنشيطي على فعالية الكولاجينيز، اجريت عملية الترسيب للتخلص من نسبة كبيرة من الماء اذ تعد هذه الخطوة احدى الخطوات المهمة في عمليات التنقية نظرا لما تمتاز به من صفات ايجابية من ناحية تقليص الحجم وزيادة كفاءة التنقية والتخلص من اكبر كمية من البروتينات (14 ; 4) .

كروموتوكرافيا التبادل الايوني

اجريت عملية التبادل الايوني للمستخلص الا نزيمي المتحصل عليه من الخطوة السابقة باستعمال المبادل DEAE- Sephadex A-50 بوجود محلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 6.5 وقد اظهرت النتائج في الشكل (3) ظهور قمة بروتينية واحدة في مرحلة الغسل تركزت في الاجزاء المنفصلة 33-52، فضلا عن ظهور قمتين



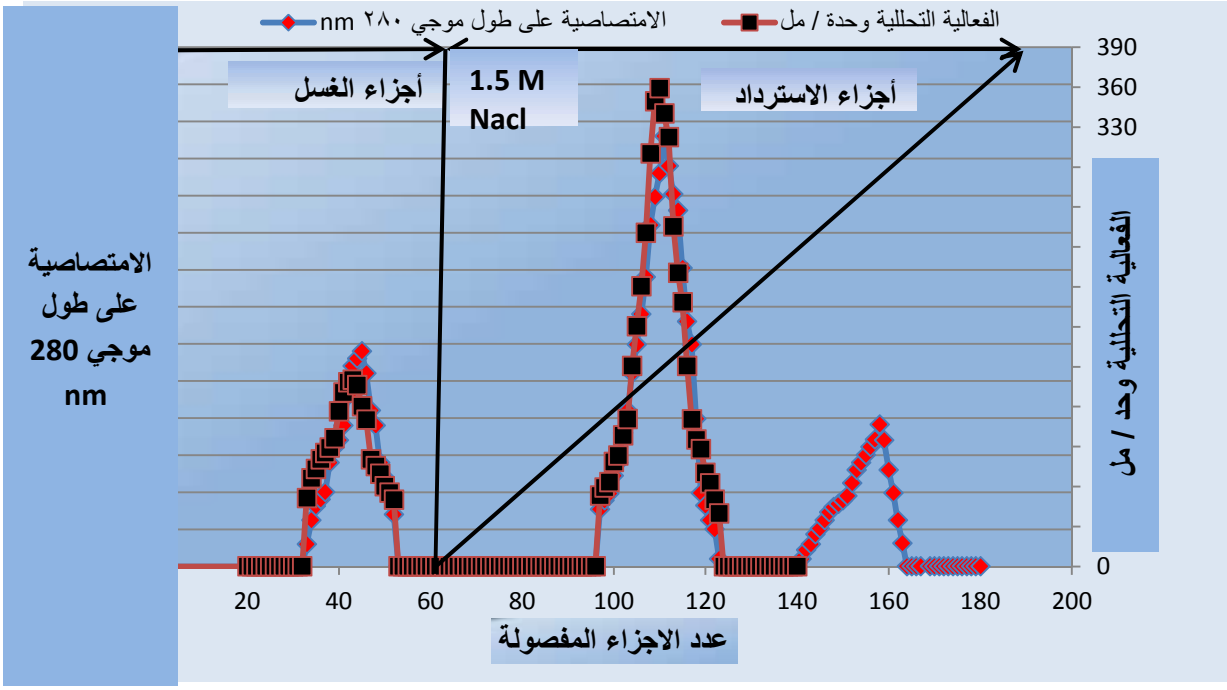
شكل (2): الفعالية الانزيمية للمستخلص الانزيمي المركز بوساطة كبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين 20 – 80 %.

