أستخلاص وتنقية وتوصيف وربط ببسين الدجاج واستعماله في تحضير متحلل بروتيني

زينة كاظم عيسى و منير عبود جاسم
قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة

المستخلص: هدفت الدراسة الحالية الى استخلاص انزيم الببسين EC:3.4.23.1 من بعض المصادر الحيوانية وتنقيته ودراسة بعض صفاته وربطه واستعماله في التطبيقات العملية في مجال الصناعات الغذائية ، استخلص الانزيم من معدة ثلاثة انواع من الحيوانات (الاغنام ، الدجاج ، سمك النويبي) باستعمال خمسة محاليل استخلاص تضمنت الماء المقطر، محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 10% ، محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 6 % الحاوي على 2 % حامض بوريك ، محلول فوسفات الصوديوم الدارىء بتركيز 0.1 مولاري ورقم هيدروجيني 7.3 ومحلول Tris–acetic acid بتركيز 0.4 مولاري برقم هيدروجيني 7.6 لغرض تحديد افضل مصدر للانزيم وافضل محلول استخلاص وقد وجد ان معدة الاغنام كانت افضل مصدر للحصول على الانزيم وان محلول كلوريد الصوديوم 6% الحاوي على 2% حامض البوريك هو افضل محلول استخلاص اذ اعطى اعلى فعالية نوعية للانزيم والتي بلغت 14.3 وحدة/ملغم .بعد ذلكركز المحتوى البروتيني للمستخلصات الانزيمية الخام باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع تراوحت بين 30–70% ، 20–90% ، 20–60% لببسين الاغنام والدجاج وسمك النويبي على التوالي ، ثم اجريت عملية الديلزة باستعمال الماء المقطر ، وقد اعطى ببسين الدجاج المنقى جزئياً اعلى فعالية انزيمية. اظهرت دراسة ربط ببسين الدجاج المنقى جزئياً باربعة انواع من المواد الرابطة تضمنت السليكاجل ،راتنج SRF، الجينات الكالسيوم والاكار ان افضل مادة ربط هي الاكار اذ اعطي اعلى كفاءة ربط والتي بلغت 67%.كان افضل تركيز لربط ببسين الدجاج المنقى جزئياً بالاكار هو 3 % اذ اعطى اعلى فعالية انزيمية والتي بلغت 75%. بلغت الفعالية المتبقية لببسين الدجاج المنقى جزئياً المرتبط بالاكار 21% بعد استعماله 7 مرات، وبلغت الفعالية المتبقية لببسين الدجاج المنقى جزئياً المر تبط بالاكار 27.6% عند خزنه لمدة 60 يوم بدرجة حرارة 4 م. وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحليلية لببسين الدجاج المنقى جزئياً الحر والمرتبط هو 2 ، ووجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات ببسين الدجاج المنقى جزئياً الحر والمرتبط كان 3 وان كلا الانزيمين الحر والمرتبط فقدا فعاليتهما عند الارقام الهيدروجينية القاعدية 8 و9 .كانت درجة الحرارة المثلى للفعالية التحللية لببسين الدجاج المنقى جزئياً الحر 45 م والمرتبط 55 م ، ووجد ان درجة الحرارة المثلى لثبات ببسين الدجاج المنقى جزئياً الحر والمرتبط كانت تتراوح بين 15–45 م وان ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط فقد فعاليته بالكامل عند 85 م. استعمل ببسين الدجاج المنقى جزئياً المرتبط بالاكار في تحضير متحلل بروتيني من سمك النويبي ووجد ان التحلل البروتيني بلغ اقصاه في فترة 180 دقيقة وان تحلل ببسين الدجاج المرتبط كان مقارب لتحلل ببسين الدجاج الحر حيث بلغ 2.6 ، 2.8 مل على التوالي .

Key word: Extraction Pepsin, Purification Pepsin, Characterization Pepsin, Immobilization Pepsin.

المقدمة

تعد البروتيزات احد الانزيمات المهمة صناعياً حيث تمثل 60 % من الانزيمات المسوقة تجارياً ويمكن

الحصول عليها من المصادر المكروبية والنباتية والحيوانية (10) ، وللبروتيزات تطبيقات متعددة في صناعات متنوعة مثل الصناعات الغذائية، صناعة المستحضرات الصيدلانية،صناعة المنظفات ودباغة الجلود (19;12).

الببسين هو اول انزيم حيواني يكتشف وقد اكتشف من قبل Theodor Schwann عام 1836 (5) وهو ايضاً الذي صاغ اسمه من الكلمة اليونانية Pepsis

التي معناها هضم (4).

ان تنقية الانزيمات عملية مكلفة جداً وان استعمالها يكون غير اقتصادي ، لان الانزيم يستعمل مرة واحدة فقط ولا يمكن استعماله مرة اخرى (3). لذلك كرست العديد من الابحاث للحصول على طريقة يرتبط فيها الانزيم بمادة داعمة ، بحيث يكون من السهولة اضافته في العمليات التصنيعية المختلفة ومن ثم ازالته (13)، كما ان استعمال الانزيم المرتبط يقدم فوائد اكثر من الانزيم الحر وذلك لإمكانية استعماله بصورة مستمرة، الانهاء السريع للتفاعل ، السيطرة على صناعة المنتوج وسهولة ازالة الانزيم من المنتوج النهائي (7).

هدفت الدراسة الى استغلال المخلفات الحيوانية (الاغنام ،الدجاج والاسماك) في استخلاص انزيم الببسين وتحديد افضل محلول لاستخلاصه و تنقيته وتوصيفه وربطه ودراسة تأثير بعض العوامل المختلفة على فعاليته التحللية واستعماله في صناعة المتحللات البروتينية بدلا من الانزيمات التجارية باهظة الثمن.

المواد وطرائق العمل:

1-استخلاص الانزيم: استخلص أنزيم الببسين من معدة الأغنام ،الدجاج وسمك النويبي بأستعمال خمسة محاليل أستخلاص ثم تم اختيار المحلول الأمثل لأستخلاص الأنزيم على اساس الفعالية النوعية للأنزيم الناتجة من كل محلول استخلاص.

محاليل الأستخلاص هي:1-ماء مقطر،2-محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز10% (25).3-محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز6% الذي يحتوي على 2% من حامض البوريك Boricacid (18).4-محلولفوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.3(11). 5محلولTris_acetic acid بتركيز0.4 مولار ورقم هيدروجيني7.6،حضر بأذابة 12.1 غم من Tris مع كمية من الماء المقطر ثم اضيف اليه 17.5 مل من حامض الخليك ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر (11).

اتبعت طريقة(25) لاستخلاص أنزيم الببسين مع اجراء بعض التغييرات عليها، حيث أخذت المعدة الطازجة وأزيلت محتوياتها والأسطح الدهنية وغسلت بالماء البارد وحفظت بالتجميد لمدة 24 ساعة ثم فرمت ومزجت مع محلول الاستخلاص بنسبة2:1 (وزن :حجم) وجنست بخلاط كهربائي (blender) لمدة 10 دقائق ،بعدها وضع المستخلص بالمجمدة لمدة ساعتين ثم اجري له طرد مركزي 15,000 gبدرجة حرارة 4 م لمدة 15 دقيقة. أهمل الراسب وجمع الراشح وعدل الرقم الهيدروجيني له الى 1.8 باستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك HCl بتركيز 1مولار وترك لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة المختبر ثم اجري له طرد مركزي مرة اخرى وعدل الرقم الهيدروجيني له الى 5.5 باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 1مولار.

