استخلاص الانفرتيز من الجزر وتنقيته جزئياً وتوصيف بعض خواصه[+]

EXTRACTION, PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SOME PROPERTIES OF CARROT INVERTASE

سوسن مصطفى عبد الرحمن[*] جاسم محمد عودة [**]

المستخلص :

هدف البحث الى استخلاص الانفرتيز من الجزر العراقي المحلي وتنقيته وتحديد بعض خواصه . تمت التنقية الجزئية للانزيم بخطوتين تمثلت الاولى بتركيز المحتوى البروتيني للمستخلص الخام لعصير الجزربوساطة ترسيبه بالاسيتون بنسبة ٢:١ . ولاكمال عملية التنقية اجري الفصل باستخدام كروماتوغرافي الترشيح الهلامي على عمود من هلام Sephadex G-100. بينت نتائج التنقية للانفرتيز ان الحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية والفعالية النوعية عند اخرخطوة كانت ٨,٦% و٢,١٥٢ مرة و١,١٨٨ وحدة/ملغم ، على التوالي . اشارت نتائج دراسة توصيف الانفرتيزالمنقى جزئياً ان ألاس الهيدروجيني الامثل لفعاليته كان ٦ . وقد اظهر الانزيم اعلى درجة من الثبوت بمدى ٥-٧ من قيم الأس الهيدروجيني عند حضنه لمدة ١٥ دقيقة حيث احتفظ بكامل فعاليته عند تلك القيم أي في الاوساط المتعادلة والحامضية القريبة من التعادل.كما اظهر الانزيم اعلى فعالية عند درجة حرارة ٤٥ م وهي المثلى لفعاليته ، وعند تعيين الثبوت الحراري للانفرتيز فقد احتفظ بمعظم فعاليته اي حوالي ٩٥-١٠٠% عند حضنه بدرجات حرارة بين ١٥-٥٠ م لمدة 15 دقيقة اي انه كان ثابتاً في مدى واسع من درجات الحرارة . وعند اختبار تاثير بعض المواد في فعالية الانزيم ، لوحظ فقدان الانزيم لكامل فعاليته عند اضافة كلوريد الزئبقيك لوسط التفاعل واظهر الانزيم انخفاضا واضحا في الفعالية عند اضافة كبريتات النحاس اما كلوريد الكالسيوم فلم يظهر تاثيراً في الفعالية الانزيمية

Abstract:

This research aimed at extraction, purification and determination of some properties of Iraqi carrot (*Daucus carota)* invertase . Partial purification of the enzyme was done by two steps including concentrating the crude extract by precipitation with acetone at the ratio 1:2 . To complete the purification process separation was made using gel filtration chromatography through Sephadex G-100.The results of partially purified invertase revealed that the enzyme yield ,purification folds and specific activity at the last step were 8.6% and 2.125 times and 1.186 unit/mg , respectively. The results of characterization of partially purified enzyme pointed out that the optimum pH for the enzyme activity was 6 , and it was most stable and retained its full activity for 15 min incubation at pH range of 5-7, which means that the enzyme was stable at the neutral and acid near neutral medium . The optimum temperature for maximum invertase activity was 45 C. The determination of heat stability showed that the enzyme retained almost its entire activity for 15 min incubation at 15 to 50 C , which means that it is stable at a broad range of temperature . Upon examining the effects of some chemical

[+] تاريخ استلام البحث :٢٠٠٩/٨/١٠ ، تاريخ قبول النشر :٢٠١٠/١١/٢٤

[*] مدرس / كلية الزراعة / جامعة بغداد

[**] مدرس مساعد/ كلية الزراعة / جامعة بغداد

compounds on invertase activity a complete inhibiton was observed upon the addition of $HgCl_2$ to the reaction medium and the enzyme activity was reduced obviously due to the addition of $CuSO_4$, while addition of $CaCl_2$ did not show any effect on the enzyme activity.

المقدمة :

