دراسة كفاءة عزله محلية للفطر *Aspergillus niger* في إنتاج إنزيم اللاييز

سيف طالب جاسم[1] ، خليل ابراهيم بندر[1] ، ذكرى احمد حمادة[2]

[1] *قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق*

[2] *كلية الطب ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق*

(تاريخ الاستلام: 22 / 5 / 2012 ---- **تاريخ القبول:** 1 / 10 / 2012)

الملخص

تم عزل وتشخيص 17 عزلة محلية من الجنس *Aspergillus* تعود إلى الانواع هي : *Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus* . من البذور الزيتية والتربة . والكشف عن قابليتها على افراز انزيم اللاييز باستخدام طريقة الاوساط الصلبة الحاوية على مادة Tween 80وانتخبت عزلة الفطر (1) *Aspergillus niger* المعزولة من بذور الفستق بوصفها أفضل عزلة محلية منتجة لأنزيم اللاييز إذ حققت أعلى نمو وأفضل إفراز لانزيم للاييز، واخضعت لمجموعة من التجارب وذلك لتحديد الظروف المثلى لنمو العزلة وإنتاجها للإنزيم باستخـدام الأوساط السائلة. استخلص انزيم اللاييز بالنبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4مْ وبسرعة 5000 دورة/دقيقة وتمت تنقيته إذ أظهرت خطوات تنقية إنزيم اللاييز المنتج من العزلة المحلية.*A. niger* بالترسيب بملح كبريتات الامونيوم بنسبة إشباع تراوحت بين(20-80%) وان النسبة 60% هي الأفضل في الترسيب إذ أعطت فعالية نوعية قدرها 22.76 وحدة/ملغم بروتين بعدد مرات تنقية 2.16 مرة وحصيلة إنزيمية93.15%، وأدى إمرار المحلول الإنزيمي على عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose إلى زيادة نقاوة الإنزيم إذ ارتفعت الفعالية النوعية إلى58.29 وحدة/ملغم بروتين وعدد مرات تنقية إلى 5.54 مرة وبحصيلة إنزيمية 66.02%. جمعت الأجزاء التي أظهرت فعالية إنزيمية عالية وأخضعت لعملية الفصل بطريقة الترشيح الهلامي بعمود هلام Sephacryl-S300 أعطت هذه الخطوة فعالية نوعية 66.92 وحدة/ملغم بروتين وعدد مرات تنقية 6.36 مرة وحصيلة إنزيمية مقدارها 40.36%. بلغ الوزن الجزيئي للانزيم المنقى 28.840 كيلودالتون.

المقدمة :

تعد اللاييزات lipases من الإنزيمات التي تعمل على التحلل المائي للاصرة الاسترية للمادة الاساس الغير ذائبة في الماء خلال التداخل السطحي بين المادة الاساس وسطح الماء وهذا يساعد في تحلل الكليسريدات الثلاثية طويلة السلسلة الى كليسريدات احادية وثانوية والتي تحرر الدهون والكليسرول [1–2]

يعد علم تكلنولوجيا الآنزيمات من العلوم الحيوية التي ارتبطت ارتباطاً وثيقاً بالنواحي الاحيائية والفسيولوجية للإنسان والحيوان والنبات والاحياء المجهرية [3].

إن هذه الانزيمات المحللة للدهون واسعة الانتشار في الطبيعة إذ انها تنتج من الاحياء المجهرية المتمثلة بالبكتريا والفطريات ومن اهم الفطريات *Rhizopus sp.* و *Mucor sp.* و *Aspergillus sp.* و *Fusarium sp.* والتي تَعدّ من مصادر اللاييز الفضلى وذلك لإمكانية السيطرة على انتاجها من خلال سهولة السيطرة على البيئة التي تنمو فيها وسهولة تكاثرها وايضاً امكانية احداث الطفرات عليها لتنتج تلك الانزيمات [4–5].

ولإنزيم اللاييز دورٌ كبيرٌ في التقانة الحيوية والتطبيقات الصناعية إذ اشتملت عليها تطبيقات مهمة في مجالات صناعية حتى اصبحت اهميتها تفوق اهمية استخدام البروتيز وانزيم الاميليز وخاصة في مجال الكيمياء العضوية الصناعية وعمليات تحسين النكهة للمواد الغذائية ،إذ يدخل في صناعة الاجبان وتحضير الغذاء المستعمل في الحمية الغذائية [6]. ويدخل في صناعة الدهون وصناعة الورق والجلود والمنسوجات وصناعة مساحيق التنظيف[7]. كذلك يتميز بتطبيقاته الطبية واستعماله في انتاج المواد الصيدلانية والكيميائية ويستخدم في معالجة مياه الصرف الصحي والنفايات والتحليل الحيوي للبلاستيك[8].

تم في هذا البحث استغلال البذور الزيتية وعينات من التربة لعزل الفطريات واختبار قابلية هذه الفطريات المعزولة على افراز انزيم اللاييز ومعرفة العزلة الكفؤة في انتاجها لهذا الانزيم من خلال تغير بعض الظروف الزرعية . وبعد ذلك تم انتاج اللاييز في الوسط السائل ثم استخلاصه وتنقيته بعدة طرائق وتحديد الوزن الجزيئي له .

المواد وطرائق العمل :

1– عزل وتشخيص الفطريات من البذور:

جمعت بعض البذور الزيتية الفستق ، الفسق الحلبي ، الكازو، الجوز، السمسم، واللوز من الاسواق. وبعد الجمع غسلت بماء الحنفية للتخلص من الشوائب والاتربة ثم أخذت البذور وعقمت سطحياً بغمرها بمحلول 1% هايبوكلورات الصوديوم (NaOCl) Sodium hypochlorite solution لمدة دقيقة واحدة وفي ظروف معقمة ثم غسلت القطع بالماء المقطر المعقم ووزعت البذورعلى الاطباق الحاوية على وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose agar (PDA) المعقم والمضاف اليها المضاد الحيوي Streptomycin (100 جزء بالمليون) وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة (28 ± 1) مْ لمدة 7 ايام [9]. وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية [10–12] تم تشخيص الفطريات المعزولة من البذور.

2– عزل وتشخيص الفطريات من التربة :

تم إزاحة الطبقة العلوية بحدود 2 – 5 سم من تربة حديقة الجامعة في تكريت ، واتبعت طريقة التخافيف المتسلسلة وفقاً لما جاء به [13] و

نُشر باستخدام الناشر الزجاجي في طبق بتري يحتوي على وسط (PDA) المعقم مضاف اليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول بتركيز (10) مايكروغرام/مل وبواقع (3) مكررات/عينة. وضعت الاطباق في حاضنة عند درجة حرارة (28 1 ± °م) لمدة (2-8) ايام بعدها فحصت المستعمرات النامية ثم اجريت عملية نقل الفطريات النامية إلى وسط (PDA) . واعتمدت على المفاتيح التصنيفية في تشخيص الفطريات المعزولة من التربة [10–12].

