مجلة البصرة للعلوم الزراعية ، المجلد ٢٤ ، العدد (١) ،٢٠١١

تنقية وتوصيف انزيم البيتاكالاكتوسايديز المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة

علي خضيرجابر   غياث حميد مجيد   * علاء جبارعبد

قسم علوم الاغذية /كلية الزراعة / جامعة البصرة

البصرة – العراق

الخلاصة

عزلت خمسون عزلة محلية لاعفان من التربة والجبن والشرش واجريت لها عمليات التنقية والغربلة (الاولية والثانوية) وكان عفن *Aspergillus oryzae* هو الاكفأ في انتاج انزيم البيتاكالاكتوسايديز ،تمت تنقية الأنزيم الخام باستعمال التركيزبكبريتات الأمونيوم بنسبة تشبع(65- 80%)ثم التبادل الأيوني باستعمال المبادل الايوني DEAE-sephadex A-50 والترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-100 بعدد مرات تنقية 9.70 مرة وبحصيلة أنزيمية بلغت 25.88% على التوالي، كماوجد ان الانزيم نقي تماما من خلال اظهاره حزمة واحدة ، درست صفات الانزيم المنقى فكان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية ألانزيم هو 5 في حين تراوح المدى الأمثل لثبات الأنزيم بين 4-6.5 ،كماأظهر ثباتاً حرارياً بين20-50 ^{o}م لمدة 15 دقيقة ،وكانت درجة الحرارة المثلى 50 م والتي احتفظ عندها الانزيم بكامل فعاليته عند الحضن لمدة ساعة ، كما بلغت قيمة طاقة التنشيط 6.19 كيلو سعرة / مول في حين بلغت قيمة طاقة مسخ الانزيم 52.31 كيلو سعرة / مول، اما الوزن الجزيئي للانزيم فبلغ 97.72 كيلودالتون باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي بينما بلغ 103.51 كيلودالتون عند استعمال تقنية الترشيح الهلامي، لوحظ أن ايونات المنغنيز والصوديوم لها دور منشط في فعالية الأنزيم بينما انخفضت وبنسب مختلفة عند اضافة المغنيسيوم والنحاس والحديد والكالسيوم مع زيادة التركيز في حين لم تؤثر اضافة البوتاسيوم في الفعالية، كما لوحظ انخفاض الفعالية الانزيمية عند اضافة اليوريا وسكر الكالاكتوز ومع زيادة التركيز في حين حصلت زيادة طفيفة بوجود المركابتوايثانول اما مركب EDTA فلم يكن له تأثير في الفعالية ، كما ان قيم ثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} للإنزيم كانتا 1.435 ملي مولاري و1040.23 وحدة / مل على التوالي عند استعمال ONPG ، تم الكشف عن نواتج تحلل سكراللاكتوز بوساطة تقنية الطبقة الرقيقة TLC اذ ظهر كل من الكلوكوز والكالاكتوز .

الكلمات المفتاحية :انزيم البيتاكالاكتوسايديز ، تنقية ، توصيف

*مستل من اطروحة الدكتوراه

المقدمة

نظرا لأهمية الانزيمات ودورها فقد وصل الانتاج العالمي من الانزيمات الى 53000 طن سنويا تتصدره الدنمارك بواقع 24910 طن كما ان مبيعات الانزيمات الصناعية في العالم لسنة 2009 قد تراوح بين 650-750مليون دولار بعد ان كان اقل من 150 مليون دولار في منتصف السبعينات وبالرغم من ان الانزيمات قد استخلصت على نحو تقليدي من النباتات والحيوانات الا ان انتاجهـا من الاحياء المجهرية قد تزايد بشكل سريع اذ ان 90 %من انتاج الانزيمات مصدره الاحياء المجهرية وتأتي الفطريات الخيطية في الصدارة والتي تعد خزيناً لا ينضب لمختلف انواع الانزيمات التي يربو عددها بحوالي2000-3000 انزيم ،بيد ان المستعملة منها في المجالات المختلفة لا يتجاوز 25 نوعاً اذ تحتل الصناعات الغذائية المرتبة الاولى في الاستعمالات التطبيقية وبنسبـة 45 % في حين ان 6% من الانزيمات مصدرها حيواني و4 % نباتي (21 , 1). يُـعدانزيم البيتاكالاكتوسايديز من الانزيمات المهمة في صناعة الالبان ويوجد في الامعاء الدقيقة للبائن كما لوحظ تواجده في النباتات والاحياء المجهرية و يعمل على تحليل سكراللاكتوز إلى وحداته الاولية من السكريات وهي سكرالكلوكوزوالكالاكتوزونتيجة لذلك تزداد الذوبانية والحلاوة بمقدار اربع مرات وتقل المشاكل الناجمة نتيجة تبلوره في صناعة المثلجات القشطية والالبان المكثفة كما ان للانزيم دور مهم في معالجة ظاهرة عدم تحمل اللاكتوز Lactose intolerance والتي يعاني منهـا اكثر مـن 70 % من سكان العالم(17) لذلك جاءت الدراسة الحالية للاسباب المذكورة اعلاه من خلال انتاج وتنقية الانزيم من عزلة محلية بطريقة تخمرات الحالة الصلبة .

المواد وطرائق العمل

مصادر العزل :عزلت 50 عزلة فطرية من مصادر مختلفة شملت التربة والجبن والشرش واجريت عليها عمليات غربلة اولية وثانوية للوصول الى العزلة الاكفأ انتاجا" لانزيم البيتاكالاكتوسايديز.

انتاج الانزيم : وضع 10 غم من نخالة الحنطة في دورق زجاجي سعة 250 مل ورطبت مع 10 مل من الشرش المزال منه البروتين على درجة 90 م لمدة 5 دقائق ، لقحت بأضافة 1 مل من المعلق البوغي لكل عزلة والذي يحتوي على 10^6 بوغ، حضنت المزارع بدرجة 30 م لمدة 5 أيام .

استخلاص الانزيم:استخلص الأنزيم من الوسط بأضافة 50 مل من دارئ الخلات عند رقم هيدروجيني5 (0.2 مولاري)الى الوسط واجري التحريك باستعمال الهزاز بسرعة150 دورة /الدقيقة

عند درجة 30 م لمدة ساعة بعدها رشح المستخلص خلال قطعة شاش نظيفة ونبذ الراشح بسرعة 6200 xg ولمدة 20 دقيقة وفي ظروف مبردة اخذ الرائق الذي يمثل المستخلص الخام للأنزيم .

تقدير فعالية الأنزيم: اتبعت الطريقة الموصوفة في (3) لتقدير فعالية ألانزيم , وعرفت وحدة الفعالية للانزيم البيتاكالاكتوسايديز (Unit) بانها كمية الانزيم التي تحرر 1 مايكرومول من ONP في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التفاعل.

تقدير البروتين : اتبعت طريقة (11) .

تنقيةالانزيم:اجريت تنقية الانزيم بعدة خطوات تمثلت الخطوة الاولى بالتركيز بكبريتات الامونيوم(80%) ثم عملية الديلزة ضد دارئ الخلات (pH 5,0.01M) ولمدة 48 ساعة بعدها التبادل الايوني باستعمال المبادل الايوني DEAE Sephadex A-50 على عمود ذو ابعاد (2.5×34 cm) واخيرا بالترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-100 بابعاد 86×2.5) . cm)

تحديد نقاوة الانزيم اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد تبعاً لطريقة (9).

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثباتيةالأنزيم :حضرت المادة الاساس الصناعية(Orthro-Nitrophenyl-B-D-galactopyranoside) بارقام هيدروجينية(2−8)،اما الثبات قدر بمزج حجوم متساوية من الأنزيم مع المحاليل الدارئة وحضنت في حمام مائي بدرجة حرارة 37م لمدة 60 دقيقة.

تعيين درجة الحرارة المثلى وطاقة التنشيط والثبات الحراري للانزيم :قدرت الفعالية على مدى حراري (20-80)°م وحسبت طاقـــة التنشيط وفقـــا" لمعادلـــة ارينيوس باستخراج الميل Slope (19) وقدرالثبات الحراري للانزيم المنقى بدرجات حرارة 20-90 م مدة 15 دقيقة.