بروتينيتين في مرحلة الاسترداد تمركزت في الاجزاء المنفصلة 97 – 123 و 141 – 163 عند قياس الامتصاصية على طول موجي مقداره 280 نانومتر وبتقدير الفعالية الانزيمية في القمم المذكورة لوحظ وجود فعالية انزيمية لأنزيم الكولاجينيز للقمة البروتينية الواقعة في الاجزاء 33– 52 في مرحلة الغسل اضافة الى القمة البروتينية الواقعة في الاجزاء من 141– 163 في مرحلة الاسترداد الشكل (3). لذا فقد تم تقدير الفعالية الانزيمية في الاجزاء التابعة للقمم الحاوية على فعالية انزيم الكولاجينيز. كما جمعت الانابيب من 33 – 52 الخاصة بالقمة الاولى والانابيب 97 – 123 الخاصة بالقمة الثانية. مزجت الانابيب للقمم كلا على حدا وحسب حجمها وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين لاستخراج الفعالية النوعية كما في الجدول (1).

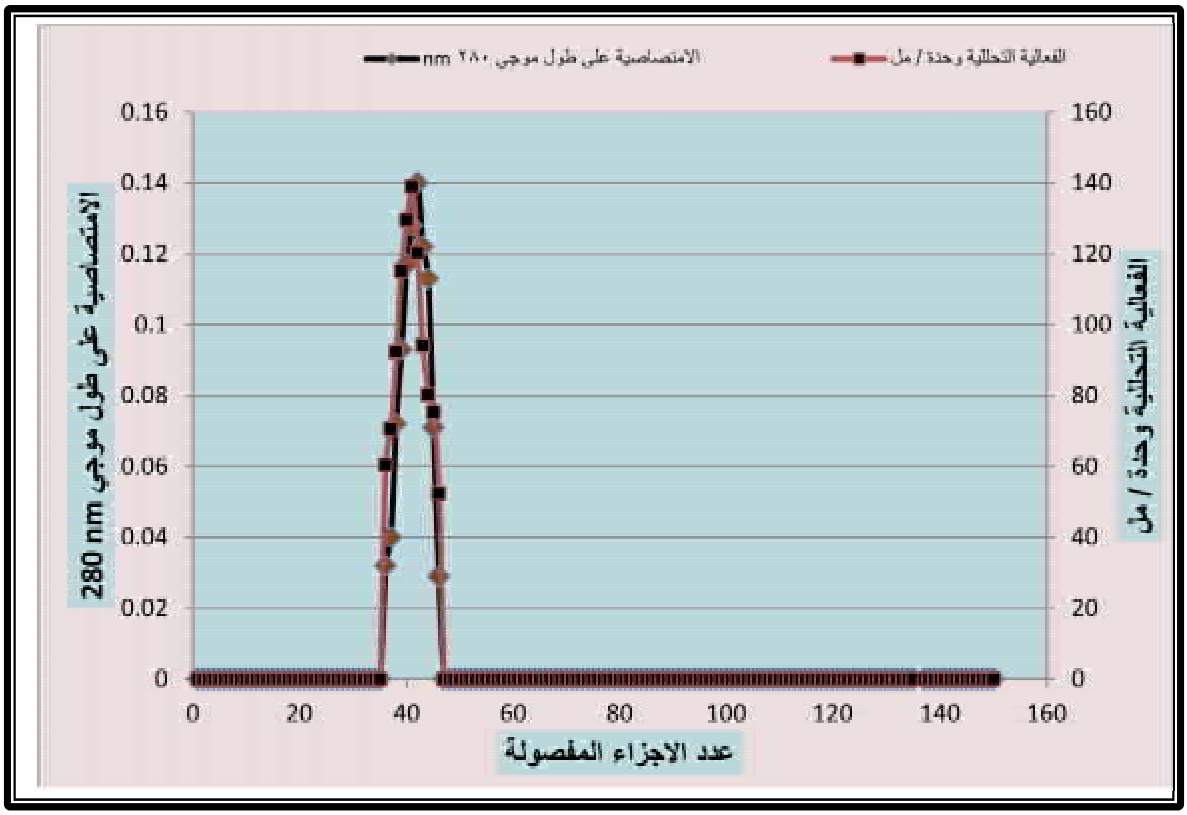
يتضح من النتائج وجود صورتين لأنزيم الكولاجينيز المنتج من سمك الكارب كـبير الــرأس (*Aristichthys nobilis*). اظهر فصل الصورة W (صورة الغسل) لأنزيم الكولاجينيز قيد الدراسة الى الحصول على نقاوة جيدة للأنزيم بعدد مرات تنقية 1.57 مرة وحصيلة انزيمية 10.56 % كما في الجدول (1)، كما لو حظ من الجدول نفسه ان فصل الصورة C (صورة الاسترداد) ادى الى الحصول على نقاوة جيدة للأنزيم بعدد مرات تنقية 4.75 مرة وحصيلة انزيمية مقدارها 36.56 %.

الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G – 100

بينت النتائج في الشكل (4) الترشيح الهلامي لأنزيم الكولاجينيز الصورة W ظهور قمة بروتينية واحدة تركزت الفعالية الانزيمية في نفس القمة ايضا في الاجزاء (36– 46) ويعد هذا التطابق احد ادلة النقاوة للانزيم (22) .



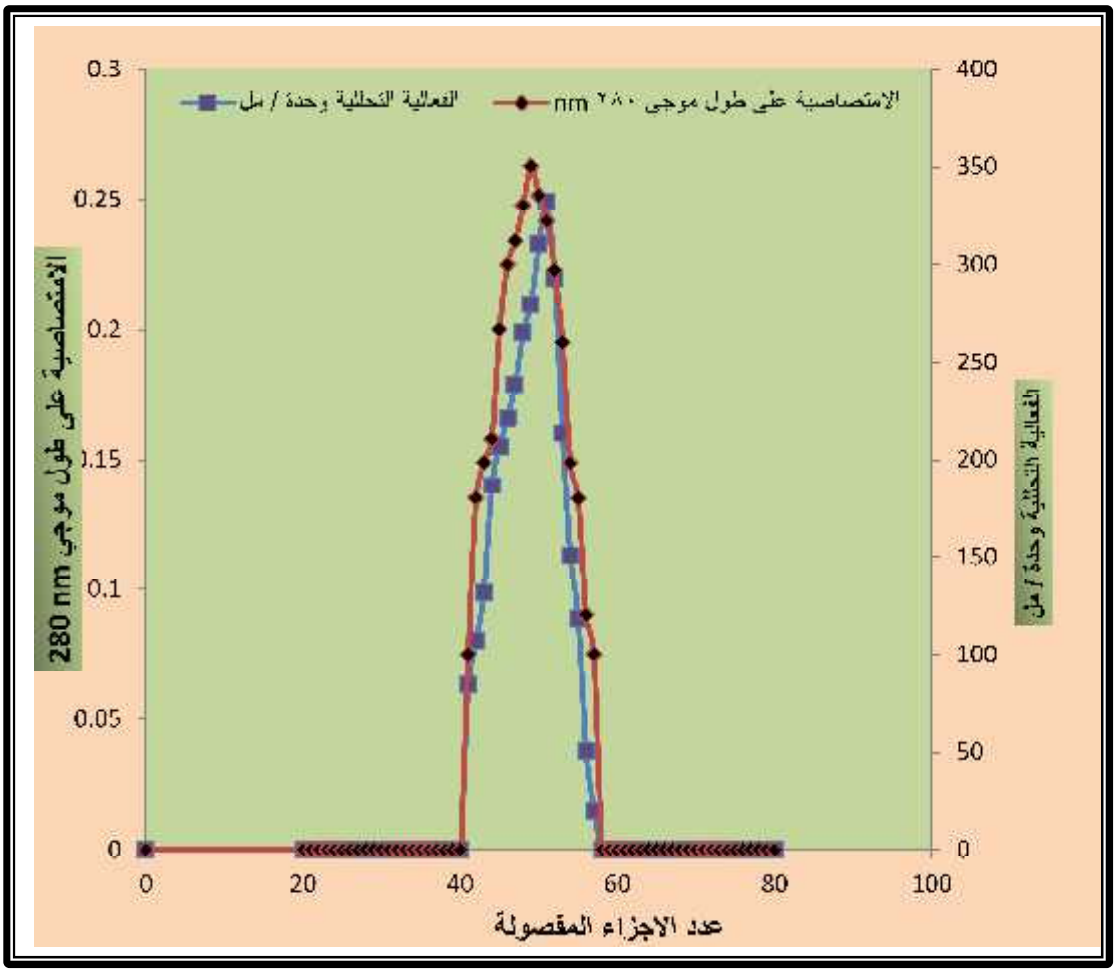
شكل (3): كروموتوكرافيا التبادل الايوني لأنزيم الكولاجينيز المنقى من سمك الكارب كبير الرأس باستعمال المبادل الايوني EDTA Sephadex A– 50 بأبعاد (2 × 80) سم ، والموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولاري وبدالة حامضية 6.5 وبتدرج ملحي (0 – 1.5) مولاري Nacl بمعدل جريان (30 مل / ساعة) بواقع 3مل / جزء.