يعد السكروز، وهو سكر غير مختزل، من المركبات السائدة والناتجة عن التمثيل الضوئي ويلعب دوراً مهماً في ايض ونقل الكربوهيدرات في النباتات الراقية [2] . يستعمل الانفرتيز β-Fructofuranosidases , EC.3.2.1.26 لفلق جزيئة السكروز غير العكسي الى كلوكوز وفركتوز ، ويعد هذا الانزيم واحدا من الانزيمات المفتاحية و الذي يلعب دورا حيوياً مهما في أيض السكروز [5,4,3] لتجهيز الانسجة النامية بالسكريات سداسية الكربون (hexoses) مصدرللطاقة والكربون لادامة نمو الخلية وتطورها [7,6] . تحوي النباتات الراقية عموماً على مجموعة من الانفرتيزات الموجودة بشكل دائمي [9,8] . تكون معظمها من نوع البيتا– فركتوسايدو – انفرتيز وبذلك تظهر تخصصاً مشابهاً لتخصص انفرتيز الخميرة [1] .تصنف الانفرتيزات النباتية حامضية ومتعادلة وقاعدية اعتماداً على قيمة الاس الهيدروجيني لاقصى فعالية، ومعظم هذه الانزيمات التي توجد في انسجة النباتات تكون من النوع الخارج خلوي(Extracellular) او بحالة ذائبة[10,6] . يكون الانفرتيز الحامضي اما بروتين ذائب في الحويصلة او مرتبط ايونياً مع جدار الخلية، ويتراوح الاس الهيدروجيني الامثل لفعاليته بين ٤,٥ الى ٥,٥ . يعد الانزيم الحامضي مهم لنمو النباتات وقد اقترح ايضاً انه يشترك في تنظيم التنافذ ورد فعل النباتات للاصابة او الجروح [8,7] . توجد فعالية الانفرتيز الحامضي بشكل اساس في اعضاء النباتات غير الناضجة وتنخفض بسرعة مع تراكم السكروزعند النضج . اما الانفرتيزات المتعادلة او القاعدية فهي ببتيدات متعددة سايتوبلازمية وقد اشارت البحوث الى ارتباطها بالانسجة الناضجة وان وظيفتها هي تحليل السكروز في سايتوبلازم الخلايا . وقد بينت الدراسات الحديثة وجود انفرتيزات متعادلة / قاعدية ومتناظرات مختلفة من الانفرتيزات الحامضية في نفس النسيج النباتي [9] . يحفز الانفرتيز المتعادل تحلل النهاية غير المختزلة في β-D -fructo furanosidase ويحتمل اشتراكه في اعادة تحول(turnover) السكروزفي انسجة ساق قصب السكر[5] . للانفرتيز دور مهم جداً في التصنيع الغذائي ويستخدم لانتاج شراب سكري مركز (syrup) يحتوي على السكريات المختزلة والذي تكون درجة حلاوته اعلى من السكروزنفسه . وللسكريات الاحادية الناتجة بفعل الانفرتيز درجة ذوبان عالية ولهذا اهمية كبيرة حيث لاتتبلور عند وجودها بتراكيز عالية[1] .القليل من الابحاث اجري لتنقية وتوصيف الانفرتيزمن النباتات ولهذا اجري هذا البحث في محاولة لاجراء تنقية جزئية ودراسة بعض خواص الانفرتيز من الجزر العراقي *Daucus carota* وهو من محاصيل الخضر الشتوية المهمة والذي يمكن زراعته خلال السنة فهو عشب حولي ولكن غالباً مايظهر في الشتاء . والجزر ذو قيمة غذائية مهمة فهو مصدر لفيتامين A ومصدر غني بالهيدروكاربونات الذائبة في الدهون . يحتوي على الكربوهيدرات بنسبة ١٠,٧% وتتالف من النشا والسكروز فضلا عن سكريات احادية كالكلوكوز، وجذوره تخزن السكروز بشكل رئيس . يمتاز الجزر برخص ثمنه وسهولة انتاجه وطول مدة خزنه اذ اشير الى امكانية خزنه بعد ازالة القمم لاكثر من ٥ اشهر بدون فقد النوعية او الكمية [11] .

المواد وطرائق العمل:

مصدرالانزيم

تم شراء الجزر العراقي من السوق المحلية ، وبعد عملية التنظيف استخدمت عصارة كهربائية للحصول على عصير الجزر وللتخلص من الرواسب اجري الطرد المركزي للعصير بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة وبعد جمع

الراشح قدرت فعالية الانزيم وتركيز البروتين والحجم في المستخلص الخام وخلال خطوات التنقية . فعالية الانزيم قدرت فعالية الانفرتيز تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Balasundaram و Pardit [12] .عرفت وحدة الفعالية بانها كمية الانزيم التي تحرر ١ مايكرومول من السكريات المختزلة من السكروز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة .
تركيز البروتين اتبعت طريقة Bradford لتقدير تركيز البروتبن [13] .تنقية الانزيم الجزئية
اجريت عملية تنقية جزئية للانفرتيز وذلك بتركيز المحتوى البروتيني للمستخلص الخام حيث وضع في حمام ثلجي واضيف له الاسيتون البارد ببطء مع التحريك المستمر بنسبة ٢:١ من عصير الجزر مع الاسيتون ، ثم ترك المحلول لليوم التالي بدرجة حرارة ٤ م. اجريت بعدها عملية الطرد المركزي بسرعة 8000 د / د لمدة ٣٠ دقيقة . جمع الراسب وذوب في ١٠ مل من محلول الفوسفات الدارئ بتركيز ٠,٠٥ مولار واس هيدروجيني٧ ثم قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين .
بعد ذلك اتبعت تقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود هلام السيفادكس G-100 بابعاد (٤٠× 1.5) سم واجريت عملية الموازنة والاسترداد باستخدام محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 0.05 مولار واس هيدروجيني 7 وبسرعة جريان ١٨ مل / ساعة وبواقع ٢,٥ مل / انبوب . قيس امتصاص الضوء عند طول موجي 280 نانومتر لتعيين تركيز البروتين وقدرت فعالية الانزيم للأجزاء المستردة ثم جمعت الأجزاء المحتوية على الفعالية ، قيس الحجم وتركيز البروتين والفعالية الانزيمية .

