تنقية وتوصيف أنزيم الأنيولينيز من الفطر *Aspergillus niger* المعزول محليا

علي عبد الكاظم ناجح هاشم كاظم

كلية العلوم- جامعة كربلاء

أم البشر حميد جابر

كلية الزراعة- جامعة البصرة

Ali.jasim@uokerbala.edu.iq.

الخلاصة

تم تنقية انزيم الانيولينيز من عزلة محلية من الفطر *Aspergillus niger* واشتملت خطوات التنقية على الترسيب بالكحول الاثيلي 70% فالتبادل الايوني بأستخدام المبادل DEAE-cellulose وأخيرا الترشيح الهلامي مرتين بأستخدام الهلام Sephadex-G-150واسفرت عملية التنقية عن الحصول على على صورتين لأنزيم الانيولينيز (W و A) وبلغ عدد مرات التنقية (6.8 و9.4) مرة والحصيلة الانزيمية (9 و13.5)% لكل من صورتي الأنزيم W و A ,على التوالي. اثبتت نتائج الترحيل الكهربائي ظهورحزمة واحدة لكل من صورتي الانزيم مما يؤكد نقاوتهما بشكل تام.

اما نتائج توصيف الانزيم فقد اوضحت ان الوزن الجزيئي لصورة الانزيم W قد بلغ 72.4 بينما بلغ 69.18 لصورة الانزيم A .وكان الرقم الهيدروجيني 4.5 هوالامثل لفعالية كلا صورتي الانزيم, كما كانت الصورة W ثابتة بمدى من الرقم الهيدروجيني (3.5- 7) بينما كانت الصورة A ثابتة بمدى رقم هيدروجيني (4.5- 9).

ابدت الصورة W ثباتا حراريا بمدى (20-45) م° في حين ابدت الصورة A ثباتا بمدى(20-50) م°. وبلغت قيم ثابت ميكالس(1.052 و0.909) ملي مولر والسرعة القصوى (2.86 و5) مايكرومول/ ملليتر/ دقيقة لصورتي الأنزيم W و A, على التوالي بأستخدام الانيولين كمادة تفاعل .

الكلمات المفتاحية: انزيم الانيولينيز ، المبادل DEAE-cellulose ، الترشيح الهلامي ، الثوابت الحركية ، الثبات الحراري للانزيم.

Abstract

Inulinase from *A. niger* local isolate was purified.The purification steps included precipitation with ethanol 70% ,Ion exchange chromatography with DEAE-cellulose and finaly ,gel filteration (two steps) using Sephadex G-150.

Two forms of inulinase (W and A) were obtained from the purification procedure used. Inulinase forms were purified with (6.8 and 9.4) fold and (9 and 13.5) % yield , respectively. Electrophoresis results confirmed the complete purity to the two enzyme forms since they gave a single band in polyacrylamide gel electrophoresis.

Enzyme characterization revealed that the molecular weight of the W and A forms were 72.4 and 69.18 ,respectively. The optimum pH activity was 4.5 for both enzyme forms . The W form was stable within the range (3.5-7.0) while the A form was stable within the pH (4.5- 9.0). The W form was stable with in temperature range (20-45) C° while the A form was stable within the range (20-50) C°. Km value were (1.052 and 0.909) mM and V max values were (2.86 and 5) µM/ml/min for both enzyme forms W and A , respectively .

Key words:- Inulinase, DEAE- cellulose, Gel filteration, Enzyme kinetics, Enzyme thermal stability.

المقدمة

يعد الانيولين بوليمر خطي لجزيئات الفركتوز المرتبطة فيما بينها بالرابطة β(2-1) والذي ينتهي بوحدة كلوكوز طرفية (Castaneda *et al.*,2012). وتختلف جزيئات الانيولين في درجة بلمرتها اذ تعتمد درجة البلمرة على المصدر النباتي والمناخ وظروف الزراعة ومدة الخزن بعد الحصاد (Chi *et al.*, 2011).

انزيم الانيولينيز احد انواع انزيمات التحلل المائي يعمل على تحلل الرابطة β(2-1) لسكر الانيولين مؤديا الى انتاج الفركتوز والكلوكوز والـ Inulo-oligosaccharides (Neagu and Bahrim,2011).

تقسم انزيمات الانيولينيز الى :انيولينيز داخلي (Endoinulinase, EC 3.2.1.7) وانيولينيز خارجي (Exoinulinase, EC 3.2.1.80) (Gong *et al.*,2008). يقوم الانيولينيز الداخلي بقطع الروابط الداخلية

للأنيولين منتجا Inulo-oligosaccharides , بينما يقوم الانيولينيز الخارجي بأزالة ثمالات الفركتوز الطرفية من النهاية غير المختزلة للأنيولين للحصول على الفركتوز والكلوكوز (Chi *et al.*,2009;Yuan *et al.*,2012).

تنتشر انزيمات الانيولينيز انتشارا واسعا في الطبيعة وتعد الفطريات الخيطية والخمائر والبكتريا اهم الكائنات الحية المنتجة لهذا الانزيم (Castaneda *et al.*,2012) .وقد استقطبت هذه الانزيمات اهتمام الباحثين في العقود الاخيرة نظرا لاستخداماتها الكبيرة في المجالات الصيدلانية والغذائية (Singh and *Gill*, 2006) .

ونظرا لاهمية انزيم الانيولينيز الكبيرة فقد هدفت هذه الدراسة الى تنقية انزيم الانيولينيز من عزلة محلية للفطر *Aspergillus niger* فضلا عن دراسة بعض صفاته المهمة .

المواد وطرائق العمل

- **العزلة الفطرية والوسط المستخدم وظروف انتاج الانزيم :-**

استخدمت عزلة فطرية محلية تم تشخيصها في دراسة سابقة هي *Aspergillus niger* 22 واستخدم الوسط الموصوف من قبل Al-Ghanimi *et al.* (2011) في انتاج الأنزيم اذ يتكون هذا الوسط من المستخلص الخام لمسحوق الكراث بنسبة 1.5% المدعم بـ 0.1% كبريتات المغنيسيوم برقم هيدروجيني ابتدائي 4.5 .

لقح الوسط اعلاه بعد تعقيمه بحجم لقاح 1.5 × 10^6 بوغ / مللتر من الوسط وتم تنمية الفطر في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 30 م° وسرعة رج 150 دورة / دقيقة لمدة 96 ساعة . وبعد انتهاء مدة الحضن رشحت النماذج للتخلص من المايسيليا في حين تم الاحتفاظ بالراشح لغرض اجراء عملية التنقية عليه.

- **تقدير فعالية انزيم الانيولينيز:-**

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل Singh *et al.*(2007) والمحورة من قبل Al-Ghanimi *et al.* (2011) في تقدير فعالية انزيم الانيولينيز , وذلك بمزج 0.1 مللتر من المستخلص الانزيمي مع 0.9 مللتر من محلول منظم خلات الصوديوم (0.1 مولر,pH4.8) الحاوي على 1% من مادة التفاعل (انيولين) وحضن المزيج في حمام مائي درجة حرارته 40 م° لمدة 15 دقيقة ثم اوقف التفاعل باضافة 1 مللتر من محلول DNSA 3,5 واستكمل تقدير السكريات المختزلة حسب طريقة Miller (1959).

- **تقدير البروتين:-**

قدرت كمية البروتين في الراشح الانزيمي بأتباع طريقة Bradford(1976) بأستخدام البومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin ,BSA) بروتينا قياسيا .

خطوات تنقية الانزيم

جرت جميع خطوات التنقية تحت ظروف مبردة (4 م°) بحسب الخطوات الآتية:-

1- الترسيب بالكحول الاثيلي 70% :-

تم ترسيب 500 مل من المستخلص الانزيمي الخام بأستخدام الكحول الاثيلي المبرد بنسبة ترسيب 70% اذ تم مزج المستخلص الأنزيمي مع الكحول الأثيلي بالتحريك البطئ بأستخدام جهاز المحرك المغناطيسي (Magnetic stirrer) لمدة نصف ساعة ثم نبذ المحلول بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 10000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة , اذ أذيب الراسب المتحصل عليه في محلول منظم الفوسفات (0.005 مولر, ورقم هيدروجيني 6.6).

2- التبادل الايوني بأستخدام المبادل DEAE-cellulos

اضيف المحلول الانزيمي الناتج من خطوة الترسيب بالايثانول 70% الى سطح عمود المبادل (1.8 × 18) سم وغسل العمود بمحلول منظم الفوسفات (0.005 مولر,ورقم هيدروجيني 6.6) لأنزال البروتينات غير المرتبطة بالمبادل وجمعت الاجزاء المفصولة من العمود وتم قياس الامتصاص للأجزاء المفصولة من العمود عند الطول الموجي 280 نانوميتر بوساطة جهاز المطياف الضوئي .سميت القمة البروتينية المتحصل عليها بالصورة W اذ اظهرت فعالية انزيمية حيث تم تركيزها لأستخدامها في خطوة التنقية اللاحقة .

استرد الانزيم من العمود بوساطة التدرج الخطي الملحي بأستخدام كلوريد الصوديوم (0.34 مولر). وتمت متابعة الامتصاص للقمم البروتينية في الاجزاء المستردة على طول موجي 280 نانوميتر .سميت القمم البروتينية الحاوية على فعالية لانزيم الانيولينيز A و A_1 .وركزت الصورة A في حين اهملت الصورة A_1.

