Vol. 7, No. 13 and 14, P. (27-37)A, 2018

تنقية انزيم الانيولينيز المنتج من عزلة محلية من الخميرة Kluyveromyces marxianus AY2

محمد عمر محي الدين وجاسم محمد عودة
علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق

تاريخ الاستلام: 5 / 1 / 2017
تاريخ قبول النشر: 17 / 5 / 2017

Abstract

The enzyme produce from Kluyveromyces marxianus AY2 by submerged culture was purified by several steps included precipitation by ammonium sulphate at (30-70%) saturation DEAE- sephadex A50 Ion exchange chromatography and gel filtration on sephadex G150. The final purification folds and the yield of the enzyme were 16.97 times and (25.3%), respectively.

Keywords

Enzyme, Inulinase, Inulin, Purification

الخلاصة

أنتج أنزيم الانيولينيز بطريقة المزارع المغمورة من الخميرة المحلية Kluyveromyces marxianus AY2 ونقي الانزيم بعدة خطوات اشتملت على الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع (30-70٪) وكروماتوكرافيا التبادل الأيوني بعمود DEAE Sephadex A (5) ثم الترشيح الهلامي في Sephadex (G150) وبلغ عدد مرات التنقية بعد هذه الخطوات (16.97) مرة وبحصيلة مقدارها (25.3٪).

الكلمات المفتاحية

انزيم، الانيولينيز، الانيولين، التنقية .

1. المقدمة:

تضاف المحليات الطبيعية أو الصناعية Natural and Artificial sweeteners الى العصائر والمشروبات والمعجنات والحلويات وعدد من الأغذية، ولاسيما أغذية الأطفال، إذ يفضل الطفل الطعام حلو المذاق، وقد حذرت منظمة الصحة العالمية (WHO) من مخاطر عدد كبير من هذه المحليات الصناعية وذلك لعلاقتها ببعض الأمراض مثل السرطان وتضرر خلايا المخ (brain cell damage) [1,2].

ويستخدم السكروز (سكر المائدة) مُحلياً طبيعياً بشكل كبير في الصناعات الغذائية إلاّ أن الطلب قد إزداد في العقود الأخيرة على الفركتوز Fructose وذلك لأنه أكثر ذوباناً من السكروز، وحلاوته عالية تبلغ (174٪) مقارنةً بالسكروز (100٪) والكلوكوز (74٪) وبذلك أمكن استعماله كمحلٍ بكميات قليلة وبسعرات حرارية واطئة في ذلك المنتوج، وهو أمر مهم لمن يعاني من السمنة [3]. ويتطلب التمثيل الغذائي للفركتوز كميات أقل من الانسولين مقارنةً بالكلوكوز [4] كما يسهم الفركتوز في زيادة إمتصاص الحديد في الجهاز الهضمي للأطفال، كذلك زيادة قدرة الجسم في التخلص من الإيثانول [5]. ينتج الفركتوز بالطريقة التقليدية بتحويل النشا إلى الفركتوز بثلاث خطوات أنزيمية باستعمال الأميليز Amylase والكلايكواميليز Glucoamylase وكلوكوز ايسوميريز Glucose isomerase. ويكون الناتج حاوياً على (42٪) فركتوز و(50٪) كلوكوز و(8٪) سكريات أخرى، كما هو الحال في منتج شراب الذرة عالي الحلاوة. والذي يستخدم في مختلف الصناعات الغذائية [7,6]. يمكن الحصول على الفركتوز النقي وبتركيز يصل الى (95٪) وذلك عند أنتاجه أنزيمياً من الانيولين [8] الذي يوجد في عدد من النباتات مثل الهندباء والاسباركس والشوفان والشعير والثوم أضافة الى الالمازة والتي تمتاز بان الانيولين فيها يمثل (60٪) من وزنها الجاف [9] وغيرها من النباتات الاخرى [10] ويمكن كسر الاواصر الرابطة بين وحدات الفركتوز بطريقة كيميائة وذلك باستعمال حرارة عالية (غليان) في رقم هيدروجيني بحدود (2-1) .وهي طريقة غير مرغوبة في الصناعات الغذائية وذلك لإحتمالية إنتاج مركبات أخرى مثل مركبات الفورفورال [11]، من هنا فان التحلل الأنزيمي باستعمال الانيولينيز يعد هو الأفضل في هذا المجال فضلاً عن مجالات التقنية الحيوية إذ وجد [12] أن خميرة *Saccharomyces cerevisiae* تنتج الأيثانول بكمية أكبر عند تنميتها على الأنيولين المتحلل بالطريقة الأنزيمية مقارنةً بالانيولين المتحلل بالطريقة الكيميائية. تفضل الطريقة الأنزيمية لأسباب أخرى منها كلفتها الواطئة وكفاءتها العالية في إنتاج الفركتوز بتركيز يصل الى (95٪) وذلك باستعمال الانيولينيزات المنتجة من الأحياء المجهرية، ويمكن استعمال الأنيولينيز الداخلي E.C: 3.2.1.7 في تكسير الانيولين الى وحدات أصغر تسمى (IOS) inulo-oligosaccharides والتي تدخل في مختلف الصناعات الغذائية كأغذية وظيفية (FF) Functional Foods وذلك لتأثيراتها الإيجابية في جسم الانسان، ومساهمتها في الوقاية من سرطان القولون. كما تعد من المحفزات الأولية [13] prebiotics. ومن الاستعمالات الطبية للأنيولينيز هو استعماله في فحص وظائف الكلية. ويرى بعض الباحثين أن للانيولينيز المفرز من الأحياء المجهرية تأثيراً مثبطاً للخلايا السرطانية (5).

