دراسة تقييد البيتاكالاكتوسايديز المنقى من عفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة وتطبيقه في بعض منتجات الالبان

غياث حميد مجيد علي خضيرجابر علاء جبارعبد آل منهل

قسم علوم الاغذية /كلية الزراعة / جامعة البصرة

البصرة - العراق

ISSN –1817 –2695

(الاستلام 21 تشرين الثاني 2010، القبول 8شباط 2011)

الخلاصة

أظهر استعمال الكايتوسان تفوقاً في التقييد بكفاءة 76.60 % ودرست صفاته فوجد ان افضل كمية مضافة من الانزيم هي 0.75 مل / 0.5 غرام كايتوسان، كما وجد ان ا لرقم الهيدروجيني الامثل ودرجة الحرارة المثلى للانزيم المقيد مماثلة للانزيم الحر(50 م و5 pH)، الا انه حصل اتساع في مدى الثبات لكلا الصفتين ، كما لوحظ انخفاض تأثير التثبيط بسكر الكالاكتوز على فعالية الانزيم المقيد مقارنة بالانزيم الحر ، واحتفظ الانزيم المقيد بنسبة 71.35 % من الفعالية بعد استعماله 10 مرات. درس ثبات الإنزيم الحر والمقيد خلال مدد الخزن اذ لوحظ ان الانزيم المقيد احتفظ بكامل فعاليته عند درجة حرارة 5 م الا انه فقد اقل من 9 % من فعاليته عند 25 °م في حين ان الأنزيم الحر فقد اكثر من 12 % و 29 % من فعاليته عند الخزن بدرجة 5 و25 ° م على التوالي خلال 30 يوم من الخزن . وجد عند استعمال الانزيم الحر والمقيد في تحليل سكر اللاكتوز ان اعلى نسبة تحلل كانت للاكتوز المتواجد في دارئ الخلات اذ وصلت الى 66.2 % و 81.54 % وفي الحليب الفرز40.72 % و61.84 % بينما في الشرش كانت نسبة التحلل 49.35 % و66.47 %عنداستخدام الانزيم الحر والمقيد على التوالي بعد 6 ساعات من الحضن على درجة 50 م.

الكلمات المفتاحية : البيتاكالاكتوسايديز ، تقييد ، كايتوسان ، تطبيق الانزيم

المقدمة

يُعرّف التقييد بأنه العملية التي يتم بوساطتها تحديد حركة الخلايا أو الانزيمات او هوالذي يقيد او يغلف بماده مدعمة غير ذائبة (حامل Carrier) عن طريق اربعة اساليب هي الامتزازAdsorption ،الارتباط التساهمي Covalent Binding ، الحجز Entrapment ، والتغليف Encapsulationفضلاً عن وسائل اخرى مثل الربط الايوني Ionic Binding وربط المعادن الكلابية Metal Binding[11 Chelation of] ان لعملية التقييد العديد من الفوائد منها اطالة مدة استعمال الانزيمات المقيده اذ إنها تحتفظ بفعاليتها عندعملية التحويل وبذلك تقلل من تكاليف الانتاج، وزيادة ثباتية الانزيمات المقيده تجاه الحراره وذلك لحساسية الانزيمات الحره تجاه التغيرات الحراريه،توفير الفرصه لانهاء عملية التفاعل في الوقت المناسب وتقليل التفاعلات غير المرغوبه التي تحدث بعد انتهاء التخمر،يمكن استعمال الانزيمات المقيدة في عمليات تخمر مستمرة او متقطعة مع سهولة تنقية واستخلاص نواتج عملية التخمرلخلوها من الانزيم الحر فضلاعن تنوع استعمال الانزيمات المقيدة[5,22] لذلك بدأ الباحثون بتطبيق هذه التقنية على العديد من الانزيمات ومنها انزيم البيتاكالاكتوسايديز لما لها من دور مهم في التغلب على التثبيط الحاصل للانزيم عند تحلل اللاكتوز وتراكم سكر الكالاكتوز .يُعد البيتاكالاكتوسايديز من الانزيمات المهمة في صناعة الالبان

وهو يتواجد في الامعاء الدقيقة للثديات كما لوحظ تواجده في النباتات والاحياء المجهرية و يعمل على تحليل سكراللاكتوز Lactose إلى وحداته الاولية من السكريات الاحادية (الكلوكوز و الكالاكتوز) ونتيجة لذلك تزداد الذوبانية والحلاوة (بمقدار اربع مرات) وتقليل المشاكل الناجمة نتيجة تبلور سكر اللاكتوز في صناعة المثلجات القشطية والالبان المكثفة كما ان للانزيم دور مهم في معالجة ظاهرة عدم تحمل اللاكتوزLactose intolerance والتي يعاني منهـا اكثر مـن 70 % من سكان العالم [9].

المواد وطرائق العمل

مصادر العزل

عزلت 50 عزلة فطرية من مصادر مختلفة شملت التربة والجبن والشرش واجريت عليها عمليات غربلة واختير عفن *Aspergillu oryzae* كونه الاكفأ في انتاج الانزيم .

انتاج الانزيم : وضع 10 غم من نخالة الحنطة في دورق زجاجي سعة 250 مل ورطبت مع 10 مل من وسط الشرش المزال منه البروتين وعقم بالمؤصدة ، لقحت بأضافة 1 مل من المعلق البوغي لكل عزلة والذي يحتوي على 10^6 بوغ، حضنت المزرعة بدرجة 30 لمدة 5 أيام ،استخلص الأنزيم من الوسط بأضافة 50 مل من الماء المقطر الى الكتلة الصلبة وتركت على الهزاز بسرعة 150 دورة /الدقيقة بدرجة 30 °م لمدة ساعة بعدها رشح المستخلص خلال قطعة شاش نظيفة ونبذ الراشح بسرعة 6200 xg ولمدة 20 دقيقة وفي ظروف مبردة واعتبر الرائق المستخلص الخام للأنزيم .

تقدير فعالية الأنزيم : اتبعت الطريقة الموصوفة في[4] لتقدير فعالية الانزيم, وعرفت وحدة الفعالية للانزيم (Unit) بانها كمية الانزيم التي تحرر 1 مـايكرومـول مـن (Orthro ONP Nitro Phenol) في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التفاعل.

تقدير تركيز البروتين : اتبعت طريقة[12] لتقدير تركيز البروتين

تقييد الانزيم:

التقييد بتقنية الحجز بالاكار Agar اتبعت طريقة [3] لتقييـد الانزيم المنقى باستعمال محلول الاكار بتركيزين 2% و4% ، إذ اضيف الانزيم النقي إلى الاكار بدرجـة حـرارة 40-45 م(قبل تصلبه) وبنسبة 1:1 ومزج جيداً ثم وضع المزيج فـي اطباق بعمق 2 ملم وقطع إلى قطع صغيرة غُسلت جيداً بدارئ الخلات 0.05 مولاري ورقم هيدروجيني 5 لازالة الانـزيم غير المقيد ، وحسبت كفاءة الانزيم المقيد حسب طريقة [21] .