3- الترشيح الهلامي بأستخدام الهلام Sephadex G-150:-

أجريت عملية الترشيح الهلامي لكلا صورتي الانزيمW و A (كلا على انفراد) اذ تم امرارهما على عمود من الهلام Sephadex G-150 (1.4×87) سم الذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات (0.2 مولر, 6.6 H).

تمت قراءة الامتصاص على 280 نانوميتر للأجزاء المفصولة .ركزت القمة البروتينية التي اعطت فعالية انزيمية ثم اعيدت لها عملية الترشيح الهلامي مرة ثانية على نفس الهلام .

تعيين نقاوة الانزيم

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Lammli (1970) في تعيين نقاوة انزيم الانيولينيز بوساطة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بغياب المواد الماسخة والموصوفة من قبل Garfin(1990).

توصيف انزيم الانيولينيز

1- تقدير الوزن الجزيئي لصورتي انزيم الانيولينيز W و A بطريقة الترشيح الهلامي :-

استخدم عمود الهلام Sephadex G-150 (1.4×87) سم في تقدير الوزن الجزيئي لصورتي الانزيم اعتمادا على استخدام البروتينات القياسية RNase و Ovalbumin و Bovine Serum Albumin و Glucose Oxidase والتي تبلغ اوزانها الجزيئية (13 و45 و67 و160) كيلو دالتن , على التوالي .

2- تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم :-

حضرت محاليل منظمة مختلفة بتركيز (0.1 مولر) ليتم استخدامها بمدى رقم هيدروجيني من (2-7) وذلك لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الأنزيم لكلتا صورتيه .

3- تحديد مدى الرقم الهيدروجيني لثبات الانزيم :-

حضرت محاليل منظمة مختلفة من الخلات والفوسفات والترس بتركيز (0.1 مولر) ليتم استخدامها بمدى رقم هيدروجيني من (2-10.5) وذلك لتحديد مدى الرقم الهيدروجيني لثبات كلا صورتي الأنزيم.

4- الثبات الحراري للأنزيم:-

قدر الثبات الحراري لصورتي الأنزيم W و A بدرجات حرارية مختلفة من (20-90) م° في حمام مائي لمدة 30 دقيقة .

5- تقدير الثوابت الحركية للأنزيم :-

قدرت قيم ثابت ميكالس Km والسرعة القصوى Vmax بوساطة المنحني المقلوب لتركيز مادة التفاعل (الانيولين) مقابل السرعة الأولية تبعا لمعادلة Lineweaver and Buck (1934) .

النتائج والمناقشة

تنقية انزيم الانيولينيز

1- تركيز الانزيم الخام

تهدف عملية تركيز الانزيمات عندما تتم في المراحل الاولى من التنقية الى التخلص من اكبر كمية ممكنة من الماء للحصول على محاليل بروتينية اكثر تركيزا فضلا عن تحقيق درجة من النقاوة عبر التخلص من البروتينات غير الانزيمية (Reed,1975).

استخدم الكحول الاثيلي المبرد بنسبة ترسيب 70% (حجم / حجم) في الخطوة الاولى لتنقية انزيم الانيولينيز قيد الدراسة . ويبين الجدول (1) انه قد تم تركيز حجم المستخلص الانزيمي الخام من 500 مللتر الى 18 مللتر, ومن جراء هذا الترسيب فقد ارتفعت الفعالية النوعية للأنزيم من 20.494 وحدة/ملغم بروتين الى 51.433 وحدة/ملغم بروتين الامر الذي ادى الى ارتفاع عدد مرات التنقية لتصبح 2.509 مرة اما الحصيلة الانزيمية فكانت 74.73% .ساعدت خطوة الترسيب أعلاه في تحقيق نقاوة جيدة للأنزيم فضلا عن تهيئة المستخلص الانزيمي لخطوة التنقية اللاحقة .

تعد الحصيلة الانزيمية للأنزيم قيد الدراسة في هذه الخطوة اعلى مقارنة بما حصل عليه Nakamura *et al*. (2001) الذي قام بأستخدام الكحول الاثيلي بتركيز (60-75)% في تنقية انزيم الانيولينيز الداخلي p111 من الفطر *A. niger* strain 12 بحصيلة انزيمية قدرها 33.9%.

يحدث الترسيب بأستخدام المذيبات العضوية بسبب خفض ثابت العزل الكهربائي (Dielectric constant) مما يؤدي الى زيادة التجاذب بين الجزيئات وبالتالي تكتلها ثم ترسيبها (Whitaker,1972).

2- كروماتوغرافيا التبادل الايوني :-

يعد المبادل DEAE-cellulose ملائما لفصل البروتينات ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة فضلا عن الاحتمالات القليلة لمسخ البروتين (Jonson and Ryden, 1998).

تمخض عن عملية التبادل الايوني ظهور قمة بروتينية واحدة في مرحلة الغسل تركزت في الاجزاء المنفصلة 7-18 كما في الشكل (1) فضلا عن ظهور عدة قمم في مرحلة الاسترداد (الشكل 2) وبتقدير الفعالية الانزيمية في القمم المذكورة لوحظ وجود فعالية انزيمية لانزيم الانيولينيز في القمة البروتينية الواقعة في الاجزاء 7-18 في مرحلة الغسل (الشكل 1) اضافة الى قمتين بروتينيتين واقعتين في الاجزاء 26-67 و104 -116 في مرحلة الاسترداد (الشكل 2) لذا فقد تم تقدير الفعالية الانزيمية في الاجزاء التابعة للقمم الحاوية على فعالية انزيم الانيولينيز , كما جمعت الانابيب من 30- 60 الخاصة بالقمة الاولى والانابيب (104-116) الخاصة بالقمة الثانية (كلا على انفراد) بمزجها وحساب حجمها وتقدير الفعالية الانزيمية والبروتين لاستخراج الفعالية النوعية (الجدول 1) .

يتضح من النتائج وجود ثلاث صور انزيمية لانزيم الانيولينيز المنتج من الفطر *A. niger* 22 . ان تعدد الصور الانزيمية لهذا الانزيم شائع عند تنقيته من الاحياء المجهرية فقد اشار Pessoni *et al*. (1999) الى ظهور صورتين لانزيم الانيولينيز المنقى من الفطر *Penicillium janczewskii* في خطوة التبادل الايوني. في حين تم فصل ثلاث صور لانزيم الانيولينيز الخارجي المنقى من الفطر *Penicillium sp*. Strain 1 (Nakamura and Nakatsu,1977).

ادى فصل الصورة W (صورة الغسل) لانزيم الانيولينيز قيد الدراسة إلى الحصول على نقاوة جيدة للانزيم بعدد مرات تنقية 2.137 وحصيلة انزيمية 11.75% (الجدول1) . كما يلاحظ من الجدول نفسه ان فصل الصورتين A و A1 (صورتي الاسترداد) ادى الى الحصول على نقاوة جيدة للانزيم بعدد مرات تنقية 8.97 و 1.01 مرة وحصيلة انزيمية مقدارها (40.6 و 3.01)% للصورتين A و A1 , على التوالي . ونظرا لانخفاض الحصيلة الانزيمية المستحصلة من صورة الاسترداد A1 لذا قد تم استبعادها من الدراسة واكملت خطوات التنقية للصورتين W و A لانزيم الانيولينيز قيد الدراسة فقط .

استخدمت كروماتوغافيا التبادل الايوني بأستخدام المبادل DEAE-cellulose في العديد من دراسات تنقية انزيم الانيولينيز من الفطريات فقد استخدم Ertan *et al.*(2005) المبادل المذكور في تنقية انزيم الانيولينيز من الفطر *Rhizoctonia solani* وكان عدد مرات التنقية المستحصلة من هذه الخطوة 5.21 مرة بحصيلة انزيمية 17.93% .

3- الترشيح الهلامي:-

اعقبت خطوة التبادل الايوني خطوتي ترشيح هلامي لفصل صورتي انزيم الانيولينيز (W و A) بأستخدام الهلام Sephadex G-150 . اختير هذا الهلام لان حدود الفصل فيه للبروتينات تتراوح بين (5-300) كيلو دالتن وهو المدى الذي يغطي الاوزان الجزيئية لانزيمات الانيولينيز المنقاة من عزلات مختلفة للفطر *A. niger* اذ اشار Singh and Gill (2006) الى ان الاوزان الجزيئية لانزيمات الانيولينيز المنقاة من الفطر *A. niger* تتراوح بين (28-300) كيلو دالتن.

يوضح الشكل (3) الترشيح الهلامي الاول للانزيم (الصورة W) اذ تم فصل ثلاث قمم بروتينية , وبتقدير الفعالية الانزيمية اظهرت القمة الثانية منها فعالية في الاجزاء (12-23) . وبعد جمع تلك الاجزاء بلغ حجمها 31.3 مللتر وبتقدير فعاليتها الانزيمية فضلا عن البروتين امكن الحصول على فعالية نوعية 89.09 وحدة/ ملغم بروتين . ويبين الجدول (1) ان خطوة الترشيح الهلامي الاولى للصورة W حققت عدد مرات تنقية مقدارها 4.35 مرة وحصيلة انزيمية 11.08%.

ركزت الصورة W بعد الترشيح الهلامي الاول الى 4 مللتر واجريت لها عملية الترشيح الهلامي الثاني تحت الظروف ذاتها ويلاحظ من الشكل (4) ظهور قمة بروتينية واحدة تركزت الفعالية الانزيمية في نفس القمة ايضا مع تطابق القمتين في الجزء 17 ويعد هذا التطابق احد ادلة النقاوة للأنزيم (Whitaker,1972) والتي سيتم تعزيزها عند الكلام عن نتائج الترحيل الكهربائي فيما بعد . ومن الجدول (1) يتبين ان الفعالية النوعية للصورة W بعد الترشيح الهلامي الثاني اصبحت 139.41 وحدة/ ملغم بروتين وعدد مرات التنقية 6.8 مرة والحصيلة الانزيمية 9.0%.