توصيف الانزيم

تضمن اجراء الاختبارات الاتية : ــ

١ . تعيين الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم : استخدم محلول الخلات الدارئ بقيم أس هيدروجيني5 و5.5 و ٦ ومحلول الفوسفات الدارئ بقيم اس هيدروجيني 6.5 و7 و 7.5 و 8 بتركيز ٠,١ مولار .

٢ . تعيين الاس الهيدروجيني الامثل لثبوت الانزيم : حضن حجم معلوم من الانزيم مع حجم مساو من المحاليل الدارئة ذات قيم اس هيدروجيني مختلفة تراوحت بين ٤ ــ ٨,٥ بفارق نصف درجة من محلول لاخر، وحضن بدرجة حرارة ٣٠ م لمدة ١٥دقيقة جرى بعدها تقدير الفعالية المتبقية للانزيم.

٣ . تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم : قدرت الفعالية في مدى درجات حرارة مختلفة تراوح بين ٢٥– ٦٥ م

٤ . تعيين الثبوت الحراري للانزيم : عومل المحلول الانزبمي بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين١٥–٧٠ م بفارق ٥ درجات من محلول لاخر(وفي الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية) ثم نقل الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية المتبقية .

٥. تاثير بعض المواد في فعالية الانزيم : حضرت محاليل كلوريد الزئبقيك وكلوريد الكالسيوم وكبريتات النحاس بتركيز ١٠ ملي مولار . اضيف الانزيم الى وسط التفاعل الحاوي على محاليل المواد المختبرة ثم قدرت الفعالية المتبقية اما معاملة السيطرة control فتمت بدون اضافة محاليل المواد المدروسة.

النتائج والمناقشة :

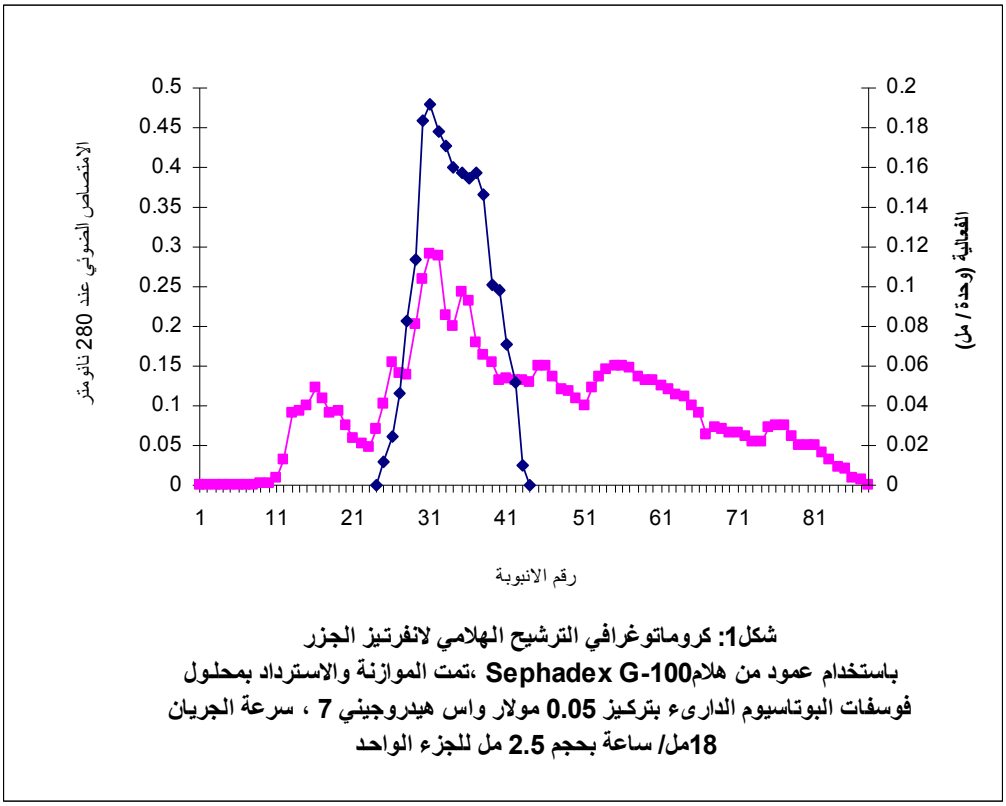
تنقية الانفرتيز الجزئية

اجريت عملية التركيز والتنقية الجزئية للانفرتيز المستخلص من الجزر ويمكن ملاحظة نتائج التنقية في الجدول رقم ١ .