قدرت الفعالية التحليلية حسب طريقة (26) واستعملت طريقة (14) في تقدير تركيز البروتين خلال مرحلة التنقية.

2-تنقية الانزيم: تم ترسيب الانزيم باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة تشبع 30-70% ثم اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 1911.6×gلمدة نصف ساعة بعدها اجريت عملية الديلزة للانزيم تجاه الماء المقطرلمدة24 ساعة مع تبديل الماء كل 12 ساعة.

3- توصيف الانزيم: عين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم باستعمال المحاليل الدارئة التالية بتركيز 0.2 مولار ،1-محلول الفوسفات الدارئ يتكون من حامض الفوسفوريك وفوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين للحصول على الارقام الهيدروجينية (1،2،3).2-محلول الخلات الدارئ يتكون من حامض الخليك و خلات الصوديوم للحصول على الارقام الهيدروجينية (4،5).3-محلول الفوسفات الدارئ يتكون من فوسفات الصوديوم احادية وثنائية الهيدروجين للحصول على الارقام الهيدروجينية (6،7،8).4-محلولTris_Hcl الدارىء للحصول على الرقم الهيدروجيني (9)، قدرت الفعالية التحللية ثم رسمت العلاقة بين الفعالية التحللية للانزيم وقيم الارقام الهيدروجينية لتعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم التحللية، كما عين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بخلط حجم معين من الانزيم مع حجم مساوٍ له من المحاليل الدارئة بارقام هيدروجينية متدرجة من 1-9 وحضن بدرجة حرارة35 م لمدة نصف ساعة ثم نقل الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية التحللية .تم تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم التحللية وذلك بتقدير الفعالية في مدى من درجات الحرارة تراوح بين 15_85 م.كما تم تعيين الثبات الحراري بحضن حجم معين من الانزيم بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 15- 85 م لمدة 15 دقيقة ثم نقل الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية التحللية.

تم تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم التحللية وذلك بتقدير الفعالية في مدى من درجات الحرارة تراوح بين 15_85 م بفارق عشر درجات ورسمت العلاقة بين درجة الحرارة وفعالية الانزيم لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم. كما تم تعيين الثبات الحراري بحضن حجم معين من الانزيم بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 15- 85 م بفارق عشر درجات لمدة 15 دقيقة ثم نقل الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية التحللية ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة المختلفة مقابل النسبة المئوية للفعالية المتبقية لتعيين درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم.

4- ربط الانزيم: رُبط انزيم الببسين المنقى جزئياً باستعمال طرائق مختلفة من الربط ثم درست كفاءة ربط الانزيم. تضمنت هذه الطرق1- ربط الانزيم بالادمصاص على هلام السليكا جلتبعا للطريقة الموصوفةمن قبل(16) 2 – ربط الانزيم على الراتنجresinousبتقنيةCross_Linkingتبعا للطريقة الموصوفة من قبل(23) 3- ربط الانزيم بتقنية الحجز بالجينات الكالسيوم باتباع الطريقة الموصوفة من قبل(21) – ربط الانزيم بتقنية الحجز بالاكار باتباع الطريقة الموصوفة من(24) واستعملت تراكيز مختلفة من الاكارمن 1 – 5% لمعرفة افضل تركيز لربط الانزيم.

5- قياس الفعالية المتبقية:قدرت الفعالية التحللية لكل من الانزيم الحر والمرتبط لكل طريقة ربط وذلك لمعرفة كفاءة الربط.

6- تحضير المتحلل البروتيني:حضر متحلل بروتيني من لحم سمك النويبي وحسب طريقة (1)، بعدها وضع في حمام مائي بدرجة حرارة 35 م واضيف له انزيم الببسين المنقى جزئياً(الحر، المرتبط) بنسبة 2.5 %. قيس التحلل البروتيني باتباع طريقة (6) لقياس التحلل البروتيني باستعمال طريقة الفورمالين وقيس التحلل كل 30 دقيقة ولمدة 3 ساعات واستعمل المتحلل البروتيني بدون اضافة انزيم كعينة مقارنة.

النتائج والمناقشة

استخلاص الانزيم : تشير النتائج الموضحة في الشكل (1) ان افضل محلول لاستخلاص انزيم الببسين من معدة الاغنام هو محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 6% الحاوي على 2% حامض بوريك ، اذ انه اعطى اعلى فعالية نوعية والتي كانت 14.3 وحدة /ملغم مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى والتي تراوحت الفعالية النوعية فيها بين 8.04-13.49 وحدة/ملغم . وتبين النتائج في الشكل (2) ان محلول فوسفات الصوديوم الدارىء بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.3 هو المحلول الافضل لاستخلاص انزيم الببسين من معدة الدجاج اذ اعطى فعالية نوعية مقدارها 13.79 وحدة /ملغم مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى التي تراوحت الفعالية النوعية فيها بين 10.34 – 12.73 وحدة /ملغم .بينما اوضحت النتائج في الشكل (3) ان محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 6% الحاوي على 2% حامض بوريك هو افضل محلول لاستخلاص انزيم الببسين من معدة سمك النويبي اذ اعطى اعلى فعالية نوعية والتي بلغت 13.65 وحدة /ملغم مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى التي تراوحت الفعالية النوعية بين 10.29 _ 13.12 وحدة /ملغم .

نلاحظ من النتائج ان محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 10% اعطى اعلى فعالية انزيمية عند استعماله في استخلاص انزيم الببسين من معدة الاغنام ، الدجاج وسمك النويبي وفي الوقت نفسه اعطى زيادة في تركيز البروتين مما ادى الى انخفاض قيمة الفعالية النوعية لانزيم الببسين اذ ان وجود تركيز عالي من الملح في محلول الاستخلاص ادي الى زيادة في ذوبان اكبر كمية من البروتينات (دلالي،1983).كما توضح النتائج انخفاض الفعالية الانزيمية والنوعية لانزيم الببسين المستخلص من معدة الاغنام ، الدجاج وسمك النويبي باستعمال الماء المقطر مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى اذكانت الفعالية الانزيمية 10 ،18.6 ،19.2 وحدة /مل على التوالي والفعالية النوعية 8.04، 10.34، 10.29 وحدة /ملغم على التوالي . ان سبب هذا الانخفاض قد يعود الى عدم امتلاكه قوة ايونية تمكنه من فك ارتباط الانزيم من الانسجة كما انه لا يمتلك سعة بفرية تمكنه من المحافظة على رقم هيدروجيني مناسب لثبات.

ان الاختلافات الموجودة في قيم الفعالية النوعية لمحاليل الاستخلاص يمكن ان تعزي الى اختلاف ذائبية البروتينات الموجودة في انسجة المعدة باختلاف محاليل الاستخلاص والتي تنعكس على تركيز البروتين وهذا بدوره يؤثر في الفعالية النوعية لانزيم الببسين .

تنقية انزيم الببسين:1-تركيز الانزيم: ركز انزيم الببسين باستعمال املاح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع متدرجة تراوحت بين20-90%،وكانت افضل نسبة اشباع لتركيز ببسين الاغنام، ببسين الدجاج وببسين سمك النويبي من 30-70% ، 20-90% ، 20-60 % على التوالي ، اذ جمع الراسب الناتج من النبذ المركزي واذيب في قليل من الماء المقطر وتمت ديلزته تجاه الماء المقطر للتخلص من كبريتات الامونيوم ثم قيست الفعالية الانزيمية والنوعية لكل منها وكان مقدارها 54.2 ،58.8 ، 56.3 وحدة /مل و 44.42 ،42 ،41.39 وحدة /ملغم على التوالي كما موضح في الشكل (4) .