تقدير الوزن الجزيئي :قدر الوزن الجزيئي بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود المادة الماسخة SDS - PAGE الموصوفة من قبل (4) و طريقة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-200 استعملت بروتينات قياسية وهي : كلوكوز اوكسيديز والبومين المصل البقري والبابابن والببسين واللايسوزايم والتي اوزانها الجزيئية هي 160 و67 و45 و34 و14.4 كيلودالتون على التوالي.

دراسة تأثير بعض العناصر المعدنية والمركبات في فعالية الانزيم : درس تاثير بعض الايونات الفلزية (Ca , Cu, Mn , Fe , Mg, Na, K) بتركيز 5 و 10 ملي مولاري والكواشف (EDTA , Urea, 2 – mercapto ethanol)بتركيز1 و 5 ملي مولاري وحسب طريقة (2)

، كما درس تأثير اضافة سكر الكالاكتوز بتركيز 1% و5 %وحسب طريقة (6) على الانزيم.

تقدير الثوابت الحركية :استعملت معادلة Line weaver-burk plot لتقديرالثوابت الحركية بتركيز (1-21)ملي مولاري من ONPG .

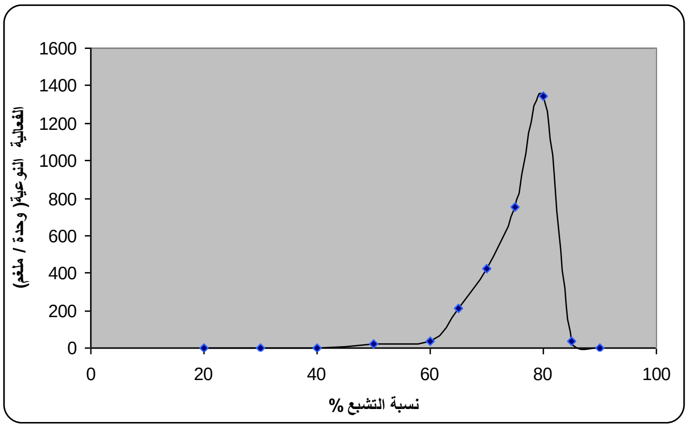
كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) للكشف عن تحلل اللاكتوز بفعل انزيم البيتاكالاكتوسايديز ستعملت حسب الطريقة المتبعة من قبل (24).

النتائج والمناقشة

اجريت عمليات العزل والغربلة للوصول الى العزلة الفطرية الاكفأ في انتاج الانــزيم فكانــت العزلة التي تم تشخيصها على ضوء المفاتيح التشخيصية الواردة في (8) وتبــين انهــا عفــن *Aspergillus oryzae* ، اجري انتاج الانزيم بواسطة هذه العزلة بطريقة تخمــرات الحالــة الصلبة.

تنقية الانزيم : نقي الانزيم بعدة خطوات وهي :

1- الترسيب بكبريتات الامونيوم : يبين شكل (1) خطــوة الترسيب التدريجي للأنزيم من المستخلص الخام إذ يلاحظ حدوث ارتفاع واضح بشكل تدريجي للفعالية النوعية للأنزيم في الراسب الناتج رافقه انخفاض ملحوظ في الفعالية النوعية للأنزيم في الراشح الناتج لغاية نسبة إشباع 80% والتي بلغت عندها اقصى فعالية نوعية للانزيم في الراسب ، اعقبتها عملية الديلزة للراسب (المذاب بدارئ الخلات) الناتج للتخلــص مــن امــلاح كبريتات الامونيوم مــقابل محلول الخلات الــدارئ، وقد أعطت هذه الخطوة فعالية نوعية مقدارها 1093.21 وحدة / ملغم بعدد مرات تنقية 3.29 مرة وحصيلة أنزيمية بلغت 55.16% عند استعمال نسب إشباع تراوحت بيــن 65-80% (جدول 1).

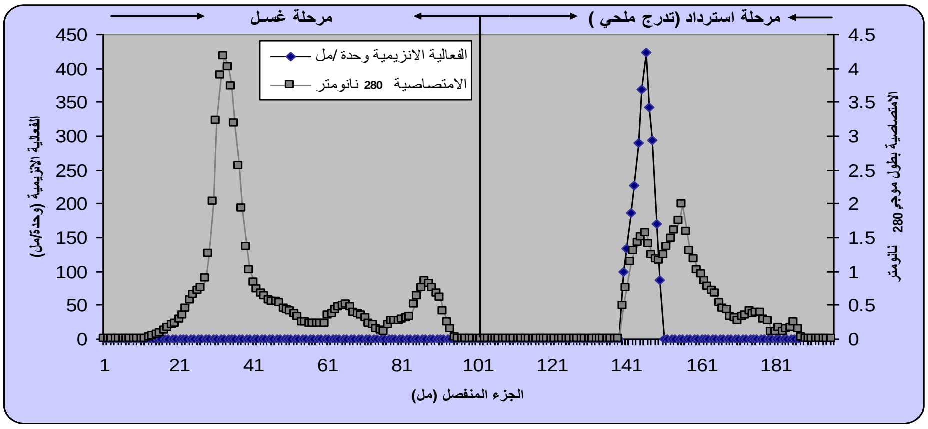


شكل (1) الترسيب التدريجي للبيتاكالاكتوسايديز من المستخلص الخام بأستعمال نسب إشباع (20 - 90)%.

اتفقت النتائج مع ما توصل إليه (20) اذ باستعمالة نسبة تشبع 90 % من كبريتات الامونيوم يمكن من الحصول على فعالية نوعية 3.07 وحدة / ملغم لترسيب الأنزيم المستخلص من عفن *Rhizomucor* sp. وبعدد مرات تنقية 1.5 مرة ، بينما تباينت النتائج مع ماتوصل اليه (2) اذ استعمل نسبة تشبع 30-65% لترسيب الانزيم المنتج من بكتريا *Bacillus stearothermophilus*بفعالية نوعية 80.3 وحده/ملغم وبعدد مرات تنقية 12.4 مرة وبحصيلة انزيمية 73.6% ، وقد يعود سبب التباين الى اختلاف المصدر الميكروبي.

2- التبادل الايوني

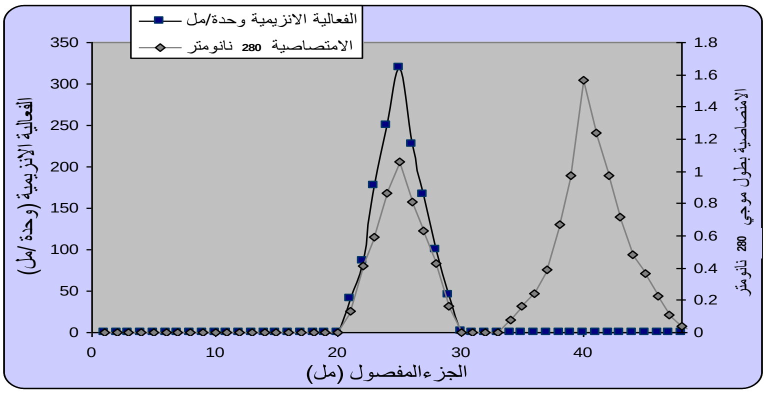
مرر المحلول الأنزيمي بعد التركيز بكبريتات الامونيوم على المبادل الايوني-DEAE Sephadex A-50 ، إذ يبين شكل (2) ظهور قمم بروتينية في منطقة الغسل خالية من الفعالية الأنزيمية ذات شحنة موجبة، وظهور عدة قمم بروتينية في مرحلة الاسترداد وقمة واحدة ذات فعالية انزيمية تطابقت تقريبا مع أحدى القمم البروتينية، وهذا يشير إلى احتواء المستخلص الأنزيمي علىبروتينات أخرى مشابهة في الشحنة ولكنها تختلف عنها بمحصلة الشحنة وكثافتها مما يؤدي إلى تباين قوة ارتباطها بمادة المبادل وانفصالها عنه بسبب تأثير القوة الملحية المتدرجة من كلوريد الصوديوم بتراكيز تراوحت من(0-1) مولاري،اذ بلغت الفعالية النوعية للجزء المسترد 1734.47 وحدة /ملغم بعدد مرات تنقية 5.23 مرة وحصيلة أنزيمية مقدارها 38.56%(جدول 1).