3- الأوساط الزرعية :

1-3: وسط الكشف عن افراز انزيم اللايبيز بوساطة تحلل مادة Tween 80

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل [14-15] لتحضير الوسط الزرعي الخاص والذي يتكون من المكونات التالية (غم/لتر):ببتون 8، كلوريد الكالسيوم المائي $CaCl_2.2H_2O$ 0.1، اكار20 و Tween 80 (Poly Oxyethylene Monooleite) 10 مل ، و تم إذابة ببتون و كلوريد الكالسيوم المائي والاكار في كمية من الماء المقطر باستخدام محرك مغناطيسي Magnetic stirrer مع رفع درجة حرارة المزيج ثم أكمل الحجم إلى لتر، وضبط الأس الهيدروجيني الابتدائي عند 5.6 وعقم الوسط (Autoclave)، وتم تعقيم مادة Tween 80 بصورة منفردة في قنينة زجاجية، ثم تم إضافة مادة التفاعل80 Tween المعقمة والمضاد الحيوي Streptomycin إلى وسط التفاعل المعقم بعد ان يبرد وفي ظروف معقمة ثم حُرك الوسط وبهدوء على شكل رقم8 ليتم توزيع مادة التفاعل Tween 80 بصورة متجانسة في الوسط ، صبت الإطباق وبصورة متساوية وتركت لحين تصلب الوسط . لقحت الاطباق بعزلات من الفطر *Aspergillus niger* وذلك بأخذ اللقاح منها بواسطة الطعن اي بملامسة ابرة التلقيح لسطح المستعمرة الفطرية ونقلت ابرة التلقيح بهدوء الى الاطباق الحاوية على وسط الكشف واستخدمت هذه الطريقة للتلقيح وذلك لصعوبة الحصول على مستعمرة واحدة فقط داخل الطبق حيث ان هذا الفطر له القابلية على تكوين عدة مستعمرات داخل الطبق.

بعدها حضنت الاطباق بدرجة (28 ± 1) مْ لمدة 5 ايام، حسب ما جاءت به دراسة سابقة [14] ان الكشف عن افراز انزيم اللايبيز يتم بتكوين راسب ابيض تحت المستعمرة الفطرية النامية وحولها.

2-3: انتاج الانزيم على الوسط الغذائي السائل :

استخدم الوسط الغذائي السائل الخاص لإنتاج أنزيم اللايبيز والموصوف من قبل [17] والذي يتركب من (غم/ لتر) :فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين 12 ، كبريتات الأمونيوم 10 ، كبريتات المغنيسيوم المائية0.3، فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين 2، وكلوريد الكالسيوم 0.25 . وتم إضافة المصدر الكاربوني في الوسط (زيت الزيتون20 مل/ لتر) ثم ضبط الاس الهيدروجيني عند 6.0 باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم 1ع وحامض الهيدروكلوريك 1ع ، حيث تم توزيع الوسط الغذائي في دوارق مخروطية سعة 100 مل بمقدار 50 مل لكل دورق وبمعدل ثلاثة مكررات لكل معاملة وسدت الدوارق باستخدام سدادات قطنية وغلفت برقائق الألمنيوم ثم عقمت بجهاز المعقام عند الضغط 1.5بار ودرجة حرارة 121 مْ ولمدة 15 دقيقة ،بعد التعقيم تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت في ظروف معقمة بعالق سبورات الفطر المحضر بتركيز 5×10^{5} سبور/ مل من مستعمرة بعمر اسبوع، وبعد التلقيح وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة الحرارة المطلوبة وبمعدل 120 دورة/ دقيقة حسب فترة التحضين المطلوبة.

4- تحضير العالق السبوري:

حضر عالق سبورات الفطر حسب ما جاءت به دراسة [18-19].

5- قياس فعالية انزيم اللايبيز :

تم قياس فعالية انزيم اللايبيز حسب ما جاءت به دراسة سابقة [19].

6 :احتساب فعالية انزيم اللايبيز:

حسبت فعالية انزيم اللايبيز وفقاً لما جاء بهِ [20] وكما يلي :-

$$V_T - V_B = \text{Lipase activity in (Tietz and Fiereck) Unit/ml}$$

حيث ان :-

VT = حجم محلول هيدروكسيد الصوديوم المستعمل في تسحيح نموذج الاختبار.

VB = حجم محلول هيدروكسيد الصوديوم المستعمل في تسحيح نموذج السيطرة.

ويمكن تحويل هذه الوحدات إلى وحدات عالمية :

حيث ان :-

1.0(Tietz-Fiereck)Unit/ml = 0.278 U/ml
or= 280u/ml

7- تقديرتركيزالبروتين :

وصفت في دراسة سابقة [21].

9 : عزل الإنزيم Enzyme Isolation:

أُجريت عملية العزل للإنزيم وتقدير فعاليتة وتركيز البروتين بأسلوب مطابق لما ورد في الفقرتين 5 و6 و7على التوالي. جمع الراشح الذي يمثل الإنزيم الخام لانزيم اللايبيز، واستخدم في خطوات التنقية اللاحقة.

10 : تنقية إنزيم اللايبيز Lipase Purification

1-10 : تأثير نسب التشبع بكبريتات الامونيوم في تركيز إنزيم اللايبيز:

أُستعملت نسب مختلفة من كبريتات الامونيوم لتحديد نسبة الإشباع المثلى لتركيز المحلول الإنزيمي الخام، وأُستعملت نسب إشباع (20 و30 و40 و50 و60 و70 و80) % وأضيفت التراكيز المحضرة بصورة تدريجية في حمام ثلجي بدرجة حرارة 4 مْ مع التحريك المستمر على جهاز المحرك المغناطيسي، أُجريت بعد ذلك عملية النبذ المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة نصف ساعة وعند درجة الحرارة أعلاه، أُذيب الراسب بوساطة المحلول المنظم Tris-HCl بتركيز0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 7.0، وقُدرت الفعالية الإنزيمية بطريقة التسحيح وتركيز البروتين عند كل خطوة من مراحل الترسيب.

2-10 :تنقية الأنزيم باستعمال المبادل الأيوني:

DEAE–Cellulose (Diethylaminoethyl-Cellulose)

❖ **تحضير المبادل الأيوني** : حضر المبادل الأيوني تبعاً للطريقة التي قام بوصفها[22] .