يعد الانزيم الناتج من خطوات الترسيب بكبريتات الامونيوم منقى تنقية جزئية (Partially Purified) بسبب تداخل ذائبية مديات واسعة من بروتينات مختلفة (2).

نلاحظ من الشكل ان ببسين الدجاج المنقى جزئيا يمتلك فعالية انزيمية اعلى من ببسين الاغنام وسمك النويبي لذلك استعمل في عملية الربط .

ربط ببسين الدجاج المنقى جزئيا (المديلز):استعملت عدة طرق لربط الانزيمتضمنت ربط الانزيم بواسطة الحجز بالجينات الكالسيوم ، ربط الانزيم

بالادمصاص على السليكاجل ، ربط الانزيم بالارتباطات المستعرضة Caross-linking باستعمال راتنج SRF وربط الانزيم بالحجز بالاكار.

تبين النتائج ان كفاءة ربط الانزيم بطريقة الحجز بالجينات الكالسيوم كانت اقل من طريقة الحجز بالاكار اذ بلغت 55 % وان كلا الطريقتين اعطتا كفاءة ربط تقع ضمن المدى الطبيعي والذي يتراوح بين 50-80 % (17) .

قُيمت افضل طريقة لربط الانزيم عن طريق تقدير كفاءة ربط الانزيم وتبين النتائج الموضحة في الشكل (5) تفوق طريقة الحجز بالاكار في ربط ببسين الدجاج المنقى جزئيا مقارنة بالطرق الاخرى اذ اعطت هذه الطريقة اعلى كفاءة ربط للانزيم اذ بلغت 67% .وتشير النتائج ان كفاءة ربط الانزيم بطريقة Cross-linking باستعمال راتنج SRF كانت 43 % ،وان ربط الانزيم بطريقة الادمصاص على السليكا جل اعطى اقل كفاءة ربط مقارنة بالطرق الاخرى اذ بلغت15.7%.

قد يعود سبب انخفاض فعالية الانزيم المرتبط براتنج SRF الى قلة عدد الاواصر التساهمية المتكونة نتيجة لعدم وجود بعض المواد التي تساعد على تكوينها مثل Glutaraldehyde ،او الى تكوين اواصر تساهمية بين البروتينات الموجودة مع الانزيم والمادة الداعمة. اما سبب انخفاض فعالية الانزيم المرتبط بالسليكا جل فيعود الى احتمال حدوث ضمور للمواقع الفعالة نتيجة لادمصاص الانزيم على سطح السليكاجل او حدوث تسرب لجزيئات الانزيم وانفصالها عن السليكا جل او حدوث ارتباط للمواقع الفعالة مع السليكا جل او ارتباط البروتينات الموجودة مع الانزيم مع السليكا جل. بينما يعود سبب احتفاظ الانزيم المرتبط بالحجز بالاكار وبالجينات الكالسيوم بفعاليته الى امكانية هذه التقنية في المحافظة على الهيئة الطبيعية للانزيم بحيث لا يحدث أي ارتباط جانبي يؤدي الى شغل جزء من الانزيم وانما يعتمد على حجز الانزيم داخل شبكة هلامية تعمل على الحفاظ عليه من الخروج الى وسط التفاعل وتسمح في الوقت ذاته بدخول كافة مكونات التفاعل وخروج النواتج (28).

اختيار افضل تركيز من الاكار في ربط الانزيم: استعملت التراكيز (1 ،2 ،3 ،4 ،5) % من الاكار لربط ببسين الدجاج المنقى جزئيا وذلك لمعرفة افضل تركيز لربط الانزيم .اشارت النتائج الموضحة في الشكل (6) ان افضل تركيز لربط ببسين الدجاج المنقى جزئيا بالاكار هو تركيز 3% اذ اعطى اعلى كفاءة ربط والتي بلغت 75% بينما كانت اقل كفاءة ربط للانزيم عند تركيز 1% اذ بلغت 43% وذلك بسبب خروج الانزيم من قطع الاكار التي كانت هشة بسبب تركيزها الواطيء. وعند تركيز 2% كانت قطع الاكار اقل هشاشة من تركيز 1% وبذلك قلت كمية الانزيم المتسربة من مسامات الاكار وبالتالي كانت كفاءة الربط عند تركيز 2% والتي بلغت 67% اكثر من كفاءة الربط عند تركيز 1% .

كما تبين النتائج ان تركيز 4% و5% اعطيا كفاءة ربط اقل من تركيز 3% وقد يعزى سبب ذلك الى صلابة قطع الاكار وبالتالي صغر حجم المسامات مما ادى الى اعاقة وصول المادة الاساس الى الانزيم المحجوز داخل الاكار .ان هذه الاختلافات في كفاءة ربط الانزيم بالحجز يعود الى الاختلافات في حجم مسام المادة الداعمة والذي يعتمد على تركيز المادة المستعملة في الربط بالحجز (8).

تاثير عدد مرات استعمال الانزيم المرتبط على الفعالية: درس تاثير عدد مرات استعمال قطع الاكار المحتوية على ببسين الدجاج المنقى جزئياً على الفعالية المتبقية للانزيم المرتبط .وتبين النتائج في الشكل (7) الى امكانية استعمال الانزيم المرتبط لغاية 7 مرات لكن الفعالية الانزيمية قلت مع زيادة عدد مرات الاستعمال .فقد احتفظ ببسين الدجاج المنقى جزئيا بـ 76% عند الاستعمال الرابع ، بينما احتفظ بـ 25% عند الاستعمال السابع وانه فقد فعاليته باكملها عند الاستعمال الثامن، قد يعود

سبب انخفاض الفعالية مع استمرار الاستعمال الى تسرب الانزيم من المادة الداعمة خلال الاستعمال والغسل بالماء بعد كل استعمال.

تاثير فترات الخزن على فعالية الانزيم: خُزن ببسين الدجاج المنقى جزئيا المرتبط بالاكار بالتجميد والتبريد وبدرجة حرارة المختبر لمدة60 يوم .ان عملية الخزن بالتجميد وبدرجة حرارة

المختبر لم تنجح بسبب تهشم قطع الاكار وخروج الانزيم منها عند الخزن بالتجميد وبسبب نمو الاحياء المجهرية على الاكار عند خزنه بدرجة حرارة المختبر .اما بالنسبة للخزن بالتبريد فتشير النتائج الموضحة في الشكل (8) الى ثباتية ببسين الدجاج المنقى جزئيا بعد 60 يوم من الخزن حيث بلغت الفعالية المتبقية 22%.

الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الببسين: قدرالرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحللية لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط بمدى من الارقام الهيدروجينية تتراوح بين 1-9 وبينت النتائج الموضحة في الشكل (9) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط بلغ 2 . حيث اعطى الببسين اقصى فعالية عند هذا الرقم الهيدروجيني والتي بلغت 26.15 وحدة/مل للحر و 18.2 وحدة /مل للمرتبط .