اما نتائج الترشيح الهلامي الاول للأنزيم (الصورة A) فمن الشكل (5) يلاحظ ظهور ثلاث قمم بروتينية اما الفعالية الانزيمية فقد تركزت في قمة واحدة للأجزاء 11-24 , وبعد جمع هذه الاجزاء ومزجها وتقدير فعاليتها الانزيمية والبروتين بلغت فعاليتها النوعية 189.06 وحدة/ ملغم بروتين , ويبين الجدول (1) ان خطوة الترشيح المذكورة حققت نقاوة جيدة لصورة الانزيم A اذ بلغ عدد مرات التنقية 9.225 بحصيلة انزيمية 20.41% .

ثم ركزت هذه الاجزاء واجري لها ترشيحا هلاميا ثانيا بنفس ظروف الترشيح الهلامي الاول . يبين الشكل (6) ظهور قمتين منفصتين للبروتين , الاولى في الاجزاء 13-20 والثانية في الاجزاء 27-32 , اما الفعالية الانزيمية فقد ظهرت في القمة الاولى فقط وتركزت في الاجزاء 13-22 وقد تطابقت تماما مع قمة البروتين في الجزء 17 وان هذا التطابق دليل وصول الصورة الانزيمية A الى درجة عالية من النقاوة , وبعد جمع الاجزاء ذات

الفعالية الانزيمية بلغت فعاليتها النوعية 192.63 وحدة/ ملغم بروتين كما يتبين من الجدول (1) ان عدد مرات التنقية المستحصلة من هذه الخطوة 9.4 مرة بحصيلة انزيمية 13.5% .

ورد استخدام هلام السيفادكس Sephadex G-150 في العديد من الدراسات المتعلقة بتنقية انزيم الانيولينيز من الاحياء المجهرية , فقد استخدم هذا الهلام من قبل Kochhar *et al.*(1997) لتنقية الانزيم من الفطر *Aspergillus versicolor* وكان عدد مرات التنقية المستحصل عليها 50 مرة . كما تم اسستخدامه في تنقية الانزيم من الفطر *Penicillium palitans* T-1 والفطر *Penicillium cyclopium* T-18 وكانت الحصيلة الانزيمية (16 و10)% للانزيمين المنتجين من الفطرين , على التوالي (Balayan *et al.*,1996).

أختبار نقاوة الانزيم

استخدم الترحيل الكهربائي لانزيم الانيولينيز المنقى من الفطر *A. niger* 22 للتأكد من نقاوة صورتي الانزيم W و A .

يوضح الشكل (7) نتائج الترحيل الكهربائي المذكور اذ يلاحظ ظهور حزمة بروتين واحدة في الهلام ولصورتي الانزيم كلتيهما , وتعد هذه النتيجة دليلا على نقاوة الانزيم وتعزز النتائج المستحصل عليها من خطوة الترشيح الهلامي الثاني والمتمثلة بظهور قمة فعالية انزيمية متطابقة مع قمة البروتين , وهذا دليل ايضا على ان الخطوات والظروف التي تم استخدامها في تنقية الانزيم كانت كفؤة بالقدر الذي تم فيه الحصول على حزمة بروتينية واحدة لصورتي انزيم الانيولينيز في اختبار تحديد النقاوة .

توصيف انزيم الانيولينيز المنقى من الفطر *A. niger* 22 :-

1- تقدير الوزن الجزيئي للأنزيم :

اتبعت طريقة الترشيح الهلامي بأستخدام عمود Sephadex G-150 في تقدير الوزن الجزيئي لصورتي انزيم الانيولينيز الداخلي قيد الدراسة . ويتضح من الشكل (8) ان الوزن الجزيئي لصورتي انزيم الانيولينيز (W و A) قد بلغ (72.4 و 69.18) كيلو دالتن , على التوالي.

تتفق النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة مع ماوجده Nakamura *et al.*(1994) اذ بلغ الوزن الجزيئي لانزيم الانيولينيز الداخلي (Endo-inulinase) المنقى من الفطر *A. niger* strain 817 (64 و 68.1) كيلو دالتن, على التوالي .

2- الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم الانيولينيز:

اظهرت النتائج المبينة في الشكلين (9 و10) ان الرقم الهيدروجيني 4.5 هو الامثل لفعالية الانزيم . ويمكن ان يؤثر الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في ارتباط مادة التفاعل بلانزيم والحالة الايونية لثمالات الاحماض الامينية التي تشترك في الفعل الحفزي للانزيم وتأين مادة التفاعل , فضلا عن تأثيره في قابلية الانزيم على تحويل معقد الانزيم- مادة التفاعل الى ناتج (Fullbrook,1983;Chesworth *et al.*,1998).

وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما اشير اليه في العديد من الدراسات فقد كان الرقمان الهيدروجينيان 4.3 و4.5 هما الامثلان لفعالية الانزيم المنقى من الفطرين *A. niger* و *A. awamorii* على التوالي (Derycke and Vandamme,1984) و(Arand *et al.*,2002) ,على التوالي ايضا .

3- مدى الرقم الهيدروجيني لثبات انزيم الانيولينيز :

درس الرقم الهيدروجيني لثبات انزيم الانيولينيز المنقى من الفطر *A. niger* 22 الذي يعد من الصفات المهمة في تحديد ظروف التنقية وخزن الانزيم ويتضح من الشكل (11) ان مدى الرقم الهيدروجيني لثبات انزيم الانيولينيز (الصورة W) يتراوح بين 3.5-7 كما يلاحظ ان الصورة المذكورة احتفظت بـ 95% من فعاليتها عند

الحضن لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37م° في الرقم الهيدروجيني 7.5 وانخفضت الفعالية الى 81% عند الرقم الهيدروجيني 8 . وكانت الفعالية الانزيمية منخفضة في الارقام الهيدروجينة الحامضية والقاعدية المتطرفة , اذ احتفظت صورة الانزيم أعلاه بـ (25 و68)% فقط من فعاليتها عند رقم هيدروجيني 2 و9 ,على التوالي .

اما الصورة A من الانزيم فيلاحظ من الشكل (12) ان الرقم الهيدروجيني لثباتها يقع بمدى 4.5–9 وهذا يدل على انها اكثر ثباتا من الصورة W اذ احتفظت الصورة A للانزيم بـ (72 و74)% من فعاليتها عند الارقام الهيدروجينية 2.5 و10.5 , على التوالي .

قد يعود السبب في انخفاض الفعالية الانزيمية عند الارقام الهيدروجينية الحامضية والقاعدية الى تغيرات في التركيب الثانوي والثالثي لجزيئة الانزيم (الدنترة) علاوة على تغيير الحالة الايونية للموقع الفعال ومادة التفاعل (Lehmacher and Bisswanger,1990), ولكون مصدر الانزيم والطبيعة الكيمياوية للمحلول المنظم يعدان من العوامل المهمة التي تؤثر في تحديد الرقم الهيدروجيني لثبات الانزيم (Segel,1976) فقد تباينت الدراسات في تحديد الرقم الهيدروجيني لثبات الانزيم .

4- الثبات الحراري للانزيم :

اظهرت نتائج حضن انزيم الانيولينيز المنقى من العزلة المحلية للفطر *A. niger* 22 بدرجات حرارة تراوحت بين (20–90) م° ولمدة 30 دقيقة ان الصورة W للانزيم قد احتفظت بكامل فعاليتها بدرجات حرارة تراوحت بين (20–45) م° (الشكل 13), انخفضت بعدها الفعالية الانزيمية تدريجيا, اذ فقدت الصورة المذكورة 19% من فعاليتها بدرجة حرارة 55 م° و 52.5% بدرجة حرارة 60 م° , وفقدت فعاليتها تماما بدرجة حرارة 75 م° .

اما الشكل (14) فيبين ان الصورة A للانزيم قد احتفظت بكامل فعاليتها الانزيمية في درجات حرارة تراوحت بين (20–50) م° وفقدت 17% من فعاليتها بدرجة حرارة 55 م° و75% بدرجة حرارة 60 م° وفقدت فعاليتها تماما بدرجة حرارة 75 م° .

ويمكن ان يعزى الانخفاض في فعالية انزيم الانيولينيز المنقى من هذه الدراسة للصورتين W و A عند درجات حرارة اعلى من 45 م° الى تأثير الحرارة في تركيب جزيئة الانزيم ومن ثم مسخه (Meng *et al.*,1993) اذ يمكن ان تؤثر الحرارة على جزيئة البروتين عن طريق تكسير الاواصر المثبتة للمستويات الثانوية والثلاثية لتركيب البروتين مما يؤدي الى مسخه (Chesworth *et al.*,1998).

وقد تباينت الدراسات في تحديد الثبات الحراري لانزيم الانيولينيز وذلك حسب مصدر الانزيم فقد وجد Nakamura *et al.*(2001) ان صورتي انزيم الانيولينيز p11 و p111 من الفطر *A. niger* 22 يحتفظان بكامل فعاليتهما عند الحضن لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة (50 و60) م° , على التوالي ,بيد انهما تفقدان فعاليتهما تماما عند درجتي حرارة (70 و80) م° ,على التوالي ايضا.