جدول ١: خطوات تنقية الانفرتيز من عصير الجزر

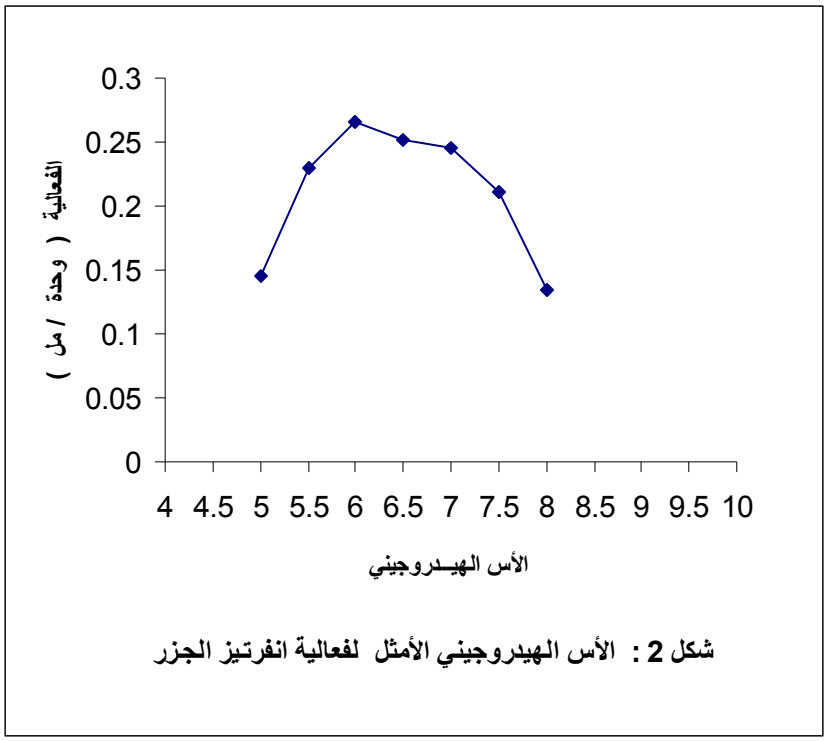
خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة / مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الخام	**100**	**0.292**	**0.529**	**0.552**	**29.2**	**1**	**100**
الترسيب بالاسيتون	**10**	**0.59**	**0.813**	**0.726**	**5.9**	**1.315**	**20.2**
الترشيح الهلامي بعمود السيفادكس	**22**	**0.114**	**0.096**	**1.188**	**2.51**	**2.152**	**8.6**

ادت خطوة التركيزبالاسيتون الى زيادة فعالية الانزيم وفعاليته النوعية فكانتا ٠,٥٩ وحدة/مل و٠,٧٢٦ وحدة/ملغم على التوالي ، اما عدد مرات التنقية فبلغت ١,٣١٥ وبحصيلة انزيمية مقدارها ٢٠,٢% . تركز الانزيمات عادة في المراحل الاولى من التنقية للتخلص من نسبة كبيرة من الماء وتستخدم الاملاح عموماً لهذا الغرض او المذيبات العضوية كالايثانول او الاسيتون [14] اذ تقوم المذيبات العضوية بخفض ثابت العزل الكهربائي Dielectric constant للوسط مؤدية بذلك الى زيادة قوة التجاذب بين الجزيئات فتتكتل وتترسب [15] . ثم اجريت تنقية اضافية للانفرتيز باستخدام الترشيح الهلامي كما يوضح الشكل ١ الذي يبين نمط الاسترداد المتحصل عليه للانزيم من عمود السيفادكسG-100 حيث سجلت قيم الامتصاص عند طول موجي ٢٨٠ نانومتر والتي تمثل تركيز البروتين وقيم الفعالية الانزيمية للاجزاء المستردة . وبعد جمع الاجزاء التي اظهرت فعالية الانفرتيز بعضها مع البعض كان عدد مرات التنقية ٢,١٥٢ بحصيلة انزيمية ٨,٦% (جدول ١) . يلاحظ زيادة الفعاليةالنوعية للانزيم في كل خطوة على الرغم من ان الحصيلة كانت واطئة ، وقد يعزى هذا الانخفاض لاحتمال حدوث دنترة للانزيم خلال طريقة التنقية اولاسباب اخرى ، ولذا يوصى باتباع طرائق اخرى في التنقية مثل استخدام الترشيح الفائق او الترسيب بكبريتات الامونيوم واستخدام DEAE او Sephacryl S-300 .