شكل (2) كروماتوكرافيا التبادل الايوني لتنقية البيتاكالاكتوسايديز من عفن A_9 *Aspergillus oryzae* باستعمال عمود المبادل الايوني (DEAE Sephadex A-50) بابعاد (2.5 × 34) سم الموازن بدارئ خلات الصوديوم بتركيز (0.01) مولاري ورقم هيدروجيني (5) بمعدل جريان (30 مل/ساعة) بواقع 5 مل /جزء .

3-الترشيح الهلامي

اعقبت الديلزة وتركيز الانزيم بجهاز التجفيد (freeze drier)خطوة الترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephadex G-100 ، اذ يبين شكل (3) ان اجزاء الاسترداد تضمنت قمتان بروتينية احداهما وهي الاولى احتوت على فعالية انزيمية اما الاخرى فكانت خالية تماماً من اي فعالية وان قمة الفعالية مطابقة الى حد كبير لقمة البروتين الاولى، وان مطابقة منحنى الفعالية والبروتين الى هذا الحد تعد احد الدلائل الاولية للنقاوة (28) ، وكانت الفعالية النزعية للانزيم 3216.12 وحدة / ملغم (الجدول 1), وبحصيلة بلغت 25.88% اما عدد مرات التنقية فكانت 9.70 مرة .



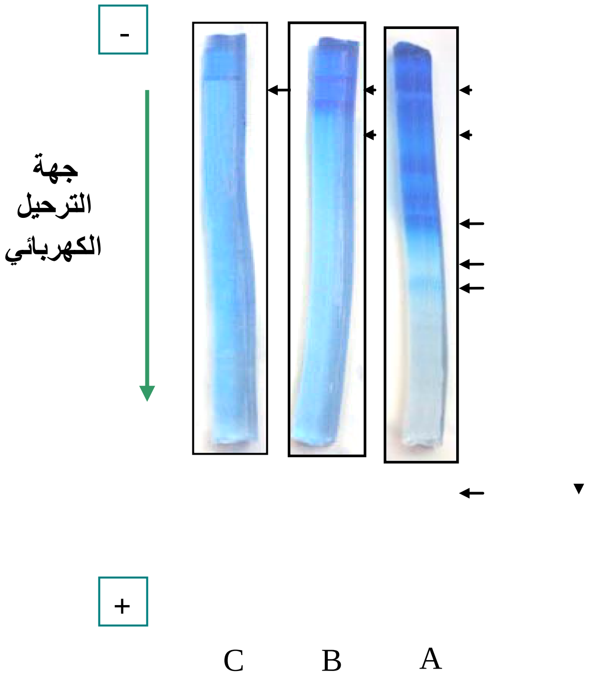
شكل(3)كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي لتنقية البيتاكالاكتوسايديز المنتج من عفن A_9 *Aspergillus oryzae* باستعمال عمود Sephadex G-100 بابعاد(2.5 × 86)سم الموازن بدارئ خلات الصوديوم بتركيز 0.05 مولاري ورقم هيدروجيني 5 بمعدل جريان 30 مل/ساعة بواقع 5 مل/جزء.

جدول (1) خطوات تنقية البيتاكالاكتوسايديزالمنتج من عفنA_9 ***Aspergillus oryzae***

خطوة التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة /مل)	تركيز البروتين (ملغم /مل)	الفعالية النوعية (وحدة /ملغم)	الفعالية الكلية	عدد مرات التنقية	الحصيلة 100%
المستخلص الخام	200	248.52	0.75	331.36	49704	1	100
التركيز بملح الامونيوم بنسبة أشباع 65-80% والديلزة	38	721.52	0.66	1093.21	27417.76	3.29	55.16
التبادل الايوني بأستعمال DEAE Sephadex A-50	65	294.86	0.17	1734.47	19165.9	5.23	38.56
الترشيح الهلامي G-100	50	257.29	0.08	3216.12	12864.5	9.70	25.88

تعيين نقاوة الانزيم

يبين شـــكل(4) خطوات تنقية الأنزيم، إذ يمثل الهلام A حركة المستخلص الأنزيمي الخام والتي ظهرت بشكل حزم بروتينية عديدة في هلام متعدد الاكريل امايد، بينما يلاحظ ظهور حـــزمتين بروتينيـــة في الهلام B والـــذي يمثـــل الجـــزء المـــستحصل عليـــه بعـــد خـــطوة التبـــادل الايونـــي ، في حين يمثل الهلام C الجزء المستحصل عليه بعد خطوة الترشيح الهلامي، إذ يلاحظ ظهور حزمة بروتينية مفردة وهذا يعطي صورة واضحة على مدى كفاءة عمليات التنقية الهادفة للتخلص من كل البروتينات المرافقة للأنزيم في المستخلص الخام والحصول عليه بشكل مفرد مما يدل على النقاوة العالية للأنزيم (19).



A: المستخلص الخام

B: الانزيم بعد المبادل الايوني

C: الانزيم بعد الترشيح الهلامي

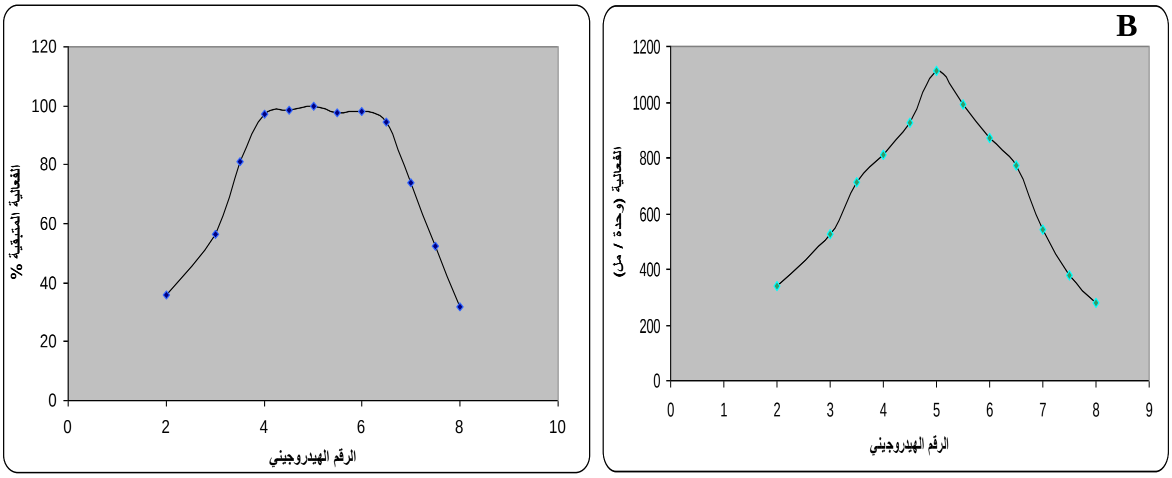
شكل (4) الترحيل الكهربائي باستعمال الهلام المتعدد الاكريل امايد للأنزيم في خطوات التنقية

توافقت النتائج المستحصل عليها مع ماتوصل اليه (14) اذ تمكنا من الحصول على حزمة بروتينية واحدة باستعمال طريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد عند التأكد من نقاوة الأنزيم المستحصل عليه من عفن *Aspergillus niger* .