التقييد بالادمصاص على السليكا جيل :اتبعـت طريقـة [14]وذلك بخلط 0.5 غم من مـادة الـسيلكا جيـل مـع الكلوتريلديهايد باستعمال خلاط مغناطيسي لمـدة سـاعتين، بعدها تم الترشيح تحت التفريغ بوسـاطة قمـع بخنروجمـع الراسب واضيف اليه 1مل من الانزيم المنقى وترك لمدة 48 ساعه في الثلاجة بعدها ازيل الراشح وغسل الانزيم المقيـد بمحلول الخلات الدارئ وحسبت كفاءة التقييد.

التقييد بتقنية الحجزبالجينات الصوديوم :اجري التقييد حسب طريقة [7] وذلك بمزج كميات متساوية من محلول الانزيم النقي مع محلول 5 % الجينات الصوديوم واضيف المزيج بهيئة قطرات الى محلول كلوريد الكالسيوم المبرد 0.2 مولاري بوساطة محقنة طبية سعة 5 مل . غسلت الحبيبات بدارئ الخلات وقيست كفاءة عملية التقييد .

تقييد الانزيم في مادة الجيلاتين : اجري التقييد تبعالطريقة [2] بوزن 0.4غم جيلاتين لتقييد الانزيم في 5مل من دارئ الخلات لاجراء عملية الانتفاخ اذ سخن المزيج بدرجة 50 م لمدة 5 دقائق لاكمال عملية الاذابة ، برد المزيج وبعدها اضيف 1 مل من محلول الانزيم بعد المزج اضيف الكلوترالديهايد بنسبة 3%، ومزج جيدا بدرجة حرارة 28 م وصب على الالواح الزجاجية ، وخزن بدرجة 5 °م لمدة 18 ساعة ،غسلت طبقة الانزيم المقيد بدارئ الخلات بعدها قطعت طبقة الجيلاتين الحاوية للانزيم المقيد الى كتل صغيرة وحفظت بالثلاجة.

تقييد الأنزيم على الكايتوسان : اجري التقييد حسب طريقـة [3] باخذ 0.5 غرام من الكايتوسان في هزاز مع 2.5 مل من 0.1 مولاري حامض الهيدروكلوريك الحاوي على 3% كلوتريلديهايد لمدة ساعتين بدرجة 30 م، رسب الكايتوسـان المذاب باضافة 1 مل من هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري ،ثم جمع الراسب بالترشيح وغسل بالمـاء المقطـر لازالة الكلوتريلديهايد ، خلط الكايتوسان الرطب مع 1 مـل من المحلول الانزيمي النقي وضع بعدها في هزاز لمدة ساعة بدرجة 30 م ثم غسل الراسب بدارئ الخـلات ، حفظـت

المادة المترسبة والتي تمثل الأنزيم المقيد بالكايتوسان بعد ان قطعت في نفس المحلول الدارئ في الثلاجة بعد قياس الفعالية الأنزيمية وكفاءة التقييد .

تعيين كمية الأنزيم الامثل لعملية التقييد في فعالية الأنزيم : حضن 0.5 غم من الكايتوسان مع (0.25 و 0.5 و و0.75 و 1 و 1.25 و 1.5) مل من الانزيم المنقى .

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثباتية الأنزيم المقيد: اعتمدت طريقة [6] وحضرت محاليل المادة الاساس (ONPG) بارقام هيدروجينية (2-8).

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية وثباتية الإنزيم المقيد : قدرت بمدى 20-80م اماالثباتية فتم حضن الانزيم المقيد بدرجات حرارة مختلفة فضلا عن تعيين الثبات عند درجة50 م ولمدة 6 ساعات .

دراسة تأثير التثبيط بسكر الكالاكتوز على فعالية الانزيم المقيد : درس تأثير اضافة سكر الكالاكتوز وحسب طريقة[8] وبتركيز 1% و5% على فعالية الانزيم.

تأثير عدد مرات استعمال الأنزيم المقيد: درس حسب طريقة [16] وتم متابعة الفعالية المتبقية اذ اعتبرت الفعالية 100 % في المرة الاولى ومن خلالها حسبت النسبة المئوية لفعالية الانزيم المقيد والمتبقية.

ثبات الإنزيم الحر والمقيد خلال مدد الخزن: حفظ الإنزيم الحر وبشكل محلول والمقيد في درجة حرارة(5°م و 25°م) على التوالي لمدة 30 يوم وتمت متابعة الفعالية الإنزيمية المتبقية.

دراسة قابلية الانزيم الحروالمقيد على تحليل سكر اللاكتوز في دارئ الخلات وفي الشرش والحليب اضيف الانزيم المنقى الحر والانزيم المقيد الى محلول 5 % لاكتوز كذلك الى الشرش والحليب، حضن المزيج بدرجة حرارة 50 م مع التحريك ولمدة 6 ساعات وتمت متابعة تحلل اللاكتوز بمدد زمنية مختلفة وذلك من خلال سحب كمية من محلول التفاعل ومعاملتها حراريا" في حمام مغلي لمدة 5 دقائق لغرض ايقاف فعالية الانزيم . ثم قدرت كمية الكلوكوز المتحررة وفق طريقه [18] .

النتائج والمناقشة

اجريت عمليات العزل والغربلة للوصول الى العزلة الاكفأ في انتاج الانزيم فتبين ان العزلة التي تم تشخيصها في ضوء المفاتيح التشخيصية الواردة في[10] على انها عفن *Aspergillus oryzae* هي الاكفاء في انتاج الانزيم.