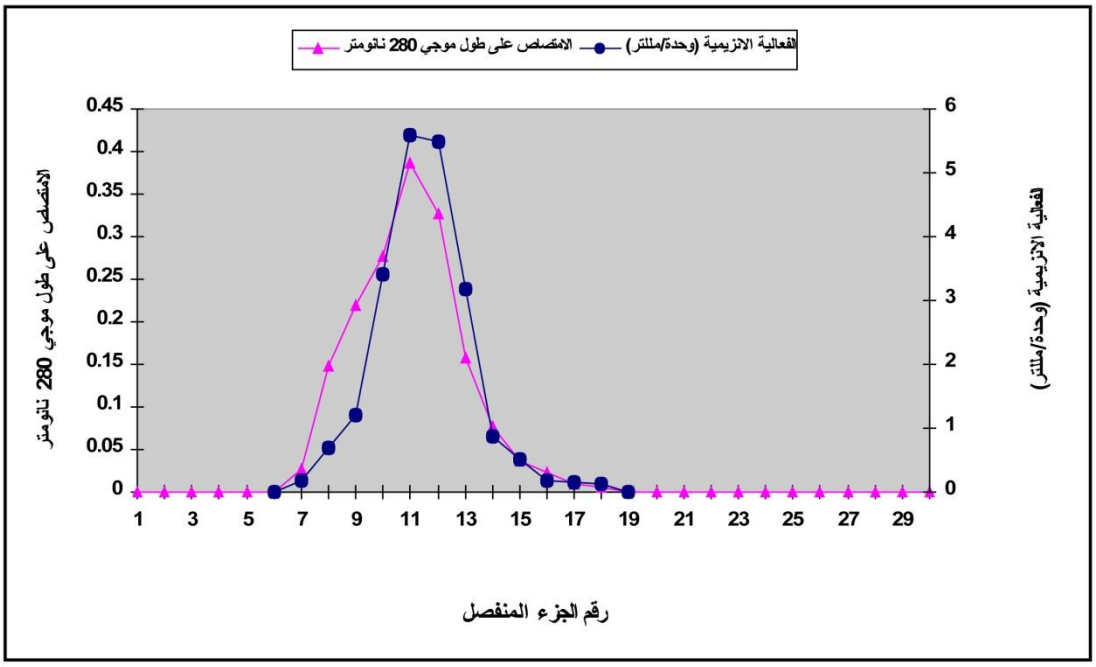
5- الثوابت الحركية لانزيم الانيولينيز:

اظهرت النتائج المبينة في الشكل (15) ان قيمة ثابت ميكالس للانزيم الصورة W كانت 1.052 ملي مولر والسرعة القصوى 2.86 ميكرومول/مللتر/ دقيقة , اما قيمة ثابت ميكالس للانزيم الصورة A فكانت 0.909 ملي مولر والسرعة القصوى 5 ميكرومول/مللتر/ دقيقة (الشكل 16).

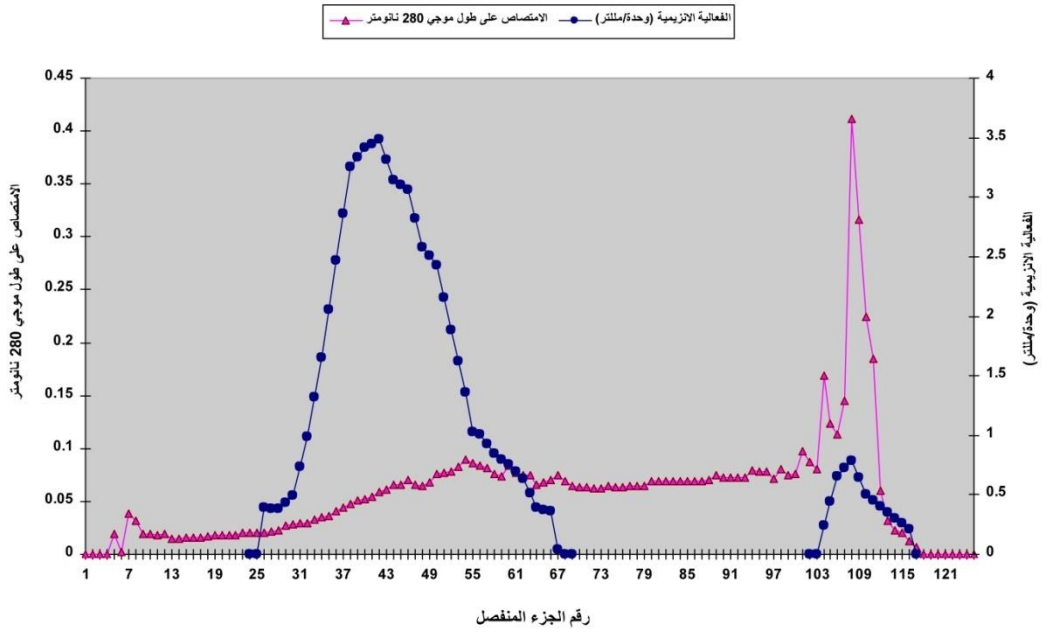
يعد ثابت ميكالس (Km) من اهم الثوابت المميزة للانزيم كونه يعبر عن عدد من خواصه ولاسيما درجة الفته لمادة التفاعل و يختلف هذا الثابت باختلاف مصدر الانزيم و مادة التفاعل (Segel,1976) اذ تعد قيمة ثابت ميكالس مؤشرا لمدى الفة الانزيم تجاه مادة التفاعل فكلما كانت قيمته واطئة كلما كانت الفة الانزيم عالية للأرتباط بمادة التفاعل (Whitaker,1972) . في دراسة قام بها Ohta *et al.*(2004) لتوصيف انزيم الانيولينيز من الفطريات وجد ان قيمة ثابت ميكالس للأنيولينيز الداخلي تتراوح بين (0.2–8.1) ملي مولر , في حين كانت تتراوح بين (0.003–15) ملي مولر للأنيولينيز الخارجي , وذلك بأستخدام الانيولين كمادة تفاعل .

الجدول (1): خطوات تنقية إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger* 22

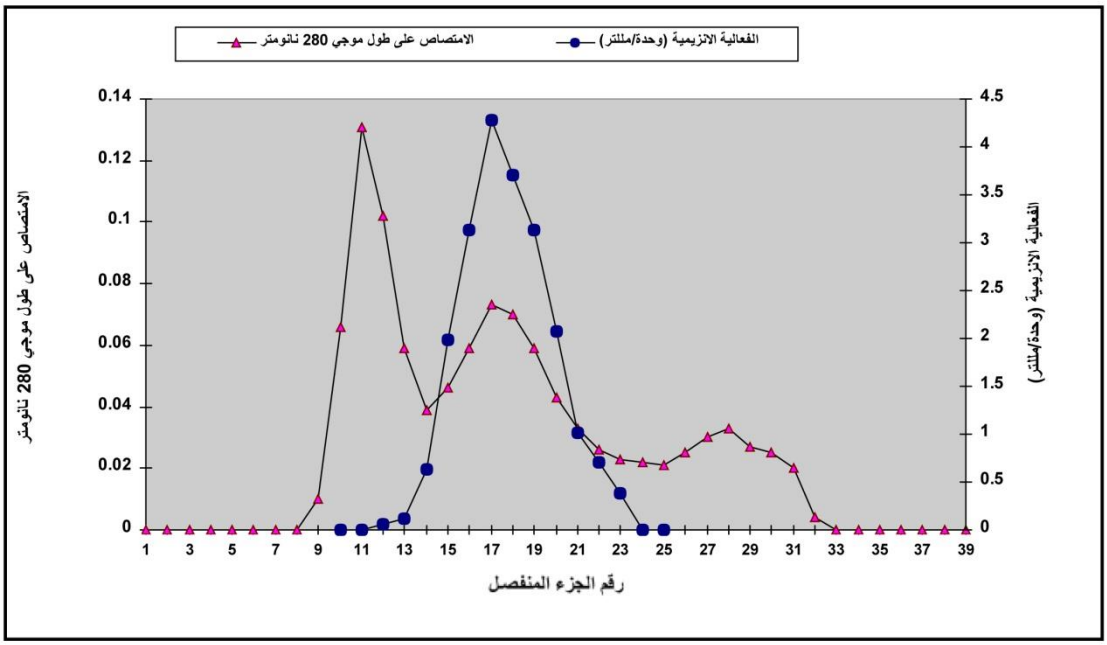
خطوة التنقية	الحجم (مللتر)	الفعالية (وحدة/مللتر)	تركيز البروتين (ملغم/مللتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
المستخلص الإنزيمي الخام	500	1.66	0.081	20.494	830.0	1	100
الترسيب بالكحول الاثيلي 70%	18	34.46	0.67	51.433	620.28	2.509	74.73
التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE –Cellulose							
الغسل الصورة (W)	53	1.84	0.042	43.809	97.52	2.137	11.75
الاسترداد							55.36
الصورة (A)	141	2.39	0.013	183.85	337.0	8.97	40.60
الصورة (A1)	71	0.352	0.017	20.705	24.99	1.01	3.01
الترشيح الهلامي الأول باستخدام الهلام Sephadex G-150							
الصورة (W)	31.3	2.94	0.033	89.09	92.022	4.35	11.08
الصورة (A)	28.0	6.05	0.032	189.06	169.4	9.225	20.41
							31.49
الترشيح الهلامي الثاني باستخدام الهلام Sephadex G-150							
الصورة (W)	31.5	2.37	0.017	139.41	74.655	6.8	9.00
الصورة (A)	30.6	3.66	0.019	192.63	112.0	9.4	13.5
							22.5