هدفت دراستنا الحالية الى تنقية الانزيم بعدة خطوات لغرض التخلص من الملوثات الاخرى معه لغرض اعداده لدراسة مواصفات الانزيم واستخدامه لاحقا في صناعات محلية

2. المواد وطرق العمل:

(جميع المواد الكيمائية مجهزة من شركة oxoid)

(اجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم علوم الاغذية – كلية الزراعة – جامعة بغداد)

1.2. إنتاج الأنزيم:

استعملت طريقة المزارع المغمورة لإنتاج الأنزيم، إذ لقحت دوارق زجاجية سعة (300) مل حاوية على (100) مل من الوسط

Inulin yeast extract- Peptone broth IYP

وحضر بإذابة (2) غم من الانيولين مع (5) غم من خلاصة الخميرة (5) غم من الببتون في (1000) مل من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني على 5 ثم عقم بالمؤصدة. لقح بالخميرة (تم عزلها في دراسة سابقة) *Kluyveromyces marxianus* AY2 (10^6) خلية / مل من الوسط، وحضنت في حاضنة هزازة بدرجة حرارة (30) م مدة (24) ساعة وبسرعة (150) دورة / دقيقة. ثم فصلت الكتلة الحيوية عن الوسط بالنبذ المركزي المبرد على سرعة (4000×g)مدة (30) دقيقة بدرجة حرارة (4) م. وأهمل الراسب وعُدّ الراشح المستخلص الخام للأنزيم.

2.2. محلول المادة الأساس:

حضر هذا المحلول بتركيز (3٪) بإذابة (3) غم من الانيولين في كمية قليلة من محلول دارئ الخلات برقم هدروجيني 5 وبتركيز (0.2) مولاري في دورق حجمي سعة (100) مل وأكمل الحجم إلى العلامة بالمحلول الدارئ نفسه، واستعمل مادة أساس لتقدير الفعالية.

3.2. تقدير فعالية الإنزيم:

أتبعت الطريقة المذكورة من [14] في تقدير فعالية الأنزيم بطريقة كاشف حامض (3,5) ثنائي نايترو سالسيلك (3,5-dinitro salicylic acid (DNSA) إذ أضيف (0.1) مل من المستخلص الأنزيمي إلى (0.9) مل من محلول المادة الأساس في حمام مائي بحرارة(30م وأستمر التفاعل مدة (10) دقائق، بعد ذلك أضيف(1) مل من (DNSA) ثم وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي مدة (10) دقائق. بردت مباشرة بالماء. أضيف (10) مل الماء المقطر وقيست الامتصاصية على (540) نانو وبالرجوع إلى المنحنى القياسي للفركتوز تم أستخراج السكريات المختزلة والمتحررة بفعل الأنزيم على المادة الأساس (الانيولين) ومنها تم تقدير فعالية الإنزيم:

عرفت وحدة الفعالية (Unit):- بأنها كمية الإنزيم التي تحرر(1) (99) مايكرو مول من الفركتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

4.2. تقدير تركيز البروتين:

أتبعت طريقة [14] في تقدير البروتين وباستعمال محلول ألبومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin) ومحلول الصبغة (G-250 brilliant blue Commassie) في اعداد المنحى القياسي وقدرت تركيز البروتين في النماذج بنقل (0.1) مل من المحلول الأنزيمي إلى (1) مل من الصبغة ومزجت جيدا وتركت (5) دقائق بحرارة الغرفة وقيست الإمتصاصية على (595) نانو. قدر تركيز البروتين إعتمادا على المنحنى القياسي الذي تم إعداده كما في الفقرة المذكورة آنفاً. أما محلول الكفء (السيطرة) فحضر بالخطوات نفسها، بإستثناء استعمال الماء المقطر بدلا من المحلول الأنزيمي.

5.2. تنقية الأنزيم:

أجريت عملية التنقية لأنزيم الانيولينيز من عزلة الخميرة المنتخبة وذلك بتركيز الأنزيم بوساطة كبريتات الأمونيوم ثم كروموتوكرافيا التبادل الأيوني أعقبها كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي وفيما يأتي ملخص لكل من هذه الخطوات:

1.5.2. التركيز بكبريتات الأمونيوم

أجريت عملية التركيز باستخدام نسب مختلفة من كبريتات الأمونيوم لتحديد نسبة الإشباع المثلى لتركيز المحلول الأنزيمي الخام، فوجد إن نسبة الإشباع المثلى تقع بين (30–70٪). وتمت إضافة كبريتات الأمونيوم في حمام ثلجي مع مزج مستمر، ثم أخضع المحلول للنبذ المركزي بسرعة (10000 ×g) لمدة (30) دقيقة، أعقبتها عملية الديلزة لليلة كاملة تجاه الماء المقطر. قدر حجم المحلول وفعالية الإنزيم وتركيز البرتين.

2.5.2. كروموتوكرافيا التبادل الايوني

محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز (0.5) مولار. محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز (0.5) مولار. محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.05) مولار وبرقم هيدروجيني (6). محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ – كلوريد الصوديوم بتركيز (0.5) مولار وبرقم هيدروجيني (6).

3.5.2. المبادل الايوني ثنائي اثيل امينو اثيل سيفادكس DEAE Sephadex A50:

حضر المبادل الايوني السالب Anion Exchange المجهز من شركة (Pharmacia) السويدية طبقا لما ذكره [14] بتعليق (20) غم منه في (500) مل ماء مقطر مع التحريك المستمر داخل أسطوانة مدرجة وترك ليركد. غسل عدة مرات لإزاحة الدقائق الطافية حتى أصبح السائل العلوي رائقا، ثم علق في محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز (0.5) مولار أعيد غسل المبادل بالماء المقطر لحين التخلص من المحلول السابق. ثم علق بمحلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز (0.5) مولار وتم غسله بالماء المقطر عدة مرات، بعدها تمت موازنته بمحلول الفوسفات الدارئ بتركيز (0.05) مولار وبرقم هيدروجيني (6) أجريت عملية إزالة الغازات Degassing بإستخدام مضخة التفريغ ثم عبأ في عمود بأبعاد (1.5×28) سم وتمت موازنته بمحلول الفوسفات الدارئ أيضاً.

6.2. طريقة العمل:

مرر محلول الأنزيم المركز بطريقة كبريتات الأمونيوم على عمود المبادل الايوني السالب DEAE – Sephadex A50 الذي سبق موازنته بمحلول الفوسفات الدارئ جمعت الأجزاء المفصولة من العمود بوساطة جامع الأجزاء بسرعة جريان مقدارها (30) مل / ساعة بواقع (2.5) مل للجزء الواحد.