استعملت طرائق عدة في تقييد البيتاكالاكتوسايديز، وتم تقييم الطرائق لتحديد أفضل طريقة لتقييد الأنزيم من خلال تقدير كفاءة عملية التقييد ، ويظهر جدول (1) تفوق استخدام الكايتوسان في تقييد البيتاكالاكتوسايديز مقارنة مع المواد الأخرى من خلال الحصول على أعلى كفاءة في عملية التقييد إذ بلغت 76.60 % مع الاشارة الى اهمية الكلوتريلديهايد Gluteraldehyde المضاف والذي يكون مسؤولا" عن تكوين الارتباطات العرضية وبالتالي زيادة كفاءة عملية التقييد كونة يعمل على منع تسرب الانزيم وزيادة ثباتيته، بينما كانت طريقة تقييد الأنزيم بوساطة السلكاجيل اقل كفاءة إذ بلغت 31.95% فقط. وجاءت هذه النتائج مشابهة لما توصل اليه [3] عند دراستهم أمكانية تقييد انزيم Levansucrase المنقى جزئيا من بكتريا *Bacillus subtilis* على مجموعة من المواد المقيدة ومن ضمن هذه المواد الكايتوسان بوجود الكلوتريلديهايد بتركيز 3 % ، فوجدوا ان كفاءة تقييدالأنزيم تبلغ 81.51% بينما كانت كفاءة التقييد 29% و اقل من 5% عند استعمال الاكار(بتركيز 1%) والجينات الكالسيوم على التوالي، كذلك وجد[21] عند استعمالهم الكايتوسان والامبرلايت(Amberlite MB1) والالجينات مع الجيلاتين و Eudragit S-100 والهلام المتعدد الاكريل اميد لتقييد انزيم β-xylosidase لاحظوا تفوق الكايتوسان على باقي المواد المستعملة بكفاءة تقييد بلغت 91% مقارنة بباقي الطرق ،ان المجاميع الفعالة المتمثلة بمجاميع الهيدروكسيل والامين والامايد والكاربوكسيل والسلفهايدرل والفينول والاندول تعتبر ضرورية لحصول عملية التفاعل والتقييد بين البروتينات (الانزيمات) والمادة الساندة ،كما ان عملية التقييد تحصل نتيجة تكون الاواصر الببتيدية (الامايدية) او عملية الالكله(Alkylation) او بواسطة قاعدة شيف (Schiffs base) او التفاعلات مع الكلوتريلديهايد او غيرها من التفاعلات [11] تعد هذه النتائج مشجعة في تقييد الأنزيم قيد الدراسة بالنسبة لطريقة تقييد الانزيم تساهميا مع الكايتوسان وذلك لكون الفعالية التي

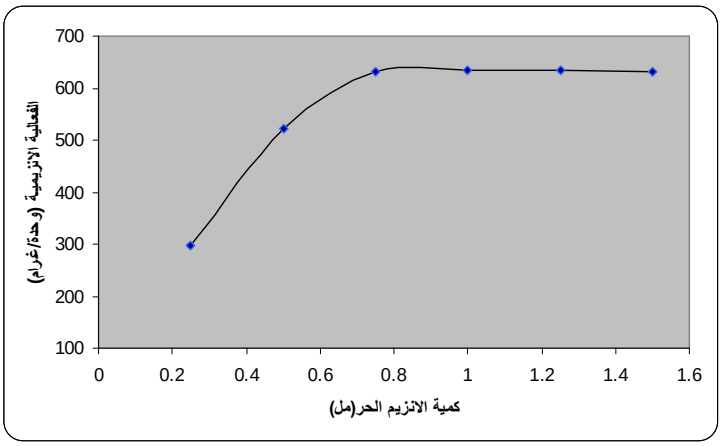
احتفظ بهـا الأنزيم المقيد تقع ضمن المـــــدى الطبـيـعي الـــذي يتراوح بيـن 50-80% مـن الفعاليـة الأصليـة [15], لهـذا تم استعمال طريقة تقييد الأنزيم بوساطة الكايتوسان والذي يعتبر مصدر طبيعي ورخيص يمكن استعمالة بدلا من الحوامل التجارية المكلفة في التجارب اللاحقة من الدراسة .

جدول (1) كفاءة الطرائق المختلفة وباستخدام مواد متنوعة في تقييد البيتاكالاكتوسايديز

تقنيات التقييد	الفعالية الانزيمية (وحدة/مل)	كفاءة التقييد(%)
الانزيم الحر	831.26	100
الحجزداخل الاكار2%	362.17	43.57
الحجز داخل الاكار 4%	400.16	48.14
الامصاص على السليكاجيل	265.58	31.95
الحجز داخل الجينات الكالسيوم	477.55	57.45
الحجز داخل الجيلاتين	493.02	59.31
التقييد التساهمي مع الكايتوسان	636.74	76.60

درس تأثيركمية الانزيم المضافة الى حبيبات الكايتوسان على فعالية الأنزيم المقيد ، وبينت النتـائج الموضـحة فـي شكل(1) أن فعالية الأنزيم المقيد تزداد بزيادة كمية الأنـزيم المضافة بشكل ملحوظ حتى تصل إلـى فعاليـة مقـدارها 652.19 وحدة/غم للحبيبات باستعمال 0.75 مل من الأنـزيم في عملية التقييد بعد ذلك استقرت الفعالية الانزيمية مع زيادة كمية البيتاكالاكتوسايديز المضافة.

وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه[14] عند دراستهم افضل تركيز للانزيم المضاف لعملية التقييد على مادة السليكا اذ انه بزيادة تركيز الانزيم المضاف تزداد الفعالية الانزيمية لتصل الى اقصاها بعدها تستقر الفعالية وتبقى ثابته مع زيادة تركيز الانزيم المضاف ،كذلك ذكر [19] خـلال دراسـتهم تأثير كميـة البيتاكالاكتوسـايديز اللازمـة للتقييـد بمـادة magnetic Fe_3O_4–chitosan بتركيز تراوح بين 0.3-0.7 ملغم