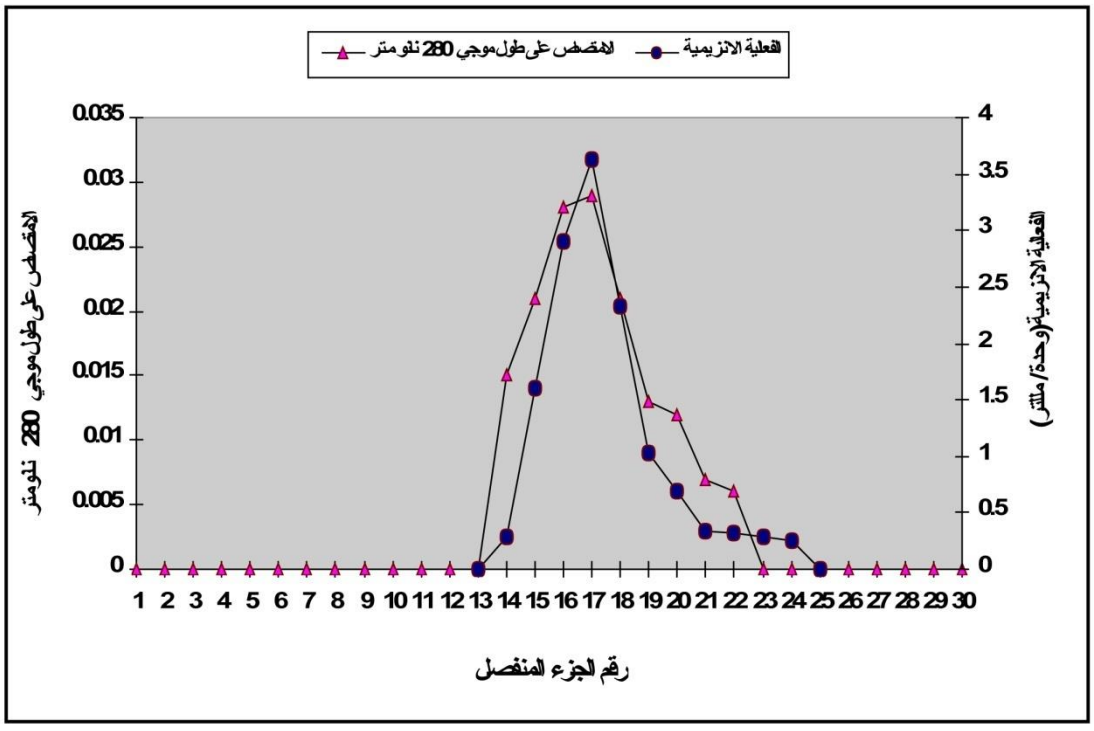
الشكل (1): كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتنقيه إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger* 22 باستخدام عمود DEAE-Cellulose (1.8× 18) سم الدي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات 0.005 مولاري ورقم هيدروجيني 6.6 بسرعه جريان 60 مللتر/ساعه وبواقع 5مللتر/جزء (خطوة الغسل).



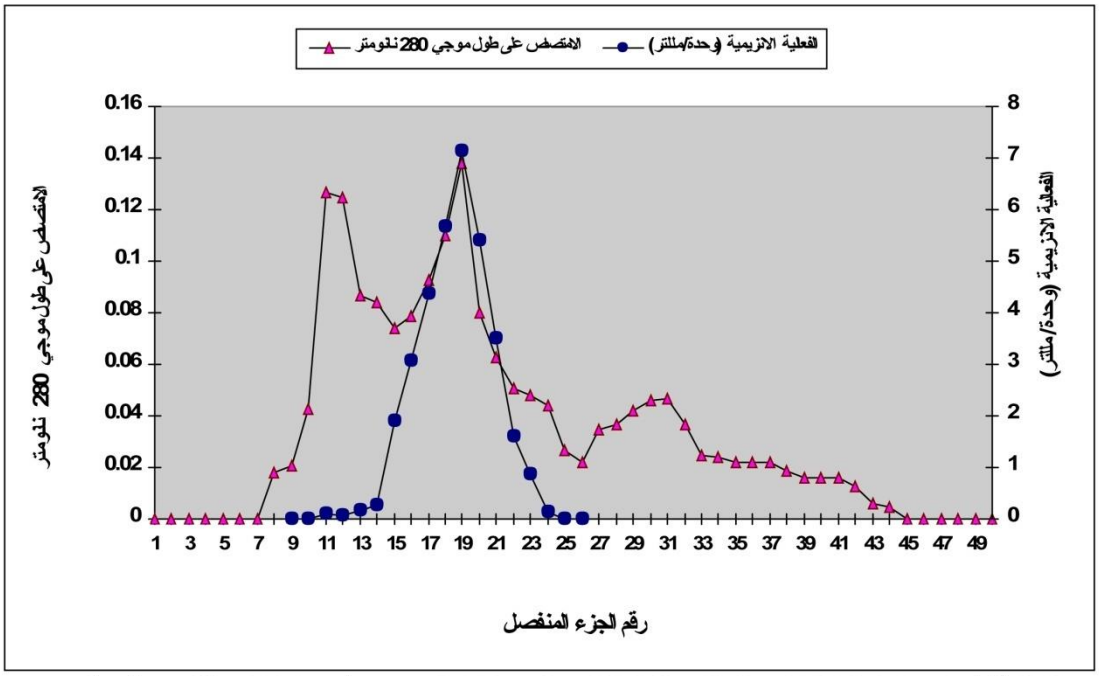
الشكل (2) : كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger*22 باستخدام عمود DEAE-Cellulose (1.8 × 18) سم الذي تمت موازنتة بمحلول منظم الفوسفات 0.005 مولاري ورقم هيدروجيني 6.6 تم الاسترداد بمحلول تدرج ملحي من كلوريد الصوديوم 0.34 مولاري بسرعة جريان 60 مللتر/ساعة بواقع 5 مللتر/جزء



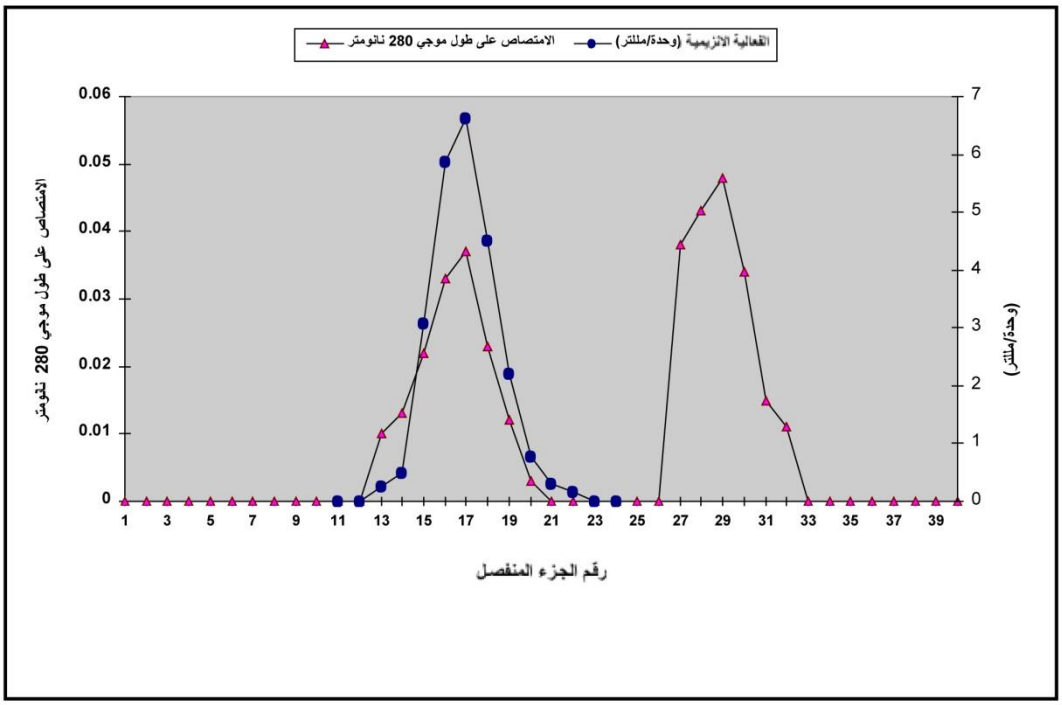
الشكل(3): كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي الاول لإنزيم الانيولينيز الصـــوره:W مـــن الفطـــر22 *A. niger* باستخدام عمود السيفادكس Sephadex G-150 بابعاد (1.4 × 87) سم والدي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات0. 2 مولاري برقم هيدروجيني 6.6 بسرعه جريان 20 مللتر/ساعه وبواقع 3 مللتر/جزء