نلاحظ من النتائج انخفاض الفعالية التحللية للببسين الحر والمرتبط بارتفاع الرقم الهيدروجيني عن 3 ويأتي هذا الانخفاض نتيجة لتاثير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في المجاميع القابلة للتاين الموجودة في الموقع الفعال او لتغيير الحالة الايونية للمادة الاساس او لتغيير الحالة الايونية

لمعقد الانزيم –المادة الاساس (ES) ومعقد الانزيم الناتج (EP) (9;27).

الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الببسين: عُيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط بحضنه لمدة 30 دقيقة بدرجة 35 ْم في محاليل دارئة تراوحت ارقامها الهيدروجينية بين 1-9 .

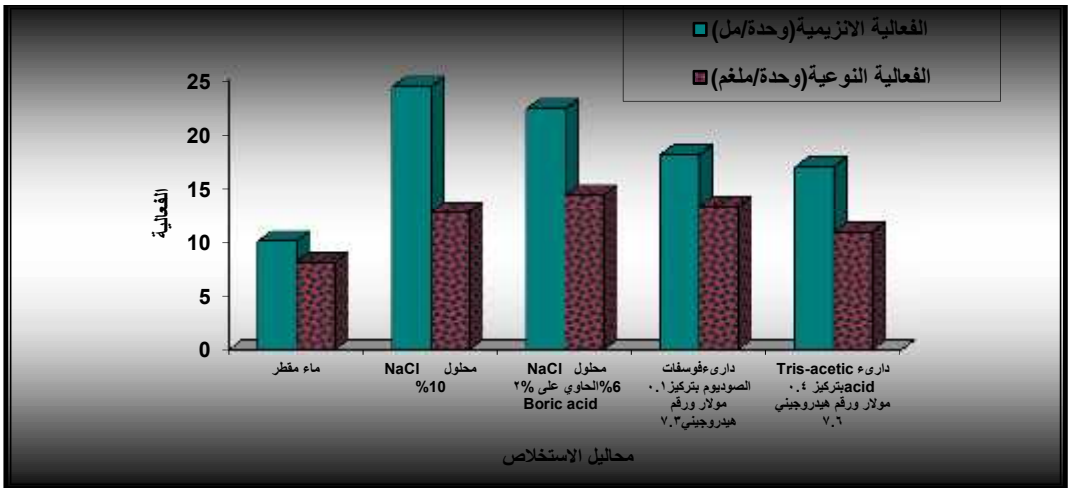
تبين النتائج في الشكل (10) ان المدى الامثل لثبات ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط يتراوح بين 2-3 وان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم هو 3 ، كما توضح النتائج ان ثباتية الانزيم الحر والمرتبط تنخفض كلما ارتفع الرقم الهيدروجيني من- 7 وانه فقد فعاليته عند الارقام الهيدروجينية القاعدية 8 ،9 .

يعزى سبب انخفاض فعالية الانزيم عند ارتفاع الرقم الهيدروجيني عن الحدود المثلى للثبات الى مسخ جزيئة البروتين وتغير شكل او هيئة الموقع الفعال او تغير التركيب الثانوي والثلاثي للانزيم ومن ثم فقدان الفعالية الانزيمية (22).

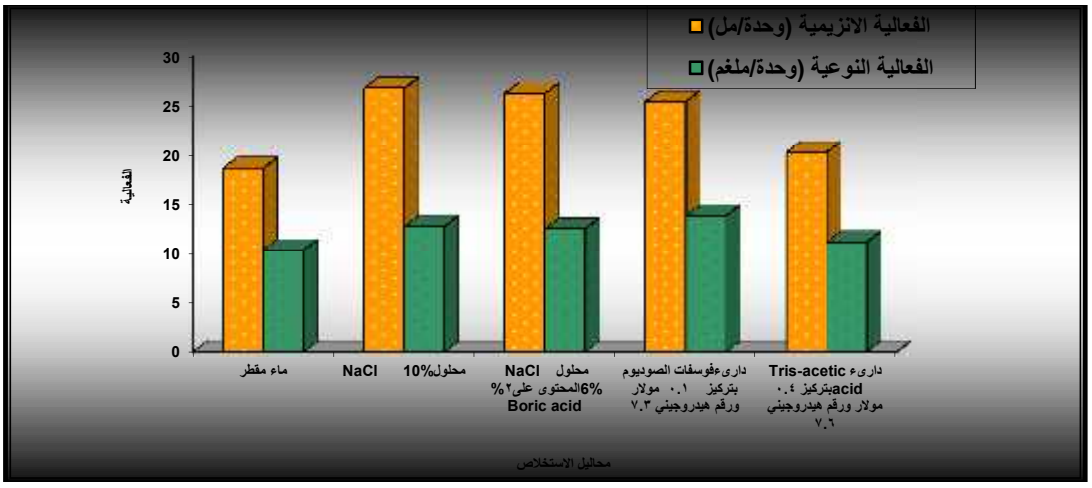
درجة الحرارة المثلى لفعالية الببسين :تشير النتائج في الشكل (11) الى حصول زيادة واضحة في الفعالية التحللية بزيادة درجة حرارة التفاعل حتى بلغت اقصاها عند درجة حرارة 45 م لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر و55 م للمرتبط ، اذ بلغت الفعالية التحللية 31.6 وحدة /مل للحر و 30.8 وحدة /مل للمرتبط .

بعد ذلك انخفضت الفعالية التحللية بزيادة درجة الحرارة لتصل الى 4.56 وحدة /مل لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر عند 75 ْم والى 14.3وحدة /مل لببسين الدجاج المنقى جزئيا المرتبط عند 75 ْم .

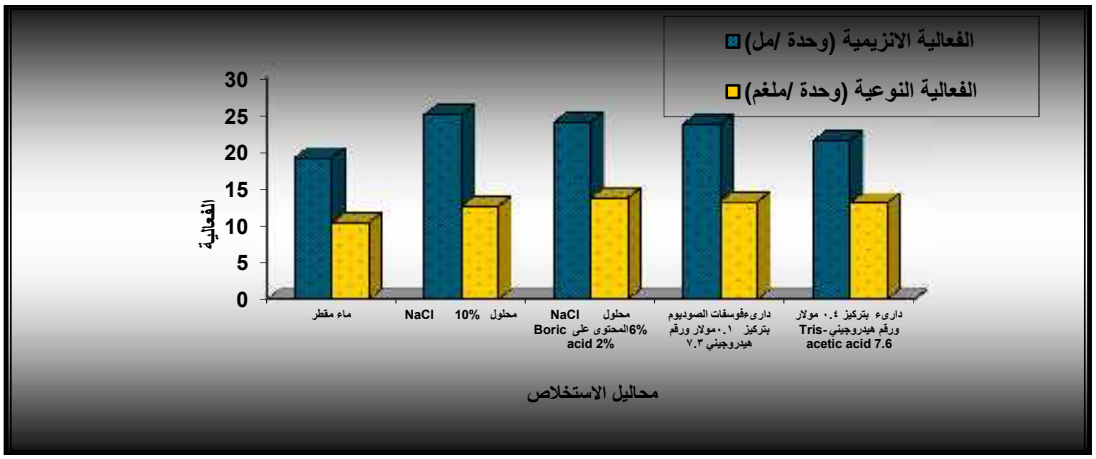
ان زيادة سرعة التفاعلات الانزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة يعود الى زيادة الطاقة الحركية للجزيئات ومن ثم زيادة التصادمات بين جزيئات الانزيم وجزيئات المادة الاساس ، اما انخفاض الفعالية الانزيمية عند الدرجات الحرارية العالية فانه يعود الى امتصاص الجزيئات المتفاعلة لطاقة عالية مما يؤدي الى تغيير التركيب الثلاثي للانزيم ومن ثم مسخه وفقدانه جزء من فعاليته (22).