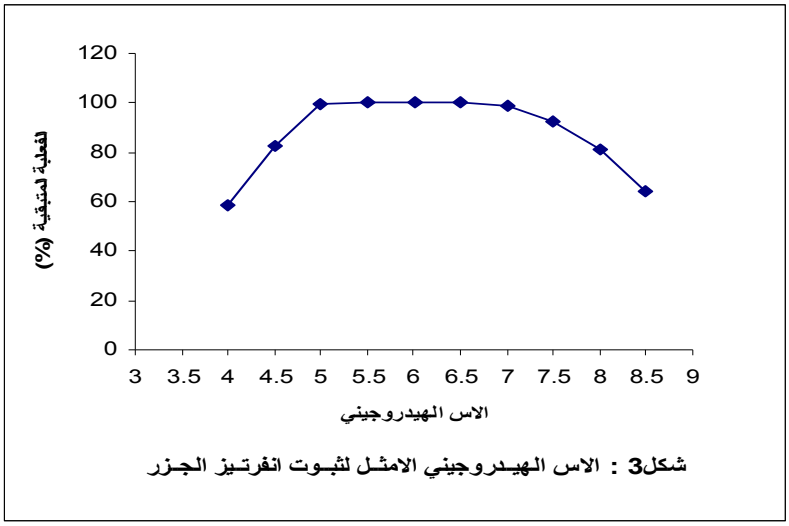
شكل1: كروماتوغرافي الترشيح الهلامي لانفرتيز الجزر
باستخدام عمود من هلام Sephadex G-100 ،تمت الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارىء بتركيز 0.05 مولار واس هيدروجيني 7 ، سرعة الجريان 18مل/ ساعة بحجم 2.5 مل للجزء الواحد

تنوعت التقنيات المستخدمة من قبل الباحثين لتنقية الانفرتيز من مصادره المختلفة ، اذ قام كلا من Vorster و Botha [5] بتنقية الانفرتيز من قصب السكر وذلك بترسيبه بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٢٠% اولاً ثم ٦٠% تبع ذلك التنقية على عمود المبادل السالب ووصلت الحصيلة الانزيمية النهائية الى ٨١% اما عدد مرات التنقية فكان ٢٥ . وتمكن Kim و Jhon [16] من تنقية الانفرتيز من درنات حرشف القدس (الخرشوف) Artichoke Tuber Jerusalem بثلاث خطوات هي الترسيب الملحي بكبريتات الامونيوم الصلبة بنسبة اشباع ٢٠-٥٠%ثم امرار الانزيم على عمود DEAE-Cellulose ومن ثم فصله على عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 . بلغ عدد مرات التنقية عند الخطوة الاخيرة ٧٠,٦ وبحصيلة مقدارها ٥٠,٢% . واستعمل Rahman واخرون [6] كروماتوغرافي التبادل الايوني على عمود DEAE-Cellulose لتنقية الانفرتيز من ثمار المانغو ، اعقبها خطوة الفصل على عمود CM-Cellulose وتم الحصول على عدد مرات تنقية ٥٢,٧٣ وحصيلة انزيمية ١٩,٢٦%.توصيف الأنزيم تحديد الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الانزيم لتعيين الاس الهيدروجيني الامثل لاعلى فعالية لانفرتيز الجزر يبين شكل ٢ النتائج التي تم الحصول عليها وان اقصى فعالية ملاحظة كانت عند قيمة الاس الهيدروجيني 6 . ولوحظ انخفاض تدريجي على جانبي الاس الامثل وان ادنى قيمة للفعالية كانت عند الارقام الهيدروجينية ٨ و ٥ . وقد برجع سبب انخفاض الفعالية على جانبي القيمة المثلى للفعالية نتيجة لتآثير الاس الهيدروجيني لوسط التفاعل على الحالة الايونية للمجاميع الجانبية للحوامض الامينية في الموقع الفعال للانزيم والمادة الاساس وجعلهما في هيئة غير ملائمة للارتباط [17] .



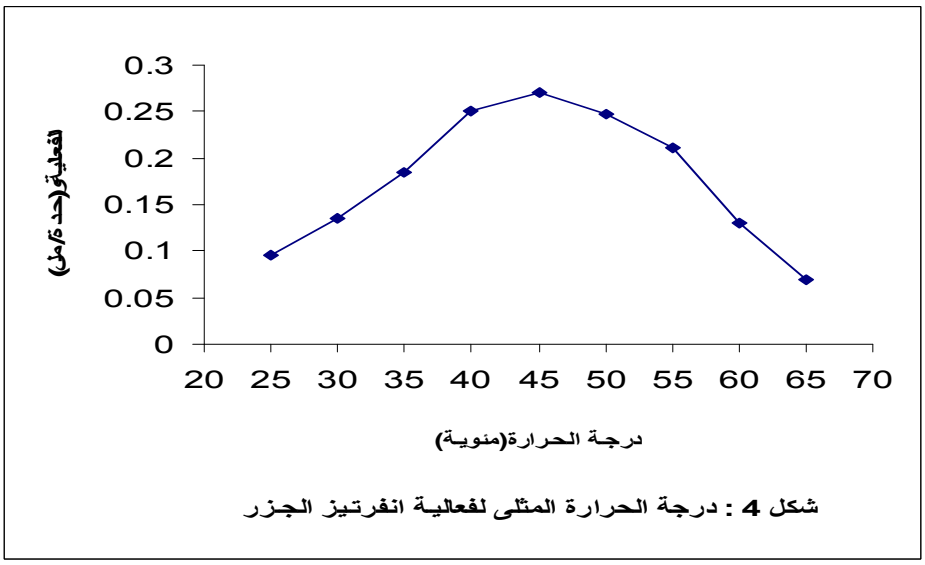
شكل 2 : الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية انفرتيز الجزر