وأجريت التنقية كما يلي:-

1. أُضيف المستخلص الإنزيمي المركز من خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم على عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بعناية.
2. نُظمت سرعة الجريان لتكون 1 مللتر/ دقيقة.
3. غُسلت مادة المبادل بضعف حجمها بوساطة محلول الموازنة .
4. أُستردت الأجزاء المرتبطة بسطح المبادل بوساطة محلول الاسترداد وجمعت بواقع 5 مللتر/جزء وبمعدل جريان 60 مللتر/ساعة بوساطة التدرج الملحي الخطي.
5. تَمت متابعة تركيز البروتين في الأجزاء المنفصلة بقياس امتصاص الضوء عند طول موجي 280 نانوميتر.
6. قُدرت الفعالية الإنزيمية للأجزاء المستردة وجمعت بعدها الأجزاء التي أظهرت فعالية إنزيمية وقيس حجمها ووضعت في الثلاجة لاستعمالها في المراحل اللاحقة.

3-10: الترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephacryl –S300

بعد تهيئة العمود وموازنة العمود وحسب ما جاءت به دراسة سابقة [22] اتبعت الخطوات التالية في أجراء تنقية الانزيم:-

1. أُضيف المحلول الإنزيمي المستحصل من خطوة التبادل الأيوني السابقة إلى عمود Sephacryl – S300 بعناية.
2. نُظمت سرعة الجريان لتكون 0.6 مللتر/ دقيقة.
3. أُسترد الإنزيم بإضافة محلول الاسترداد بمعدل جريان مقداره 36 مللتر/ساعة، وجمعت الأجزاء المفصولة بواقع 3 مللتر/جزء.
4. تَمت متابعة تركيز البروتين في الأجزاء المنفصلة بقياس امتصاص الضوء عن طول موجي 280 نانوميتر.
5. قُدرت الفعالية الإنزيمية للأجزاء المستردة وجمعت بعدها الأجزاء التي أظهرت فعالية إنزيمية وقيس حجمها وحفظت في الثلاجة لاستعمالها في المراحل اللاحقة.

11 :تقدير الوزن الجزيئي لإنزيم اللاييز

قُدر الوزن الجزيئي للإنزيم باستعمال طريقة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي وباستعمال عمود Sephacryl-S300 وتحت الظروف نفسها التي أشير إليها في الفقرة السابقة(10-3) واستخدمت خمسٌ من البروتينات القياسية لرسم العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي وحجم الاسترداد/حجم الفراغ(Ve\Vo) التي اعتمدت لتقدير الوزن الجزيئي والبروتينات القياسية هي:

البروتين	الوزن الجزيئي (دالتون)
Ribonuclease A	13700
Chymotrypsinogen	25000
Ovalbumin	43000
Bovine serum albumin	67000
Phosphorelase b	94000

وحضر بإذابة 5 ملغم من كل بروتين في 1 مللتر من محلول Tris-Hcl (pH=8.5). ومرر محلول كل بروتين من البروتينات القياسية فضلا عن المستخلص الأنزيمي على العمود واسترد في ظروف استرداد الدكستران الأزرق المذكورة الفقرة (10-3) نفسها وقيست الامتصاصية على طول موجي قدره 280 نانوميتر لكل جزء من الأجزاء المنفصلة بغية تحديد حجم الاسترداد (Elution volume) Ve لكل بروتين قياسي ثم استخرج حجم استرداد كل بروتين قياسي إلى حجم استرداد الدكستران الأزرق (Ve\Vo) ورسم منحنى قياسي بين (Ve\Vo) ولوغاريتم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية شكل (5) واعتمدت هذه العلاقة لتعيين الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى جزئياً.

النتائج والمناقشة :

1- عزل وتشخيص الفطريات :

من بذور الزيتية و التربة ظهرت انواع فطرية تعود الى جنس *Aspergillus* و تم تشخيص الانواع التالية : *A.niger, A.flavus, A.fumigatus* . والمعزولة من الفستق والفستق الحلبي واللوز والجوز والسمسم والكازو ومن التربة . بالاعتماد على شكل ولون المستعمرة وقطرها وكذلك بالفحص المجهري للمستعمرات باستخدام المجهر الضوئي وذلك طبقا للمفاتيح التصنيفية المعتمدة [10-12].

2- كفاءة الفطريات المعزولة في إفراز إنزيم اللاييز

من اجل التعرف على كفاءة الفطريات المعزولة من البذور الزيتية على إفراز إنزيم اللاييز فقد تم استخدام طريقة الأوساط الصلبة لهذا الغرض باستخدام تحلل مادة Tween 80 ويتم الاستدلال من خلال ملاحظة المستعمرات النامية في هذه المادة حيث يتكون راسب أبيض حول المستعمرات النامية وهذا دليل على إفراز إنزيم اللاييز من قبل العزلة الفطرية . وتظهر النتائج في الجدول (1) كفاءة الفطريات المعزولة على إفراز إنزيم اللاييز باستخدام طريقة tween 80 ان اغلب الفطريات أعطت نتيجة موجبة بقدرتها على افراز اللاييز مع وجود اختلافات فيما بينها ، اما العزلتان اللتان تم الحصول عليهما من الفستق والجوز *A,flavus* و(2) *A. flavus* على التوالي فأعطت كشفاً سالباً . ولاحظه ظهور هالة شفافة حول المستعمرات في اليوم الثاني من التحضين حيث زادت مساحة التحلل في اليوم الخامس وكانت هنالك عزلة متميزة في تحليلها لمادة tween 80 80 وهي عزلة الفطر *A.niger* المعزولة من بذور الفستق وهذا موضح في الجدول (1). اما بقية العزلات فتباين نشاطها بين جيد ومتوسط وضعيف في أنتاج اللاييز وهذا موضح في الجدول (1) فعزلات التي أعطت نشاطاً جيد +++هي : *A.niger*(2) المعزولة من الفستق الحلبي و *A.niger* المعزولة من الكازو و *A.niger*(1) المعزولة من اللوز و*A.niger* المعزولة من الجوز ، في حين اعطت العزلات التالية نشاطاً متوسطاً ++وهي *A.niger* المعزولة من التربة و(1) *A.flavus* المعزولة من الفستق و *A.niger*(1) المعزولة من الفستق

الحلبي واما العزلات المعزولة من السمسم هي *A.fumigatus* و *A.niger* و *A.flavus*(1) من الجوز اما بقية العزلات فقد اعطت نشاطاً ضعيفاً + كما موضح في الجدول (1)، أما العزلات التي اعطت نشاطاً سالباً وهي(2) *A.flavus* و *A. flavus*(2) المعزولة من الفستق والجوز والسبب يعود إلى ان الانزيم الذي يفرزه الفطر يكون غير قادر على التحليل المائي Hydrolyze لاصرة الأستر الموجودة في مادة التفاعل Tween 80 . او هذه العزلات غير قادرة على تحلل الدهون فقد ذكر[23] اذ ان أنزيم اللايبيز موجود في معظم الفطريات وأن عدم ظهوره في الكشف قد يعود لقصر مدة الاختبار إذ ذكر [14] ان بعض الاحياء المجهرية تتطلب مدة تصل إلى 10 أيام لتعطي تحليلاً مرئياً للدهون غير ان معظمها لايتطلب اكثر من 5 ايام لهذا الغرض . وان استخدام مادة Tween كمادة تفاعل للكشف عن افراز اللايبيز من قبل الفطريات وذلك لما تمتاز به من إعطاء كشف مرئي سهل الملاحظة اولاً وان سيولتها وسهولة امتزاجها مع مكونات الوسط الزرعي يعطي تماسكاً أكبر بينها وبين الانزيم المحلل للدهون [24].