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثباتية الإنزيم

بينت النتائج الموضحة في شكل (5) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية كان 5 اذ ظهرت أعلى فعالية للأنزيم عند هذا الرقم،وكانت هذه النتائج مقاربة لماتوصل إليه(20) للانزيم المستخلص من عفن *Rhizomucor* sp. اذ ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم كان 4.5 ، كما اشار(18) الى ان افضل فعالية انزيمية عند رقم هيدروجيني 5.2 من عفن *Aspergillus japonicus* كذلك ذكر (14) بأن افضل فعالية انزيمية كانت عند الرقم الهيدروجيني 4 , وأن سبب الانخفاض في فعالية البيتاكالاكتوسايديز في المدى القاعدي الأعلى و المدى الحامضي الأعلى يعود لتأثير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في المجاميع القابلة للتأين الموجودة في الموقع الفعال، أو حدوث تغيير في المادة الاساس للتفاعل ، أو نتيجة لحدوث تغيير في الحالة الأيونية لمواد التفاعل التي تشمل معقد الأنزيم مع المادة الاساس (ES) و معقد الأنزيم مع نواتج التفاعل (EP) (28). كما تم تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم، اذ اظهرت النتائج الموضحة في شكل (B 5) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الإنزيم يتراوح بين 4-6.5 إذ احتفظ الإنزيم بكامل فعاليته تقريبا عند

حضنه في هذا المدى من الارقام الهيدروجينية في حين فقد الإنزيم اكثر من 65% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني القاعدي8 ، ولوحظ هبوط في الفعالية الإنزيمية عند القيم الهيدروجينية الحامضية العالية إذ احتفظ بنسبة 35.99% و56.2% من فعاليته عند الارقام الهيدروجينية 2 و 3على التوالي , وقد يعود سبب الانخفاض في الفعالية عن القيم الهيدروجينية الحامضية أو القاعدية الى حدوث تغيرات في التركيب الثانوي والثالثي لجزيئة الانزيم علاوة على تغير الحالة الايونية للموقع الفعال للانزيم (10). فضلا عن مصدر الإنزيم والطبيعة الكيميائية للمحلول الدارئ والتي تعد من العوامل المهمة التي تؤثر في تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم (19). تباينت نتائج الدراسات في تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الإنزيم , اذ وجد (20) ان الانزيم المستخلص من عفن *Rhizomucor* sp. ذو مدى واسع للثبات تراوح بين 3-8 بدرجة حرارة 4 م ولمدة 24 ساعة غير انه فقد 30 % من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 9 اما (7) فقد ذكروا ان الانزيم المنتج من عفن *Aspergillus niger* ذو ثبات عند رقم هيدروجيني 3-6 ولمدة 5 ايام بدرجة حرارة 25 م.

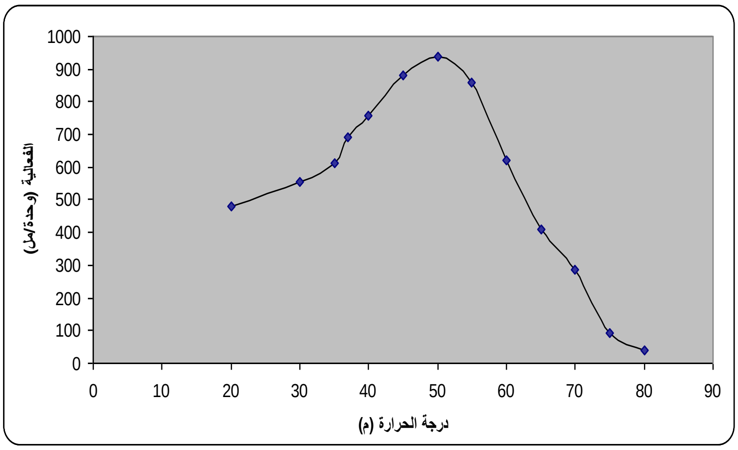


شكل (5) تاثيرالرقم الهيدروجيني في فعالية وثباتية البيتاكالاكتوسايديز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae*

تأثير درجة الحرارة في فعالية وثباتية البيتاكالاكتوسايديز

يشير شكل (6) إلى حصول زيادة واضحة في الفعالية الأنزيمية بازدياد درجة حرارة التفاعل حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 50 م ، ثم انخفضت الفعالية بشكل تدريجي حتى وصلت الى 4.44% من فعالية الأنزيم القصوى عند درجة حرارة 80 م، يؤدي ازدياد درجات الحرارة إلى حصول تغييرات واضحة في مكونات التفاعل التي تضم كل من الأنزيم والمادة الأساس(27)،مما

يؤدي إلى حصول زيادة مستمرة في الفعالية بسبب زيادة فرصة حدوث التصادمات (Collisions) نتيجة لزيادة الطاقة الحركية (Kinetic Energy) لجزيئات المواد المتفاعلة بفعل تأثير درجات الحرارة، إلا أن ازدياد درجة الحرارة عن الدرجة الحرارية المثلى للتفاعل تؤدي إلى حدوث انخفاض في الفعالية الأنزيمية بسبب تأثيرها بشكل سلبي في مكونات التفاعل (28). اما انخفاض الفعالية الانزيمية الشديد عند الدرجات الحرارية العالية فانه قد يعود إلى امتصاص الجزيئات المتفاعلة لطاقة عالية مما يؤدي إلى تغيير التركيب الثالثي للانزيم ومن ثم مسخه وفقدانه لجزء من فعاليته (19).



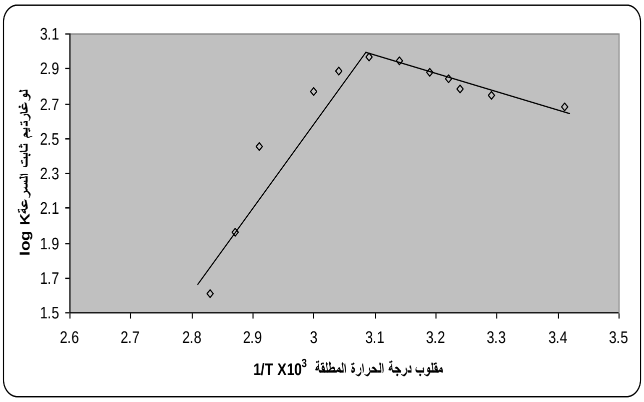
شكل (6)تاثير درجة الحرارة في فعالية البيتاكالاكتوسايديز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae*

كانت نتائج هذه الدراسة متقاربة مع ماذكره (18) فقد وجد ان الدرجة الحرارية المثلى للأنزيم المستخلص من عفن *Aspergillus japonicus* هي 45 م ، كما لاحظ كل من (6) ان اقصى فعالية انزيمية للانزيم المنقى من عفن *Aspergillus oryzae* عند 50 °م، اشار (26) الى ان افضل فعالية انزيمية للبيتاكالاكتوسايديز المستخلص من بكتريا *Streptococcus thermophilus* وبكتريا *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* عند درجة حرارة 50 و 45 °م كل بكتريا على حده وكذلك عند استعمال الجنسين معا" على التوالي.

تعيين طاقة التنشيط

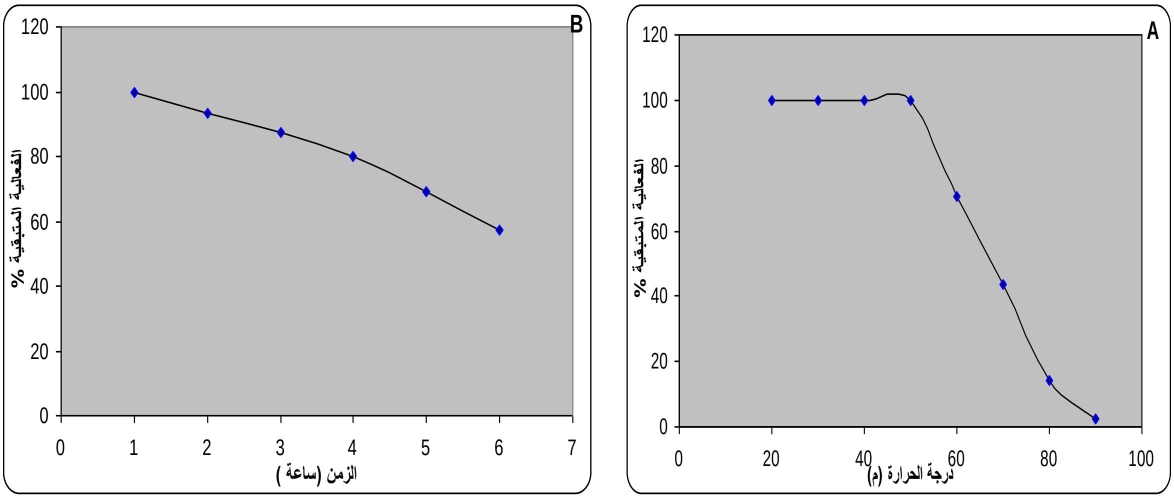
يظهرشكل (7) العلاقة بين لوغاريتم سرعة تفاعل أنزيم البيتاكالاكتوسايديز ومقلوب درجة الحرارة المطلقة وقد بلغت قيمة طاقة التنشيط (Activation Energy) اللازمة لتحويل المادة الأساس إلى ناتج 6.19(كيلوسعرة / مول)، إذ تعد هذه القيمة