اشارت البحوث الى اختلاف قيمة الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية هذا الانزيم اعتمادا على نوع النبات ، النسيج الماخوذ منه والطريقة المستخدمة لتقدير فعاليته ، فقد جمع Lee وSturm [9] خلايا الجزر البري *Daucus carota* من عالق مزارع في مرحلة طور النمو الاسي والمجنسة في محلول دارئ الاستخلاص ، وتم التعرف على انفرتيزين متعادل وقاعدي وكلا الانزيمين يمتلكان منحنى اس هيدروجيني حاد واقصى فعالية كانت عند قيمة ٦,٨ للانزيم المتعادل و ٨ للانزيم القاعدي . وكذلك فان قيمة اس هيدروجيني متعادل قد سجلت للانفرتيزات من درنة حرشف القدس وقصب السكر فكانت ٧ و ٧,٢ ، على التوالي [16,5] .ومن جهة ثانية فقد نقي متناظرين انزيميين من ثمار الكمثرى اليابانية وكان الاس الهيدروجيني لكليهما ٤,٥ مما دل على انهما من الانزيمات الحامضية وقد حدث انخفاض للفعالية عند قيم اعلى [8].الأس الهيدروجيني الأمثل لثبوت الأنزيم يوضح شكل ٣ مدى ثبوت الانفرتيز تجاه قيم الاس الهيدروجيني التي تراوحت من ٤-٨,٥ ودراسة هذه الخاصية تساعد في تحديد ظروف تنقية الانزيم وخزنه للحفاظ عليه لاطول مدة زمنية ممكنة .اظهرت النتائج ان المدى الامثل لثبوت الانزيم كان بين ٥-٧ حيث احتفظ الانزيم بكامل فعاليته في هذا المدى وبنسبة ٩٢,٣٤% من فعاليته الاصلية عند حضنه في اس هيدروجيني٧,٥، اي انه يكون ثابتاً في الاوساط المتعادلة و الحامضية القريبة من التعادل ويظهر انخفاضاً في الاوساط القاعدية. ويعزى سبب هذا الانخفاض إلى تأثير الاس الهيدروجيني في تركيب جزيئة الانزيم والذي يؤدي الى حدوث تغير في التركيب الثلاثي للبروتين وتاين المجموعات الموجودة في الموقع الفعال للانزيم [18] .



شكل3 : الاس الهيدروجيني الامثل لثبوت انفرتيز الجزر

يرجع اختلاف ثبوت الانزيم الى اختلاف المصادر المنتجة منها فقد ظهر ان الانزيم المنقى من فاكهة المانغو كان ثابتا بمدى واسع من قيم الاس الهيدروجيني ٢,٥–٨ عند حضنه مع مزيج التفاعل لمدة ١٥ دقيقة وقياس الفعالية بدرجة حرارة ٣٧ م وبينت النتائج بوضوح ان الانزيم كان اكثرثبوتاً في المدى الحامضي من الاس الهيدروجيني وهي نتيجة مشابهة لمدى ثبوت انفرتيزعصير العنب والتي كانت من ٢ الى ٨ [6] .درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم يشيرالشكل ٤ إلى تاثير درجات الحرارة والتي تراوحت من ٢٥–٦٥ م في فعالية انفرتيز الجزر حيث لوحظ ازدياد الفعالية زيادة متدرجة مع ارتفاع درجة الحرارة من ٢٥م ولغاية ٤٥م بلغت عندها الفعالية اقصاها ثم انخفضت الفعالية بعدها بارتفاع الحرارة . وسبب زيادة الفعالية بزيادة درجة الحرارة ضمن مدى معين يرجع الى زيادة الطاقة الحركية لجزيئات الانزيم ومادة التفاعل مما يؤدي الى زيادة التصادمات بينهم، وان سبب انخفاض الفعالية بعد ذلك يعود الى ان الارتفاع بدرجة الحرارة يؤدي الى تغير في تركيب الانزيم نتيجة تاثيرالحرارة في البنية الثالثية للبروتين والى تغير في تركيب الموقع الفعال للانزيم مما يؤدي الى تناقص في فعاليته [17] .