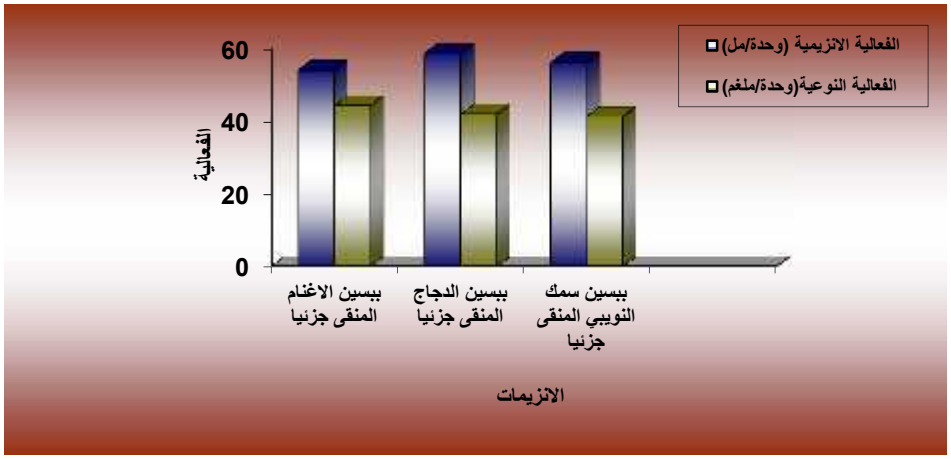
شكل (1) مقارنة بين محاليل استخلاص انزيم الببسين من معدة الاغنام



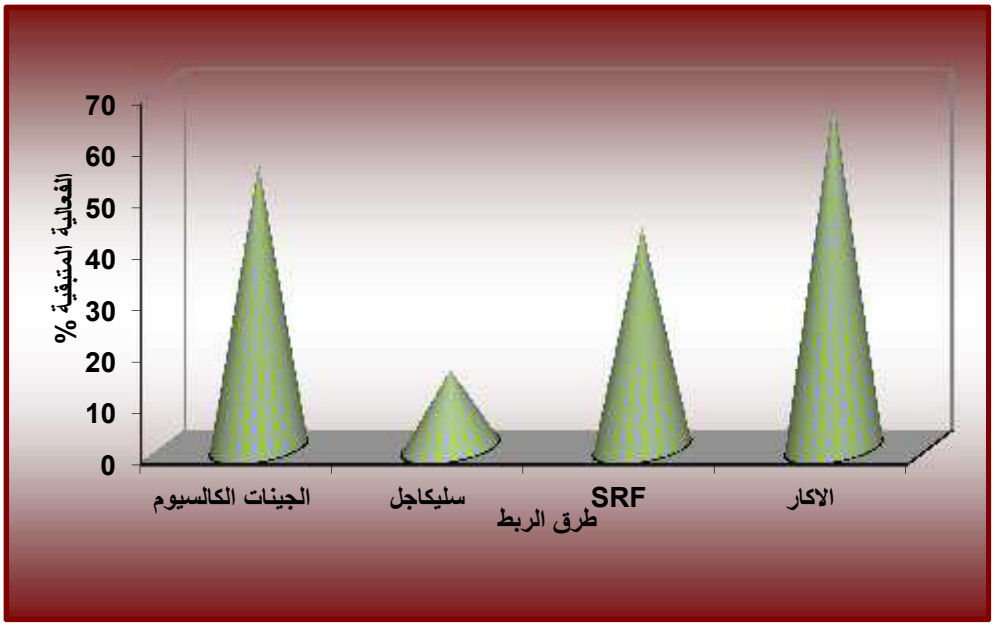
شكل (2) مقارنة بين محاليل استخلاص انزيم الببسين من معدة الدجاج



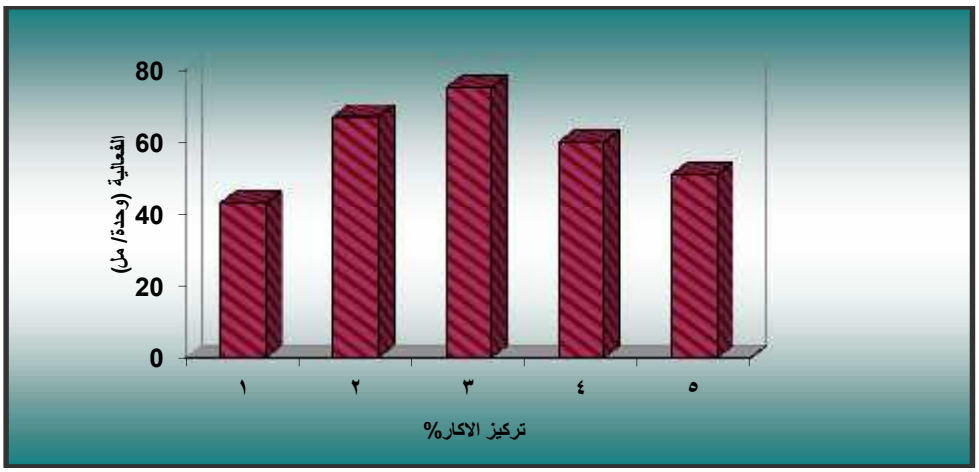
شكل (3): مقارنة بين محاليل استخلاص انزيم الببسين من معدة سمك النويبي



شكل (4) مقارنة الفعالية للانزيمات الثلاثة المنقاة جزئيا (ببسين الاغنام ، ببسين الدجاج، ببسين سمك النويبي)



شكل (5) مقارنة بين كفاءة ربط ببسين الدجاج المنقى جزئياً باستعمال طرق مختلفة.



شكل (6) اختيار افضل تركيز من الاكار في ربط ببسين الدجاج.

4-درجة الحرارة المثلى لثبات الببسين

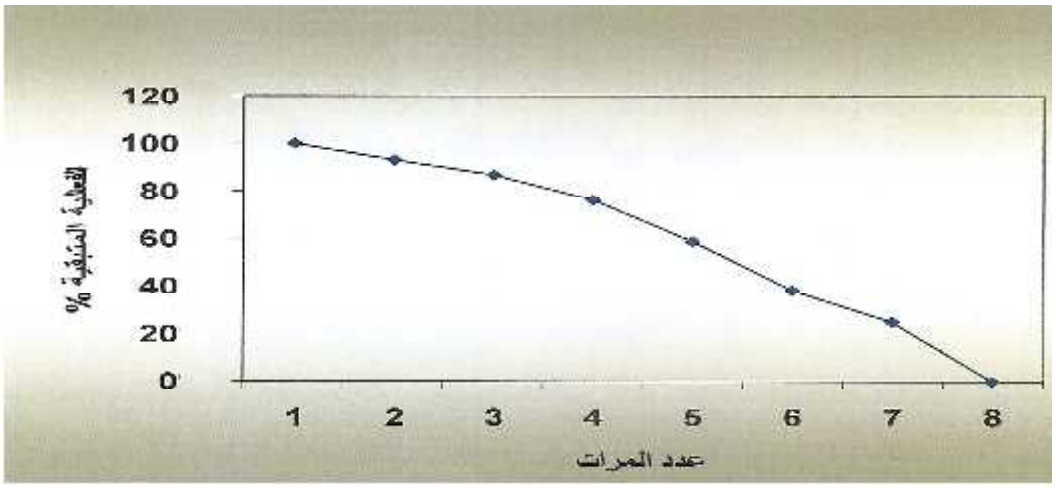
يوضح الشكل (12) نتائج حضن ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط بدرجات حرارة تراوحت بين 15-85مْ لمدة 15 دقيقة تبين النتائج ان ببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط احتفظ بكامل فعاليته التحللية بدرجة حرارة تراوحت بين 15-45م، وان الفعالية التحللية لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر والمرتبط انخفضت مع ارتفاع درجة الحرارة حيث احتفظ الانزيم الحر بـ 59%من فعاليته واحتفظ الانزيم المرتبط بـ 76% من فعاليته عند درجة 55مْ بعدها انخفضت الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة الى ان فقدت بالكامل عند 75 م للحر والمرتبط .ويعزى سبب انخفاض فعالية الانزيم مع ارتفاع درجة الحرارة الى ان الحرارة العالية تؤثر في تركيب الانزيم اذ تؤدي الى دنترته في وتغيير هيئة الموقع الفعال مما يؤدي الى فقدان فعاليته (15) .