عند وصول الامتصاصية على طول موجي (280) نانوميتر إلى الصفر ((Base line جرت عملية الاسترداد للبروتينات المرتبطة على المبادل الايوني بوساطة بمحلول الفوسفات الدارئ لمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ مذاب فيه كلوريد الصوديوم بتركيز (0.5) مولار وبرقم هيدروجيني 6. بأسلوب التدرج الملحي الخطي بتراكيز ملحية متدرجة من (0.5–0) مولار.

تمت متابعة الإمتصاصية على طول موجي (280) نانوميتر للأجزاء المفصولة من مرحلتي الغسل ((Wash والإسترداد ((Elution كما قدرت الفعالية لتلك الأجزاء، جمعت الأجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها، وركزت هذه الأجزاء بوضعها داخل كيس ديلزة ورشها بمادة السيفادكس لتهيئتها للخطوة اللاحقة.

1.6.2. كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي:

2.6.2. تحضير هلام السيفادكس Sephadex G150

حضر هلام السيفادكس Sephadex G150 على وفقا لتعليمات الشركة المجهزة (Chemicals (Phar-macia Fine بتعليق (20) غم من مسحوق السيفادكس في (500) مل من الماء المقطر ووضع في حرارة (90–85) م° مدة (5) ساعات، ثم غسل بمحلول الفوسفات الدارئ مرتين، بعدها علق بكمية مناسبة من المحلول ذاته، وإزالت

عنه الغازات ((Degassing وعبأ في العمود ليعطي هلاما بأبعاد (1.5× 40) سم وأجريت موازنة العمود بمحلول الفوسفات الدارئ المذكور.

7.2. إضافة النموذج والإسترداد:

مرر المحلول الإنزيمي المركز من خطوة التبادل الايوني على عمود الترشيح الهلامي Sephadex G150 وتم إسترداد الأنزيم بوساطة محلول الفوسفات الدارئ بسرعة جريان مقدارها (12) مل/ ساعة. تمت متابعة الامتصاصية للأجزاء المفصولة على الطول الموجي (280) نانوميتر، فضلا عن تقدير فعالية الإنزيم. جمعت الأجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها، ثم ركزت بوساطة جهاز التجفيد ووزعت في عدد من أنابيب الاختبار وحفظت بالتجميد لغرض إجراء التجارب المتعلقة بتوصيف الإنزيم.

3. النتائج والمناقشة

1.3. تركيز الأنزيم

إنتج أنزيم الانيولينيز تحت الظروف المثلى المذكورة في الفقرات السابقة. واخضع المستخلص الأنزيمي الخام لسلسلة من خطوات التنقية تمثلت الخطوة الأولى بتركيز الأنزيم للتخلص من نسبة كبيرة من الماء وأستخدم لهذا الغرض كبريتات الأمونيوم في ترسيب البروتينات، لما تتميز بها من خصائص مرغوبة كالذائبية العالية ،وتوفره، وقلة كلفته مقارنة بالمذيبات العضوية [15] الترسيب بالأملاح بفعل معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والإخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين، إذ يؤدي ذلك إلى ما تعرف بـ Salting out [14] أضيفت كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع (30٪-70٪) وجمع الراسب الناتج من الطرد المركزي واذيب في محلول الفوسفات الدارئ وتمت ديلزته تجاه الماء المقطر وقيس حجمه وفعالية الأنزيم وتركيز البرتينات فيه وحققت هذه الخطوة تنقية للأنزيم بلغت 2.05 مرة وبحصيلة مقدارها (59٪) وكما موضح في الجدول (1).

2.3. كروماتوكرافيا التبادل الأيوني والترشيح الهلامي:

أعقب تركيز الأنزيم بكبريتات الامونيوم خطوة كروموتوكرافيا التبادل الأيوني إذ مرر المحلول الأنزيمي المركز (بعد ديلزته ليلة واحدة) على عمود التبادل الأيوني (A50) DEAE Sephadex والموازن بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.05) مولار ورقم هيدروجيني (6).