جدول (1): قدرةالعزلات على تكوين هالة لتحلل Tween 80 حول المستعمرة.

العينات	عدد العزلات	تصنيف العزلات الفطريات	الكشف عن أفراز انزيم اللايبيز **
التربة	2	*Aspergillus niger* *A.flavus*	+++ ++
الفستق	3	*Aspergillus niger* *A.flavus* (1) *A.flavus* (2)	++++ ++ –
الفستق الحلبي	2	*A.niger* (1) *A.niger*(2)	++ +++
السمسم	2	*A.fumigatus* *A.niger*	++ ++
الكازو	2	*A.niger* *A.flavus*	+++ +
اللوز	2	*A.niger* (1) *A.niger* (2)	+++ +
الجوز	4	*A.flavus* (1) *A.fiavus*(2) *A.niger* *A.fumigatus*	++ – +++ +

* الأرقام بين الأقواس تشير إلى رقم العزلة

**- غير منتج لأنزيم اللايبيز عدم تكون هالة التحلل حول المستعمرة الفطرية .

+ منتج لأنزيم اللايبيز تكون هالة التحلل حول المستعمرة الفطرية بقطر (1– 3) ملم .

++ منتج لأنزيم اللايبيز تكون هالة التحلل حول المستعمرة الفطرية بقطر (4–7) ملم.

+++ منتج لأنزيم اللايبيز تكون هالة التحلل حول المستعمرة الفطرية بقطر (8– 11) ملم .

++++ منتج لأنزيم اللايبيز تكون هالة التحلل حول المستعمرة الفطرية بقطر أكثر من 12 ملم.

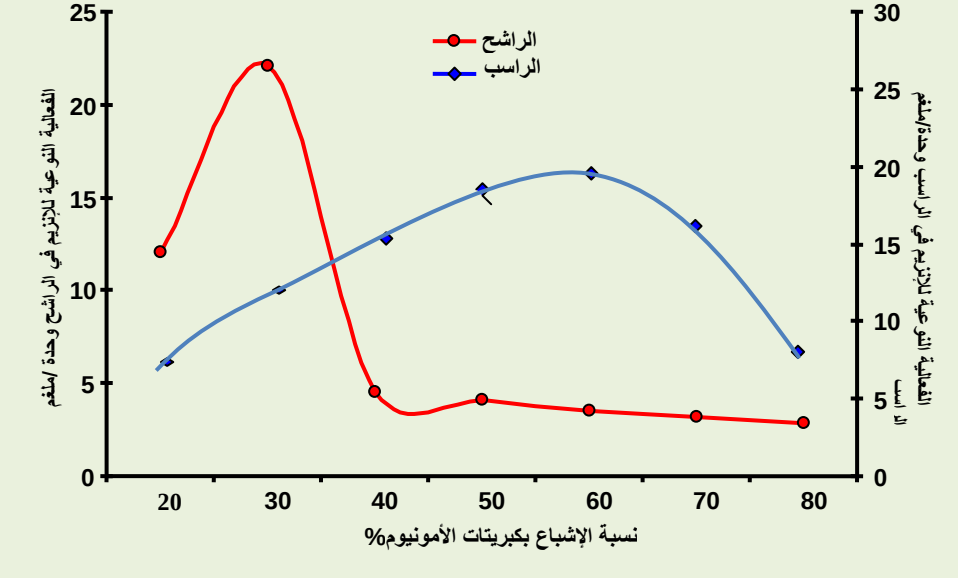
3– تنقية إنزيم اللايبيز جزئياً :

الترسيب بكبريتات الامونيوم :

استعملت كبريتات الامونيوم بنسبة إشباع مختلفة (20-80)% وتم تعين نسبة إشباع 60% لترسيب المستخلص الانزيمي الخام اذ بلغت الفعالية النوعية (19.12) وحدة/ملغم بروتين وبعدد مرات تنقية(2.16) مرة وحصيلة انزيمية (93.15) % الجدول(2) . ويعود السبب في شيوع استعمال كبريتات الامونيوم في تركيز الانزيمات عادة في خطوات التنقية الاولى للتخلص من نسبة كبيرة من الماء وللحصول على درجة عالية من النقاوة ، ومن اكثر الاملاح الشائعة هي املاح الامونيوم والصوديوم بشكل كبريتات او كلوريدات ، و تعتمد آلية الترسيب على معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل

الملح والإخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين ويؤدي ذلك الى انخفاض ذوبان البروتين وترسيبه وتسمى هذه العملية بالتملح الخارجي (salting out) .ان شيوع استعمال كبريتات الامونيوم في تركيز الإنزيمات وتنقيتها لمزاياها الايجابية مثل ذوبانها في الماء وكثافتها غير العالية بحيث لا تتداخل مع ترسيب معظم البروتينات عند نبذها ورخص ثمنها وانها لا تسبب مسخ للإنزيمات [25]. استخدمت كبريتات الامونيوم بنسب إشباع مختلفة لتركيز انزيم اللاييز المنتج من أنواع اخرى من الفطريات والبكتريا . حيث تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه [26] عند استعمال كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 70% التي عدت النسبة المثلى لترسيب الانزيم الخام المنتج من فطر *A.niger* إذ بلغت عدد مرات التنقية 2.6 وحصيلة انزيمية 26 %

وايضاً عند استعمال كبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 60 % التي عدت النسبة المثلى لترسيب الإنزيم الخام المنتج من بكتريا *Pseudomonas. sp.* [27]. كذلك وجد[28] ان نسبة الاشباع بكبريتات الامونيوم التي تراوحت بين (35-65)% الافضل في تركيز الانزيم المنتج من خميرة *Trichoderma viride* . كذلك نقى انزيم اللاييزالمنتج من *A.niger* بتركيزه بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 60 %و80 %[29]. كما أمكن تركيز الإنزيم الخام المنتج من سلالة البكتريا *Pseudomonas fragi* CRDA037 بنسبة إشباع 20-40 % في حالة انزيم اللاييز الخارجي و20-60 % في حالة انزيم اللاييز الداخلي [30] ، بينما استعملت نسبة إشباع 80 % لحصول على درجة من النقاوة للإنزيم الخام المنتج من فطر *Rihzopus. sp.*