شكل (4): كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي لأنزيم الكولاجينيز الصورة W المنقى من سمك الكارب كبير الرأس باستعمال عمود Sepadex G 100 بابعاد (2 × 80) سم بمعدل جريان (30 مل / ساعة) بواقع 3مل / جزء.

والتي سيتم تعزيزها عند الكلام عن نتائج الترحيل الكهربائي . وبعد جمع الاجزاء بلغ حجمها 33 مل وبتقدير الفعالية الانزيمية لها فضلا عن تركيز البروتين امكن الحصول على فعالية نوعية 632.68 وحدة / ملغم بروتين ،بين الجدول (1) ان خطوة الترشيح الهلامي للصورة W حققت عدد مرات تنقية مقدارها 4.26 مرة وحصيلة انزيمية 5.77 % .

اما نتائج الترشيح الهلامي للصورة C بين الشكل (5) ظهور قمة بروتينية واحدة وبقياس الفعالية الانزيمية لها وجد انها مطابقة للقمة البروتينية في الاجزاء (41 – 57) وان هذا التطابق دليلا على وصول الصورة الانزيمية C الى درجة عالية من النقاوة وبعد جمع الا جزاء بلغ حجمها 51 مل ، قدرت فعاليتها الانزيمية والنوعية وبلغت 350.21 وحدة / مل و 2918.41 وحـــــدة / ملغـــــم بروتيـــــن



شكل (5): كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي لأنزيم الكولاجينيز الصورة C المنقى من سمك الكارب كبير الرأس باستعمال عمود Sepadex G 100 بابعاد (2 × 80) سم بمعدل جريان (30 مل / ساعة) بواقع 3مل / جزء.

وعلى التوالي، كما تبين من الجدول (1) ان عدد مرات التنقية المتحصل من هذه الخطوة 19.68 مرة وبحصيلة انزيمية 22.43 %- تقنية الترحيل الكهربائي تعد خطوة تعيين نقاوة الانزيم من الخطوات المهمة للتعرف على كفاءة خطوات التنقية المستعملة ومن الضروري الحصول على انزيم منقى الى حد التجانس قبل توصيف الا نزيم لان وجود مكونات اخرى معه لا يعطي صورة واضحة عن الصفات الحقيقية لذلك الانزيم (20).