تم قياس الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر للأجزاء غير المرتبطة بالمبادل وعند وصول الامتصاصية إلى الخط الصفري (Base line) أجريت عندئذ عملية الإسترداد للأجزاء المرتبطة بالمبادل باستخدام أسلوب التدرج الملحي الخطي ((Linear salt gratient لكلوريد الصوديوم بتراكيز تراوحت (0.5-0) مولار في محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.05) مولار وبرقم هيدروجيني 6 الشكل رقم (1).

جدول (1): خطوات تنقية أنزيم الانيولينيز المنتج من الخميرة **Kluyveromyces marxianus AY2**

الخطوة	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/ مل)	تركيز البروتين (ملغم/ مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة ٪
المستخلص الخام	100	3.81	0.44	8.65	381.2	1	100

الترکیز بکبریتات الأمونیوم بنسبة إشباع 30-70٪	21	10.70	0.602	17.77	224.9	2.05	59
التبادل الأیوني DE-AESephadex A50	24	5.43	0.113	48.05	130.37	5.55	34.2
الترشیح الهلامي Sephadex G150	16	6.02	0.041	146.82	96.44	16.97	25.3

ولوحظ خلو القمم التي ظهرت في الأجزاء غير المرتبطة بالمبادل (أجزاء الفصل) من الفعالية الأنزيمية تماماً مما يؤكد إرتباط الأنزيم بالمبادل الأيوني السالب، وان محصلة الشحنات المحمولة على الأنزيم في الظروف المستخدمة هي شحنات سالبة والأجزاء المرتبطة فد أعطت قمة واحدة ذات فعالية أنزيمية من دون القمم الأخرى. جمعت أجزاء هذه القمة واحتسب حجمها وفعالية الأنزيم وتركيز البروتينات فيها، فلوحظ إرتفاع عدد مرات التنقية إثر هذه الخطوة إلى (5.55) مرة وبحصيلة أنزيمية بلغت (34.2٪) وكما موضح بالجدول (1).

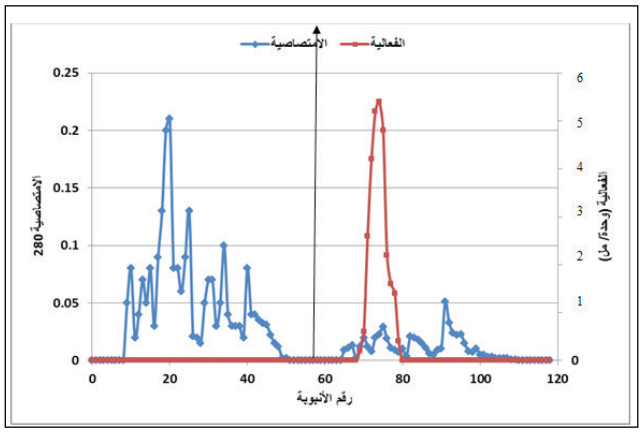
استكملت التنقية بخطوة أخرى هي خطوة الترشيح الهلامي على عمود (G150) Sephadex إذ جرى موازنة العمود والاسترداد بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.05) مولار برقم هيدروجيني (6). ارتفع عدد مرات التنقية إثر هذه الخطوة إلى (16.97) مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها (25.3٪) ويلاحظ من الشكل (1) أن الأجزاء المستردة تضمنت ست قمم بروتينية واحدة لفعالية الأنزيم كانت متطابقة مع قمة البروتين الثالثة ويعد هذا أحد دلائل نقاوة الأنزيم [14]

ويذكر أن الخطوات المستخدمة لتنقية الأنزيم في المراجع العلمية على درجات عالية من التنوع فقد نقى [16] الانيولينيز المنتج من *Kluyveromyces marxianu-sYS-1* بخطوتين تمثلت بالترسيب بالايثانول أعقبها تمرير البروتينات على عمود الترشيح الهلامي في عمود Sephadex G100 ليجد قمتين بروتينيتين كانت إحداهما تمثل الأنزيم وحصل على عدد مرات تنقية مقدارها (23.5) وبحصيلة أنزيمية (69.3٪).