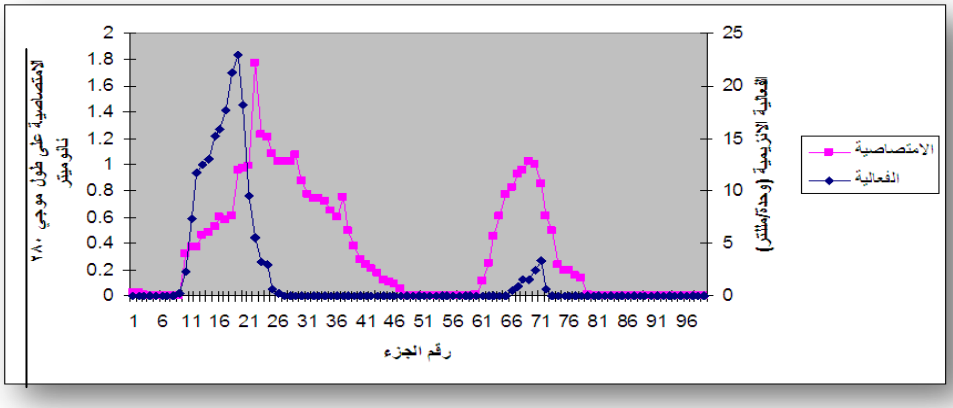
شكل (2) تأثير الترسيب التدريجي بكبريتات الامونيوم في تركيز إنزيم اللاييز من المستخلص الخام بنسب إشباع تراوحت ما بين 20-80%.

2-4-3 :كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لإنزيم اللاييز

أجريت كروماتوغرافيا التبادل الايوني كخطوة ثانية في عملية التنقية بأستخدام المبادل DEAE-Cellulose وهو من المبادلات السالبة الشحنة (Anion-exchange). من المعروف أن البروتينات التي تحمل شحنات على سطحها تزيد من قدرتها على الارتباط مع الاسطح ذات الشحنة المعاكسة وقد تكون من الشدة بحيث يصعب فصلها[31]. اضيف محلول الانزيم المأخوذ من الخطوة السابقة (التركيز بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 60%) الى عمود المبادل الايوني واستردت البروتينات بأستخدام التدرج الملحي الخطي لملح كلوريد الصوديوم بتركيز 0.1–1.0 مولاري[22].

يبين الشكل (3) ظهور عدة قمم بروتينية في الاجزاء المستردة وهذا يدل على ارتباط البروتينات الاخرى ذات الشحنة السالبة نتيجة حصول تجاذب وأرتباط مع شحنة المبادل الذي يعتمد شدته على محصلة كثافة الشحنة التي يمتلكها البروتين ، و يوضح الجدول (2) ازدياد الفعالية النوعية عن سابقتها في الخطوة السابقة اذا اصبحت 58.29 وحدة/ ملغم بروتين وعدد مرات تنقية 5.54 مرة وبحصيلة أنزيمية 66.02% وهذا يدل على زيادة النقاوة من هذه الخطوة. ويعد الفصل باستعمال المبادلات الأيونية كخطوة مبكرة وقاسماً مشتركاً في تنقية الأنزيمات ،ولعل الأسباب الرئيسية في ذلك يعود إلى أن المبادلات الأيونية تتميز بقوة فصل عالية وبالسعة العالية على استيعاب البروتينات المرتبطة وسهولة وبساطة فكرة الفصل القائمة على اختلاف في الشحنات على البروتينات في أرقام هيدروجينية معينة اعتمادا على نقطة تعادل الشحنات Isoelectric point لتلك البروتينات فضلا عن إمكانية تطبيقه على نطاق تجاري واسع[32]. واستخدم [33] خطوة التبادل الايوني فقط باستخدام مادة DEAE-Cellulose واسترد الانزيم بتدرج ملحي من كلوريد الصوديوم (0.3-1) مولاري لتنقية اللاييز المنتج من بكتريا *Pseudomonas aeruginose* وتم الحصول على عدد مرات تنقية وحصيلة انزيمية بلغت 38و 17 % على التوالي . وقد استخدمت دراسة اخرى [34] المبادل الايوني DEAE-Cellulose بعد عملية الترشيح الفائق واسترده الانزيم بتدرج ملحي

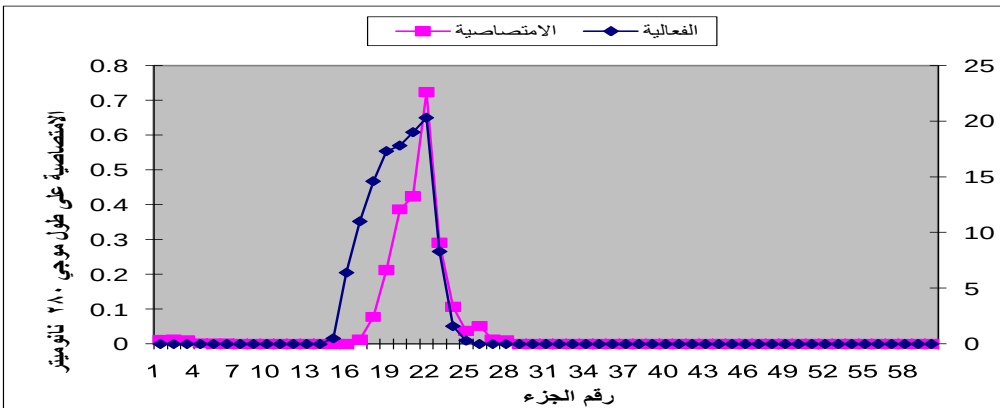
(1-0.1) مولاري من كلوريد الصوديوم لتنقية انزيم اللاييز المنتج من A .niger بعدد مرات تنقية 25,7 وحصيلة انزيمية 77.1 %. فقد استعمل كل من [35-37] مبادلات أيونية نوع DEAE- Cellulose لفصل اللاييز المستخلص من فطر *Geotricum sp.* و بكتريا *Bacillus spharicus* السلالة MTCC 7526 وبكتريا *Pseudomonas fluorescens* بعد عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم، قد وصلت الحصيلة الإنزيمية لبكتريا *B.spharicus* إلى 4.7% بعد مرات تنقية 17.74 مره.



الشكل(3) كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم اللاييز المنتج من العزلة المحلية(*A.niger*) باستخدام المبادل الايوني DEAE- Cellulose بابعاد (3.0×25) سم الموازن يمحلول الفوسفات البوتاسيوم الدارئ (0.05مولاري، pH=7.0). ثم الاسترداد بمحلول الفوسفات البوتاسيوم الدارئ بتدرج ملحي من (1-0.1) مولاري و سرعة جريان 1 مللتر/ دقيقة وبواقع 5 مللتر/جزء.