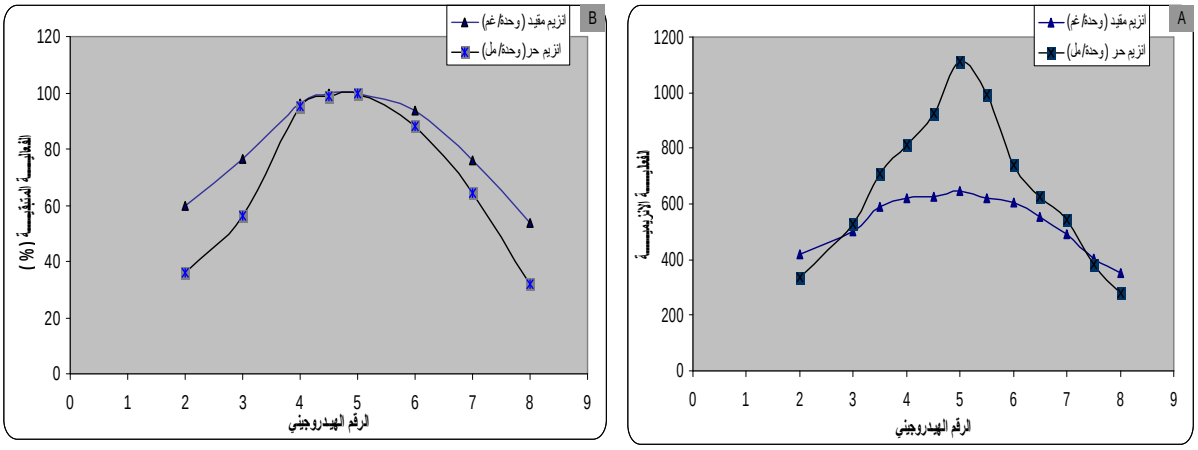


شكل (1) تحديد كمية الانزيم الامثل للمقيد بحبيبات الكايتوسان

في فعالية الأنزيم المقيد عند حضنه لمدة 3 ساعات ، ووجد أن فعالية الأنزيم المقيد تزداد بزيادة كمية الأنزيم المضافة من 0.3 ملغم وصولا الى اقصى فعالية عند 0.5 ملغم بعدها تتوقف الزيادة في الفعالية الانزيمية بزيادة التركيز. وتعزى هذا الزيادة في فعالية الإنزيم إلى زيادة كمية الأنزيم بثبات كمية المادة الاساس التي يعمل عليها الأنزيم،ويقوم بتحللها بشكل أكبر عند مدة حضن واحدة الا ان ثبات الفعالية يعود الى زيادة التجمعات الانزيمية وقلة المواقع الفعالة المتوفرة للارتباط نتيجة حصول عملية التشبع، وهذا ماكده[20] عند اضافتهم للبيتاكالاكتوسايديز الخام بوحدة 25 و 50 و 100 و 150 و 175 لعملية التقييد بحجزه داخل الجيلاتين اذ لاحظوا ان افضل فعالية للانزيم المقيد عند اضافة 150 وحدة من الانزيم، كذلك اشار[23] الى ان افضل فعالية انزيمية للبيتاكالاكتوسايديز المقيد كانت عند اضافة 2.5 مل من الانزيم الى 2 غرام من حبيبات الكايتوسان.

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثباتية الانزيم المقيد

درس تأثير الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية البيتاكالاكتوسايديز المقيد بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين (2-8)، وبينت النتائج الموضحة في شكل (A 2) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية كان 5 وهي مماثله للانزيم الحر الذي اظهر أعلى فعالية للأنزيم عند هذا الرقم ، اتفقت هذه النتائج مع دراسات مشابهه تناولت الانزيم الحر والمقيد والتي اثبتت امتلاك البيتاكالاكتوسايديز الحر والمقيد نفس الرقم الهيدروجيني الامثل [6,16,5] درس تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الانزيم المقيد فأظهرت النتائج المبينة في الشكل ذاته (شكل B2) أن الإنزيم المقيد أبدى ثباتاً جيداً في المدى 3.5-6 مع اتساع المنحنى اكثر مقارنة بالانزيم الحر، يلاحظ بأنها قد أدت إلى زيادة الثباتية والتي كانت واضحة أكثر في الجانب الحامضي وقد يعود السبب في ذلك إلى الحماية التي توفرها شبكة هلام الكايتوسان للإنزيم واعادة توزيع الشحنات عليه من تأثير المحلول الدارئ .



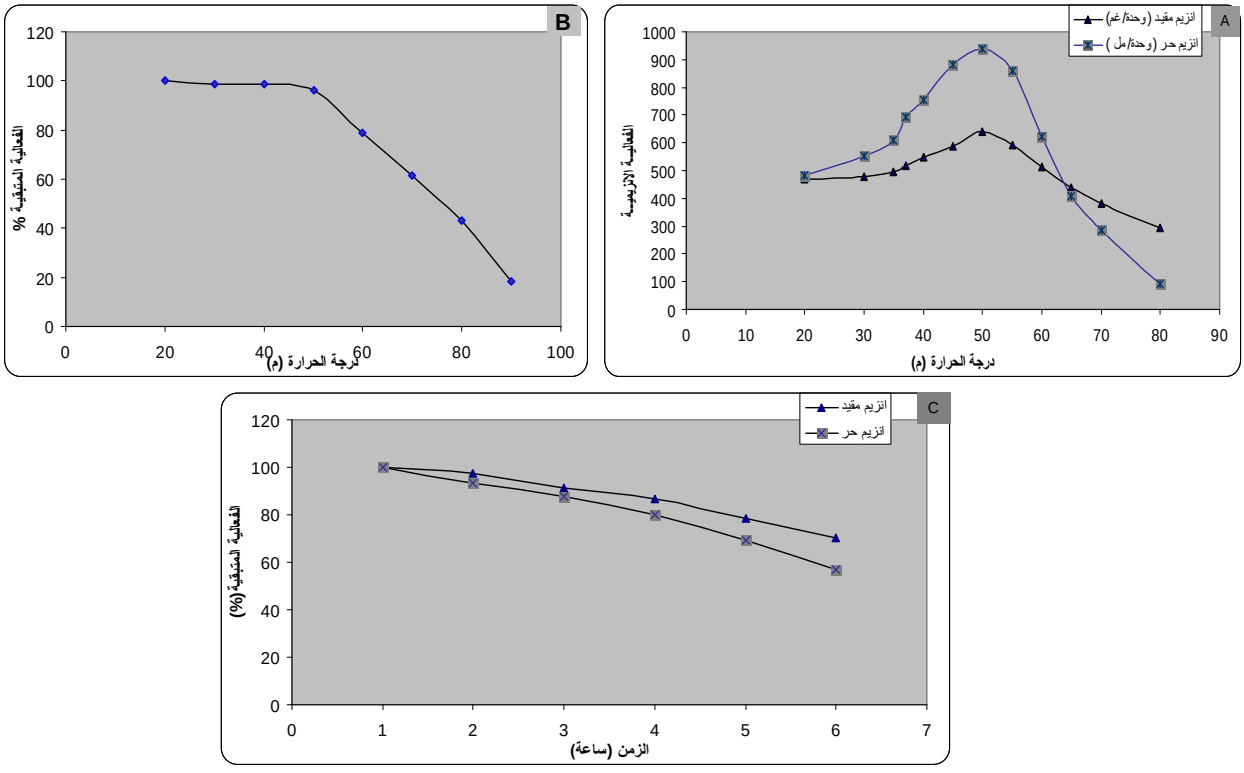
شكل(2)الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثباتية المقيد بحبيبات الكايتوسان

ذكر[1] من ان البيتاكالاكتوسايديز المنقى من بكتريا *Bacillus coagulans* والمقيد بمادة الجينات الكالسيوم قد احتفظ بنسبة 80 %من فعاليته على مدى هيدروجيني تراوح بين 6.5-11, كما وجد [19] عند دراستهم لثباتية الانزيم المقيد بمادة Fe_3O_4– magnetic chitosan ثباتا عند رقم هيدروجيني تراوح بين 5-7 كما احتفظ بنسبة 55 %من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 8 بينما احتفظ الانزيم الحر بنسبة 26%من فعالية عند نفس الرقم الهيدروجيني ولمدة 6 ساعات.

اشار [23]الى ان نوع الحامل (Carrier) المستعمل في عملية التقييد يكون مسؤول عن التغير في قيمة الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم ، فأستعمال الحوامل الموجبة المتعددة (Polycationic Carriers) يؤدي إلى إزاحة الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم المقيد نحو الجانب الحامضي وذلك بسبب زيادة الشحنات الموجبة على جزيئات الإنزيم المقيد والعكس صحيح.

