استخلاص وتنقية أنزيم البيتاكالاكتوسايديز β – Galactosidase من كبد الأغنام المحلية

أ.د. اياد نافع يحيى ، زهراء عدنان جاسم
الجامعة المستنصرية – كلية التربية الأساسية
أ.د. سند باقر محمد
جامعة بغداد – كلية العلوم للبنات.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة اختيار افضل طريقة لاستخلاص أنزيم البيتاكالاكتوسايديز من كبد الأغنام المحلية, من بين ثمان طرائق, و كان استخدام دارئ الفوسفات (٠,٢ مولاري وبدالة حموضة ٧) هو الأفضل في استخلاص الأنزيم بفعالية كلية بلغت (٧٨٨٩٨,٥) وحدة. ركز المحتوى البروتيني باستخدام كبريتات الأمونيوم (٦٠)%من بين خمس طرائق للتركيز (التنقية الجزئية), وأكملت مراحل التنقية باستخدام التبادل الأيوني والترشيح الهلامي بعمود DEAE – Sephadex A100 , ومن ثم استخدام الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل (Sephacryl S – 300) .

إذ بلغت الفعالية النوعية (٣٣٢٨,٨) وحدة / ملغم بروتين والحصيلة الأنزيمية مقدارها (٤١,٨٤)% وعدد مرات التنقية (٨,٥٧) مرة. وثم التأكد من نقاوة الأنزيم بأجراء عملية الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة للبروتين إذ ظهرت حزمة بروتينية واحدة في هلام متعدد أكريل أمايد. كان الوزن الجزيئي هو (١٨٠) كيلودالتون مقدراً بطريقة الترشيح الهلامي.

الكلمات المفتاحية: استخلاص الأنزيمات، تنقية الأنزيمات، أنزيم البيتاكالاكتوسايديز، أنزيم اللاكتيز، كبد الأغنام.

المقدمة:

الأنزيم عبارة عن بروتين أو معقد بروتيني معدني يعمل ضمن الجسم الحي في نطاق درجة حرارة الجسم الفسيولوجية كوسيط يعمل على تسريع التفاعلات الكيميائية الحيوية والتحكم بالبنية الفراغية للناتج، آلية عمله تشابه باقي الوسطاء عن طريق خفض طاقة التنشيط مما يسمح بإنجاز تفاعلات تجري عادة ضمن درجات حرارة مرتفعة جدا، وفق الشروط الحيوية بدرجة حرارة لا تتعدى درجة حرارة الجسم الحي، ليعود بعد إنجاز التفاعل إلى وضعه الأصلي مما يمكنه من المشاركة بتفاعل جديد وهذا ما يسمح لكميات قليلة من الأنزيم بالمشاركة لفترة زمنية طويلة في التفاعل (Dugdale , ٢٠١٠).

البيتا- كالاكتوسايديز (β-galactosidase) أنزيم معروف واسمه الشائع لاكتيز(lactase) بسبب كون المادة الأساس له هو سكر الـــــ Lactose وهو من الأنزيمات الكلايكوسيدية Glycosidases التي تنتمي إلى أنزيمات التحلل المائي Hydrolases , إذ يحفز الأنزيم تحلل الآصرة الكلايكوسيدية من النوع (4-1)β, لسكر اللاكتوز الذي يعد المادة الأساس التي يعمل عليها الأنزيم (Mahoney, 2003). ويسمى تبعاً للجنة الأنزيمات التابعة للأتحاد العالمي للكيمياء الحياتية Galactosides galactohydrolase– D - β , وعرف رقمياً ب EC: 3.2.1.23.

يتصف أنزيم β - Galactosidase (Lactase) بانتشاره الواسع في الطبيعة, ويتواجد في الخلايا النباتية والحيوانية, الفطريات والبكتريا. وينتج هذا الأنزيم في الأمعاء الدقيقة ويعمل على تحلل السكر الثنائي اللاكتوز Lactose ، حيث يعمل على الرابطة4 , 1 – β التي تربط بين الكلوكوز Glucose والكالاكتوز Galactose مع بعضها البعض في جزيئة اللاكتوز Lactose. ويعمل بكفاءة أقل بكثير على Fucosides و Arabinosides (Itahana وآخرون,2007) .

ولهذا الأنزيم أهمية غذائية حيث يقوم بتحليل سكر الحليب ومشتقاته عند تناولها, وان الكثير من سكان العالم يعانون من توقف إنتاج أنزيم Lactase في أجسامهم ويحدث ذلك عند بلوغهم السنة الثانية, على الرغم من أن الأعراض قد لا تظهر الأ بعد ذلك بكثير وهي عادة لا تكون خطيرة , ولكن أعراض نقصه يمكن ان تكون مزعجة وهذه الحالة أدت إلى ظهور منتجات غذائية تدعى (LACTAID) ,حيث تساعد الأشخاص الذين يعانون من عدم تحمل سكر اللاكتوز بان يتناولوا الحليب ومشتقاته مره أخرى, والأطعمة

الكربوهيدراتية تشمل جزءاً كبيراً من وجبات الأنسان, وتبعاً لذلك فان أي خلل في عملية الأيض لأي نوع من أنواع الكربوهيدرات يمكن أن يكون خطيراً. فنقص أحد الأنزيمات التي تعمل على هضم وتكسير الكربوهيدرات إلى سكريات أحادية بسيطة في الدم, ينتج عنه انعدام المادة النهائية التي تكون ضرورية لأنسجة الجسم وخلاياه فتظهر ما يسمى بأمراض أو اضطرابات التمثيل الغذائي Metabolism Disorders, بالإضافة إلى إن الزيادة من المادة الوسطية الناتجة قد تفضي إلى ظهور حالات سمية بالغة الخطورة (Desire وآخرون,2007).

ونظراً لعدم وجود دراسات كافيه عن فصل وتنقية أنزيم β-galactosidase من أعضاء وأنسجة الحيوان , فأن هذه الدراسة تهدف إلى فصل وتنقية أنزيم β-galactosidase من كبد الأغنام المحلية باستخدام طرائق فصل وتنقية مختلفة و أختيار أفضل الطرائق لفصل وتنقية الأنزيم المهم صناعياً وغذائياً وإمكانية استخدامه كمنتج يقلل من الإزعاج الذي يرافق الأشخاص المصابين بحالة Lactose Intolerance.

المواد وطرائق العمل

تحضير (عينة البحث) كبد الأغنام المحلية

Preparation (sample) local liver sheep

تم شراء كبد الأغنام المحلية من مجزرة الشعلة في بغداد , وذلك لضمان ان تكون النماذج مطابقة لعنوان الدراسة , وقطع كبد الأغنام إلى قطع صغيرة , ثم ثرمت بواسطة مثرمة اللحم الكهربائية وخلط الكبد المثروم باليد خلطاً جيداً لضمان تجانس عينة البحث , ثم حفظت في أكياس نايلون وغلقت بإحكام وخزنت في المجمدة Freezer لحين أجراء التحليلات اللازمة عليها.