3-4-3 :كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لإنزيم اللاييز

أعقبت خطوة التبادل الأيوني باستعمال المبادل DEAE-Cellulose إضافة المحلول الأنزيمي المستحصل عليه إلى عمود الترشيح الهلامي Sephacryl-S300 نظرا لما يمتاز بهِ هذا النوع من الأعمدة من خواص مهمة ومفيدة في الفصل كالصلابة الجيدة و المقاومة العالية للانضغاط بسبب احتوائها على الدكسترات والاكريل امايد فضلا عن تميزها بالفصل الجيد والسريع وسهولة تحضيرها وبقاءها ثابتة لمدة طويلة وكذلك مدى الفصل الواسع الذي يتراوح ما بين 5–600 كيلو دالتون ،فأجريت هذه الخطوة لتحقيق درجة أعلى من النقاوة لإنزيم اللاييز إذ يوضح شكل (4) ظهور قمة بروتينية واحدة ومفردة تطابقت مع قمة الفعالية الأنزيمية تقريبا والذي يعد أحد أدلة النقاوة العالية والكفاءة في التنقية والاستخلاص [22] وقد حققت هذه الخطوة فعالية النوعية بلغت 66.92 وحدة/ملغم بروتين وبلغ عدد مرات التنقية 6.36 مرة وبحصيلة إنزيمية مقدارها 40.36%. إذ استخدمت[38] كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-150 لتنقية اللاييز المنتج من بكتريا *Pseudomonas fragi* . وكذلك تم اجراء الترشيح الهلامي باستخدام Superose 128 بعد خطوة التبادل الايوني لتنقية انزيم اللاييز المنتج من *pseudomonas sp.* وتم الحصول على عدد مرات تنقية بلغت 37 [39]. وايضا تم استعمال الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-75 لتنقية اللاييز الذي تم الحصول علية من *Mucor javanicus* بعدد مرات تنقية 180 مرة وحصيلة انزيمية 2.4%[40]. اما[35] فاستعملوا كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-100 لتنقية إنزيم اللاييز المستخلص من فطر *Geotrichum sp.* السلالة SYBC WU-3 والذي أعطى حصيلة إنزيمية بلغت 11.2% وعدد مرات تنقية 9.2 مره . فيما استعمل نفس العمود لتنقية إنزيم اللاييز المستخلص من خميرة *Candida rugosa* والذي بلغت عندهُ الحصيلة الإنزيمية 22.5% وعدد مرات تنقية 43 مرة. [41] استعملوا كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl S-200 لتنقية انزيم اللاييز المستخلص من بكتريا *Staphlococcus aureus* فأعطى حصيلة إنزيمية مقدارها 32% وعدد مرات تنقية 4.2 مرة.



الشكل(4): الترشيح الهلامي لتنقية انزيم اللاييز المنتج من العزلة المحلية *A.niger* باستخدام عمود هلامي Sephacryl-S300 (1.5××70) سم. تمت موازنته بمحلول 0.01 مولاري ترس الدارئ ذي رقم هيدروجيني 8.5 بسرعة جريان 36 مللتر/ ساعة (حجم الجزء :5 ملليلتر)

جدول (2) تنقية إنزيم اللاييز المنتج من العزلة الفطرية المحلية*A.niger*

خطوة التنقية	الحجم مللتر	الفعالية الإنزيمية وحدة/مللتر	البروتين ملغم/مللتر	الفعالية النوعية وحدة/ملغم بروتين	الفعالية الكلية وحدة/مللتر	عدد مرات التنقية مرة	الحصيلة الإنزيمية %
المستخلص الإنزيمي الخام	100	8.12	0.78	10.52	821	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم %80-20	40	19.12	0.84	22.76	764.8	2.16	93.15
التبادل الأيوني بعمود DEAE-Cellulose	30	18.07	0.31	58.29	542.1	5.54	66.02
الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl-S300	20	16.73	0.25	66.92	334.6	6.36	40.36

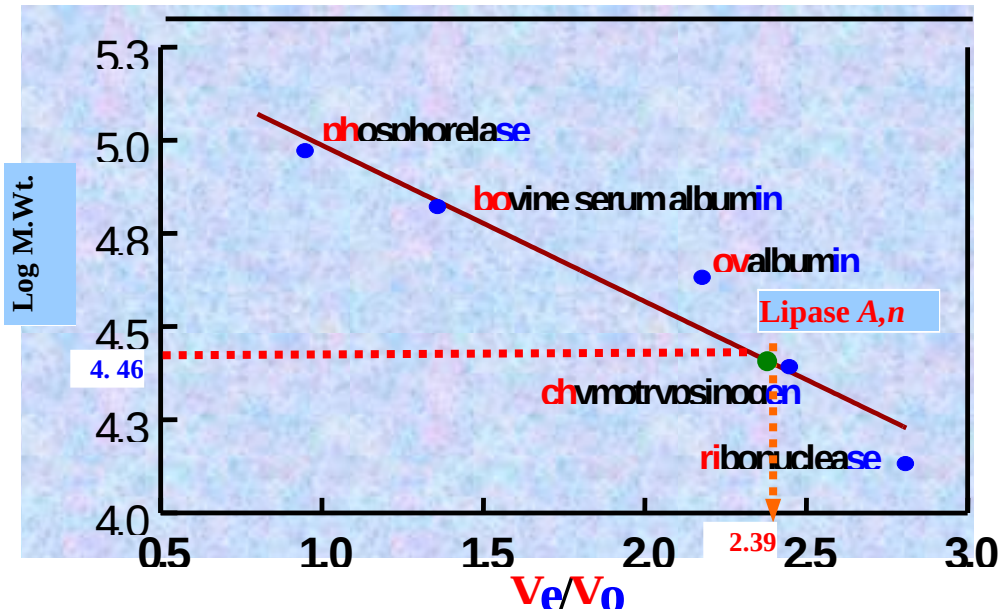
** قدرت الفعالية الانزيمية للانزيم المنقى بطريقة التسحيح الفقرة(5)

4-4-3 تعيين الوزن الجزيئي للإنزيم.

قدر الوزن الجزيئي لإنزيم اللاييز المنقى جزئياً باستعمال طريقة الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl – S300 وكما موضح في الفقرة (11) من خلال العلاقة بين نسبة حجم الاسترداد إلى حجم الفراغ (Ve/Vo) ولوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية المستعملة شكل (5) ، علماً بأن حجم الفراغ تم قياسه باستخدام الدكسترات الأزرق 2000 وقدر حجم الفراغ Void Volume(Vo) من المنحنى القياسي للدكسترات و بواقع 3 مللتر لكل جزء وكانت قيمة Vo مساوية إلى 33 مللتر وقدر حجم الاسترداد للبروتينات القياسية (Ve) Elution Volume إلى حجم استرداد الدكسترات الأزرق Vo والمتمثلة بالعلاقة Ve/Vo وكما موضح في جدول (3):

جدول (3) : الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية وحجم استرداد كل منها.