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية وثباتية الانزيم المقيد

اذ يبين شكل (A3) ان الانزيم المقيد بلغ اعلى فعالية انزيمية عند درجة حرارة 50 م وهي نفس الدرجة المثلى للانزيم الحر وهذا ماكدته معظم الدراسات ، وإن اتساع مدى المنحنى الحراري بعد اجراء عملية التقييد عند ارتفاع درجات الحرارة قابله زيادة في الفعالية الإنزيمية مقارنة مع الإنزيم الحر ، فقد أشار [5] عند دراستهم تأثير الحرارة على الانزيم الحر والمقيد والمنقى من عفن *Aspergillus oryzae* و خميرة *Kluyveromyces lactis* الى ان درجة الحرارة المثلى للانزيم المقيد هي 55 م و 50 م على التوالي وهي نفس الدرجة المثلى للانزيم الحر، لم يلاحظ [17] اي تغيير في درجة الحرارة المثلى لانزيم البيتاكالاكتوسايديز المنقى من خميرة *Kluyveromyces lactis* عند تقييده على polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic والتي كانت 50 °م بالرغم من ان هناك إتساعاً معنوياً في منحنى الفعالية تجاه الحرارة مقارنة بالإنزيم الحر، بينما وجد [8] اختلافا في درجة الحرارة المثلى للانزيم الحر عن المقيد اذ كانت 50 و 60 م على التوالي ،كذلك اشار [23] الى ان الانزيم المقيد مع حبيبات محضرة من الكايتوسان والصمغ وبوجود الكلوتريلديهايد له درجة حرارة مثلى 47 م بعد ان كانت 37 م قبل التقييد وعزي هذا الاختلاف الى الثبات الحراري الذي يبديه الانزيم المقيد مقارنة بالحر. ان عملية تقييد الإنزيم ادت إلى زيادة في الثبات الحراري للإنزيم ولجميع الدرجات الحرارية المستعملة، فقد احتفظ الإنزيم المقيد بكامل فعاليته تقريباً عند درجة حرارة 20-50 م لمدة 60 دقيقة(شكل B3)، كما احتفظ بنسبة 78.65% و 61.73 % من الفعالية عند التحضين بدرجات حرارة 60 و70م للمدة نفسها وعلى التوالي ، وكان تأثير التقييد واضحاً في الدرجات الحرارية العالية نسبياً أي كان الفرق واضحا مقارنة بالانزيم الحر كذلك يبين شكل (C3) مدى الثبات الحراري عند درجة حرارة 50 م ولمدة 6 ساعات اذ احتفظ الانزيم بنسبة 70% من فعاليته بعد مرور 6 ساعات من الحضن مقارنة بالانزيم الحر.

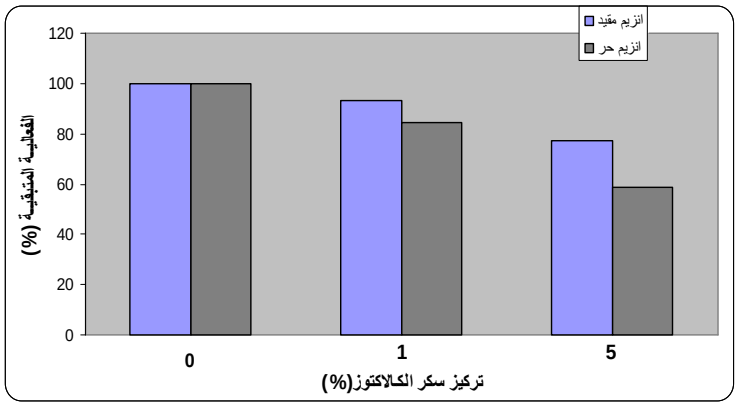


شكل (3) الثبات الحراري للبيتاكالاكتوسايديز المقيد بحبيبات الكايتوسان

وقــد يعزى ذلك إلى ما ذكره[22] بأن مادة التقييد تعمل على وقاية الإنزيم من تأثير الحرارة المرتفعة مع زيادة الثبات الحراري للإنزيم اذ يمنحها تحملاً وحماية من عملية المــسخ بتأثير الحرارة، وجاءت النتيجة متوافقة لما توصل إليــه [1] من ان البيتاكالاكتوســايديز المقيــد علــى مــادة DEAE-cellulose و الجينات الكالسيوم قد احتفظ بنسبة 82.8% من فعاليته عند درجة 60 م لمدة 15 ساعة و 50 % من الفعالية عند درجة 65 م ولمــدة 9 ساعات لطريقتي التقييــد علــى التوالي، كما اشار [16] بــأن الثبــات الحــراري لإنــزيم البيتاكالاكتوسايديز المنتج مــن خميــرة *Kluyveromyces lactis* والمقيــد فــي مــادة polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic كان أكثر بكثير مقارنة مع الإنزيم الحر عند درجة الحرارة 35 م ولمدة 24 ساعة وعلل هذه الزيادة الى الانخفاض في قابليةِ حركة جزيئــات البــروتينَ نتيجــة الارتباط التساهمي الذي يعطيه الصلابةِ في كُلّ نقطة ارتباط بالمادة المقيده وبالتالي توفر الحماية مــن تــأثيراتِ البيئــةِ المحيطة به ، وذكر [19] بأن عملية تقييد الانزيم في مادة magnetic Fe_3O_4 – chitosan حسنت معنوياً من الثبــات الحراري له إذ احتفظ الإنزيم بنــسبة 65 % مــن الفعاليــة الإنزيمية عند الحضن علــى درجــة 50 و 60 م ولمــدة 6 ساعات بينما احتفظ الإنزيم الحر بنسبة 20 % من الفعاليــة الاصلية خلال التحضين تحت نفس الظروف .

تأثير التثبيط على الانزيم المقيد بالكايتوسان

درس تأثير التثبيط باضافة ســكر الكــالاكتوز بتراكيــز مختلفة على فعالية الانزيم المقيــد وكما هو مبين فــي شكل (4) اذ احتفظ الانزيم المقيد بنــسبة 93.15 % و 77.01 %من فعاليتة عند تركيز 1 %و 5% على التوالي وهذا يدل على ان الانزيم المقيد كان افضل من الحــر فــي احتفاظــه بالفعالية الانزيمية جراء تراكم نواتج او مثبطــات التفاعــل، وهذا ماكده [6] بان اضافة الكالاكتوز بتركيــز 5 % لمــدة ساعة بدرجة حرارة 37 م ادى الى فقدان الانزيم الحر 72% مــن فعاليتــة بينمــا احتفظ الانــزيم المقيــد بنــسبة 65 %مــن فعاليتة .