التحليلات الكيميائية

أجريت التحليلات الكيميائية بمكررين اثنين على كبد الأغنام المحلية, وقدرت الرطوبة والرماد حسب ما جاء في .A.O.A.C, (١٩٩٩) , و قدرت النسبة المئوية للدهن باستخدام طريقة Soxheltالموصوفة من قبلOsborne و Voogt (١٩٨٧),باستخدام مذيب إيثر البترول Petroleum ether, و قدرت نسبة الألياف الخام ،بحسب الطريقة الوارد ذكرها في .A.O.A.C (١٩٩٩) , حيث أخذت عينة بوزن (٢)غم بعد إزالة الدهن منها بطريقة Soxhelt والموصوفة من قبل McNichol

(٢٠١٢). و جرى تقدير نسبة البروتين بحسب طريقة مايكروكلدال Micro - kjeldahl (A.O.A.C. ، 1999) واستعمل العامل (٦,٢٥) لتحويل نسبة النتروجين الكلي إلى النسبة المئوية للبروتين. و تم تقدير نسبه الكربوهيدرات على أساس إنها المادة المتبقية بعد طرح نسبه الرطوبة والرماد والبروتين والألياف والدهن من (١٠٠). وتم حساب القيمة الحرارية على أساس: القيمة الحرارية (كيلو سعرة/ ١٠٠ غم) = (4 X P)+ (9 X F) +(3.75 X C)

حيث ان: P : النسبة المئوية للبروتين و F : النسبة المئوية للدهن و C : النسبة المئوية للكربوهيدرات . قيست دالة الحموضة حسب طريقه Myers ,(٢٠١٠) , باستعمال جهاز الـــ PH من نوع PYe-unicam.

استخلاص أنزيم البيتاكالاكتوسايديز من كبد الأغنام المحلية

لغرض تحديد الطريقة الأفضل لاستخلاص أنزيم البيتاكالاكتوسايديز من كبد الأغنام المحلية فقد استخدمت ثمانية طرائق مختلفة وصفت من قبل التميمي (١٩٩٦) و الحصناوي (٢٠٠٧) منها:

الاستخلاص بالماء المقطر؛ الاستخلاص بمحلول ١٠% كلوريد الصوديوم ؛الاستخلاص بمحلول ٠,٥% كربونات الصوديوم, الاستخلاص بمحلول ٠,٢% كلوريد البوتاسيوم, الاستخلاص بمحلول ٠,٢% كلوريد الكالسيوم , الاستخلاص بمحلول ٠,٢ مولاري دارئ الفوسفات والدالة الحمضية ٥ , الاستخلاص بمحلول ٠,٢ مولاري دارئ الفوسفات والدالة الحمضية ٧ , الاستخلاص بمحلول ٢٠% كليسرول .

فعالية الأنزيم

اتبعت الطريقة الموصوفة في Food Chemical Codex (1993) لتقدير فعالية أنزيم β-galactosidase مع بعض التحويرات

تقدير البروتين

اتبعت طريقة Lowry , وآخرون (1951) الموصوفة من قبل Everette وآخرون (٢٠١٠) لتقدير تركيز البروتين في المراحل المختلفة من الدراسة .

تنقية أنزيم البيتاكالاكتوسايديز

أجريت عملية استخلاص الأنزيم من كبد الأغنام حسب الطريقة التي أعطت اعلى فعالية وهي الاستخلاص بمحلول دارئ الفوسفات بدالة حموضة ٥ , وتم تركيز

المستخلص الأنزيمي باستخدام **خمس طرائق مختلفة** وذلك لتحديد الطريقة المثلى لتركيز الأنزيم (التنقية الجزئية) للحصول على اعلى فعالية نوعية واعلى نسبة مئوية من الحصيلة الأنزيمية (Yield) والطرائق الخمس هي:- **الترسيب بالكحول الأثيلي** حيث تم تركيز المستخلص الأنزيمي بإضافة حجوم معينه من الكحول الأثيلي تدريجيا مع التحريك المستمر للحصول على نسب مئوية متدرجه من الكحول تراوحت بين (٣٠-٦٠%) , الترسيب بالترشيح الفائق حيث استخدمت خليه الترشيح الفائقة السرعة سعه (٥٠ مل) من نوع (Amicon - Model K-52PS , MAX) الهولندية الصنع واستخدم المرشح Diaflo Ultra filter من نوعXM-100 بعد نقعه بالماء المقطر لمده ساعه واحده حيث تثبت الخلية ويضاف المستخلص الأنزيمي في مستودع الخلية وتغلق . واستخدم النيتروجين لدفع المستخلص بضغط (٣,٥) كغم/ سم ووضعت الخلية على خلاط مغناطيسي لحين انتهاء الترشيح الفائق وبذلك يكون المستخلص قد ركز ثم يقاس الحجم وتركيز البروتين وفعالية الأنزيم (السعدي , ٢٠١٤) , و **التركيز بحبيبات السفادكس G. 25 الجافة** حيث يضاف المستخلص الأنزيمي إلى أنبوب الديلزة (النضح الغشائي) ويحاط بطبقة من حبيبات السفادكس G. 25 يوضع في طبق داخل الثلاجة وحتى اليوم التالي، ثم يتم قياس الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين (التميمي، ١٩٩٦).

الترسيب بالأسيتون المبرد حيث مزج الأسيتون المبرد مع المستخلص الأنزيمي بنسبه (١:٠,٥) (١:١،٢:١،٣:١،٤:١) (حجم/حجم) وأضيف الأسيتون تدريجيا مع التحريك المستمر داخل حمام ثلجي, **الترسيب بكبريتات الأمونيوم** بنسبة إشباع تراوحت بين (٣٠ – ٦٠)%.

التنقية الكلية

تمت التنقية الكلية بعد إمرار المستخلص الخام على عمود الترشيح الهلامي السيفادكس G-10 بمرحلتين الأولى كان باستخدام كروموتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام مادة DEAE Cellulose – Sephadex A 100 وبالطريقة التي وصفها (Whitaker,١٩٧٢), والمرحلة الثانية كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام مادة السيفاكريل (Sephacryl S-300) المجهز من شركة Pharmacia السويدية .

تعين نقاوة الأنزيم

اتبعت الطريقة التي ذكرها (Garfine، 1990) في تعيين نقاوة الأنزيم وهي طريقه الترحيل الكهربائي في هلام متعدد أكريل أمايد بغياب العوامل الماسخة (Poly acryl amid electrophoresis under non denatured condition).

الوزن الجزيئي للأنزيم

تم تتعين الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجنيز المنقى بطريقه الترشيح الهلامي.

النتائج والمناقشة

التحليل الكيميائي لكبد الأغنام

يبين الجدول (١) نتائج التحليلات الكيميائية لكبد الأغنام المحلية المستخدم في هذه الدراسة, حيث بلغت نسبة الرطوبة (٦٦,١٢) % ونسبة البروتين (٢٠,٦٠) % ونسبة الدهن (٣,٥٠) % وبلغت النسبة المئوية للكربوهيدرات والرماد (٨,٣٥ و ١,٤٣) % على التوالي . وبلغت القيمة الحرارية لكل (١٠٠) غم من كبد الأغنام المحلية (١٤٥,٢١) كيلو سعرة. وهذه النتائج مقاربة لنتائج الحصناوي, (٢٠٠٧) عندما اجري التحليل الكيميائي لكبد الدجاج المحلي حيث بلغت النسبة المئوية للرطوبة, البروتين, والدهن, الكربوهيدرات والرماد (٦٥,١ , ٢٠,٣ , ٤,١ , ٩,١ و ١,٤) % على التوالي وقدر القيمة الحرارية لكل (١٠٠) غم من كبد الدجاج المحلي بـــ (١٥٢) كيلو سعرة

جدول (١) التحليل الكيميائي لكبد الأغنام المحلية

المكونات	النسبة المئوية %
الرطوبة	٦٦,١٢
البروتين	٢٠,٦٠
الدهن	٣,٥٠
الكربوهيدرات	٨,٣٥
الرماد	١,٤٣
القيمة الحرارية (كيلو سعرة / ١٠٠ غم)	١٤٥,٢١

وقدر Williams , (٢٠٠٧) النسبة المئوية للبروتين والدهن في كبد الأغنام الاسترالية بـــ (٢١,٤ و ٧,٥) % على التوالي , وقدر أيضا نسبة البروتين والدهن في كبد الأبقار الاسترالية بـــ (٢٠,٠ و ٨,٦) % على التوالي. وقدر يحيى وآخرون , (٢٠١١) نسبة الرطوبة , البروتين , الدهن, الكربوهيدرات, و الرماد في دماغ الماعز المولودة حديثاً بـــــ (٦١,٢٠, ٢٦,٣٠, ٤,٢٠, ٧,٣٠ و ١,٠٠) % وبلغت القيمة الحرارية لكل (١٠٠) غم من دماغ الماعز بـــ ١٦٧,١٠ كيلو سعرة. وذكروا ان المكونات الكيميائية لأنسجة الحيوان تختلف تبعا لنوع النسيج , والسلالة , والتغذية .. الخ.