ت	البروتين القياسي	الوزن الجزيئي دالتون	لوغاريتم الوزن الجزيئي	عدد الأجزاء (مللتر)	حجم الاسترداد (مللتر) V_e	V_e/V_o
1	Phosphorelase b	94000	4.97	10	30	0.9
2	Bovine serum albumin	67000	4.82	15	45	1.36
3	Ovalbumin	43000	4.63	24	72	2.18
4	Chymotrypsinogen	25000	4.39	27	81	2.45
5	Ribonuclease A	13700	4.13	31	93	2.81



الشكل (5): تعيين الوزن الجزيئي لانزيم اللايبيز (المنقى) المنتج من العزلة *Asp.niger* AS3 بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephacryl S-300 بأبعاد (1.5×70) سم وسرعة جريان 36 مللتر/ساعة .

اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (5) بأن الوزن الجزيئي للأنزيم كان بحدود 28.840 دالتون. هذه النتائج المُستحصل عليها قريبة لما توصل اليه[42] الذين بينه بان الوزن الجزيئي لإنزيم اللايبيز المستخلص من فطر *Rhizoups chinensis* كان بحدود 28.4 دالتون، علما بان الوزن الجزيئي للانزيم المنتج من البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لكن السلالة MBSOO1 كان بحدود 29 كيلودالتون [43]. في حين كان الوزن الجزيئي للايبيز المنتج من الفطر R.delemar بحدود 30.3 دالتون [44] . ، فيما استعملت طريقة الترشيح الهلامي بعمود DEAE-Toypeal لتحديد الوزن الجزيئي لنظيرين من لايبيز الفطر *Rhizopus niveus* إذ سجل للنظير الأول Lipase I وزن جزيئي بحدود 34 كيلودالتون اما النظير الثاني Lipase II فسجل له وزن جزيئي بحدود 30 دالتون [45].وايضاً اشاره [43] بأن الوزن الجزيئي لانزيم اللايبيز المنتج من فطر *Penicillum cyclopium* يقارب 37 دالتون. اما[35] فدرسوا إنزيم اللايبيز المستخلص من فطر *Geotrichum sp.* وعند إجراء عملية التنقية بالترشيح الهلامي حصلوا على نوعين من انزيم اللايبيز وقد اختلف احدهما عن الآخر أطلق على الأول انزيم لايبيز A والثاني انزيم لايبيز B عند قياس فعاليتهما الإنزيمية كما وجدوا ان الوزن الجزيئي لهما كان 41.1 كيلودالتون لإنزيم لايبيز A و35.8 كيلودالتون للانزيم لايبيز B.

المصادر :

1- Padilha ,G.S.; Santana, J.C.C.; Alegre ,R.M. and Tambougi ,E.B.(2012) .Extraction of Lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and Its Biochemical Characterization .Braz . Arch .Biol. Technol. v. 55 n.1:pp. 7-19.

2- Toscano, L. ;Gochev, V. ;Montero, G. and Stoytcheva, M. (2011). Enhanced Production of Extracelluar Lipase by Novel Mutant strain of *Aspergillus niger*. Biotechnol.& Biotechnol .Eq. 25,(1), 2243- 2247.

3- فوده ، يحيى حسن و محمد أمين عبد الله و مجدي جمعة ألشيمي (1998) . نظم الأنزيمات وتطبيقاتها في التصنيع الغذائي . الدار العربية للطباعة والنشر / مصر ، 400 صفحة .

4- Teng, Y. and Xu, Y. (2008) . Culture condition improvement for wole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus cinensis* using statistical method. Bioresour. Technol. Vol. (99) : 3900-3907.

5- Iftikhar, T. ; Naiz, M.; Jabeen, R. and Haq, I. U. (2011). Purification and Characterization of Extracelluar Lipase . pak. J. Bot., 43(3) :1541-1545.

6- Pablo, D.M. ; Chiara, C.O. ; Bernard, T. ; Gerrald, B. and Robert, V.G. (2005). Biotechnological application of *Candida antartica* lipase A : State-of-the-art-review. J. Mol. Catal. B. Enzyme. Vol. (37) : 36-46.

7- Kumar, R.; Sharma, A.; Kumar,A. and Singh, D. (2012). Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production ,Purification and Some properties .World Appl. Sci.J., 16 (7): 940-948.

8- Teng, Y. ; Xu, Y. and Wang, D. (2009). Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus cinensis* in submerged fermentation by lipid. J. Mol. Catal. B: Enzymatic. Vol. (57) : 292-298.

9- Mengistu, A. and Sinclair, J.B. (1979) . Seed borne microorganism of Ethiopian-grown soybean and chickpea seeds . Plant Dis. Reptr.(63): 616-619.

10- Ellis, M.B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute . Kew, Surrey, England

11-Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972). Illustarted Genera of Imperfect Fungi, Burgess Publishing Company, Minnesota .241pp.

12-Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1997). Fungi and Food Spoilage, 2nd ed. Gaithersburg , Maryland . Chapman and Hall ., 593 pp.

13-Benson, (2001). Microbiological Applications Lab Manual. 8th ed., The McGraw- Hill, New Yurk.

14- Sierra, G. (1957). Asimple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatly substrate .Anton .Van .Leeuwenhook Ned .Tijdschr.Hyg . 23:15-22.

15-Trigiano, R.N.(1979). Extracellular enzyme of some fungi associated with Mushroom culture. Mycologia. 71:908-917.

16-Falony, G.; Armas, J.C.; Mendoza, J.C.D. and Hernandez, J.L.M. (2006). Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. Food Technol. Biotechnol. Vol. 44(2) : 235-240.

17- William, S.M. ; Wold and Isamu Suzuki (1976a) .The citric acid fermentation by *Aspergillus niger* .Regulation by zinc of growth and acidogenesis .Can .J. Microbiol. 22:1083-1092.

18-William, S.M. ; Wold and Isamu Suzuki (1976b) . Regulation by zinc and adenosine 3,5-cyclic monophosphate of growth and citric acid accumulation in *Aspergillus niger* .Can.J. Microbiol. 22:1093-1101.

19-Watanabe, N. ; Ota,Y. ; Minoda, Y. and Yamada, K. (1977) . Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural condition and some properties of crude enzymes. Agric. Biol. Chem. Vol. 41(8) : 1353-1358.

20-Tietz, N.W. and Fiereck, E.A. (1972) . Standard Methods of Clinical Chemistry. Ed. Cooper, G.R. Acad. Press, New York. Vol. (7): 19.

21-Lowry, O.H. ; Roseb reugh, N.I. ; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. Biol. Chem. Vol.(193):262-272.

22-Whitaker, J.R. (1972). Principle of Enzymology for Food Sciences. Marcel Dakker, Irc. New York.

23-Cochrane, V.W.(1958).Physiology of Fungi . John Wiley and Sons,Inc. New York.