نلاحظ من النتائج ان الانزيم المرتبط اكثر ثباتاً من الانزيم الحر وذلك لان عملية الربط تعطي حماية للموقع الفعال الخاص بالانزيم (20).

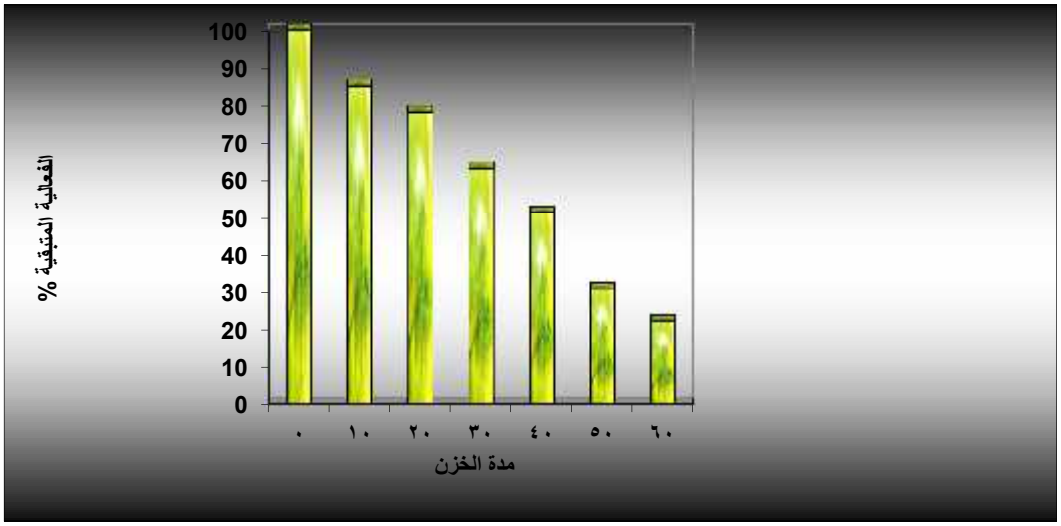
تحلل بروتينات سمك النويبي باستعمال ببسين الدجاج الحر والمرتبط

يبين الشكل (13) تحلل بروتينات سمك النويبي باستعمال ببسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار، نلاحظ زيادة التحلل مع تقدم الوقت ويمكن ملاحظة فعل الانزيم من خلال زيادة عدد مللترات القاعدة المستخدمة في التسحيح اذ بلغت اقصاها عند الفترة الاخيرة 180 دقيقة وكانت 2.8 ، 2.6 مل لببسين الدجاج الحر والمرتبط على التوالي .

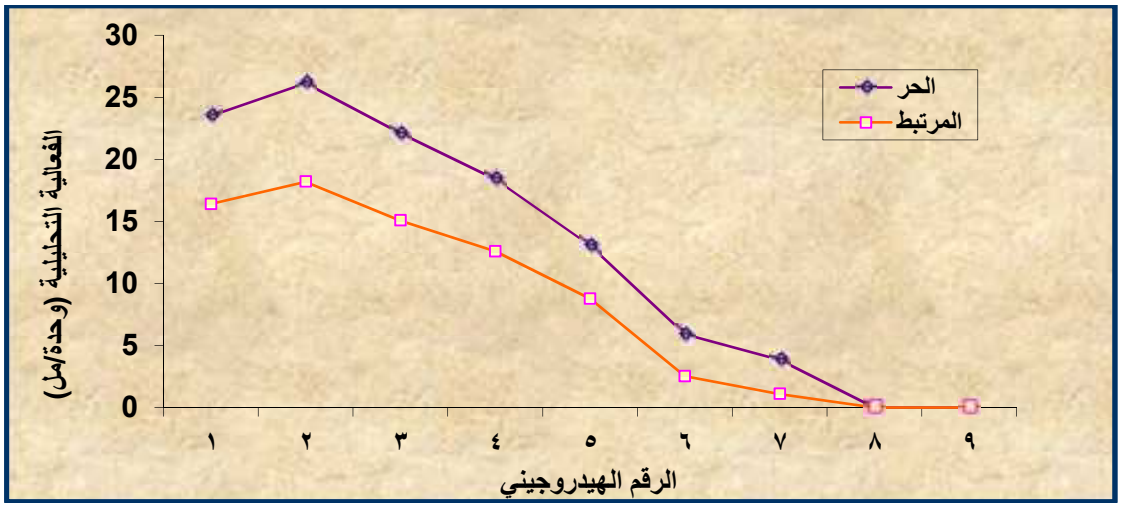
نستنتج من هذا البحث امكانية ربط ببسين الدجاج المنقى جزئياً بتقنيات ربط مختلفة و استعمال تقنية الحجز بالاكار كافضل طريقة للربط وامكانية استعمال الانزيم المرتبط في انتاج المتحللات البروتينية.



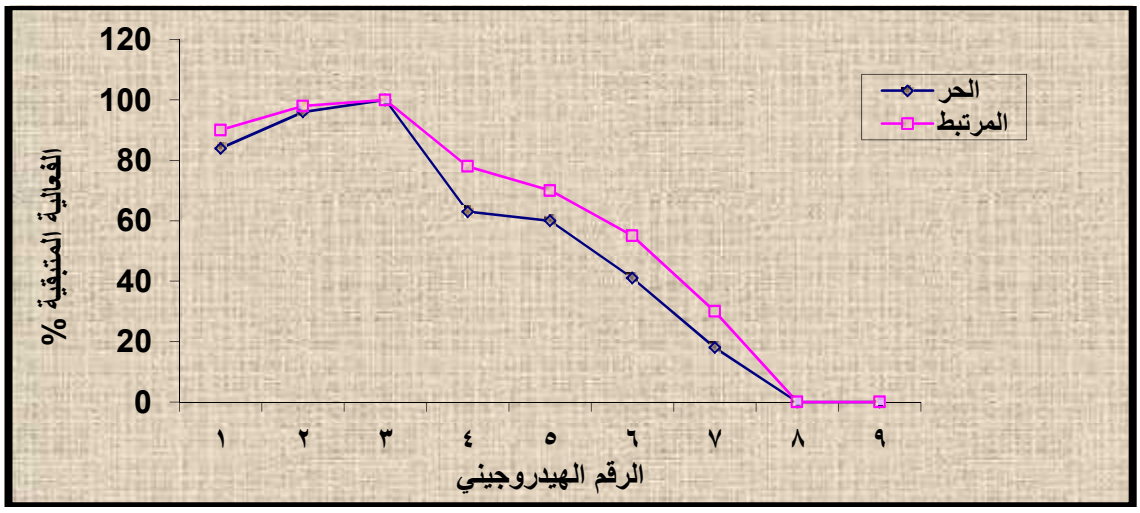
شكل (7): عدد مرات استعمال ببسين الدجاج المنقى جزئياً المرتبط بالاكار بتركيز 3% .