أستخلاص أنزيم بيتا- كالاكتوسايديز

تحديد الطريقة المثلى لأستخلاص الأنزيم

أستخلص أنزيم اللاكتيز باستخدام محاليل مختلفة تم اختيارها اعتماداً على المراجع العلمية في مجال أستخلاص الأنزيمات (Whitaker، 2004 ; Sawhney وSingh، ; 2005 الصوفي، 2005 ; الحصناوي, ٢٠٠٧ ; Al-Shammary, ٢٠١١). درست كفاءة ثمان طرائق لاستخلاص أنزيم اللاكتيز من كبد الأغنام ، إذ أظهرت النتائج المبينة في الجدول (٢) أختلاف الفعالية النوعية للأنزيم باختلاف المحاليل الدارئة وألاس الهيدروجيني المستخدم، وقد عُد الاستخلاص بمحلول دارئ الفوسفات بدالة حموضة ٥ أفضل المحاليل، من حيث يساعد على استخلاص الأنزيم بكفاءة عالية مقارنةً مع محاليل الاستخلاص الأخرى. أذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 409.64 (وحدة/ ملغم بروتين) والفعالية الكلية 78898.5 وحدة ويليه محلول الاستخلاص كربونات الصوديوم الفعالية النوعية 328.68 وحدة/ ملغم بروتين، وأن الفعالية النوعية للأنزيم المستخلص بأستخدام جميع المحاليل قد تراوحت بين (179.22–409.64) وحدة/ ملغم بروتين, القيمة الأقل كانت للاستخلاص بالكليسيرول والقيمة الأعلى لمحلول دارئ الفوسفات بدالة حموضة (٥) وتراوحت الفعالية الكلية بين (14500 - 78898.5) وحدة كانت القيمة الأقل للماء المقطر والأعلى لدارئ الفوسفات بدالة حموضة (٥) .

تعود قابلية محلول دارئ الفوسفات العالية في استخلاص أنزيم البيتاكالاكتوسايديز (اللاكتيز) إلى أن زيادة القوة الأيونية , ويعود تأثير هذه المحاليل على الاستخلاص إلى قدرتها على فك الترابط الموجودة بين الإنزيم والمواد الخلوية الأخرى ، إذ كانت القوة الأيونية لمحلول دارئ الفوسفات بدرجة حموضة (٥), كافية لفك الترابط بين الإنزيم

والمواد الخلوية الأخرى , مما أدى إلى فك أرتباط الإنزيم بالنسيج الموجود فيه في محلول الإستخلاص وبالتالي إلى زيادة فعاليته النوعية (Barceló, Munoz; 1972, Whitaker , ١٩٩٥ ;الأعرجي ، ; ٢٠٠٠ السلطان وجماعته ، ٢٠٠٤ ; جاسم، ٢٠٠٤ ; كريم ،٢٠٠٤).

وقد استخدم AL-Bakir وآخرون, (١٩٨٨) هذه الطريقة نفسها في استخلاص الأنزيمات من مصادر مختلفة. ومن الجدير بالذكر ان عملية الاستخلاص وأرتفاع أو انخفاض الفعالية النوعية في المستخلصات الخام المتحصل عليها يعتمد على نوع الأنزيم ومصدر الأنزيم نباتي ام حيواني أو من الأحياء المجهرية، كذلك يعتمد على طبيعة تركيب الأنزيم والحالة الوراثية والبيئية لمصدر الأنزيم والى طبيعة الارتباطات الحاصلة بين الأنزيم والمكونات الخلوية الأخرى للحيوان أو النبات مثل المواد البكتينية والألياف والمواد الكربوهيدراتية التي تحتاج إلى محاليل أستخلاص ذات أس هيدروجيني متعادل وذات قوة أيونية عالية لتسهيل عملية الاستخلاص لأنزيم اللاكتيز.(جاسم ، ٢٠٠٤ ؛ Javeri وUhlenbruck ، ٢٠٠٤; الطويل , ٢٠٠٠ ; التميمي، ١٩٩٦)

جدول (٢) طرائق استخلاص أنزيم البيتاكالاكتوسايديز (اللاكتيز)

ت	محلول الاستخلاص	الحجم (مل)	الفعالية وحدة /مل	البروتين ملغم	الفعالية النوعيه وحدة/ ملغم بروتين	الفعالية الكلية (وحدة)
1	الماء المقطر	25	580	3.04	190.78	14500
2	% 0.5 $Na_2 CO_3$	30	1272.0	3.87	328.68	38160
3	دارئ الفوسفات pH_5	45	1753.3	4.28	409.64	78898.5
4	كلوريد البوتاسيوم	45	1393.3	4.78	291.48	62698.5
5	كلوريد الكالسيوم	45	1122.6	4.72	237.83	50517
6	كليسيرول	35	604.0	3.37	179.22	21140
7	دارئ الخلات 0.2M pH_5	37	946.7	4.50	210.37	35027.9
8	كلوريد الصوديوم (%10)	44	1480.0	5.26	281.36	65120
9	دارئ الفوسفات 0.2M pH_7	48	170	4.6	36.96	٨١٦٠

التنقية الجزئية للأنزيم Partial Purification of β-galactosidase

الغرض من التنقية الجزئية هو التخلص من اكبر قدر من الماء من الأنزيم المستخلص الخام ولذلك تسمى بتركيز الأنزيم أو ترسيب الأنزيم وهناك طرق مختلفة للتنقية الجزئية واهمها خمس طرائق والتي استخدمت في هذه الدراسة وهي كالاتي:-

التركيز بالكحول الأثيلي Concentration by Ethanol

يوضح الجدول (٣) نتائج ترسيب الأنزيم بأستخدام الكحول الأثيلي البارد إذ تراوحت الفعالية النوعية بين 21.61–408.50 وحدة/ ملغم بروتين للأنزيم المركز بالكحول الأثيلي عند رفع نسبته في المستخلص الخام من 30% – 60% مقابل 388.8 وحدة/ ملغم بروتين في المستخلص الخام، وعليه فان عدد مرات التنقية الذي حصلنا عليه ما بين النسبتين المذكورتين من الكحول الأثيلي مره واحده كخطوة أولى من خطوات التنقية وعلى مرحلتين في الأولى أضيف الكحول الأثيلي إلى المستخلص الخام بتركيز 30% أهمل الراسب المتكون (قليل الفعالية النوعية) أذ بلغت الفعالية 148.7 وحدة ثم رفع تركيز الكحول في الراشح إلى 60% أمعاناً في ترسيب الأنزيم وجمع الراسب وأذابته في اقل كمية من المحلول الدارئ أذ بلغت الفعالية الكلية في هذه النسبة من الكحول 1503.3 وحدة.