شكل 4 : درجة الحرارة المثلى لفعالية انفرتيز الجزر

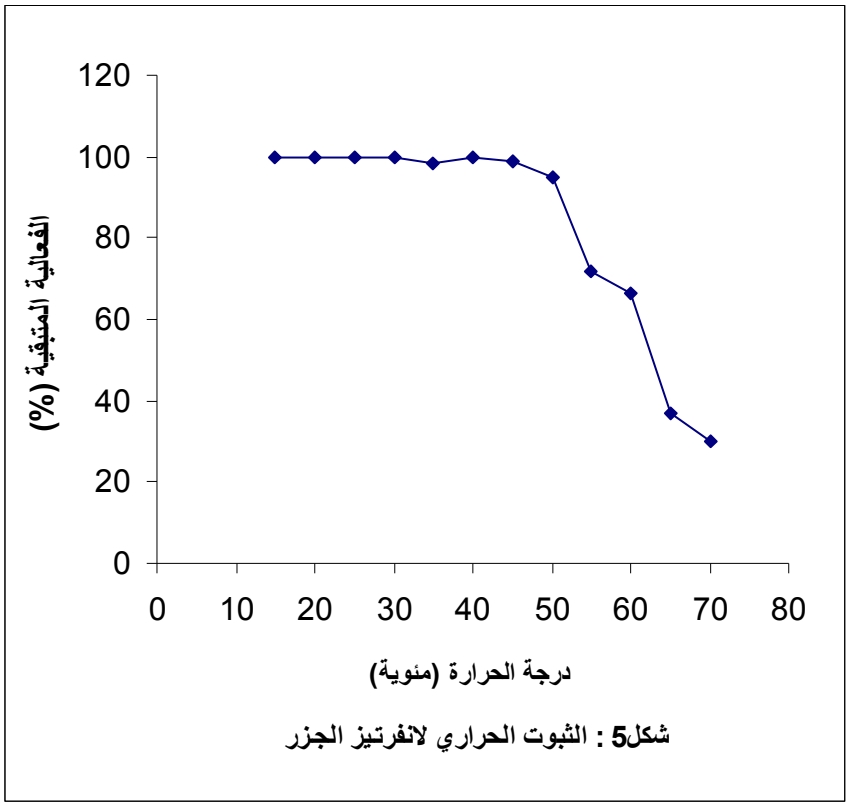
يختلف تاثير درجة الحرارة في الانفرتيزات باختلاف مصادرها ومع ذلك جاءت هذه النتيجة متفقة مع ماتوصل له Marouf و Zeki [4] من ان اعلى فعالية لانفرتيزي تمور الزهدي الذائب وغير الذائب كانت عند درجة حرارة ٤٥ م. وسجلت درجة الحرارة ٤٠م بوصفها درجة الحرارةالمثلى لفعالية الانفرتيز المنقى من درنات حرشف القدس [16]

. اما Dahot و Noomrio [10] فوجدوا ان اعلى فعالية لانزيمي I و II المنقاة من ثمار Achras sapota تحدث

بدرجة حرارة ٢٠م وان فعالية كلا الانزيمين كانت غير مستقرة حراريا لحد درجتي الحرارة ٣٠ و ٤٠ م، ثم فقدت الفعالية تماما بدرجتي الحرارة ٤٥ و ٧٠ م خلال ١٠ دقائق .

الثبوت الحراري للانزيم

من المهم دراسة الثبوت الحراري للانزيم بوصفه احد العوامل المهمة والذي يمكن من خلاله تحديد درجات الحرارة التي يحتفظ فيها الانزيم بنشاطه وتلك التي تؤثر فيه سلبا . من ملاحظة شكل ٥ اظهر الانفرتيز ثبوتاً حرارياً ضمن مدى ١٥- ٥٠م واحتفظ بنسبة ٧٢ % من فعاليته بدرجة حرارة ٥٥ م ثم بدات الفعالية بالانخفاض مع ارتفاع درجات الحرارة ، وعموما فان معظم الانزيمات تكون اكثر ثبوتاً بدرجات حرارة منخفضة لذا يفضل خزنها بتلك الدرجات المنخفضة للمحافظة عليها . وتماثل نتيجة هذه الدراسةمع ماذكره بعض الباحثين من ان انفرتيز ثمار المانغو يتصف بكونه ثابتاً تجاه مدى واسع من درجات الحرارة والبالغ ١٠-٧٥ م [6] .



شكل5 : الثبوت الحراري لانفرتيز الجزر

تاثير بعض المواد في فعالية الانزيم

يوضح الجدول ٢ تاثير بعض المواد المختلفة في فعالية انفرتيز الجزر ، فعند اضافة كلوريد الزئبقيك لوسط التفاعل ادى ذلك الى تثبيط واضح في الفعالية الانزيمية وفقد الانزيم فعاليته بشكل كامل وبذلك يعد مثبطا قويا .كما انخفضت فعالية الانزيم بشكل كبير بوجود كبريتات النحاس حيث بلغت الفعالية المتبقية ١٤,٤٣ % من الفعالية الكلية . ويمكن تفسير الانخفاض الحاصل في فعالية الانزيم الى ان تاثير هذه المواد يكون في فعالية الانزيم من جهة والمادة الاساس من جهة اخرى من خلال تكوين معقدات مع البروتين قد تفضي الى اعاقة ارتباط الانزيم بالمادة الاساس. اما كلوريد الكالسيوم

فليس له اي تاثير في فعالية الانفرتيز وقد اشار Whitaker و Bernhard [19] حيث ان الانزيمات هي بروتينات لذا فانها تملك مجاميع فعالة مختلفة ولها القدرة على التفاعل مع العديد من المركبات الاخرى غير المادة الاساس التي تعمل عليها فعند اضافة مركب ما الى التفاعل المحفز بالانزيم فضلا عن المادة الاساس فان المركب قد ينشط او يثبط او ليس له تاثير على التفاعل .