24- الرفاعي ، فاتن نوري (1999) . الفطريات المعزولة من بذور بعض المحاصيل المخزونـة والمنتجة للأنزيمات (السليوليز). رسالة ماجستير ، كلية العلوم / جامعة الموصـل.

25-Volesky, B. and Luong, I. (1985). Microbiol enzymes, productions, purification and isolation. CRC.(critical reviews in biotecgnology). Vol. (2): 119–146.

26-Al-Shammary , E.l.(1999).Lipases Production by *Aspergillus niger* and Using of it Acceleration of Aushari cheese Ripening .M.Sc. Thesis ,College of Agriculture,Baghdad University-Iraq.

27- Kanwer, L.; Gogoi, K.B. and Goswami, P. (2002). Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and it's isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. Bioresource Technol. Vol. (84): 207-211.

28-Kashmiri, M.K. ; Adnan, A. and Butt, B.W. (2006) . Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichderma viride*. African J. Biotechnol. Vol. 5(10) : 878-882.

29-Mustafa, T.A. (2002). production and Characterization of Lipase from Local fungal isolation by solid-state fermentation .Thesis .College of Science Saddam University, Iraq.

30-Schueep, C. ; Kerasha, S. ; Michalaski, M.C. and Morin, A. (1997). Productions, partial purification and characterization of lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. Process Biochem. 32: 225-232.

31-Pohl, M.; Mesch, K,; Rodenbrock,; A. and Kula, M.R. (1995).Stability investigation on the pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis.* Biotechnology and Applied Biochemistry.22:95-105 (Cited in Colacino and Crichton,1997).

32-Karlsoon, E.; Ryden, L. and Brewer, J. .(1998).Ion exchange chromatography: Introduction to Protein Purification.A.Lohn Twiley.New York, Vol. 43-79.

33-Wonchoo,D.;Kurhara,T.;Suzuki, T.; Kenjisodu, and Esaki, N.(1998).A cold adapted lipase of Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas sp* .strain B11-1:Gene cloning and enzyme , purification and characterization . Appl .& Environmental Microbiol .64(2): 486 -491.

34-Malle,D.;Garingan,G.;Peralta,M.and Revilleza,M.J.(2008). Rapid purification and partial Characterization of an Extracellular Enantioselective Lipase from *Aspergillus niger*.Annales Bogorinenses n.s. vol.12.no.1.

35- Cai, Y. ; Wang, L. ; Liao, X. ; Ding, Y. and Sun, J. (2009). Purification and partial characterization of two new cold- adapted lipase from mesophilic *Geotrichum sp.* SYBC WU-3. J. Process Biochem. Vol. 83(9) : 1-25.

36-Joseph, B. (2006).Isolation, Purification and Characterization of Cold Adapted Extracellular Lipase from Psychrotrophic Bacteria: Feasibility as laundry detergent additive. Ph. D. Thesis. Allahabad Agricultural institute. Deemed University, Allahabad, India.

37-Sztajer, H. ; Lunsdorf, H. ; Erdman, H. ; Menge, U. and Schmid, R. (1992) . Purification and properties of *Penicillium simplicissimum* . Biochem. Biophys. Acta. Vol. (1124) : 253-261.

38-Baral,A.and Fox,P.F.(1997). Isolation andCharacteriztion of an extracellular lipase from *Ps.tolossii* .Food Chemistry .58(1-2):33-38. (Medline).

39-Dong, H.; Genog, H. and Gao, G. (1999). Purification and characterization of a *Pseudomonas sp.* lipase and it's properties in non-aqueous media. Biotechnol. Appl. Biochem. 30 (part3): 251-256.

43-Chatrain, M. ; Katz, L. ; Marcin, C. ; Thein, M. ; Smith, S. ; Fifher, E. ; Goklen, K. Salmon, P. ; Brix, T. ; Price, K. and Greasham, R. (1993).Purification and characterization of a noval bioconverting lipase from *Pseudomonas sp*. MB5001. Enzyme Microbiol. Technol. Vol. (15): 575-580.

44-Hass, M.J. ; Cichowicz, D.J. and Bailey, D.G. (1992). purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar* . Lipids. (27): 571-576.

45-Kohno, M.; Kugimiya, W.; Hashimoto, Y. and Morita, Y. (1994). Purification, characterization, crystallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus*. Biol. Sci. Biotechnol. Biochem. Vol. (58): 1007-1012.

40-Ishihara ,H.; Okuyama, H.; Ikezawa, H. and Tejima, S. (1975). Studies of lipase from *Mucor Javanicus I* .purification and proerties. Biochem. Biophys. Acta. (388):413-422.

41-Horchani, H. ; Mosbah, H. ; Ben-Salem, N. ; Gargoui, Y. and Sayari, A. (2009). Biochemical and molecular characterization of a thermoactive alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. J. Mol. Catal. B : Enz. (56): 237-245.

42-Yasuda, M. ; Ogino, H. ; Kiguchi, T. ; Kotani, T. ; Takakura, S. ; Ishibashi, T. ; Nakashima, T. ; Fukuda, H. and Ishikawa, H. (2000). purification and characterization of the lipase *Rhizopus chinensis* cells. J. Ferment. Bioeng. Vol. (88): 571-573.

Evaluating the efficiency of a local isolate of *Aspergillus niger* to produce the enzyme lipase

Saif T. Jassaim[1] , kalil I.Bander[1] , Theka A.Hamad[2]

[1] *Department of Biology , College of Science , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

[2] *College of Medicine , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

(**Received:** 22 / 5 / 2012 ---- **Accepted:** 1 / 10 / 2012)

Abstract

Sevententh local fungal isolates ,from oil seeds and soil belong to soil *Aspergillus* including: *Aspergillus niger,Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* were sparated and diagnosed .The study investigates the ability of isolated fungi to excrete Lipase using the method of solid media contained Tween80 substance.

Aspergillua niger, Which isolated from Pistachio seeds gave the highest growth rate and highest lipase and selected to detect the best condition for growth and production of lipase using liquid media. Lipase enzyme was extracted by cooling centrifugation and partially purified and steps insequence showed the purification of the enzyme produced from the local isolate *A.niger* .The include precipitation with ammonium sulfate showed a saturation percent between (20-80%). The 60% percent was the gave a high qualitative activity (22.76) unit/mg by (2.16) times of purification and enzyme yield (93.15)% , Thereafter the enzyme solution was passed through an ionic exchange column ,DEAE-Cellulose to (5.54) times to get (58.29) unit/mg with enzyme yield (66.02)% .All parts with enzyme activities were gathered and put under acrylamide column filtration Sephacyl –S300, This step gave (66.92)unit/mg under purification times (6.36) with an enzyme yield (40.36)% .The results indicated that the molecular weight of enzyme was 28,840 Dalton.