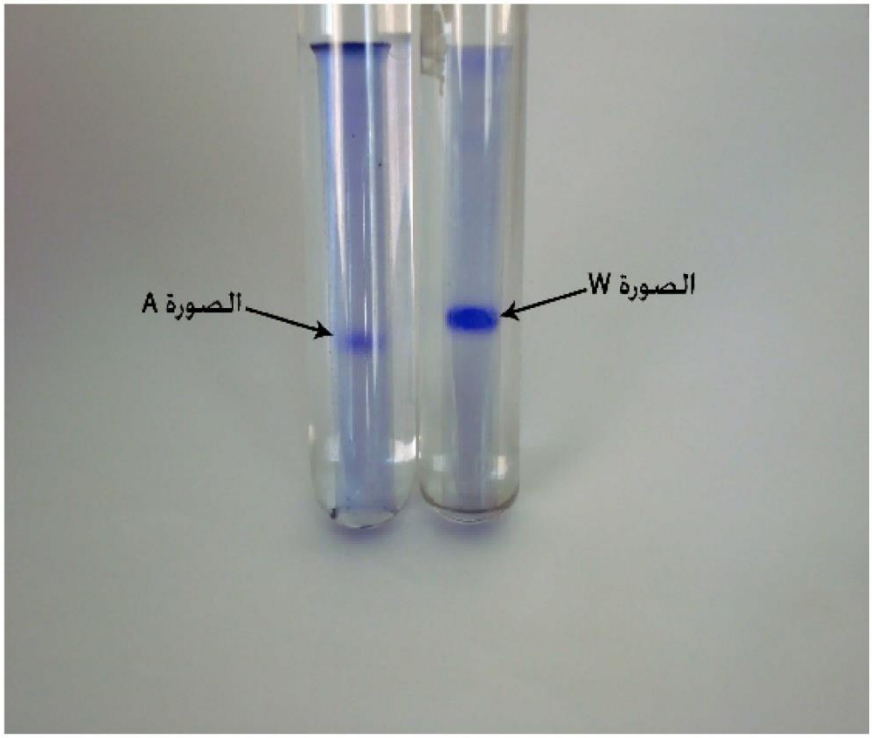
الشكل(4): كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي الثاني لإنزيم الانيولينيز الصورة:W من الفطر22 *A. niger* باستخدام عمود السيفادكس Sephadex G-150 بابعاد (1.4 × 87) سم والدي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات0. 2 مولاري برقم هيدروجيني 6.6 بسرعة جريان 20 مللتر/ ساعة وبواقع 3 مللتر/ جزء



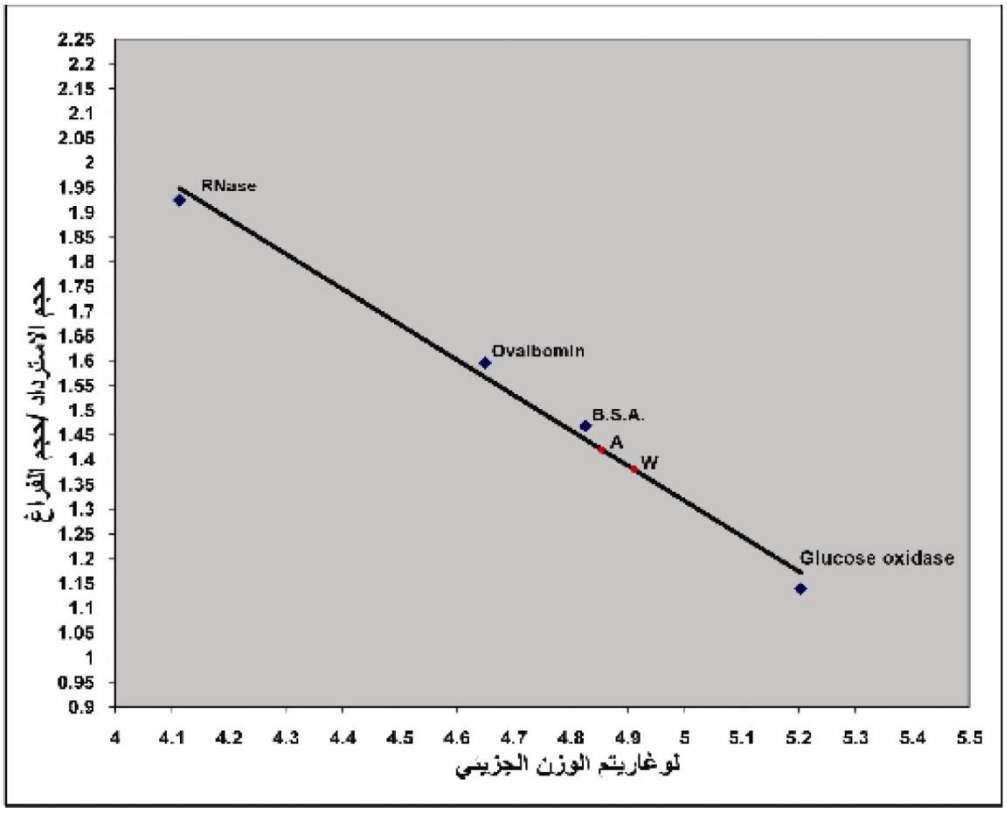
الشكل(5): كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي الاول لإنزيم الانيولينيز الصوره:A من الفطر *A. niger* 22 باستخدام عمود السيفادكس Sephadex G-150 بإبعاد (1.4 × 87) سم والذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات 0.2 مولر برقم هيدروجيني 6.6 بسرعه جريان 20 مللتر/ساعه وبواقع 3 مللتر/جزء .



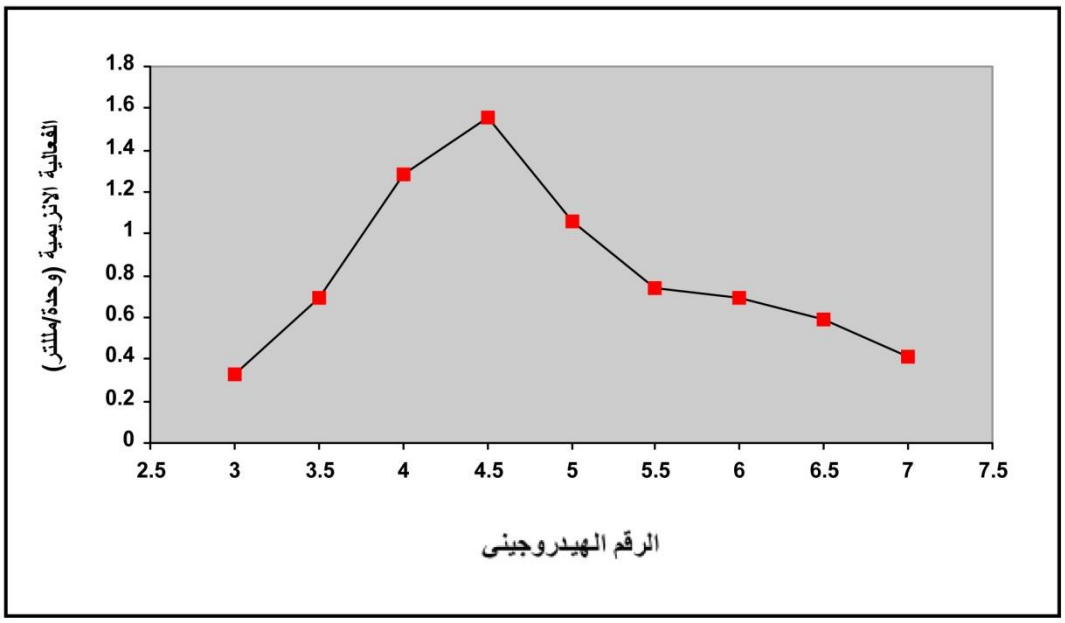
الشكل(6): كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي الثاني لإنزيم الانيولينيز الصوره:A من الفطر *A. niger* 22 باستخدام عمود السيفادكس Sephadex G-150 بإبعاد (1.4 × 87) سم والذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات 0.2 مولاري برقم هيدروجيني 6.6 بسرعه جريان 20 مللتر/ساعه وبواقع 3 مللتر/جزء .



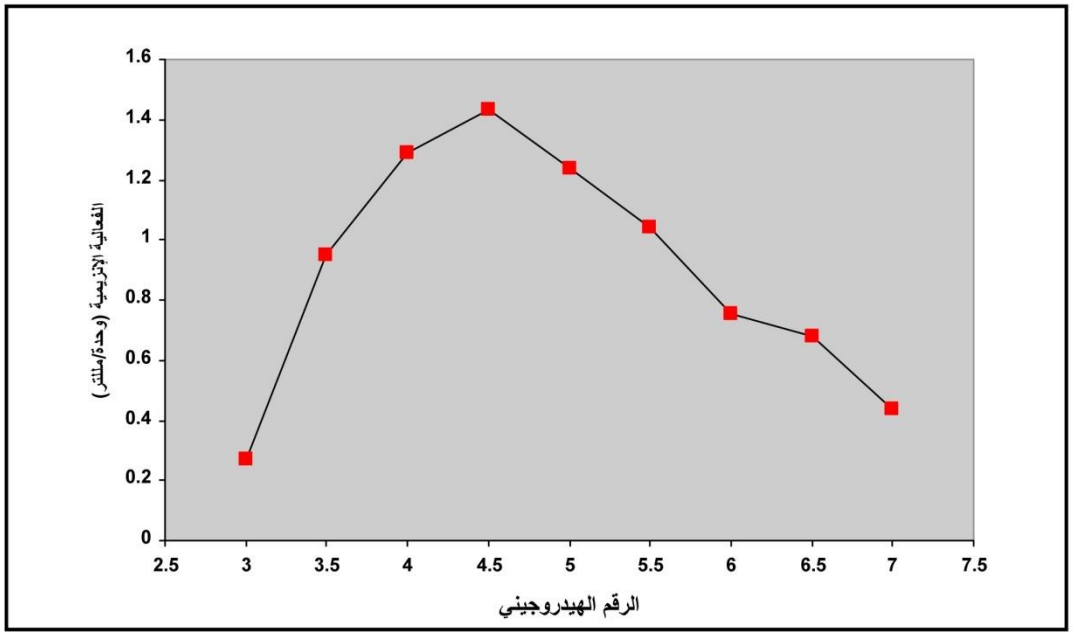
الشكل (7) :الترحيل الكهربائي لصورتي إنزيم الانيولينيز W و A المنقاه من الفطر *A. niger* 22