جدول ٢ : تاثير بعض المواد في فعالية انفرتيز الجزر

المادة	الفعالية المتبقية % نسبة الى control
سيطرة control	100
كلوريد الكالسيوم	100
كلوريد الزئبقيك	0
كبريتات النحاس	14.43

*** اضيف الانزيم الى وسط التفاعل الحاوي على ١٠ ملي مولار من المواد المختبرة وقدرت الفعالية المتبقية**

وتتوافق هذه النتيجة مع عدد من الدراسات فقد لاحظ Vorster و Botha [5] تثبيط كامل تقريبا لانفرتيز قصب السكر مع $HgCl_2$ و $ZnCl_2$ و $AgNO_3$ و $CuSO_4$ بتركيز ١ ملي مولار بينما لم يظهر $CaCl_2$ و $MgCl_2$ و $MnCl_2$ اي تثبيط واضح في فعالية الانزيم اي انه ليس هناك اي تاثير . كما وجد Kim و Jhon [16] ان ايونات المعادن الاتية : Hg^{+2} و Cu^{+2} و Zn^{+2} بتركيز ١٠ ملي مولار ثبطت بشكل كامل فعالية الانفرتيز المنقى من درنات حرشف القدس وبين Rahman واخرون [6] ان فعالية الانفرتيز المنقى من ثمار المانغو قد ثبطت كليا بوساطة ١ ملي مولار كلوريدالزئبقيك و SDS .

المصادر:

١- دلالي ، باسل كامل . الانزيمات *في التصنيع الغذائي* .ترجمة عن جيرالد ريد . دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل .112-118، 1982 .

2- Pan ,Q.H., K.Q.Zou .,C.C,Peng .,X.L, Wang and D . P.Zhang . "Purification ,Biochemical and Immunological Characterization of Acid Invertase from Apple fruit ". J. Intergrative plant . Biology . 47 (1) : 50- 59 , 2005 .

3-Beruter , J., FME ,Studer and P. Ruedi ."Sorbitol and sucrose partitioning in the growing apple fruit ". J . Plant . Physiol . 151 :269 -279 , 1997 .

4-Marouf ,B and L .Zeki ."Invertase from date fruits ". J . Agric . Food . Chem . 30 : 990 - 993 , 1982 .

5-Vorster , D . J and F. C , Botha .”Partial purification and characterization of sugarcane Neutral invertase “. Phytochemistry . 49(3): 651 - 655 , 1998 .
6-Rahman , M .H .,A .H.Akand .,T.Yeasmin .,M.S.Uddin and M.Rahman .”Purification and properties of invertase from Mango fruit”. Pakistan . J. Biological Sci . 4(10) : 1271 - 1274 , 2001
7 – Ungez , C.M., Hardegger ., S . Lienhrd and A . Sturm .”c DNA cloning of carrot (*Daucus carota)* soluble Acid B-Fructofuranosidases and comparison with the cell wall isoenzymes”. Plant Physiol . 104 :1351 - 1357 , 1994 .
8 – Hashizume, H.,K.Tanase .,K.Shiratake ,H. Mori and S . Yamaki . “Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese Pear fruit”. Phytochemistry . 63:125 - 129, 2003 .
9 – Lee, H . S and A . Sturm .”Purification and characterization of Neutral and Alkaline invertase from carrot”. Plant Physiol . 112:1513 -1522, 1996 .
10 – Dahot, M.U and M.H . Noomrio .”Purification and some properties of invertase from Achras Sapota Fruit”. J . Islamic Academy Sci . 9(2):1 – 4 , 1996 .
11 – Chakraavarty , H. L . *Plant Wealth of Iraq* . Vol 1 . 194 - 198 , 1976 .
12 – Balasundaram , B and A.B. Pardith .”Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation “. B iochem . Engin . 8: 251 - 256 , 2001 .
13 – Bradford ,M.M .”A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein dye binding “. Analytical Bioch . 72:248 - 254 , 1976 .
14 – Janson , J and L.Ryden . *Protein purification principles, High Resolution , Methods and Application* . (2 ed.) John Wiley & Sons .I nc .USA ,1998 .
15 – Whitaker , J . R. *Principles of Enzymology for the Food Science* . Marcel Dekker , Inc . New York .USA . 65 - 119 , 1972 .
16 – Kim , M . H and D . Y Jhon .”Partial purification and properties of invertase from Jerusalem Artichoke Tuber “. Korean Biochem . J . 21(4) : 436-440 , 1988 .17-Parkin , K.L . *Environmental effects on enzyme activity. In Enzymes in Food Processing*.
(3 eds Nagodawithana ,T and Reed ,G .) Academic Press , Inc.New York , USA , pp.273 , 1993 .
18- Segel, I.H . *Biochemical Calculation*. 2nd – edition, John Wiley & Sons, Inc, New York , USA , pp.273 , 1976 .
19-Whitaker,J.R. and R . A .Bernhard . *Experiment for : An Introduction to enzymology* . The Wiber press . Davis , California , U.S.A.1972 .