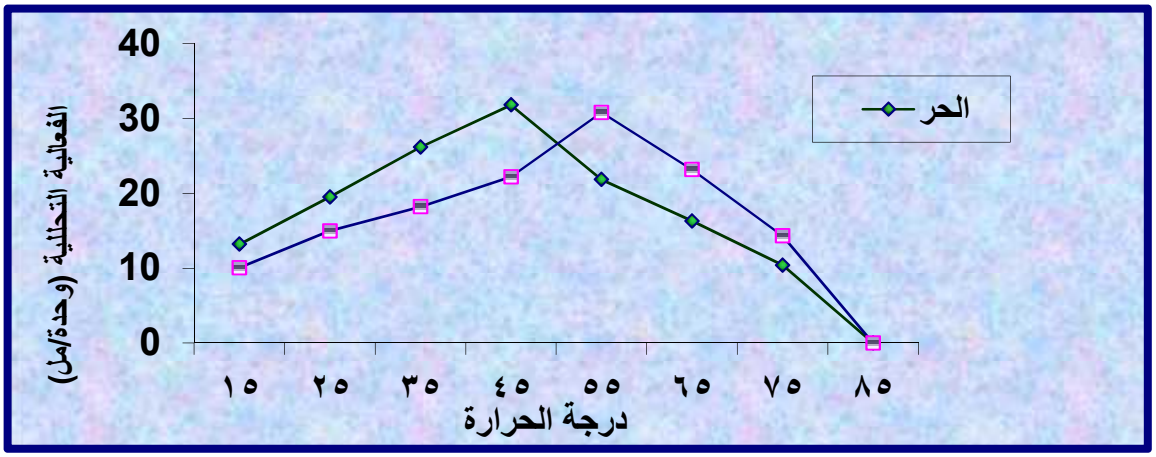
شكل (8): فعالية ببسين الدجاج المنقى جزئيا المرتبط بالاكار خلال خزنه لمدة 60 يوم في درجة حرارة 4° م.



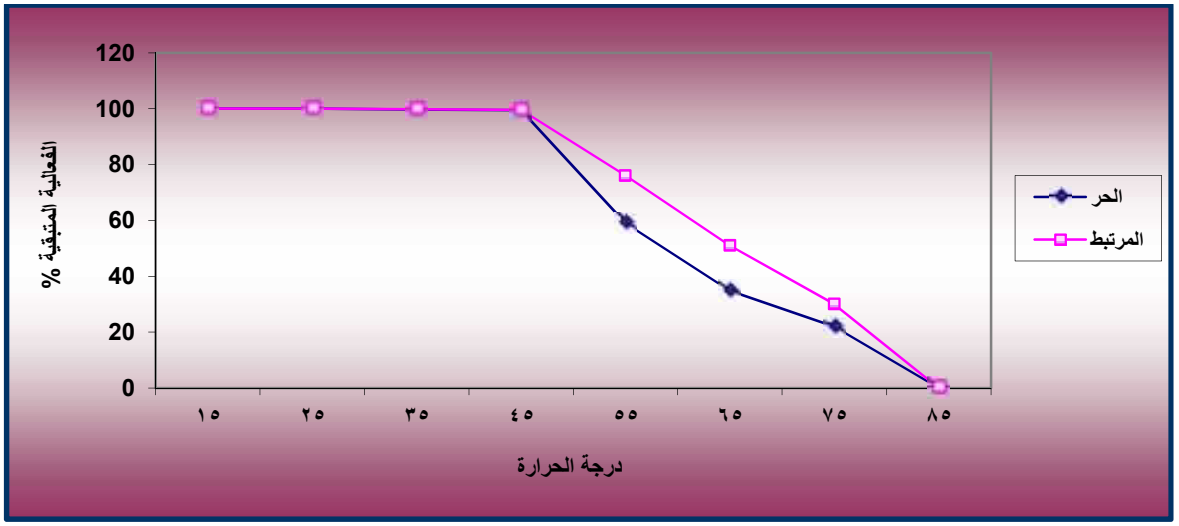
شكل (9):الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحللية لببسين الدجاج الحروالمرتبط بالاكار.



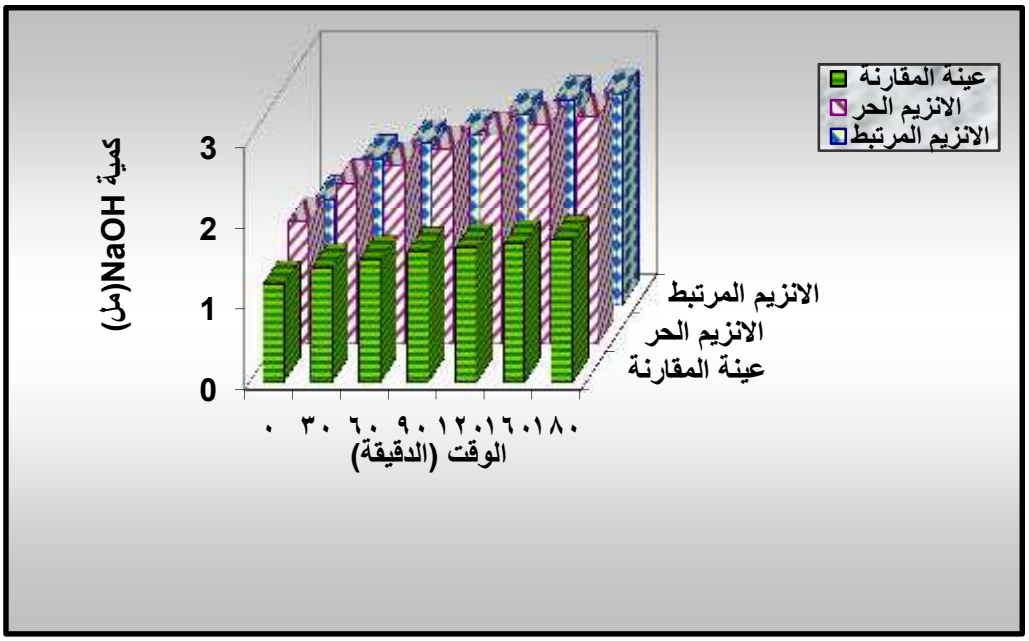
شكل (10): الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الفعالية التحللية لببسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار.



شكل (11): درجة الحرارة المثلى للفعالية التحللية لببسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار.



شكل (12): درجة الحرارة المثلى لثبات الفعالية التحللية لببسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار.



شكل (13): تحلل بروتينات سمك النويبي باستعمال ببسين الدجاج الحر والمرتبط بالاكار.

المصادر

1- الطائي ، منير عبود جاسم والموسوي ، ام البشر حميد جابر (1992). تكنلوجيا اللحوم والاسماك العملي . دار الحكمة – جامعة البصرة.