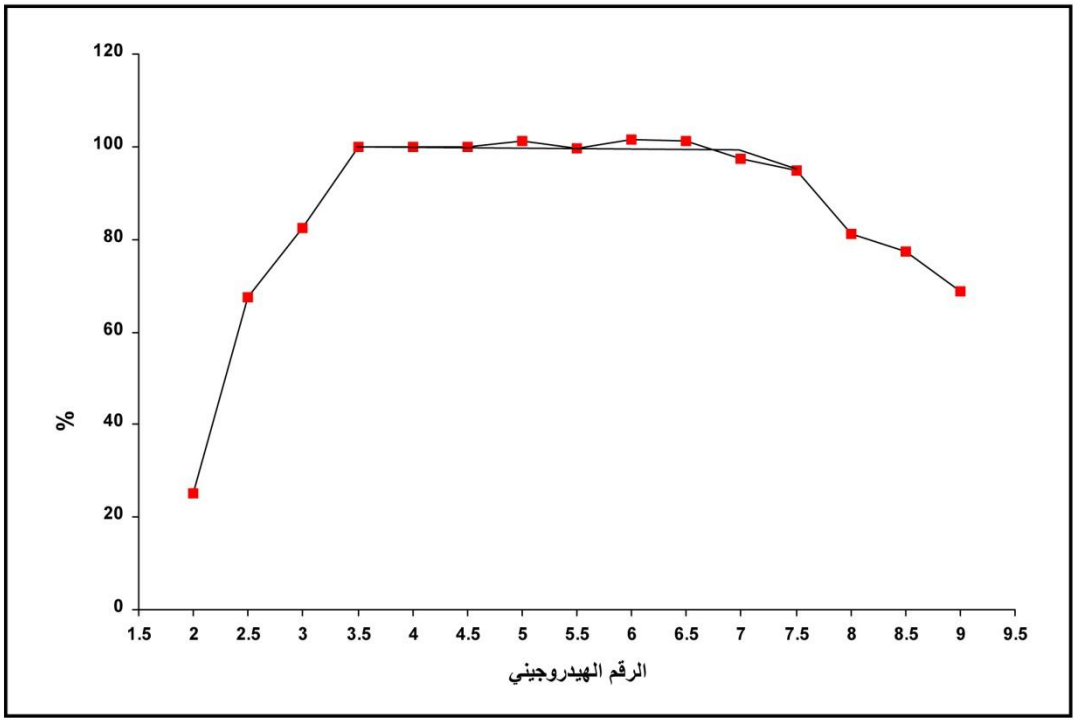
الشكل (8) :تقدير الوزن الجزيئي بطريقة الترشيح الهلامي لصورتي إنزيم الانيولينيز W و A المنقاة من الفطر *A. niger* 22



الشكل (9): منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليه إنزيم الانيولينيز الصورة : W المنفى من الفطر22 *A. niger*

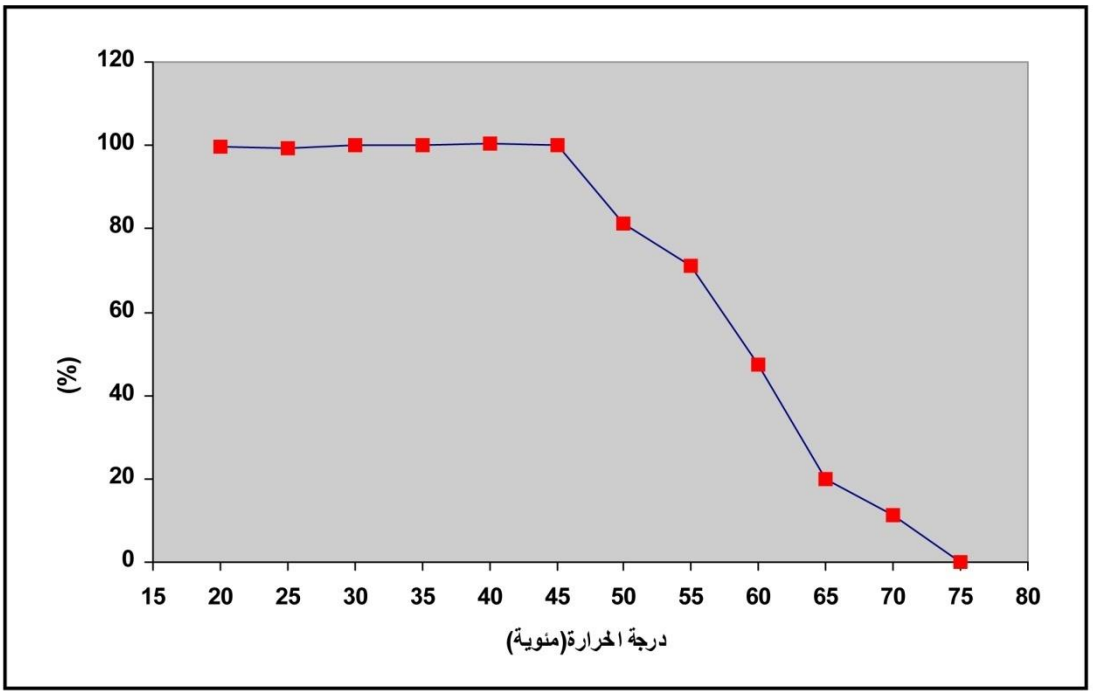


الشكل (10): منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليه إنزيم الانيولينيز الصورة:A المنفى من الفطر *A. niger* 22

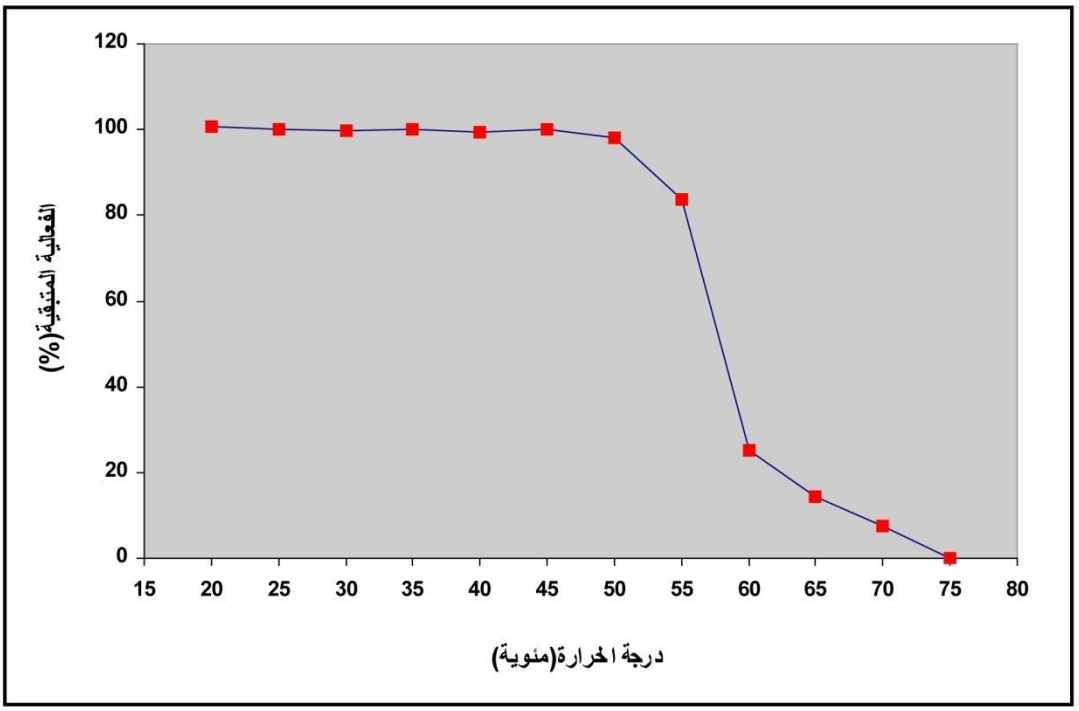


الشكل (11): منحنى الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم الانيولينيز الصوره:W المنقى من الفطر *A. niger* 22

الشكل (12) : منحنى الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم الانيولينيز الصورة: A المنقى من الفطر *A. niger* 22

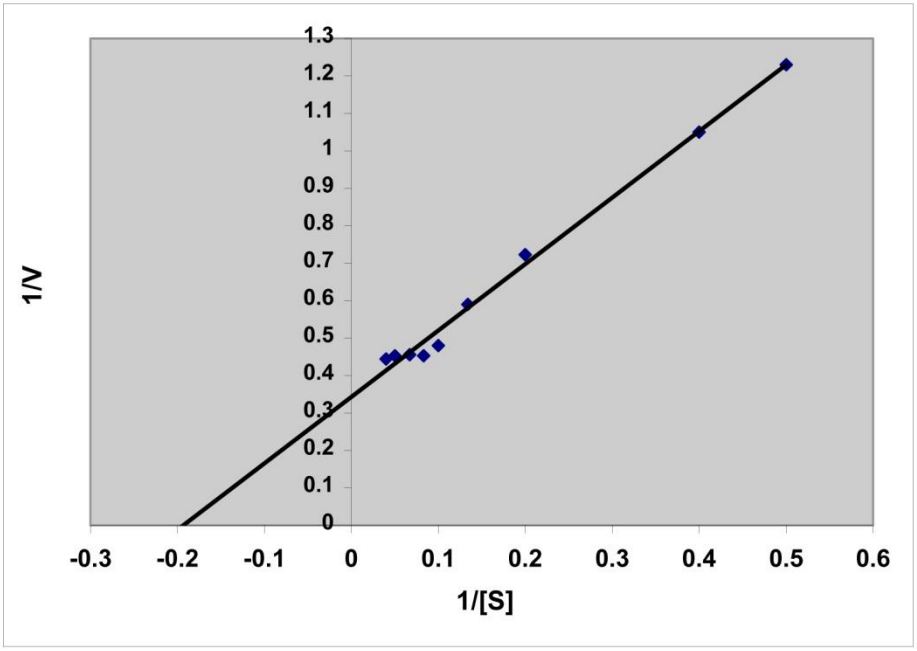


الشكل (13): منحنى الثبات الحراري لإنزيم الانيولينيز الصوره :W المنقى من الفطر *A. niger* 22