ضمن المدى المعروف لقيم طاقة التنشيط (Ea) لتفاعلات تحويل المادة الأساس إلى ناتج وتقع بين (6 - 15) كيلوسعرة / مول (28). تشابهت هذه النتائج مع نتائج دراسة (13) من أن قيمة طاقة التنشيط للأنزيم المنقى من خميرة *Kluyveromyces lactis* قد بلغت 25.5 كيلوجول / مول (6.09 كيلوسعرة /مول)، وتجدر الاشارة الى ان قيمة طاقة التنشيط تعطي فكرة عن كفاءة عمل الأنزيم في تحويل المادة الأساس إلى ناتج، فكلما كانت هذه القيمة واطئة كلما كان الأنزيم ذو كفاءة اكبر في تحويل المادة الأساس ومن ثم الإسراع في إنجاز التفاعل (28)، اما طاقة مسخ الانزيم فكانت 52.31 كيلو سعرة / مول وتعطي هذه القيمة فكرة عن مدى ثباتية الانزيم بدرجات الحرارة العالية فكلما كانت هذه القيمة عالية كان الانزيم اكثر ثباتاً تجاه الحرارة وتتراوح قيمة طاقة مسخ الانزيم لمعظم التفاعلات الانزيمية بين 40 – 150 كيلو سعرة / مول (27). وجد(26) ان طاقة مسخ الانزيم الخام لبكتريا *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* وخليط من المزرعتين كانت 48.3 , 44 , 51.3 كيلو سعرة /مول على التوالي.



شكل (7) منحنى ارينوس لتقدير طاقة التنشيط لانزيم البيتاكالاكتوسايديز

أظهرت نتائج حضن البيتاكالاكتوسايديز بدرجات حرارية تراوحت بين 20-90 م مدة 15 دقيقة ان الإنزيم احتفظ بكامل فعاليته بدرجات حرارة تراوحت بين 20-50 م ، بعدها انخفضت الفعالية الانزيمية تدريجيا وفقد 25% من فعاليته على 60 °م وفقد 97% من فعاليته على 90 °م ، كما لوحظ ان الإنزيم المنقى احتفظ بكامل فعاليته عند الدرجة الحرارية المثلى 50 م مدة 60 دقيقة بينما فقد 42.98% من فعاليته لمدة 6 ساعات عند الدرجة المثلى (شكل8) .



شكل (8) الثبات الحراري للبيتاكالاكتوسايديز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* A_9

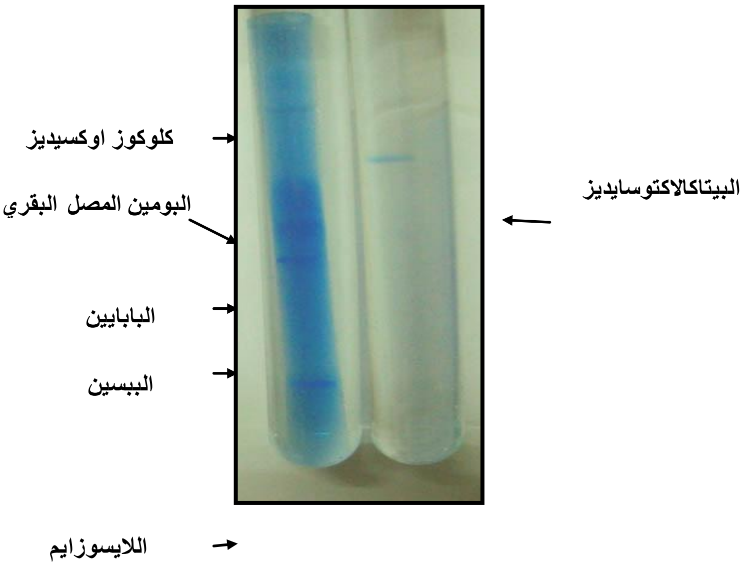
تباينت الدراسات في تحديد الثبات الحراري للبيتاكالاكتوسايديز وذلك حسب مصدر الإنزيم ، واشار(20) الى ان الانزيم احتفظ بنسبة 67 %من فعاليته عند الدرجة الحرارية المثلى ولمدة 50 دقيقة، كما لاحظ (25)ان الإنزيم المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بدرجة حرارة 60 م لمدة ساعتين.

ويذكر ان درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم ليست صفة ثابتة للانزيم كونها تعتمد على الظروف التجريبية المستعملة وان انخفاض ثبات الانزيم عند اطالة المدة الزمنية لتفاعل الانزيم في هذة الدرجة نتيجة تاثير درجة الحرارة في تركيب الانزيم ، وكلما ازدادت المدة الزمنية زاد معها التاثير، ودرجة الحرارة المثلى الحقيقة للانزيم هي اعلى درجة يمكن ان يبقى فيها الانزيم محتفظا" بفعاليته خلال مدة من الزمن على الاقل اطول من المدة التي يتم فيها تقدير فعالية الانزيم في الحالة الاعتيادية . (19, 28)

تعيين الوزن الجزيئي

يوضح شكل(9) الترحيل الكهربائي للبروتينات القياسية والبيتاكالاكتوسايديز قيد الدراسة بوجود SDS،اذ قيست الحركة النسبية Rm للبيتاكالاكتوسايديز ومن خلال هذه القيمة أمكن تحديد الوزن الجزيئي من لوغارتيم الوزن الجزيئي تحت الظروف نفسها وكان مساويا لــ 97.72 كيلودالتون، وتختلف قيمة الوزن الجزيئي للبيتاكالاكتوسايديز تبعاً لمصدر هذا الانزيم كما ان تقدير الوزن الجزيئي بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة تعطي الوزن الجزيئي للوحدة الواحدة من جزيئة الأنزيم والتي تظهر بشكل حزمة بروتينية واحدة وهذا ماكده (12) بان الانزيم المنتج من عفن *Penicillium chrysogenum* ظهر بحزمة واحدة وله اربع وحدات متشابهة

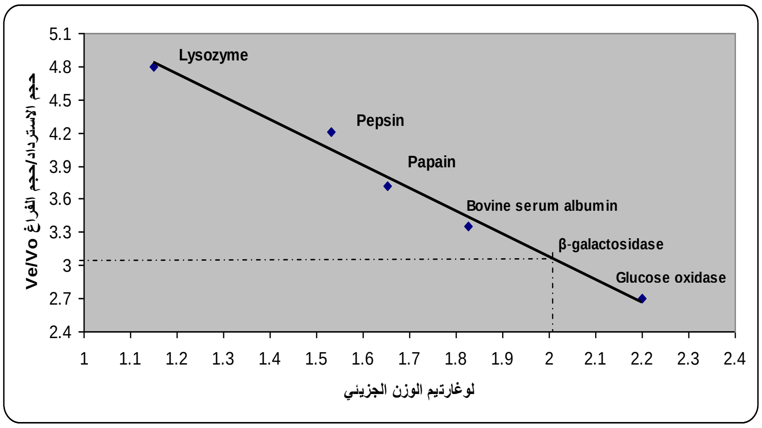
بوزن جزيئـــي 66 كيلودالتون لكـــــل وحـــــدة اما (25) فقد اكـــــد عـــلى ان الانزيم المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* باستعمال طريقة الترحيل الكهربائي وبوجود العوامل الماسخة اظهر حزمة واحدة ومكون من وحدة واحدة فقط(Monomeric protein) وبوزن جزيئي 113 كيلو دالتون ، كذلك وجد (14) ان الانزيم المنتج من عـــفن *Aspergillus niger* له حزمة واحدة ومكون من وحدة واحدة ايضا" وبوزن جزيئي 129 كيلودالتون .