ومن الجدير بالذكر أن عملية الترسيب بفعل المذيبات العضوية (الميثانول، الإيثانول، الأسيتون.. الخ) القابلة للامتزاج بالماء (Water Miscible) تعتمد على ثابت الفصل الكهربائي Dielectric constant لهذه المذيبات العضوية الذي هو أوطأ من الماء بكثير مما يؤدي إلى إنخفاض كبير في قيمة هذا الثابت وأرتفاع قيمة القوة التي تجذب الجزيئات بعضها إلى بعض وتكوين كتل تترسب في المحلول.

وعلى الرغم من ان كثيراً من الباحثين ومنهم (كريم، ٢٠٠٤ ; جاسم ، ٢٠٠٤ ; الشيخلي ،٢٠٠٤ ;الصوفي، ٢٠٠٥) أستخدموا كبريتات الأمونيوم في تركيز الأنزيمات ومنها الليبوكسيجينيز، إلا أن بعضهم أكد كفاءة التركيز بالمذيبات العضوية مثل الكحول الأثيلي والأسيتون وفضل عدد كبير منهم ترسيب الأنزيمات من مستخلصاتها الخام بالمذيبات العضوية دون اللجوء إلى الترسيب بالأملاح (AL-Obaidy, , ١٩٧٥ ; محي الدين عمر،١٩٩٨ ; حسن،١٩٩٦).

الترسيب بحبيبات السفادكس الجافة G-25

Concentration by dry granules of sephadex G-25

تظهر النتائج الموضحة من الجدول (٣) أن هذه الخطوة قد حققت تنقية جزئية للأنزيم بعدد مرات مقدارها (2.95) مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها (34.28)% وهي نتيجة جيدة في ترسيب الأنزيم، ولكن عملية الترسيب بحبيبات السفادكس الجافة G-25 أعطت تنقية جزئية أقل من الترسيب بالأسيتون البارد والترشيح الفائق وكبريتات الأمونيوم بإشباع 60%ولكنها كانت اعلى من طريقة الترسيب بالكحول وكبريتات الأمونيوم بإشباع 30%.

أن معظم الدراسات المتوفرة في مجال تنقية أنزيم البيتا كالاكتوسايديز لم تشر إلى استخدام حبيبات السفادكس كطريقة لتركيز المستخلصات الأنزيمية فهذه الطريقة استخدمت بنجاح لتوظيف الترشيح الهلامي في أواخر ١٩٥٠ وكانت حينها تقنية فصل أنشأت كأسلوب مكمل لامتزاز اللوني, لكن لم تستعمل حديثا على نطاق واسع لمحدودية قدرتها في ترسيب الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية العالية فهي عادة تعمل على ترسيب الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة والمتوسطة (Akinloye, ٢٠١٢). استخدمت في هذه الدراسة بديلاً عن مادة متعدد الأثيلين كلايكول Poly ethylene Glycol غير المتوفرة حاليا والغالية الثمن (الحصناوي, 2007).

التركيز بالترشيح الفائق Concentration by Ultra – Filtration

تعد من الطرائق المستخدمة على نطاق واسع على المستويات المختبرية والصناعية ولاسيما في تنقية الأنزيمات وذلك لكون هذه الطريقة لا تحتاج إلى مواد كيميائية كثيرة، ويتم العمل على درجات حرارية منخفضة ولا يحدث تغيير في طور البروتين أي لا يحدث تحول من ذائب إلى راسب, (Abed , ٢٠١٠). يوضح الجدول (٣) النتائج المتحصل عليها من هذه الطريقة عند تركيز الأنزيم أذ كانت الفعالية النوعية (1219.2) وحدة/ملغم بروتين وبعدد مرات تنقية 3.12 مرة وبحصيلة أنزيمية 38.62%. وقد وجد البيار (1994) ان هذه الطريقة مجدية في مجال تركيز أنزيمات الأميليز وكذلك أستخدمها سعيد, (2004) في تركيز أنزيم البروتييز المنتج من خميرة*candida albicans*، وأيضاً استخدمها السلطان وآخرون ,(2004) في تركيز الليبوكسيجينيز من فستق الحقل إذ حصل على عدد مرات تنقية (2.28 مرة) وبحصيلة أنزيمية 41.95%، وأيضاً أستخدمها جاسم,

(2004) في التنقية من بذور الترمس , واستخدمها Dubey وآخرون, (٢٠١١) عندما استخلصوا بعض الأنزيمات من مصادر بكتريا مختلفة.

جدول (٣) طرائق تركيز الأنزيم من المستخلص الخام " التنقية الجزئية "

ت	الطريقة	الحجم (مل)	الفعالية (مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
1	المستخلص الخام	45	1750	4.5	388.88	78750	1.0	100
	الإيثانول %30 %60	10 10	148.7 1503.3	6.88 3.68	21.61 408.50	1487 15033	0.055 1..050	1.88 19.08
2	المستخلص الخام	45	1750	4.4	397.72	78750	1.0	100
	السفادكس G-25	10	2699.8	2.3	1173.82	26998	2.95	34.28
3	المستخلص الخام	45	1760	4.5	391.11	79200	1.0	100
	الترشيح الفائق	13	2353	1.93	1219.2	30589	3.11	38.62
4	المستخلص الخام	45	1758	4.5	390.66	79110	1.0	100
	الأسيتون المبرد	13	2674.4	1.94	1378.55	34767.2	3.53	43.94
5	المستخلص الخام	45	1750	4.5	388.8	78750	1.0	100
	كبريتات الأمونيوم %30 %60	15 15	270.2 6368.7	9.1 2.36	29.69 2698.60	4053 95530.5	0.077 6.94	5.14 121.30

الترسيب بالأسيتون البارد Concentration by cold acetone

أشار Ajaykumar وأخرون (٢٠١٢) وكذلك Silvia وأخرون (٢٠١٤) إلى أن يمكن توضيح فائدة الأسيتون البارد في الترسيب بأنه يحدث تكتل لجزيئات البروتين مع بعضها بإرتباط المجاميع المشحونة ومن ثم زيادة قوة التجاذب Attraction Force , إذ يؤدي خفض قيمة ثابت الفصل الكهربائي إلى زيادة قوة التجاذب، وبما أن قيمة ثابت الفصل للمذيبات العضوية (الإيثانول، الميثانول، الأسيتون) هي ٣٠ وهي أقل من قيمة ثابت فصل الماء ٨٠ فسوف يؤدي ذلك إلى مضاعفة قوة التجاذب ومن ثم إلى ترسيب البروتين. ويستخدم الأسيتون البارد لتفادي حدوث تمسخ للبروتينات (الإنزيمات) Denaturation عند أستخدام المذيبات العضوية نتيجة كسر الروابط الكارهة للماء Hydrophobic bonds الموجودة في التركيب الجزيئي للبروتين.

وقد أستخدمت في هذا الدراسة خمس نسب خلط للأسيتون البارد مع المستخلص الأنزيمي هي (0.5 : 1 و 1 : 1 و 2 : 1 و 3 : 1 و4 : 1) (حجم/حجم) لترسيب الأنزيم من

مستخلصاته، أظهرت النتائج أفضلية نسبة الخلط (٢ : ١) على بقية النسب من حيث الفعالية النوعية المستحصل عليها لذلك أعتمدت في ترسيب الأنزيم من مستخلصاته كما موضح في الجدول (٣). وقد ساهم في تحقيق تنقية جزئية للأنزيم بعدد مرات تنقية (3.53) مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها (43.94)% وبفعالية كلية بلغت (٣٤٧٦٧,٢) وحدة .