2-دلالي ، باسل كامل (1983). فهم الانزيمات. مطابع جامعة الموصل – جامعة الموصل .

3-Altun, G. D. and Cetinus, S. A. (2007). Immobilization of pepsin on chitosan beads. Food chemistry, 100: 964-971.

4-Asimov, I.(1980). A short history of biology. West port, Greenwood press.

5-Aszmann, O. C. (2000). The life and work of Theodore Schwann. J. Reconstr. Microsurg,16: 291-296.

6-Beddows, C. G. ;Ismail, M. and Steinkeraus, K. H. (1976). The use of bromelaion in the hydrolysis of mackerel and the investigation of fermented fish aroma. J. Food Technol.,11: 379-388.

7-Cao, L.; Langen, L. V. and Sheldon, R. A. (2003). Immobilisedenzymes:carrier-bound or carrier free?. Current Opinion in Biotechnology, 14: 387–394.

8-Cao, L. (2005). Carrier-bound Immobilized Enzymes principles, Applications and Design. Wiley –VCH Gmb H& Co. KGaA .

9-Fullbrook , P . O . (1983). Practical limits and prospects , In . Industrial Enzymology , The Application of Enzmes . (Eds., Godfery, T . and Reichelf, J .) . The Natural Press . London .

10-Godfrey, T. and Reichelt, J. (1983). Industrial Enzymology.Nature Press, New York.

11-Green, M.L. (1972) .Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as rennet substitutes for cheddar cheese-making. J. Dairy Res.,39: 261-273.

12-Gupta, R.; Beg, Q. K. and Lorenz, P. (2002). Bacterical alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. Applied microbiology and Biotechnology, 59: 15-32.

13-Kennedy, J. F. and Melo, E. H. M. and Jumel, K. (1990). Immobilized Enzmes and cells chemical Engineering progress, 86(7): 81-89.

14-Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein

measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

15-Maciunska, J.; Czyz, B. and Synowiecki, J. (1998). Isolation and some properties of B- galactosidase from the thermophilic bacterium Thermusthermophilus.Food Chemistry , 63(4): 441-445.

16-Minovska, V.; Winkelhausen,E and Kuzmanova, S. (2005). Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. J. Serb. Chem. Soc., 70 (4): 609-624.

17-Monsan, P. and Combes, D. (1988). "Enzyme Stabilization by Immobilization". In Eds., Mosbach, K. (Ed.). Methods in Enzymology Vol. 137, Part D. Academic Press, Inc. 584pp.

18-Moschopoulou, E. E. ; Kandarakis, I. G.; Alichanidis, E. and Anifantakis, E. M. (2006). Purification and characterization of chymosin and pepsin From kid. J. Dairy Research, 73: 49-57.

19-Moses, V. and Cape, R. E. (1991). Biotechnology, the science and business. UK:Harwood Academic publishers: 322-326.

20-Olson, A.C. and Stanley, W.L. (1974). The use of tannic acid andphenol-formaldehyde resins with gluteraldehyde to immobilize enzymes. In: Olson, A. C. and Cooney, C.L.(Eds.). Immobilized enzymes in food and microbial processes. Plenum Press, New York. Pp. 51-62.

21-Riaz, A; Qader, S. A. U,; Anwar, A. and Iqbal, S. (2009) . Immobilization of the rmostable A-amylase on calcium Alginate Beads from *Bacillus Subtilis* KIBGE-HAR.Australian. J. Basic and Applied sci.,3(3):2883-2887.

22-Segel, I.H. (1976). Biochemical calculations. 2nd Edn, John and sons. Inc. New York.

23-Shah, B.; Kumar, S. R. and Devi, S. (1995). Immobilized proteolytic Enzymes on Resinous Materials and their use in Milk-clotting. process Biochemistry, 30(1): 63-68.

24-Shubber, N.A.K. (2000). Production of gluconic acid from D-glucose by immobilization techniques in bioreactor. M.Sc. Thesis, Baghdad Univ.

25-Temiz, H; Okumus, E, Akut, U; Dervisoglu, M. and Yazici, F. **(**2008). Portial purification of pepsin from turkey proventriculus. World J. Microbiol Biotechnol., 24(9): 1851-1855.

26-Whitaker, J. R. (1958). Properties of the proteolytic enzymes of commercial ficin . J. Food Research, 22:483-493.

27-Whitaker, J. R. (1972). Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker, Inc., New York. Pp 571-579 .

28-Zaborsky, O . (1974) . Immobilized Enzymes . 3rd Edn. CRC Press.

Extraction, Purification, Characterization and Immobilization of Chicken Pepsin and Using it in Protein hydrolysate

Zena K. Issa and Munir A. Jasim
Department of Food Science, College of Agriculture, University of Basrah

Abstract: The present study aimed to Isolate pepsin enzyme Ec: 3.4.23.1 from some animal sources and Purified it and Studied it's Characteristics and Immobilized it as well as it's practical applications in food industry. The enzyme was extracted from the stomach of three animal sources (Sheep, Chicken and Nuwaibi fish) using five extraction solutions including Distilled water , Sodium chloride (10%) solution , Sodium chloride (6%) Boric acid (2%) solution ,Sodium Phosphate 0.1M and an pH 7.3 solution and Tris-acetic acid 0.4M and an pH 7.6 solution in order to find out the best source of enzyme and the best extraction solution . Sheep's stomach was the best source of enzyme , Sodium chloride (6%) Boric acid (2%) solution was the best extraction solution which gave the highest specific activity 14.3 unit / mg .Protein content for the crude enzyme extracts were con centrated using saturated ammonium sulfate in arrange 30-70% , 20-90% and 20-60% for Sheep, Chicken and Nuwaibi fish pepsin respectively, Dialysis was done using distilled water. Dialyzed Chicken pepsin possesses the highest proteolytic activity. The dialyzed chicken pepsin Immobilized study with four carriers including Silica gel, SRF Resinous, Calicium Alginate and Agar showed that the best carrier was agar which gave the maximum Immobilized efficiency 67%.The best optimum concentration for Immobilize dialyzed chicken pepsin with agar was 3% with the highest proteolytic enzyme 75%. The purified sheep pepsin was Immobilized with agar in 3% concentration .The remainder enzyme activity for agar Immobilized pure Sheep pepsin and dialyzed Chicken pepsin were 25% , 21% respectively after 7 times using and the remainder enzyme activity for agar Immobilize pure Sheep pepsin and dialyzed Chicken pepsin wer 22%, 27% respectively was stored for 60 days in 4 °C. The optimal pH for proteolytic activity for pure free and Immobilize dialyzed Chicken pepsin was 2 .The optimal pH for the stability of free and Immobilize dialyzed Chicken pepsin are 3. The free and Immobilize enzymes lost their activities at alkaline pH values 8 and 9. The optimal temperature for free dialyzed Chicken pepsin was 45 ˚C and 55 °C for its Immobilize form. The optimal temperature for clotting activity for free and Immobilize dialyzed chicken pepsin was 35°C .The optimal temperature for free and Immobilize dialyzed Chicken pepsin stability was 15-45 ˚C. Both free and Immobilize dialyzed Chicken pepsin lost their activities completely at 85°C. Agar Immobilized dialyzed Chicken pepsin was utilized in the preparation of protein concentrate reached the maximum hydrolysis in 180 min. Immobilize Chicken pepsin hydrolysis was approximately similar to free Chicken pepsin which reached 2.6, 2.8 respectively.