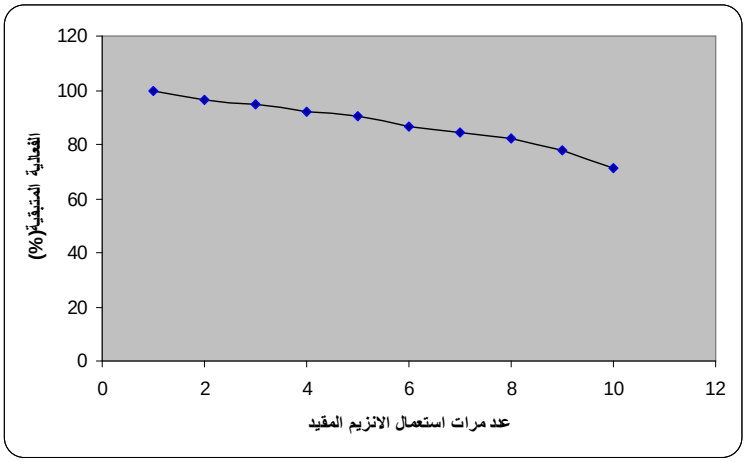
شكل (4) تأثير اضافة تراكيز مختلفة من سكر الكالاكتوز على فعالية الانزيم المقيد

اذ ان تاثيــر المثبطات عــلى الانزيمات المقيــدة يكــــون اقل بكثيــر مقارنــة" بالانزيمات الحرة ويمكن تعليــل هــذه الظاهرة إلى بطء نفاذ ووصول هذه المواد خلال شبكة مــادة التقييد إلى الموقع الفعال مقارنة بسرعة نفاذ المادة الاســاس وقد يكون وصول هذه المواد إلى الإنزيم متأخراً وبعد بدايــة التفاعل الإنزيمي ، كما تعمل الظروف الجديدة بعــد عمليــة التقييد على إخفاء الموقع الفعال وعرقلة تاثير هذه المركبــات في التفاعل الإنزيمي [2,8] .

تأثير عدد مرات استعمال الأنزيم المقيد بالكايتوسان في الفعالية الانزيمية

تم دارسة تأثير عدد مرات استعمال الانزيم المقيد بحبيبات الكايتوسان على الفعالية الانزيمية ، وبينت النتائج في شكل (5) انخفاض الفعالية الانزيمية إذ فقد الانزيم المقيد 28.65 % من فعاليته بعد الاستعمال العاشر، وقد يعزى هذا الانخفاض في الفعالية الأنزيمية الى حصول تسرب للانزيم اونتيجة التعرض للحرارة باستمرار عندالاستعمال المتكرر للحبيبات المقيدة للأنزيم.

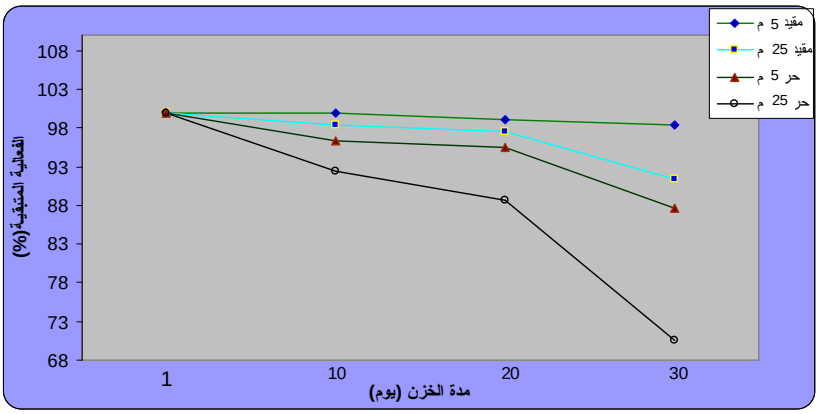
وجاءت النتائج متوافقة مع ماشار اليه كل من [6] ان الانزيم المقيد بمادة حبيبات النشا والجينات الكالسيوم احتفظ بنسبة 65 %من فعاليته بعد المرة السادسه ، كذلك درس [17] تأثير عدد مرات استعمال البيتاكالاكتوسايديز المقيد بمادة polysiloxane-polyvinyl alcoholعلى الفعالية الأنزيمية اذ لاحظوا انخفاض الفعالية الأنزيمية بعد استعمال الأنزيم المقيد 10 مرات اذ فقد 14%من الفعالية عند المرة العاشرة ، بينما وجد[19] احتفاظ الانزيم المقيد بمادة magnetic Fe_3O_4–chitosan بنسبة 92% من فعاليته بعد استعمالة 15 مرة، كذلك اشار [23] الى ان الانزيم المقيد مع حبيبات محضرة من الكايتوسان والصمغ وبوجود الكلوتريلديهايد قد احتفظ بنسبة 53 % من فعاليته بعد9 مرات من الاستعمال، كذلك لاحظ[20] ان الانزيم الخام المنتج من خميرة *Kluyveromyces marxianus* YW-1 والمقيد بالجيلاتين ذو ثباتية في تحلل اللاكتوز بعد كل عملية استعمال لحين وصوله الى الاستعمال الثامن بنسبة تحلل 49 % بعدها بدأت الفعالية التحللية بالانخفاض الى ان وصلت نسبة من 25 % مع المرة التاسعة.



شكل(5) تاثير عدد مرات استعمال الانزيم المقيد في الفعالية المتبقية عند درجة حرارة 50 م ولمدة 15 دقيقة

ثبات الإنزيم الحر والمقيد خلال مدد الخزن

تبين النتائج في شكل (6)إلى ان الانزيم المقيد احتفظ بكامل فعاليته عند درجة حرارة 5 م الا انه فقد اقل من 9 % فقط من فعاليته عند 25 م في حين ان الأنزيم الحر فقد اكثر من 12 % و 29 % من فعاليته عند الخزن بدرجة 5 و25 م على التوالي بعد مرور 30 يوم من الخزن.