وقد أستخدم هذه الطريقة كثير من الباحثين في تنقية الأنزيم إذ أستخدمها السلطان وجماعته (2004) في تنقية الأنزيم الليبوكسيجينيز من فستق الحقل , واستخدمها الحصناوي, (٢٠٠٧) عندما استخلص أنزيم اللاكتيز من كبد الدجاج المحلي, واستخدمها ويحيى وآخرون, (٢٠١١) عندما استخلصوا أنزيم اللاكتيز من دماغ الماعز حديث الولادة , واستخدمها Prasad,(٢٠١٤) عندما استخلص البروتين من الصويا.

الترسيب بأستخدام كبريتات الأمونيوم Concentration by Ammonium

يلاحظ من الجدول (٣) ان الفعالية النوعية للأنزيم كانت بين(٢٩,٦٩ – ٢٦٩٨,٦٠) وحدة /ملغم بروتين ما بين نسبتي الإشباع (٣٠) إلى (٦٠)% وهذا يعني أن نسبة الإشباع (٣٠)% لم ترسب أنزيم اللاكتيز وإنما رسبت بروتينات أخرى بدليل أن فعالية الأنزيم كانت منخفضة جداً وهي (٢٧٠,٢) مل مقارنةً بالفعالية عند نسبة إشباع (٦٠)% والتي بلغت (٦٣٦٨,٧) مل, أن الفعالية النوعية بنسبة إشباع ٦٠% كانت (٢٦٩٨,٦٠) وحدة/ملغم بروتين مقارنةً بـــ (٢٩,٦٩)) وحدة/ ملغم بروتين بنسبة إشباع (٣٠)%. وكان عدد مرات تنقية الأنزيم (٦,٩٤) مرة عند التركيز بكبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع (٦٠)% , وبحصيلة أنزيمية مقدارها (١٢١,٣٠) %.

وقد أستخدم (جاسم، 2004) هذه الطريقة في تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الترمس وبنسب إشباع مختلفة, وكذلك أستخدمها الشيخلي، (٢٠٠٤) في تنقية أنزيم ألفا أميليز من بكتريا Bacillus lichenforimis R5 بنسبة إشباع ٨٠%. أيضاً أستخدمها الحصناوي, (2007) في تنقية أنزيم اللاكتيز وبنسب إشباع تتراوح بين 20 –70%، واستخدمها Ajay وآخرون, (٢٠١٢) بنسبة إشباع (١٥ – ٦٠ %) عند استخلاصهم أنزيم اللاكتيز من اللوز. واستخدمها Mozumder وآخرون, (٢٠١٢) وبنسبة إشباع ٨٠% عند استخلاصهم أنزيم اللاكتيز من بكتريا الـــ *Lactobacillus* وكذلك استخدمها Princely وآخرون, (٢٠١٣) عند عزلهم أنزيم اللاكتيز من بكتريا *Streptococcus*

thermophilus التي نميت على الشرش وبنسبة إشباع (٧٠) %. وكذلك استخدمها Naghavi , (٢٠١٣) عند استخلاصه أنزيم الـــ Cellulase من الخشب وبنسبة إشباع (٧٠) % .

التنقية النهائية أو التنقية الكلية Final purification (Totally)

تنقية الأنزيم (كروموتوغرافيا التبادل الأيوني)

Enzyme purification (Ion Exchange Chromatography)

تضمنت تنقية الأنزيم ثلاث خطوات رئيسة (جدول ٤) وهي الإستخلاص للحصول على الأنزيم الخام بمحلول دارئ الفوسفات بدرجة حموضة (٥), والترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع (٦٠)% ثم إمرار الأنزيم المنقى جزئياً على عمود المبادل الأيوني السالب DEAE Cellulose Sephadex-A100 وهذا العمود هو عبارة عن خليط من الهلام وهي مادة السيفادكس مع مادة التبادل الأيوني DEAE وذكرت هنا لأجل التوضيح ليس إلا, لأنه يكتب على العبوة Sephadex A-100 حيث ان الـــ A تشير إلى مادة التبادل الأيوني المخلوطة مع مادة السيفادكس , وتمت موازنة العمود بدارئ فوسفات الصوديوم بتركيز (0.01) مول/لتر وبدرجة حموضة (7) ثم قيست الأمتصاصية على طول موجي (280) نانومتر.

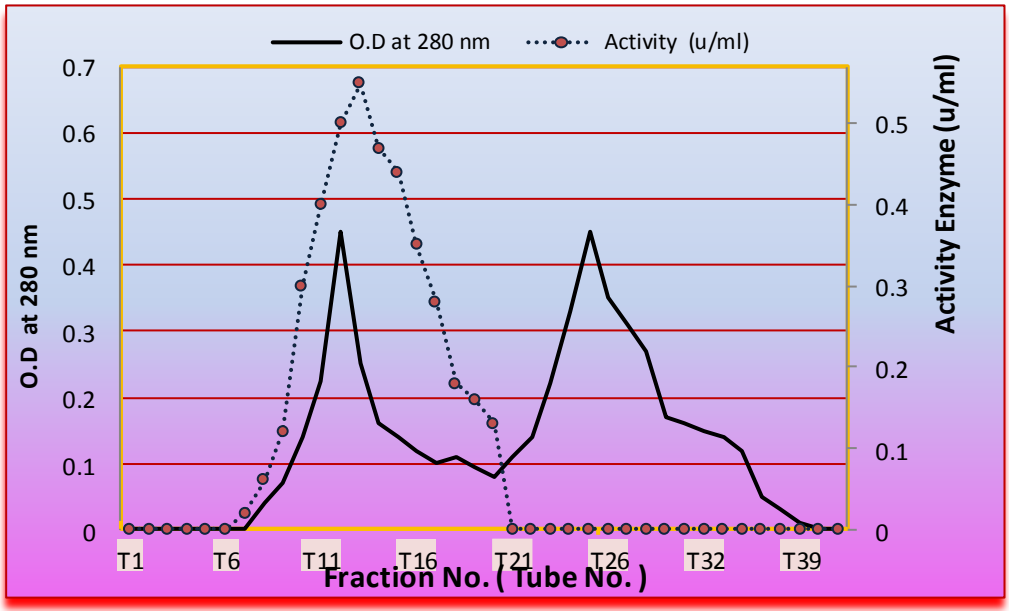
بعد الحصول على المستخلص الخام مرر على عمود الترشيح الهلامي السيفادكس G-10 (Sephadex – G10) , وهو من المحاليل المنظفة التي تزيل الملوثات مثل الأصباغ والأملاح وبكفاءة عالية, وكذلك يزيل البروتينات الصغيرة التي يقل وزنها الجزيئي عن (٧) كيلو دالتون والسكريات المتعددة polysaccharide والتي يزيد وزنها الجزيئي عن ٧ كيلو دالتون (Chemeurope , ٢٠٠٩).

يوضح الجدول (٤) ان الحصيلة الأنزيمية بلغت (٦٤,٢) % وبعدد مرات تنقية (٣,٦٧) مرة في خطوة التنقية الجزئية وهي خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع (٦٠)%, وأزداد عدد مرات التنقية إلى (٦,٩٨) مرة في خطوة التبادل الأيوني Ion Exchange ، ويلاحظ في الشكل (١) مرحلة الاسترداد (Elution) نلاحظ ظهور قمة واحدة، وكانت هذه القمة تحتوي على الفعالية التي تؤكد وجود الأنزيم في هذه المرحلة .