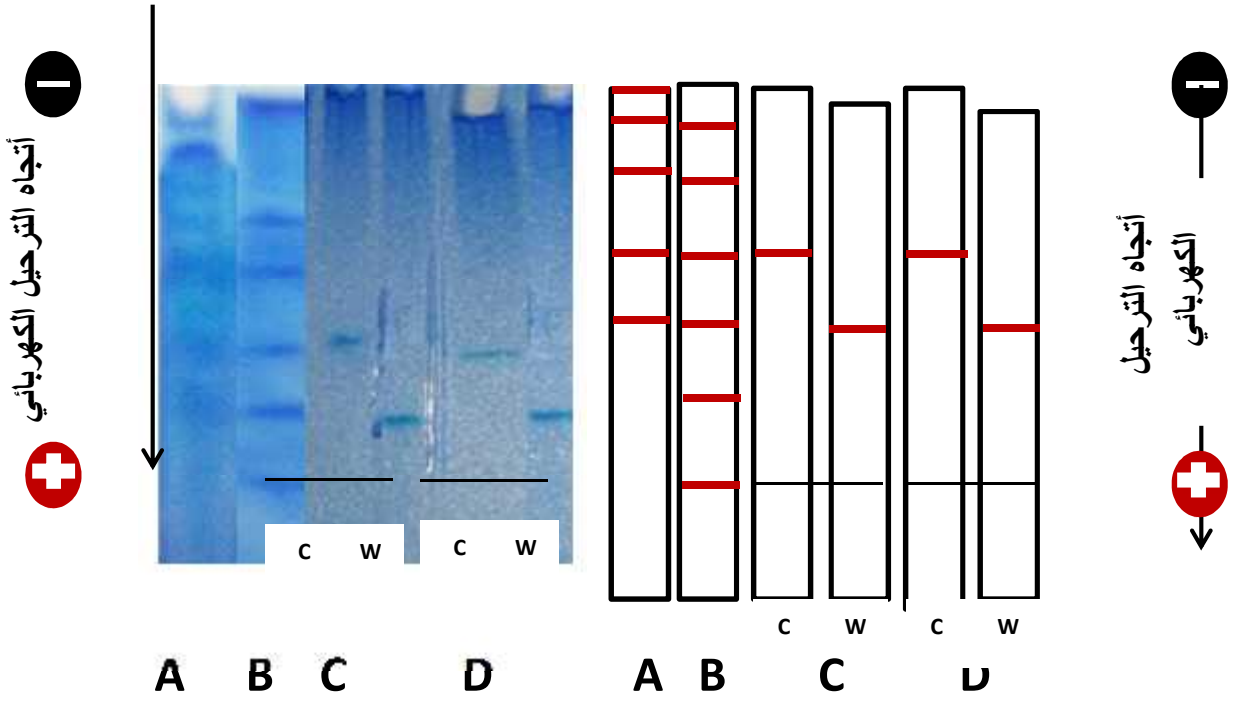
الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بغياب المواد الماسخة للبروتين

جدول (1): خطوات تنقية انزيم الكولاجينيز من مخلفات امعاء سمك الكارب كبير الراس.

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة / مل)	تركيز البروتين (ملغم / مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الخام	300	265.35	1.79	148.24	79605	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم (20 - 85 %)	25	718.67	1.09	659.33	17966.75	4.44	22.56
التبادل الايوني DEAE-Sephadex A 50							
الغسل الصورة W	60	140.22	0.60	233.7	8413.2	1.57	10.56
				47.12			
الاسترداد الصورة C	81	359.40	0.51	704.7	29111.4	4.75	36.56
الترشيح الهلامي Sephadex G100							
الصورة W	33	139.19	0.22	632.68	4593.27	4.26	5.77
				28.20			
الصورة C	51	350.21	0.12	2918.41	17860.71	19.68	22.43

توضح النتائج في الشكل (6) الترحيل الكهربائي للمستخلص الانزيمي في هلام الاكرل امايد، اذ احتوى الجزء A على مجموعة من الحزم نتيجة لاحتواء المستخلص الانزيمي الخام على مجموعة من البروتينات ، اما الجزء B فقد اظهر وجود سته حزم في هلام الاكرل امايد للمستخلص الانزيمي الناتج من الخطوة الثانية من خطوات التنقية وهي الترسيب بكبريتات الامونيوم ويوضح الشكل C احتواء هلام