شكـــل (9) الوزن الجزيئي للبيتاكالاكتوسايديز المقدر بتقنية الترحيل الكهربائي بوجود SDS

كما قدر الوزن الجزيئي للأنزيم بطريقة الترشيح الهلامي الـــدكستران الازرق (Blue Dextran 2000) و ذلك لتعيين حجم الفراغ بين الحبيبات (**V_o**) Void Volume كمـــا تـــم تعيين حجوم استرداد البروتينات القياسية المستعملة (**V_e**) Elution Volume، ومن العلاقـــة الخطية التي تمثل النسبة بين Ve/Vo من جهة ولوغارتيم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية من جهة أخرى (شكل 10) وبعد حساب النسبة بين حجم استرداد كل بروتين الـــى (**V_o**) تـــم تحديد الوزن الجزيئي للأنزيم والذي بلغ 103.51 كيلودالتون ، وهذه القيمة تعادل تقريبا القيمة المقدرة بطريقة الترحيل الكهربائي البالغة 97.72 كيلودالتون مما يشير إلى ان الإنزيم المنتج في هذه الدراسة يتالف من وحدة واحدة فقط ,واتفقت هذه النتيجة مع دراســـة (23) اذ وجـــدوا ان انزيم البيتاكالاكتوسايديز المنتج مـــن عـــفن *Aspergillus oryzae* يمتلك وزن جزيئي 105 كيلودالتون باستعمال طريقة الترشيـــــح الهلامـــي ، بينمـــا ذكـــر(12) ان الـــوزن الجزيئـــي للبيتاكالاكتوسايديز المنتج من عفن *Penicillium chrysogenum* والمعين بطريقة الترشيح الهلامي (Sephadex G-200) بلغ 270 كيلودالتون،اما (14) فقد ذكرا ان للبيتاكالاكتوسايديز المنتج من عفن *Aspergillus niger* وزن جزيئي بلغ 123 كيلودالتون باستعمال الترشـــيح

الهلامي ، ومن الجدير بالذكر إن الوزن الجزيئي للبيتاكالاكتوسايديز يختلف باختلاف المصدر، وطريقة التقدير .



شكــل (10) المنحنى القياسي للبروتينات القياسية لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم البيتاكالاكتوسايديز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* بطريقة الترشيح الهلامي Sephadex G-200.

تأثير الايونات المعدنية والمركبات في فعالية الانزيم

يوضـــح جدول (2) تأثيــر عـــدد من الايونات المعدنية في فعالية البيتاكالاكتوسايديز المنقى التي شملت كل من $MnCl_2$ و $CuCl_2$ و $FeCl_2$ و $MgCl_2$ و $CaCl_2$ و NaCl و KCl بتركيز 5و 10 ملي مولاري، إذ يلاحظ أن المنغنيز والصوديوم كان لهما دورا" منشطا" في فعالية الأنزيم عند كلا التركيزين مقارنة بالانزيم غير المعامل، اذ بلغت الفعالية المتبقية 107.80 و 104.84 % على التوالي عند تركيز 10 ملي مولاري، بينما انخفضت الفعالية المتبقية وبنسب مختلفة عند استعمال المغنيسيوم والنحاس والحديد والكالسيوم مع زيادة التركيز في حين لم تؤثر اضافه البوتاسيوم في الفعالية الانزيمية المتبقية .

جدول (2) تأثير الايونات المعدنية في فعالية البيتاكالاكتوسايديز

المواد الكيميائية	التركيز (ملي مولاري)	الفعالية المتبقية (%)
إنزيم غير معامل (control)	0	100
$MnCl_2$	5	100.92
	10	107.80
$CuCl_2$	5	77.88
	10	38.73
$FeCl_2$	5	95.16
	10	58.22
$MgCl_2$	5	90.14
	10	82.92
$CaCl_2$	5	96.65
	10	89.47
NaCl	5	101.02
	10	104.84
KCl	5	99.32
	10	100.41

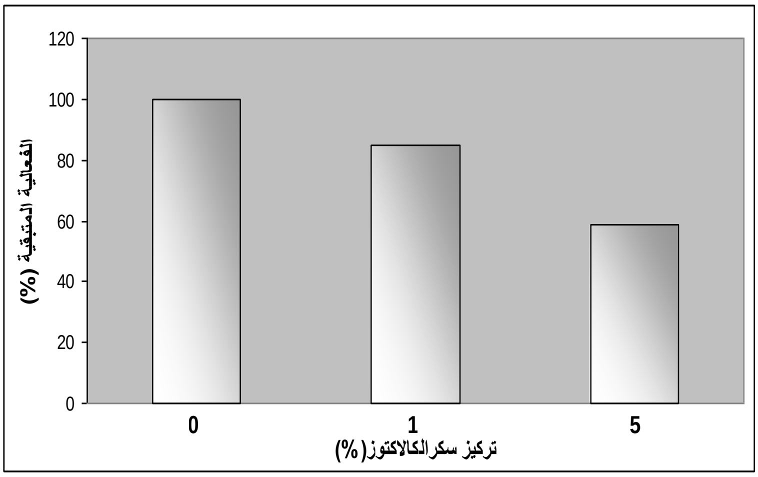
اتفقت النتائج المشار إليها مع دراسات اخرى فقد اشار (20) الى ان اضافة الايونات ثنائية التكافؤ والتي تشمل Zn^{+2} و Ni^{+2} و Hg^{+2} و Fe^{+2} و Ca^{+2} و Mn^{+2} و Mg^{+2} و Cu^{+2} للانزيم المنقى من عفن *Rhizomucor* sp. قد ادت الى انخفاض الفعالية وبنسب مختلفة عدا الكوبلت فقد زادت الفعالية عند اضافته بنسبة 33 %، لاحظ (3) بأن إضافة أيون المغنيسيوم والبوتاسيوم بتركيز 10 ملي مولاري والمنغنيز بتركيز 2 ملي مولاري ادى الى زيادة فعالية الانزيم المنقى من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* في حين انخفضت الفعالية الانزيمية باضافة Ca^{+2} و Cu^{+2} و Fe^{+2} و Pb وبتراكيز مختلفة ،بينما وجد(26) عند دراستهم تاثير الايونات المعدنية بتراكيز 1-10 ملي مولاري على فعالية البيتاكالاكتوسايديز الخام المنتج من بكتريا *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* وخليط من المزرعتين اذ لوحظ حصول تثبيط للانزيم باضافة Zn^{+2} و Cu^{+2} و Ca^{+2} في حين زادت الفعالية بوجود Mg^{+2} و Mn^{+2}. اما تأثير العوامل المعدنية الرابطة والتي تلعب دوراً كبيراً في تثبيط فعالية الأنزيمات التي يشكل فيها أيون المعدن جزءاً أساسياً من تركيب الموقع الفعال أو تلك الأنزيمات التي تحتاج في عملها إلى وجود هذا الأيون لأتمام فعلها على اكمل وجه ،اذ يبين جدول (3) حصول زيادة طفيفة في نسبة الفعالية الأنزيمية عند اضافة المركبتوايثانول، إذ ازدادت الفعالية الأنزيمية بمقدار 0.93% بتركيز 1 ملي مولاري الا ان زيادة التركيز الى 5 ملي مولاري تسبب في انخفاض الفعالية ،ان الارتفاع الطفيف في فعالية الانزيم يعود الى احتمال اشتراك مجاميع السلفهايدرل في الموقع الفعال في تحفيزالانزيم او

فـــــي الاقل اهميتها فـــــي المحافظة عـــلى التركيب الفراغي للبروتين ، اما مركب EDTA فلم يؤثر في الفعالية الانزيمية عند تركيز 1و 5 ملي مولاري وهذا يثبت ان البيتاكالاكتوسايديز ليس من الانزيمات المعدنية Metalo enzyme الذي يشكل فيها أيون معدن معين جزءً أساساً ومهماً في تحفيز فعاليتها اذ أن EDTA من العوامل المخلبية Chelating agents التي تعمل على انتزاع ايونات المعادن من جزيئات الانزيم من خلال تكوين معقدات معها يؤدي بالتالي الى تثبيط الفعالية ،بينما حصل انخفاض في الفعالية الأنزيمية عند استعمال اليوريا ومع زيادة التركيـــز اذ وصلت الفعالية الانزيمية المتبقية 50.30 % ، وهذا قد يعود الى كون اليوريا تعد احـــد عوامل المسخ التي تؤدي الى تدمير الشكل الطبيعي للبروتين عن طريق تكوين اواصر هيدروجينية بالاضافة الى الاواصر الببتيديـــة ممـــــا يفقـــد استقراريـــة البنـــاء الثانـــوي للبـــروتين وهـــذا ماأكـــده (5) عنـــد اضافـــة اليوريا بتركيز 1-5 % الى انزيم البيتاكالاكتوسايديز المنقى من عفن *Aspergillus oryzae* اذ فقد الانزيم كامل فعاليته عند تركيز 5% ولمدة ساعتين .