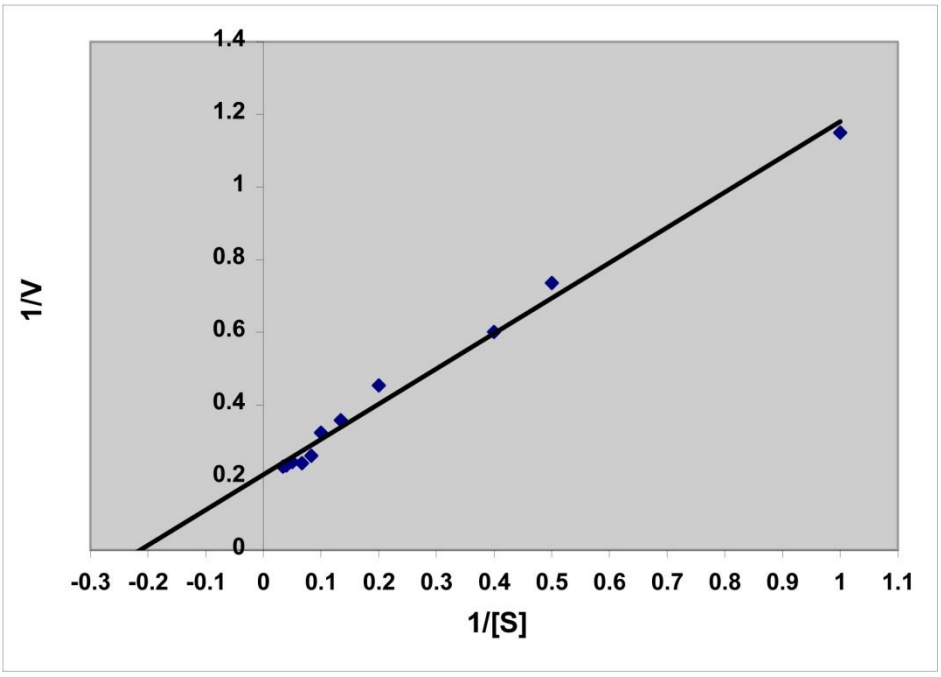


الشكل (14): منحنى الثبات الحراري لإنزيم الانيولينيز الصورة :A المنقى من الفطر

A. niger 22



الشكل (15): منحنى لينويفر – بورك (Lineweaver- Burk) لتقدير ثابت ميكالس (K_m) والسرعه القصوى (V_{max}) لإنزيم الانيولينيز الصوره:W المنقى من الفطر *A. niger* 22 باستخدام الانيولين كماده تفاعل



الشكل (16): منحنى لينويفر – بورك (Lineweaver- Burk) لتقدير ثابت ميكالس (K_m) والسرعه القصوى (V_{max}) لإنزيم الانيولينيز الصوره:A المنقى من الفطر *A. niger* 22 باستخدام الانيولين كماده تفاعل

المصادر

Al-Ghanimi, A. A. ; Al-musawi, U. H. and Kadhim, N. H. (2011). Determining the typical cultural conditions for production of inulinase enzyme from local isolate of *A.niger* . *Journal of Kerbala University,* Vol 9. No 3. scientific .

Arand, M.; Golubev, A.M.; Brnandao Neto, J.R.;Polikarpov, I.; Wattiez, R.; Korneeva, O.S.;Eneyskaya , E.V.;Kulminskaya, A.A.; Shabalin, K.A.; Shishliannnikkov, S.M.; Chepurnaya O.V. and Neustroev, K.N. (2002). Purification ,characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo- inulinase from *Aspergillus awamori*.Biochem.J. 362:131-135.

Balayan, A.M.; Pivazion, L.A.; Khachaturian, R, N; Afrikian, E.G. and Ableian, V.A. (1996). Inulinase from *Penicillium palitans* and *Penicillium cyclopium*. Biochemistry (Moscow). 61:445-450.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein- Dye Binding. Anal. Biochem. 72,248- 254.

Castaneda, C. L. ; Martinez, G. ;Esquivel, J. C. C.; Herrera, R. R. ; Barragan, A. P. and Aguilar, C. N. (2012). Inulinase production by *Penicillium citrinum* ESS in submerged and solid-state cultures. *American journal of Agricultural and Biological Sciences* 7(2):129-134 .

Chesworth, J.M.; Stuchbury, T. and Scaife, J.R. (1998). An Introduction to agricultural Biochemistry. Chapman &Hall, London.

Chi, Z. M. ; Chi, Z. ; Zhang ,T. ; Liu, G. L. and Yue, L. X. (2009). Inulinase expressing microorganisms and applications of inulinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 82(2) : 211-220.

Chi, Z. M. ; Zhang,T. ;Cao, T.S. ; Liu, X. Y. ;Cui, W. and Zhao, C. H.(2011). Biotechnological potential of inulin for bioprocesses, *Bioresource Technology*,102, 4295-4303.

Derycke, D. G. and Vandamme, E. J. (1984). Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase .J. Chem. Tech. Biotechnol.34, 45-51.

Ertan, F.; Sanal, F.E.; Kaboglu, A.C.; Aktac, T. and Bakar, E. (2005). Some properties of Inulinase from *Rhizoctonia solani*. J. of Biological Sciences 5(3): 330-334.

Fullbrook, P.D (1983). Practical limits and prospects. In: Industrial Enzymology (eds. Godfrey, T. and Reichelt J.) p.41-110 nature Press.

Garfin, D. E. (1990). Purification Procedures. electrophoretic methods. "In Methods in Enzymology" Vol. 185 (Edited. by Murray E. D. and Deutscher, P.) Academic Press, New York.

Gong, F. ; Zhang, T. ; Chi, Z. M. ; Sheng, J. ; Li, J. and Wang, X.H.(2008). Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 13(5): 533-539 .

Jonson, J.C. and Ryden, L. (1998). Protein purification principles, highresolution methods, and application, 2nd ed. John Wiley& Sons .Inc, pp.695.

Kochhar, A.; Karur, N.and Gupta, A.K. (1997). Inulinase from *Aspergillus versicolor*: A potent enzyme for production fructose from inulin. J. Sci. Ind. Res., 56:721-726.

Laemmli, U .K. (I 970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227: 680-685.

Lehmacher, A. and Bisswanger, H. (1990). Isolation and characterization of an extremely thermostable D- glucose / xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB8. J. Gen. Microbiol. 136: 679-686.

Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc.56: 658-666.

Meng, M.; Bagdasarian, M. and Zeikus, J.G. (1993). Thermal stabilization of xylose isomerase from *Thermoanaerobacterium* therm sulfurgenes. Biotechnol. 11: 1157-1161.

Miller, G.I. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 3r. 426-428.

Nakamura, T.; Kuramori, K. and Zaita, N. (2001). Purification and properties of intracellular Exo- and Endo inulinase from *Aspergillus niger* strain 12 – Bull. Fac. Agric. Miyazaki univ., 48(1-2) (49-58).

Nakamura, T. and Nakatsu, S. (1977).General properties of extracellular inulinase from *Penicillium* sp. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 51:681-689.

Nakamura, T.;Nagatomo,Y.;Hamada,S.;Nishino,Y. and Ohta,K. (1994).Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817.J.Ferment.Bioeng.,78:134-139.

Neagu, C. and Bahrim, G. (2011). Inulinases- A versatile tool for biotechnology. *Innovative Romanian Food Biotechnology.* Vol. 9, 1-11.

Ohta, K.;Akimoto,H. and Moriyama,S.(2004).Fungal Inulinases : Enzymology ,Biology and Biotechnology.J.Appl.Glycosci.,51,247-254.

Pessoni, R.A.B.; Figueiredo-Ribeiro R.L.C. and Braga, M.R. (1999). Extracellular inulinase from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (*Asteraceae*). J. Appl. Microbiol. 87: 14l-147.

Reed, G. (1975). Oxidoreductase, in ((Enzyme in Food Processing)) P. (176-196) Academic Press.

Segel, I.H. (1976). Biochemical calculations. John Wiley and Sons New York, London.

Singh, R.S.; Dhaliwal, R. and Puri, M. (2007). Partial purification and characterization of exo inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of High-Fructose Syrup. J. M.icrobiol. Biotechnol. 17(5): 733-738.

Singh, P. and Gill, P.K. (2006). Production of Inulinases: Recent Advances. Food Technol.Biotechnol.44 (2)151-162.

Whitaker, J.R. (1972). Principle of enzymology for the food science. Marcel Dekker, Inc. New York.

Yuan, W. J. ; Chang , B. L. ; Ren, J. G. ; Liu, J. P. ; Bai, F. W. and Li, Y. Y. (2012). Consolidated bioprocessing strategy for ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces marxinus* under high gravity conditions. *J. Appl. Microbiol.,* 112(1): 38-44.