الاكرل امايد على حزمتين بروتينة للمحلول الانزيمي احداهما في محلول الغسل والاخرى في محلول الاسترداد الخارجة من خطوة التبادل الايوني، اما الهلام D يمثل خطوة الترشيح الهلامي وهي خطوة تاكيدية لنقاوة الانزيم اذ تم التاكيد على وجود صورتين لانزيم الكولاجينيز والحصول عليه بشكل منفرد لكل صورة مما دل على النقاوة العالية لكلا الصورتين ، اذ تعتمد حركة البروتينات في الهلام على محصلة الشحنات التي يحملها البروتين بالدرجة الرئيسية وعلى شكله وحجمه بالدرجة الثانية ويتحرك البروتين في دالة حامضية ثابتة في مجال كهربائي بين القطبين السالب والموجب (19 ; 6).



شكل (6) : الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة SDS في هلام متعدد الاكريل امايد للكولاجينيز المنقى من سمك الكارب كبير الراس.

- A : المستخلص الانزيمي الخام
- B : المستخلص الانزيمي المركز بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 20 – 80 %
- C : صورتي الانزيم المنقى بواسطة التبادل الايوني باستعمال DEAE Sephadex A-50
- D : صورتي الانزيم المنقى بواسطة الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G100

المصادر

1. حنفي ، نصر معوض (2006) . التكنولوجيا الحيوية لمنتجات اللبن الثانوية . كلية الزراعة. جامعة طنطا ، القاهرة ، جمهورية مصر العربية.
2. دلالي، باسل كامل (1983). فهم الانزيمات. مطابع جامعة الموصل. جامعة الموصل.
3. دلالي، باسل كامل (1982). الإنزيمات في التصنيع الغذائي. دار الكتب للطباعة والنشر– جامعة الموصل.
4. المظفر، سامي عبد المهدي (1983). حركيات الانزيمات. الجزء الاول. مطبعة الخلود. بغداد.
5. Baehaki, A. ; Maggy, T. S.; Sukarno, D. S.; Azis, B. S. ; Siswa, S. and Friedhelm, M. (2012). Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F 11.4 .Afr. J. Micro. Res., 6(10): 2373 -2379
6. Blachshear, L. J. (1984). Systems polyacrylamide gel electrophoresis in methods in enzymology , Vol. 104, Jakopy W. B. (Ed.), Academic press. Inc. Harcourt Brace. Javonovich publishers, Pp: 237-256 .
7. Bradford, M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein –Dye Binding, Anal. Biochem., 72 : 248-254 .
8. Daboor, S. M.; Suzanne, M. B.; Abdel E. G.; Marianne, S. B. and Deepika D. (2012). Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. J. Biosci. Biotech., 3: 191-203 .
9. Garfin, D. E. (1990). Purification procedures electrophoretic methods. In: Murray, E. D. & Dentscher , P. J. (Eds.). Methods in Enzymolog. Academic press, New York .Pp: 425-441.
10. Kim, S. H. and Kim, S. K. (2002). Purification and characterization of a collagenase from the Mackerel (*Scomber japonicas*). J. Bioch. and Molec. Biol., 35: 576 -582 .
11. Kim, S.K. ; P.J. Park ; J.B. Kim and F. Shahidi (2002). Purification and characterization of a collagenolytic protease from the filefish (*Novoden modestrus*). J. Biochem. Molec. Biol., 335: 165-171
12. Laemmli, U. K. (970). Cleavage of structural proteins during assembly

of the bacteriophage T4 . J. Nature , 227: 680 -685 .