إزدادت الفعالية النوعية للأنزيم من (٣٨٨,٨٨) وحدة/ملغم بروتين في مرحلة الأنزيم الخام و(١٤٢٧,٤٠) وحدة/ ملغم بروتين في مرحلة التنقية الجزئية بكبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع (٦٠)% إلى (٢٧١٧,٢٠) وحدة/ ملغم بروتين في خطوة التبادل الأيوني. جمعت الأجزاء الحاوية على فعالية عالية وتم قياس حجمها والفعالية وتركيز البروتين فيها.

جدول (٤) خطوات تنقية أنزيم اللاكتيز المستخلص من كبد الأغنام المحلية

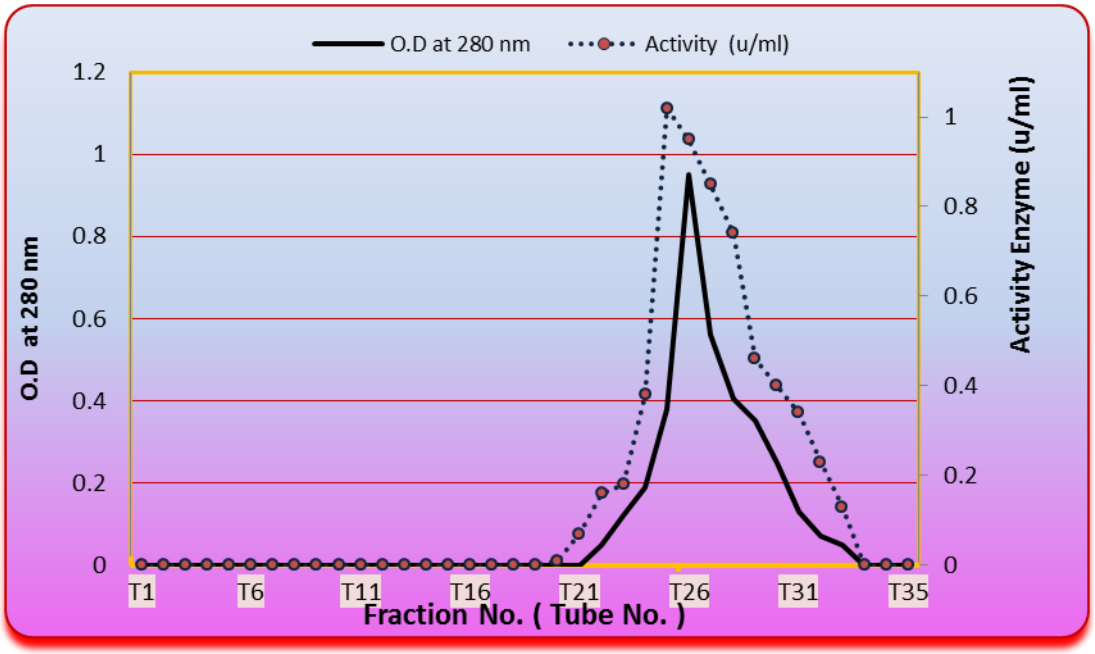
ت	الطريقة	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
1	المستخلص الخام	45	1750	4.5	388.80	78750	1	100
2	الترشيح الهلامي السيفادكس G-10	30	23310	4.43	526.2	٦٩٩٣٠	١,٣٥٣	87.8
3	الترسيب بكبريتات الأمونيوم 60%	15	3368.7	2.36	1427.4	50530	3.67	64.2
4	المبادل الأيوني والترشيح الهلامي DEAE-Sephadex A100	35	1168.4	0.43	2717.2	40894	6.98	52.0
5	الترشيح الهلامي Sephacryl S-300	30	1098.5	0.33	3328.8	32955.2	8.55	41.84



شكل (١)كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الهلامي (الاسترداد Elution) للمستخلص الخام لأنزيم اللاكتيز من كبد الأغنام المحلية بعمود (DEAE - Sephadex A100) وتمت الموازنة بأستخدام محلول ٠,٠١ مولاري من محلول دارئ الفوسفات الصوديوم ذي دالة حمضية (٧) وبواقع ٣ مل لكل جزء وبأبعاد (٥٨ x ١,٦) سم.

الترشيح الهلامي Gel filtration

تلت خطوة التبادل الأيوني إمرار المحلول الأنزيمي الناتج عن الخطوة السابقة على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-300 الذي تمت موازنته باستعمال دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز (٠,٠١) مول / لتر بدرجة حموضة (٧) ثم جمعت الأجزاء المستردة من العمود وقيست الامتصاصية الضوئية على طول موجي ٢٨٠ نانومتر. في هذه الخطوة أمكن الحصول على قمة بروتينية ذات فعالية عالية والشكل (٢) يوضح أن قمة الفعالية تكاد تكون متطابقة تقريباً مع قمة البروتين، أن هذه الخطوة تعد دليلاً على نقاوة الأنزيم، إذ أرتفع عدد مرات التنقية في هذه الخطوة إلى (٨,٥٧) مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها (٤١,٨٤)% , وهذه النسبة المئوية تعبر عن كفاءة الفصل الجيدة. وبلغت الفعالية النوعية والفعالية الكلية (٣٣٢٨,٨٠) وحدة / ملغم بروتين , (٣٢٩٥٥,٢٠) وحدة على التوالي. وبعد تلك الخطوة من التنقية جمعت أجزاء الأسترداد الحاوية على الفعالية وحفظت بالمجمدة لحين الاستعمال.

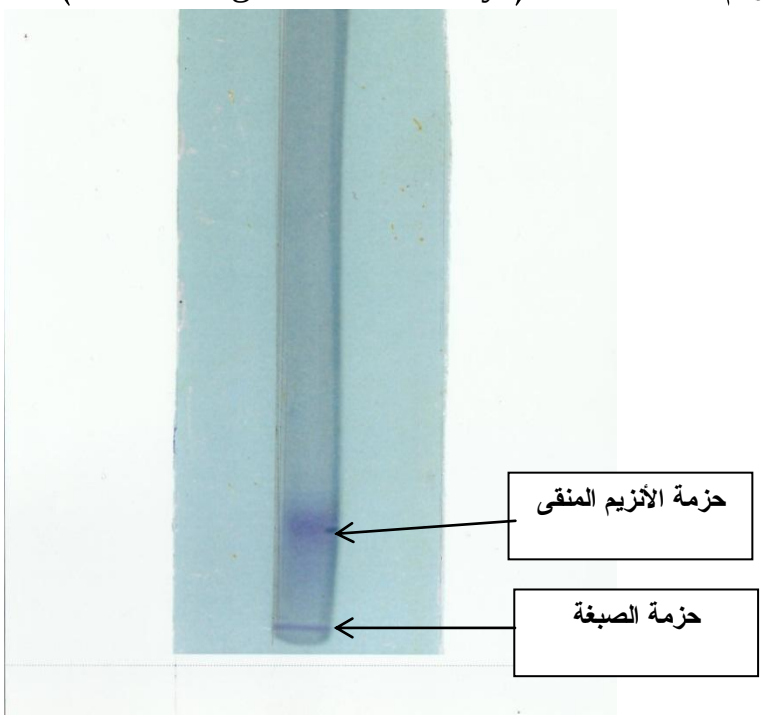


شكل (٢) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية الأنزيم باستخدام عمود Sephacryl S – 300 بأبعاد (٥٨ x ١,٦) سم بمحلول استرداد دارئ الفوسفات ذي دالة حموضة (٧) وبواقع ٣ مل / جزء.

اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه جاسم، (٢٠٠٤) إذ نقى أنزيم الليبوكسيجينيز بخطوتين متتاليتين بعمود السيفاكريل S-300 ، كما أن نتائج تنقية الأنزيم قيد الدراسة جاءت بمستوى اعلى قليلاً من النتائج التي حصل عليها السلطان وآخرون، (٢٠٠٤) إذ حصل على حصيلة أنزيمية مقدارها (٣٦)% عند تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من فستق الحقل وبخطوات التنقية نفسها أي ان هذه الدراسة حققت تقدماً بمقدار٦% من ناحية الحصيلة الأنزيمية. واستخدامها Turek وآخرون, (٢٠١١) عند استخلاصهم أنزيم الـ Hydroxylase. واستخدمها أيضاً Naghavi, (٢٠١٣) عند استخلاصه أنزيم Cellulase من الخشب .

تعين نقاوة الأنزيم Designate the purity of the enzyme

استخدم الترحيل الكهربائي بغياب العوامل الماسخة Denaturation Factors لتعيين نقاوة الأنزيم وخلوه من بروتينات أخرى، فلوحظ ظهور حزمة بروتينية واحدة (One band) في هلام متعدد أكريل أمايد Poly acryl amid Gel بعد أن كانت ٤ حزم في المستخلص الأنزيمي المركز بمحلول دارئ الفوسفات بدالة حموضة (٧) كما في شكل (٣) مما يشير إلى نقاوة الأنزيم حد التجانس (Sawheney و Singh ,٢٠٠٥).



شكل (٣) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) بهلام الأكريل أمايد بغياب العوامل الماسخة لأنزيم اللاكتيز المستخلص من كبد الأغنام بتركيزين مختلفين، إذ تمثل الحزمة العليا (الأنزيم المنقى) في حين تشير الحزمة السفلى إلى حزمة نهاية الفصل (حزمة الصبغة).

الوزن الجزيئي

أتبعت طريقة الترشيح الهلامي Gel Filtration على عمود السيفاكريل (S-300) بأبعاد (٥٨ x 1.6) سم في تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم اللاكتيز وتم تعيين حجم الفـــراغ Void Volume (Vo) للعمود بأستخدام الدكستران الأزرق (٢٠٠٠)، كما تم تعيين حجوم الأسترداد للبروتينات القياسية (Ve) التي شملت اللايسوزايم Lysozyme، التربسين Trypsin، البومين المصل البقري (Bovine Serum (B.S.A Albumin) ، ; أنزيم الكتاليز Catalase , وأنزيم اليوريز Urease , أنزيم اللاكتيز β- Galactosidase استخرجت منها قيم Vo/ Ve فكانت مساوية إلى 2.0 , ١,٨٨ , ١,٤٤ , ١,٢٢ , ١,١٢ , ١,٣٣على التوالي. ظهر أن الوزن الجزيئي لأنزيم اللاكتيز المستخلص من كبد الأغنام المحلية ١٨٠ كيلو دالتون.

وهذه القيمة قريبة للوزن الجزيئي للإنزيم المستخلص والمنقى من دماغ الأغنام حديثة الولادة حيث كان (١٨٥,٩٤٢) كيلو دالتون (Abed , ٢٠١٠) , والوزن الجزيئي للأنزيم المستخلص والمنقى من دماغ الماعز حديثة الولادة حيث كان (١٨٧,٤٣٧) كيلو دالتون (يحيى وآخرون , ٢٠١١) , فيما وجد Chunli وأخرون (٢٠١٠) إن الوزن الجزيئي كان (٣٣٥) كيلو دالتون , لإنزيم اللاكتيز المعزول والمنقى من خميرة *psychrotolerant* المعزولة من الرواسب البحرية في القطب الجنوبي , ووجد Ajay وأخرون (٢٠١٣) إن الوزن الجزيئي لإنزيم اللاكتيز المستخلص والمنقى من اللوز كان (٦٢) كيلو دالتون باستعمال طريقة الترشيح الهلامي .

المصادر

الأعرجي، سند باقر محمد. (٢٠٠٠). فصل أنزيم الليبوكسيجينيز ومثبط التربسين من فول الصويا صنف أباء وتنقيتهما وتوصيفهما. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

التميمي، سالم صالح حسين. (١٩٩٦). الأنزيمات المحللة للبروتين في حنطة صنف أبي غريب السليمة والمتضررة بحشرة السونة واثرها في بعض الصفات النوعية. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

الحصناوي , علي نوري عبد (٢٠٠٨). فصل وتنقية وتوصيف أنزيم البيتا – كالاكتوسايديز من كبد الدجاج المحلي واستخدامه في المجالات العلاجية. رسالة دكتوراه, جامعة بغداد – كلية التربية ابن الهيثم.

السلطان، أحلام مكي عبدالجبار ، الجميلي، طالب خماس حسن ، الأعرجي، سند باقر محمد. (٢٠٠٤). فصل وتنقية وتوصيف أنزيم الليبوكسيجينيز من فستق الحقل، مجلة العلوم الزراعية العراقية. ١١٢ – ١٠٣ :(٥) ٣٥.

الشيخلي، رنا عبدالله حسين. (٢٠٠٤). أنتـــاج أنزيم ألفا أميليز من البكتريا Bacillus lichenforimis R5 المعزولة محليا وتنقيته ودراسة صفاته. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

الصوفي، محمد عبدالرزاق. (٢٠٠٥). تنقية وتوصيف أنزيم G6pD من الخميرة المعزولة محليا. ودراسة أمكانية استخداماته في المجالات التطبيقية. أطروحة دكتوراه. قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

الطويل، سعد ضياء وديع. (٢٠٠٠). فصل وتنقية أنزيم البروتييز من أوراق نبات الديباج. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

جاسم , صنوبر محمد احمد. (٢٠٠٤). استخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز وتنقيته وتوصيفه من بذور الترمس *Lupinus termis* . رسالة ماجستير, كلية التربية (ابن الهيثم)– جامعة بغداد.

حسن، شذى سلمان. (١٩٩٦). إنتاج وتنقية وتوصيف الأنزيمات المحللة للبروتينات من العفن .Aspergillus Sp بطريقة تخمرات الحالة الصلبة. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم – جامعة بغداد.

حمادي، دنيا سعاد علي. (٢٠٠١) فصل وتنقية وتوصيف أنزيم الببسين من معدة اسماك الجري. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

سعيد، أسراء فريد. (٢٠٠٤). دراسة أنزيم البروتييز الاسبارتيلي المنتج من خميرة Candida albicans المعزولة محليا. رسالة ماجستير. كلية العلوم – جامعة بغداد.

كريم، سهاد خالد. ((٢٠٠٤. استخلاص وتنقية أنزيم البيروكسيديز من جذور الشلغم Brassica rapa L.. رسالة ماجستير. كلية العلوم – جامعة بغداد.

محي الدين، محمد عمر. (١٩٩٨). تنقية وتوصيف أنزيم البروتييز الحامض بديل المنفحة المنتج من العفن Rhizomucor Miehei. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

يحيى , اياد نافع ; الحصناوي , علي نوري ; محيسن , ابتسام كريم و علي , حسين عبد الأمير (٢٠١١). استخلاص وتنقية أنزيم β - galactosidase المستخلص من دماغ الماعز حديثة الولادة. مجلة جامعة دمشق المجلد (٢٧) العدد الأول :٤٩ – ٦٤.