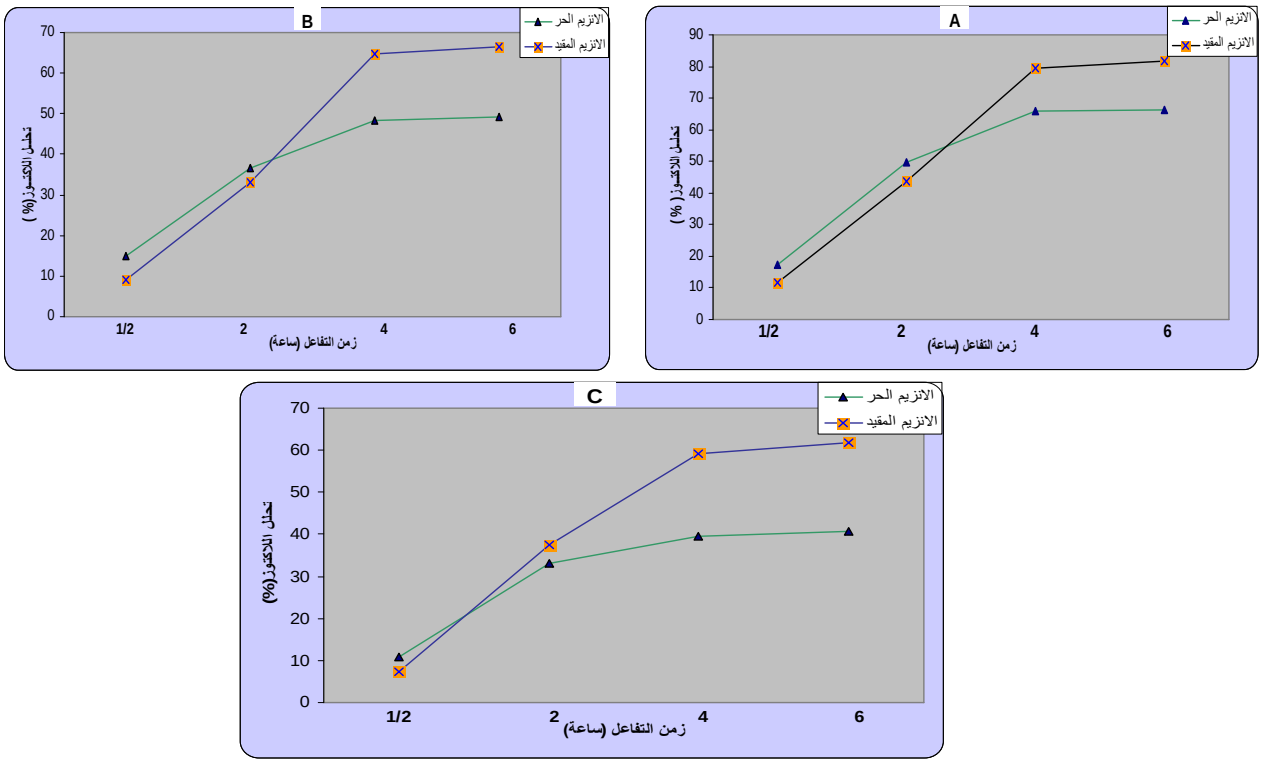
شكل (6)تأثير الخزن على فعالية انزيم البيتاكالاكتوسايديز الحر والمقيد خلال 30 يوم

واتفقت هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي اكدت على تفوق الانزيم المقيد على الحر عند الخزن، فقد لاحظ [13]ان الانزيم المقيد بمادة اكريل امايد المتعدد قد احتفظ بكامل فعالية بعد مرور20 و 30 يوم من الخزن على درجة حرارة 25 و 4 م على التوالي، الا انه فقد 30% من فعاليته بعد مرور 60 يوم بدرجة 4 م في حين فقد الانزيم الحر 60% من فعاليته عند درجة 4 م ولنفس المدة و 27 %عند درجة 25 م ولمدة 20 يوم، كما درس[24] تأثير الخزن على فعالية الانزيم المقيد بدرجة حرارة 4م لمدة 30 يوم اذ لاحظا احتفاظ الانزيم بنسبة 86 %من فعاليته بعد انتهاء مدة الخزن،اما [6] فقد لاحظا ان الفعالية المتبقية للبيتاكالاكتوسايديز المقيد بدرجة حرارة 4 م ولمدة 60 يوماً بلغت 85% للمقيد بينما احتفظ الانزيم الحر بنسبة 35 %من فعاليته عند المدة نفسها، وهذا يؤكد ان تقييد الإنزيمات يؤدي إلى زيادة ثباتيتها عند التخزين.

استعمال الانزيم الحر والمقيد في تحليل سكر اللاكتوز

اذ لوحظ من شكل (A,B,C 7) انه في بداية التفاعل كان الانزيم الحر اعلى من الانزيم المقيد الا ان زيادة مدة التفاعل قد ادت الى ارتفاع نسبة تحلل اللاكتوز للانزيم المقيد مقارنة بالانزيم الحر كما ان اعلى نسبة تحلل للاكتوز المتواجد في دارئ الخلات اذ وصلت الى 66.2 % و 81.54 % وادناها في الحليب الفرز 40.72 % و61.84 % على التوالي ،بينما في الشرش كانت 49.35 % و66.47 % للانزيم الحر والمقيد على التوالي. ان نسبة تحلل اللاكتوز في الشرش والحليب تعتمد على فعالية انزيم البيتاكالاكتوسايديز وتركيزه ورقمه الهيدروجيني ودرجة الحرارة والوقت الذي تستغرقه عملية التحلل ، كما ان ارتفاع نسبة تحلل الشرش مقارنة بالحليب يعود الى كون الرقم الهيدروجيني للشرش يتراوح بين 4.5-5 وهو الرقم الامثل لعمل البيتاكالاكتوسايديز المنقى من عفن *Aspergillus oryzae* مقارنة بالحليب الذي يتراوح رقمه الهيدروجيني بين 6-6.8 [8] ، اما ارتفاع نسبة تحلل اللاكتوز عند استعمال الانزيم المقيد مقارنة بالحر يعود الى الثباتية التي ابداها الانزيم المقيد تجاه الحرارة وكذلك تجاه عملية التثبيط الحاصله نتيجة تحرر الكالاكتوز اثناء التحلل ، وقد اتفقت هذه النتائج مع دراسات مختلفة تناولت دراسة نسبة تحلل اللاكتوز، قام[1] بمعاملة البيتاكالاكتوسايديز المقيد على مادة DEAE-cellulose و الجينات الكالسيوم في تحليل سكر اللاكتوز المحضر في دارئ الفوسفات بتركيز 5 %على درجة حرارة 55 °م لمدة 48 ساعة فحصلوا على نسبة تحلل 92.5 %و 93.7 % الا ان نسبة التحلل انخفضت الى57.1 % و69.7% على التوالي بعد 20 مرة من الاستعمال كما استعمل [16] الانزيم المنتج من خميرة *Kluyveromyces lactis* والمقيد تساهميا في البولي فينايل الكحول polysiloxane polyvinyl alcohol magnetic المنشط بالكلوتريلديهايد في تحليل سكر اللاكتوز في الحليب المنخفض الدهن(الحليب الفرز) فكانت نسبة التحلل 90 % و بدرجة حرارة 25 م ولمدة 120 دقيقة ،كما قام[8] باستعمال البيتاكالاكتوسايديز المنتج من عفن

Aspergillus oryzae المقيد مع الجينات الكالسيوم والنشا في تحليل لاكتوز الحليب والشرش فكانت نسبة التحلل 79 % و 89 % لمدة 4 و 3 ساعات على التوالي بينما كانت نسبة التحلل 70 % و 61 % على التوالي عند استعمال الانزيم الحر تحت نفس الظروف ، وبين [20] ان نسبة تحلل اللاكتوز في الحليب كانت 49 % للانزيم المقيد والمنتج من خميرة *Kluyveromyces marxianus* بدرجة حرارة 40 م ولمدة 4 ساعات.