13. Lee, S. ; Pyo-Jam P. and Se-Kwon, K. (1997). Purification of the molecular weight collagenase from pyloric caeca of tuna (*Katsuwonus pelamis*). Dep. of Chemistry, Pukyong national Univ. Korea.
14. Liu , L. ; Meihu, M. ; Zhaoxia, C. ; Xieli, Y. and Wentao, W. (2010). Purification and properties of a collagenolytic protease produced by *Bacillus cereus* MBL13 Strain .J. Food Technol. Biotech. 48 (2) : 151-60 .
15. Mandl, I., MacLennan, J., Howes, E., DeBellis, R., and Sohler, A. (1953). Isolation and Characterization of Proteinase and Collagenase from Cl. Histolyticum. J. Clin. Invest., 32: 1323 -1329.
16. Moor, S. and Stein, W. (1954). A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. of Bioch., 211: 907 – 913 . August 16th 2010.
17. Murado, M.A., Gonzalez, M.P. and Vazquez, J.A. (2009). Recovery of proteolytic and collagenolytic activities from viscera by-products of Rayfish (*Raja clavata*). J. Marine Drugs, 7: 803 – 815 .
18. Park, P. J. ; Lee, S. H. ; Byun, H. G. ; Kim, S. H. and Kim, S. K. (2002). Purification and characterization of a collagenase from the Mackerel (*Scomber japonicas*). J. Bioch. and Molec. Biol., 35: 576 -582 .
19. Sakharov, I. Y. ; Litvin, F. E. and Artyukov, A. (1994). Purification and characterization of two serine collagenolytic proteases from crab *paralithodes camtschatica* . J. Comp. Biocem. Physc. Biocem. Mlo. Biol., 108: 561-568 .
20. Segel, I.H. (1976). Biochemical calculations. 2nd Edn, John and sons. Inc. New York
21. Stoll, V. S. and Blanchard, J. S. (1991). Buffers: Principles and practice. In Denstscher, M. P. (Ed.). Methods in enzymology. Vol. 182, Guide to protein purification .Academic press . San Diego.
22. Whitaker, J. R. (1972). Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 579 .

Basrah J. Agric. Sci., 27 (2): 56-71, 2014

Extraction and Purification of Collagenase from Some Fish Wastes

Aum El-Basher H. J. Al-mossawi and Wasan Kadhim A. Al-Temimi*

Department of Food Sciences, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq

Abstract: Five marine and freshwater fish species bighead carp *Aristichthys nobilis*, silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* , shad *Tenualosa ilisha*, mullet *Liza carinata* and spotted leatherskin *Scomberoides commersonianus*, were used applying four solutions included distilled water, sodium chloride (at concentrations of 2, 5 and 7%), Tris-HCl buffer 0.05 M with pH 7, 7.5 and 8.5 sodium phosphate buffer 0.05 M , pH 5, 6.5 and 7 to limitation the best enzyme source and extraction solution. It was found that bighead carp was the better source for obtaining enzyme in comparison with other sources and sodium phosphate buffer 0.05 M with pH 6.5 was the best extraction solution where it gave the highest enzyme activity of 220.45 U/ mg protein. Ammonium sulphate added to enzyme extract with saturation rate 20-80% as a primary step for purification where the enzymatic and specific activities reached 718.67 U/ ml and 659.33 U/ mg protein, respectively, and an enzyme yield of 22.56% with 4.44 purification times. Then, concentrated enzyme extract passed through ion exchange chromatographic column DEAE Sephadex A-50. Ion exchange process produced two enzymes W and C with specific activity of 140.22 and 359.40 U/ mg , enzyme yield 10.56 and 36.56% and purification times 1.57 and 4.75 , respectively. The two enzymes subjected to and additional purification step of gel filtration using Sephadex G-100 gel filtration column where the specific activity for both enzymes W and C reached 139.19 and 350.21 U/ mg protein, enzyme yield of 5.77 and 22.43% and purification times 4.26 and 19.68, respectively. Results for determination the enzyme purity for the two enzymes revealed the appearance of one protein band for each using Poly Acryl Amide gel electrophoresis without denaturizing agents .

***Part of a Thesis of the second researcher.**