Abed, A. N. , 2010 .Isolation and Purification of β-galactosidase From New Born Sheep Brain. Iraqi Journal of Science,.50(3): 437-443.

Ajay, P.; Melita, L. and Farhath, K. (2013). Extraction, Purification and Thermodynamic Characterization of Almond (Amygdalus communis) b-Galactosidase for the Preparation of Delactosed Milk. Food Technol. Biotechnol. 51 (1): 53–61.

Ajaykumar M. ; Take, l. and Shweta N. (2012). Isolation, Characterization and Purification of α-Galactosidase from Peas. J. Adv. Lab. Res. Biol. 2(3): 164-170

Akinloye, A. ; Balogun, A. ; Kareem, S, and Mosaku, S.,(2012). Partial purification and some properties of α–glucosidase from *Trichoderma longibrachiatum*. Biokemistri 24(1):31-37.

AL-Bakir, A. Y., Al-Tai, W. F. and Ali, M. A. (1988). B-galaactosidase :anew enzyme associated with maturation of Zahdi dates. J. Agric water Res. 7: 25- 47.

AL-Obaidy , H. M., (1975) ; " Broad bean Lipoxygenase, M. Sc. Thesis, Food Sci. Dept. Agricultural college, Baghdad University.

Al-Shammary, Mohammed H. Mushrif (2011). Production, Purification and Characterization of Lipoxygenase from Fusarium proliferatum. Ph.D. Thesis College of Sciences, University of Baghdad.

Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.); official methods of analysis th[15] ed. Washington.D.C.

Chemeurope.com: From Sephadex to GE Healthcare, accessed on June 17, 2009.

Chunli, S. ; Zhenming, C.; Jing L. and Xianghong, W. (2010). β-Galactosidase production by the psychrotolerant yeast Guehomyces pullulans 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica and lactose hydrolysis. J. Bioprocess and Biosystems Engineering - BIOPROCESS BIOSYST ENG.,33(9) : 1025-1031

Desire, Y. ; Sebastien, L. and Lucien, P.(2007). Biochemical characterization of a strictly specific beta-galactosidase from the digestive juice of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* larvae. Cutomological Science. V.10:343-352.

Dubey, R. ; Kumar, J. ; Agrawala, D. and Pusp,P. (2011). Isolation, production, purification, assay and characterization of fibrinolytic enzymes (Nattokinase, Streptokinase and Urokinase) from bacterial sources. African Journal of Biotechnology. 10(8) : 1408-1420.

Dugdale, M.L. (2010). Importance of Arg-599 of b-galactosidase (E. coli) as an anchor for the open conformations of Phe-601 and the active-site loop. Biochem. Cell Biol. (88): 969–979.

Everette, D.; Bryant, M.; Green, M.; Abbey, A.; Wangila, W. and Walker, B. (2010).Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin−Ciocalteu Reagent. J. Agric. Food Chem. 58 (14): 8139-8150.

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

Garfine, E. (1990). Gel Electrophoresis of Protein. Chapter, 7, p: 197 – 268 . Oxford University press.
http://dx.doi.org/10.7554/eLife.03587.

Itahana K. ; Campisi J. and Dimri GP (2007). "Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay". Methods Mol. Biol. Methods in Molecular Biology 371: 21–31.

Javeri, S. and Uhlenbruck, G.(2004). Isolation of a β-Galactosidase from Chicken liver. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.,22:735-739.

Lowry, H. ; Rosobrough, N. and Randall, R. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. J. of Biological Chemistry. 193: 265 – 275.

Mahoney, R.R. (2003). β-galactosidase. Marcel Dekker,Inc., New York, USA.

McNichol J. A. (2012). Critical evaluation of various solvents systems used for the quantification of micro algal fatty acids with lyophilized samples has been reported. Lipids J (47):195-210.

Mozumder, N. ; Akhtaruzzaman, M. ; Bakr, M. and Zohra, F. (2012). Study on Isolation and Partial Purification of Lactase (β-Galactosidase) Enzyme from Lactobacillus Bacteria Isolated from Yogurt. J. Sci. Res. 4 (1): 239-249.

Munoz , R. and Barcelo, R. A. (1995) Enzymes in : Hand Book of Food Analysis (eds : Nollet, L. M. L.) 2 : 317 – 319. Marcel Dekker New York.

Myers, Rollie J. (2010). "One-Hundred Years of pH". Journal of Chemical Education 87: 30-35.

Naghavi, S. (2013). Partial Purification and Immobilization of Cellulase Enzymes from the Fungus Aspergillus Terreus Isolated from Rotten Wood. Journal of Life Sciences and Technologies Vol. 1 (1): 7-9.

Osborn, D. and Voogt, P. (1987). The analysis of nutrients in food science and technology academic press, London, New York, Sunfracisco.

Prasad, N. (2014). Enhanced β-galactosidase activity in probiotics for improved bioconversion of soy isoflavones in dairy and soy-based yoghurt. A thesis submitted for the degree of doctor, College of Health and Biomedicine Victoria University, Werribee Campus, Victoria, Australia.

Princely, S. ; Saleem, N. ; Basha , J. ; John, K. and Dhanaraju, D.,(2013). Biochemical characterization, partial purification, and production of an intracellular beta-galactosidase from Streptococcus thermophilus grown in whey. European Journal of Experimental Biology, 3(2) : 242-251.

Sawheney, S. K. and Singh Randhir. (2005) Introductory Practical Biochemistry. Naros a Publishing House. London.

Silvia, A. ; Coralie F. ; Matthieu B. and Audrey B.(2014). Cell cycle constraints on capsulation and bacteriophage susceptibility. Swiss National Science Foundation.

Turek, M. ; Vilimkova, L. ; Kremlackova,V. ; Paca, J. ; Halecky, M. ; Paca, J. and Stiborova, M.(2011). Isolation and partial characterization of extracellular NADPH-dependent phenol hydroxylase oxidizing phenol to catechol in Comamonas testosteroni. Neuro Endocrinol Lett. Vol.32(1) :137-45.

Whitaker , J. R. (2004) Lipoxygenase. In Oxidative Enzyme in foods, D. S., Robinson and N. A. Eskin (Ed) P. 175 Elserier Applied Sci. London.

Whitaker, J. R. (1972). Principles of enzymology for the food sciences. Mercel Dekker, inc. New York.

Williams, P. (2007). Nutritional composition of red meat. Nutrition & Dietetics, Vol. 64(Suppl 4): 113- 119.

Extraction and Purification of Beta – Galactosidase from Sheep Liver

Zahraa Adnan Jasim Prof.Dr. Ayad Nafi Yehea Prof.Dr. Sand Baker Mohammad

Summary

The study included the selection of the best methods to extract the enzyme among eight methods. It appeared that phosphate buffer (0.2 M, pH: 7) have given the highest activity of the crude enzyme (total activity = 78898.5 unit).

The protein content was concentrated and precipitated by ammonium sulfate (60) %, among other five methods of concentration (partial purification). The purification stages were achieved by using ion exchange column chromatography (DEAE – Sephadex A 100 column). Followed by gel filtration chromatography using Sephacryl S-300. This method extract pure enzyme at a yield of (41.48) %, (8.57) times of purification and specific activity of (3328.8) unit / mg. The purity of enzyme was certified by poly acryl amide gel electrophoresis under non denaturing condition. Enzyme molecular weight was (180) KD as estimated by gel filtration.

Key words: Extraction enzyme, Purification enzyme, Beta- Galactosidase, Lactase, Sheep liver.