جدول (3) تأثير بعض المركبات المختزلة والكلابية في فعالية البيتاكالاكتوسايديز

المواد الكيميائية	التركيز (ملي مولاري)	الفعالية المتبقية (%)
إنزيم غير معامل (control)	**0**	**100**
EDTA	**1**	**99.53**
	5	**98.23**
2-mercaptoethanol	**1**	**100.93**
	5	**94.54**
Urea	**1**	**78.32**
	5	**50.30**

اما سكر الكالاكتوز والمبين تاثيره في شكل (11) انه بزيادة تركيـــز الســـكر تـــنخفض الفعاليـــة الانزيمية اذ فقد الانزيم اكثر من 41 % من فعاليته عند تركيز 5 % وهذا يدل على ان الكالاكتوزهو مثبط للانزيم . ذكـــر (16) عند دراستهم لتـــاثير التثبـــيط بســـكر الكـــالاكتوز علـــى فعاليـــة انـــزيم البيتاكالاكتوسايديز المنقى من عفن *Aspergillus oryzae* انه بزيادة تركيز المادة الاســـاس (ONPG) فان تاثير المثبط سوف يقل ، وقد اظهرت البحوث التي اجريت في هذا المجـــال ان البيتاكالاكتوســـايديز يثبط تنافسيا بسكر الكالاكتوز (13, 7) .

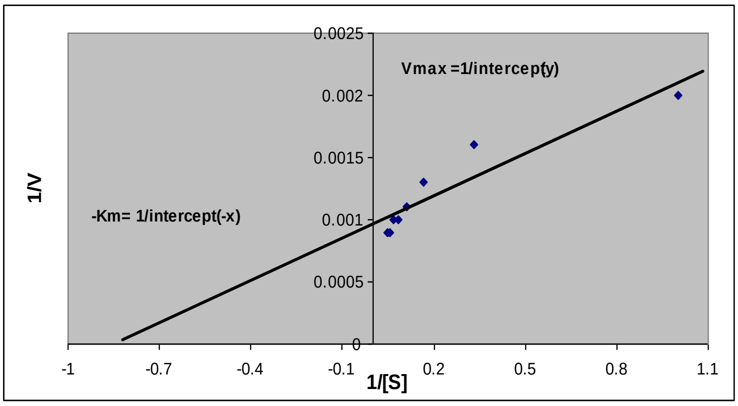


شكل (11) تأثير اضافة تراكيز مختلفة من سكر الكالاكتوز في الفعالية الانزيمية للبيتاكالاكتوسايديز المنقى من عفن *Aspergillus oryzae* A$_9$

جاءت هـذه النتائج متوافقة لمـا أشـار إليـه (23) بان EDTA والمركبتوايثانول لم يؤثران في فعالية انزيـم البيتاكالاكتوسايديز من عفن *Aspergillus oryzae* عند اضافتهم بتركيز10 ملي مولاري كما لاحظ حصول انخفاض في الفعالية الانزيمية عند اضافة سكر الكالاكتوز بتركيز 0.1 مولاري كما اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره (3) بحصول زيادة بالفعالية الانزيمية للبيتاكالاكتوسايديز عند اضافة المركبتوايثانول وبتركيز 1 ملي مولاري كما ان EDTA قد اظهر انخفاضا طفيفا في الفعالية الانزيمية اذ احتفظ الانزيم بنسبة 97.4 % من فعاليته .

الثوابت الحركية

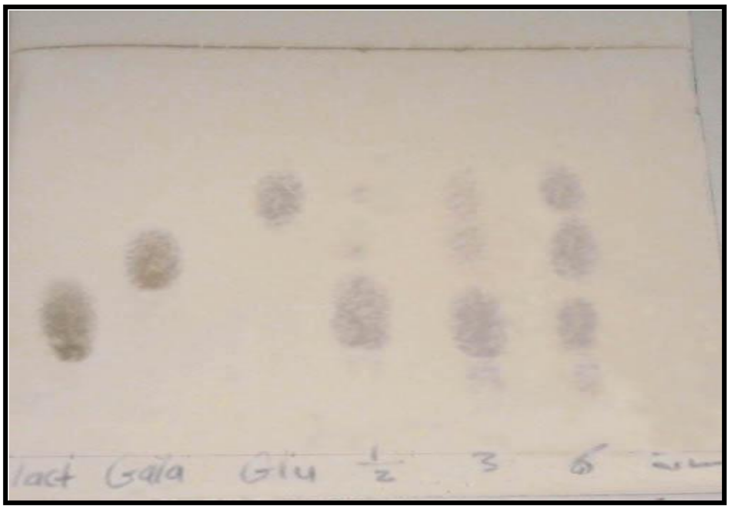
يبين شكل (12) العلاقة بين سرعة التفاعل وتراكيز مختلفـة مـن ONPG بوصـفها مـادة اساس صناعية Substrate لتعيين قيم ثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} ، ولـوحظ ان K_m بلغت 1.435 ملي مولاري و V_{max} 1040.23 وحدة/ مل. قام عدد من الباحثين بتقدير قـيم الثوابـت الحركيـة للبيتاكالاكتوسـايديز ، اذ اسـتعمل (20) مـادة ONPG و PNPG كمـواد التفاعـل لإنتاج exo-β- galactosidase من *Rhizomucor* sp. ووجد ان قيم K_m هي 0.785 و0.39 ملـي مولاري على التوالي وأشاروا الى ان قيم V_{max} للأنزيمات عادة تزداد مع زيادة طول سلسـلة مـواد التفاعل اذ بلغت 232.1 ملي مول / دقيقة /ملغم ، كما وجد (14) مـن ان قيمـة K_m هـي 1.74 و 1.14 ملي مولاري وV_{max} هي 137 و 5.033 مايكرومول /دقيقة/ملغم للمـادة الاسـاس ONPG و PNPG على التوالي .إن تباين قيم الثوابت الحركية لا يعود إلى نوع الإنزيم ومصدره فحسـب وإنمـا إلى ظروف تقدير الفعالية ايضا (عند استعمال الإنزيم من المصدر ذاته) كالرقم الهيـدروجيني ودرجـة حرارة التفاعل فضلا عن نوع محلول الدارئ وقوته الأيونية .



شكل (12) لينويفر-بورك لتعيين الثوابت الحركية للبيتاكالاكتوسايديز المنقى مـن عفـن *Aspergillus oryzae*

8-4 متابعة تحلل اللاكتوز بوساطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

فصلت نواتج تحلل اللاكتوز بفعل البيتاكالاكتوسايديز المنقى من عفن *Aspergillus oryzae* A_9 اذ يلاحظ من شكل (13) نواتج تفاعل الأنزيم النقي على سكر اللاكتوز بمدد مختلفة تراوحت من (2/1 – 6) ساعة، بظهور ثلاثة انواع من البقع والتي ظهرت مع بداية التفاعل وتزداد وضوحا مع زيادة زمن التفاعل وتم الاستدلال على نواتج التحلل بالمقارنة مع سكر اللاكتوز والكالاكتوز والكلوكوز بالاستعانة بقيم الحركة النسبية Rm وتطابقت البقع مع قيمة Rm للاكتوز والكالاكتوز والكلوكوز مما يدل على تحلل اللاكتوز بفعل الانزيم قيد الدراسة ، وكانت هذه النتائج مشابهة لما توصل اليه (22) عند معاملتهم للانزيم الخام المنتج من الخميرة مع اللاكتوز عند درجة حرارة 50 م ولمدة 4 ساعات .