شكل (7) تحلل اللاكتوز في A: دارئ الخلات B : الشرش C : الحليب الفرز بفعل الانزيم الحر والمقيد عند درجة حرارة 50 م ولمدة 6 ساعات

الاستنتاجات

نستنتج من الدراسة الحالية امكانية تقييد الانزيم تساهميا مع الكايتوسان وبمواصفات نوعية وخزنية جيدة مع انخفاض تاثير التثبيط على الفعالية الانزيمية ، كما أن للإنزيم المقيد كفاءة تحليلية جيدة عند تطبيقة في صناعة الالبان.

المصادر

1-Batra , N. ; Singh, J.;Joshi, A. and Sobti, R.C. Improved properties of *Bacillius coagaulans* β -galactosidase through immobilization . *Engineering in Life Sciences* , 5(4):581.(2005).

2-El-Shora, H. M. Properties and immobilization of urease from leaves of chenopodium album (C3) Bot. Bull. Acad. Sci., 42 : 251(2001).

3-Esawy, M.A.; Mahmoud, D.A.R. and Fattah,A.F.A. Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* , 25(2):237.(2008).

4-Food Chemicals Codex . Committee on food chemicals codex, *Food and Nutrition Board Institue of Medicine of the National Academies* , 998p(1993).

5-Grosova, Z.; Rosenberg,M. ; Gdovin, M. ; Slavikova , L. and Rebroš, M..Production of D-galactose using β -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in poly(vinylalcohol) hydrogel . *Food Chemistry* , 116: 96(2009).

6-Haider , T. and Husain, Q. Concanavalin a layered calcium alginate–starch beads immobilized β- galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. *International Journal of Pharmaceutics*, (359) 1.(2008).

7-Haider, T. and Husain, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by β - galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme . *Chemical Engineering and Processing* , 48 : 576.(2009a).

8- Haider, T. and Husain, Q. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin a layered calcium alginate–starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. *International Dairy Journal* , (19): 172. (2009b).

9- James, N.; Parker, M.D. and Philip, M. P. The official patients sourcebook on lactose intolerance.USA.200p. (2002).

10-Klich, M.A. Identification of common Aspergillus species . 1st Edition. Wageningen ,Nethelands.116p .(2002).

11-Kosseva, M. R.; Panesar, P. S.; Kaur, G. and Kennedy , J. F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*(45): 437.(2009).

12-Lowry, O.H.; Rosobrough, N.; Far, A.L.; and Randall, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* , 193: 265(1951).

13-Makkar, H. P. S. ; Sharma , O. P. and Negi ,S. S. Immobilization and properties of β-D-galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus. Journal Bioscience* , 3 (1): 7(1981).

14-Mariotti,M.P. ; Yamanaka,H. ; Araujo,A.R. and Trevisan,H.C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -Galactosidase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(6):1233(2008).

15-Monsan, P. and Combes, D. "Enzyme stabilization by immobilization", *In*: Mathods in enzymology . Klaus, M.(ed.). Academic Press, Inc., 137(D):584(1988). 16-Neri , D. F.M. ; Balco, V. M.; Carneiro-da-Cunh, M. G. ; Carvalho Jr., L. B. and Teixeira, J. A. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications* , 9 :2334. (2008).

17-Neri, D. F.M. ; Balcão, V. M.; Costa, R. S.; Rocha, I. C.A.P. ; Ferreira, E.M.F.C.; Torres, D. P.M. ; Rodrigues L.R.M. ; Carvalho Jr, L. B. and Teixeira, J. A. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry* , 115: 92.(2009).

18- Nickerson, T. A.; Vujicic, I. F. and Lin, A.Y. Colorimetric estimation o f lactose and its hydrolytic products. *Journal of Dairy Science*, 59: 386(1974).

19- Pan, C.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Ye, H. and Zeng , X. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe3O4–chitosan nanoparticles . *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , 61: 208.(2009).

20- Puri, M.; Gupta , S. ; Pahuja , P. ; Kaur, A. ; Kanwar , R. and Kennedy, J.F. Cell disruption optimization and covalent immobilization of β-D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for lactose hydrolysis in milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 160:98(2010).

21- Smaali, I. ; Rémond, C. ; Skhiri ,Y. and O'Donohue, M. J. Biocatalytic conversion of wheat bran hydrolysate using an immobilized GH43 β-xylosidase. *Bioresource Technology* , 100 : 338(2009).

22- Smith , E.J. Biotechnology.5th Edition , Cambridge Univ. Press. , (2009).

23- Zhang , S. ; Gao, S. and Gao , G. Immobilization of *β*-galactosidase onto magnetic beads. *Applied Biochemistry and biotechnology*, 160:1386(2010).

24-Zhou, Z.K. Q. and Chen, D. X. Immobilization of β-galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde . *Journal of Food Engineering*, 48: 69.(2001).

Study of Immobilization β-galactosidase purified from mold *Aspergillus oryzae* by solid state fermentations and it's applications in some dairy products

Ali K. Jaber Gheyath H. Majeed Alaa J.Abd Al – Manhal
Dept.Food Science , College of Agri., Univ. of Basrah, Basrah -Iraq

SUMMARY

Chitosan was found to be the best immobilizer for β -galactosidase with efficiency 76.60% . Characteristics of the immobilized enzyme was studied , It was found that the best amount of enzyme to chitosan granules was 0.75 ml /0.5 gm, The optimum pH and temperature of the immobilized enzyme were found to be the same as for the free enzyme , however , a wider range of stability of both characters was observed . Immobilized enzyme activity by galactose was decreased in comparison with the free enzyme , The immobilized enzyme was found to retain 71.35% of β-galactosidase activity after 10 fold of use, The stability of the free and immobilized enzyme was studied at different storage periods. It was found that the immobilized enzyme retain all its activity at 5ºC, but about 9% of its activity was lost at 25 ºC ,while the free enzyme lost more than 12% and 29 % of its activity when stored at 5 ºC and 25 ºC respectively for 30 days . It was found that , for both free and immobilized enzyme , the highest hydrolysis of the lactose was when using lactose-acetate buffer solution which reached 66.2% and 81.54% respectively for 6 hours incubation at 50 º C , The lowest hydrolysis was found in in skim milk which were 40.72% and 61.84% , While in the whey it was 49.35% and 66.47% respectively.

Keywords : β-galactosidase , Immobilization, Chitosan , application