شكل (13) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمحلول اللاكتوز المتحلل بفعل البيتاكالاكتوسايديز

إن نواتج اللاكتوز بفعل الإنزيم خلال النصف ساعة الاولى و حتى نهاية التفاعـل بقـع متـأخرة ذات حركة نسبية Rm تساوي (0.246 −0.256) على التوالي مما يشير إلـى احتمـال كونهـا مـن السكريات البضيعية الكالاكتوزايديـة Galactoligosaccharides، وأن زيـادة السـكريات البضـيعية الناتجة من تحلل اللاكتوز بتقدم زمن التفاعل يشير الى استمرار الإنزيم في تحليل اللاكتوز مـن خـلال تكسير أواصر بيتا(1−4) مما يؤدي الى إعطاء نواتج ذات أوزان جزيئية صغيرة وهذا جاء متوافقـا" مع كثير من الدراسات التي اكدت على تكون البضـيعات السـكرية مـن خـلال تفـاعلات – Trans galactosylation نتيجة تحلل اللاكتوز بفعل البيتاكالاكتوسايديز والذي يتاثر بعدة عوامل ، منها نـوع وتركيز المادة الاساس ومصدر الانزيم وتركيزه ودرجة الحرارة والرقم الهيـدروجيني وزمـن التفاعـل ووجود الايونات غير العضوية (15).

الاستنتاجات

امكانية انتاج الانزيم بنقاوة عالية وبخصائص تؤهله للتطبيقات الغذائية وبالاخص في منتجات الالبان.

المصادر

1- An , Z. (2005). Handbook of industrial mycology. NewYork . 763p.

2-Chen, W.; Chen, H.; Xia, Y.;Zhao, J., Tian ,F. and Zhang. (2008).Production , purification , and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*.*Journa lofDairyScience*,91:1751-1758.

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

4-Garfin, D. E. (1990). Purification procedures electrophoretic methods. *In*: Methods in enzymology. Murray, E. D. and Dentscher, P. J. (Eds.), 182: 425 – 441.

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

6-Haider, T. and Husain, Q.(2009). 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 : 576–580.

7-Hatzinikolaou , D. G.; Efstathios ,K.; Diomi ,M.; Amalia, D. K.; Paul, C. and Dimitris, K.(2005). Modeling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger* . *Biochemical Engineering Journal*, 24 :161–172.

8-Klich, M.A.(2002). Identification of common Aspergillus species . 1st Edition. Wageningen ,Nethelands.116p .
9-Laemmli , U . K . (1970) . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 . *Nature* , 227 : 680 - 285 .
10-Lehmacher,A. and Bisswanger, H. (1990).Isolation and characterization of an extremely thermostable D- glucose / xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB8. *Journal of General Microbiology* , 136: 679-686.
11-Lowry, O.H.; Rosobrough,N.; Far, A.L.; and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* ,193: 265-275.
12-Nagy, Z. ; Keresztessy, Z. ; Szentirmai, A. and Biro, S. (2001). Carbon source regulation of β -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Basic Microbiology* , 41(6): 351–362.
13-Neri , D. F.M. ; Balco, V. M.; Carneiro-da-Cunh, M. G. ; Carvalho Jr., L. B. and Teixeira, J. A. (2008). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications* , 9 :2334–2339 .
14-O 'Connell , S. and Walsh , G.(2010). A novel acid-stable, acid-active β-galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 86(2): 517-524.
15-Park, A.R. and Oh, D.K. (2010) Galacto-oligosaccharide production using microbial β-galactosidase : Current state and perspectives . *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1279-1286.

16-Park, Y. K.; Santi, M. S. S. and Pastore, G. M. (1979). Production and characterization of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, 44 (1) : 100 - 103 .
17-Parker , J. N. and Parker , P. M. (2002). The official patients sourcebook on lactose intolerance.USA.200p.

18- Saad, R.R. (2004). Purification and some properties of β-galactosidase from *Aspergillus japonicus*. *Annals of Microbiology*, 54 (3): 299-306.
19-Segel, I.H. (1976).Biochemical calculations. 2nd Edition, John and sons. Inc. New York.
20-Shaikh, S. A.; Khire, J. M. and Khan, M. I. (1997). Production of β-galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. .*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 19 : 239 - 245 .

21- Smith , E.J. (2009). Biotechnology.5th Edition , Cambridge Univ. Press. , 266 p

22-Song, C. ; Chi, Z. ; Li, J. and Wang, X. (2010). β-galactosidase production by the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica and lactose hydrolysis . Bioprocess and Biosystems Engineering , 1-7.

23-Tanaka, Y.; Kagamishi, A. and Kiughi, A. (1975). Purification and properties of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae. Journal of Biochemistry,* 77 : 241 - 247 .

24-Tanriseven, A. and Doğan , S.(2002). Anovel method for the immobilization of β-galactosidase .*ProcessBiochemistry,*38:27-30.

25-Todorova-Balvay, D. ; Stoilova, I.; Gargova, S. and Vijayalakshmi , M. A.(2006).An efficient two step purification and molecular characterization of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae . Journal of Molecular Recognition* , 19:299-304.

26-Ustok, F. I.; Tari, C. and Harsa, S. (2010). Biochemical and thermal properties of β-galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chemistry* , 119: 1114–1120.

27-White , A . ; Handler , P . and Smith , E . (1973).Principles of Biochemistry .McGraw-HillBookCompany.NewYork.

28- Whitaker, J.R. (1972). Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker. Inc. New York, USA.

Basra J.Agric.Sci.,24 (1) 2011

PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF Β-GALACTOSIDASE PRODUCED FROM ALOCAL ISOLATE OF *ASPERGILLUS ORYZAE* BY SOLID STATE FERMENTATIONS

Ali K. Jaber Gheyath H. Majeed Alaa J. Al – Manhal

Dept.Food Science , College of Agri., Univ. of Basrah, Basrah -Iraq

SUMMARY

Fifty isolates of molds were isolated from soil , cheese , whey. Those isolates were submitted to primary and secondary screening to select the isolate that produce the highest level of β-galactosidase. The enzyme was purified by several steps included, concentration with ammonium sulphate(65-80% saturation) followed by using Ion exchange chrommatochraphy DEAE sephadex A-50 and gel filtration on sephadex G-100 column. The final purification folds and the yield of the enzyme were 9.70 and 25.88%respectively, with a specific activity of 3216.12 U/mg . The electrophoresis pattern on PAGE technique showed one single band indicating the high purity of the enzyme. The characteristics of the purified enzyme was investigated, the optimum pH for activity was 5 , pH for stability was between 4-6 . the enzyme retained 100% of its original activity after incubation between 20-50 C° for 15 min., the optimum temperature for enzyme was 50 C° and retained 100% of its original activity after incubation for 60 min, Activation energy for conversion of the substrate ONPG to products was 6.19 Kcal / mol , whereas for enzyme denaturation was 62.31 Kcal / mol . Molecular weight of enzyme by SDS-electrophoresis was found to be 97.72 KD , while it was 103.51 KD as determined by gel filtration. Inhibitors and activators effects on enzyme activity was studied , The results showed that manganese and sodium ions caused an increase in enzyme activity whereas the magnesium ,copper , iron and calcium decreased the enzyme to different levels , No effect of potassium on enzyme activity was noticed , The highest inactivation observed when enzyme treated with urea and galactose A little increasing in activity was occurred when treated with 2-mercaptoethanol, whereas the EDTA found to have no effect on enzyme activity. Kinetic characteristic of the enzyme showed that the Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) values using ONPG as a substrate were 1.435mM and 1040.23 U/ ml respectively.The enzyme was tested for its ability to hydrolyze lactose to glucose and galactose by thin layer chromatography technique.

Keyword: β-galactosidas , Purification , Characterization