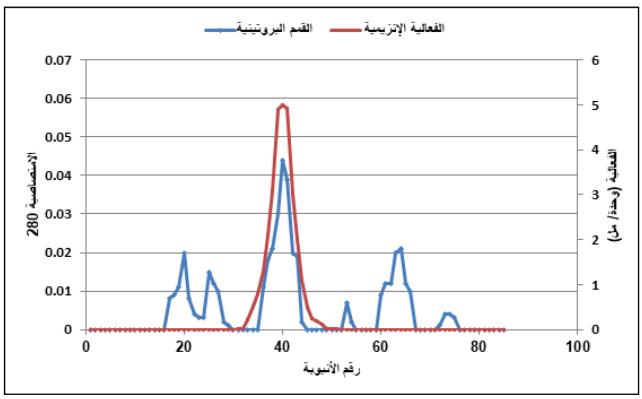
فيما إستخدم [17] كبريتات الامونيوم وبنسبة (80٪) لترسيب الأنزيم المنتج من *Ulocladium atrum* اعقبها DEAE cellulose فزادت النقاوة بمقدار (2.65) مرة. فيما قام [18] بتنقية الانيولينيز من *Streptomyces sp* بترسيبه بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع تراوحت بين (40-80٪) ومن ثم بتمرير الناتج على العمود Macro-Prep DEAE وعلى العمود Sephacryl (S-200) واخيراً استخدم عمود t-Butyl hydrophobic in-teraction فحصل في نهاية هذه الخطوات على حصيلة مقدارها (44.4) وكانت عدد مرات التنقية (5.4) مرة. كذلك قام [19] بتنقية الانيولينيز المنتج من الفطر *Asper-gillus niger* إذ رسب البروتينات باستخدام الكحول الاثيلي (70٪) ومن ثم التبادل الأيوني على عمود DEAE cellulose وحصل على ثلاث صور للأنزيم احدهم كان قد تواجد في احدى القمم البروتينية في مرحلة الغسل (W) وقمتين للفعالية في مرحلة الاسترداد (A,A_1) اهمل الصورة A_1 إذ كانت ذات فعالية ضعيفة ومرر (W وA) على الترشيح الهلامي مرتين باستخدام عمود Sephadex (G150) وحصل على حصيلة أنزيمية لكليهما بلغت (22.5٪).

كذلك استخدم [20] عمود التبادل الأيوني DEAE cel-lulose والترشيح الهلامي باستخدام عمود (G150) Sephadex وحصل على عدد مرات تنقية بلغت (8.1) وبحصيلة أنزيمية مقدارها (33.5٪).

فيما قام [21] بتنقية الانيولينيز المكلون في خميرة *Pichia pastoris* من *Cryptococus aureus HTA* بخطوة واحدة باستخدام كروموتوكرافي الالفة باستخدام عمود Ni–NTA وبلغت عدد مرات التنقية (2.13) مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها (56٪).



شكل (1): كروماتوكرافيا التبادل الأيوني لتنقية الانيولينيز المنتج من خميرة Kluyveromyces marxianus AY2 باستخدام عمود DEAE–Sephadex A50



شكل (2): الترشيح الهلامي لتنقية أنزيم الانيولينيز المنتج من خميرة Kluyvero-myces marxianus AY2 باستخدام عمود Sephadex G150

ويذكر أن الباحثين قد إعتمدوا خطوات متباينة وتقنيات مختلفة لتنقية هذا الأنزيم أو ذاك من الأنزيمات الصناعية أو الطبية ومنها أنزيم الانيولينيز. فقد إتبع [10] ثلاث خطوات لتنقية الأنيولينيز من Staphylococus aureus إشتملت على الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع (70٪)، ومن ثم مرر الناتج على عمود DEAE-Sephadex A50 فظهرت لدية ثلاث قمم بروتينية، إحداها كانت ذات فعالية، أخضع ناتج هذه القمة للترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G100 وحصل على قمه بروتينية واحدة تتطابق مع الفعالية وبحصيلة أنزيمية مقدارها (21٪) وعدد مرات تنقية بلغت (31.63) مرة. في حين إستخدم [22] أربع خطوات لتنقية الأنيولينيز المنتج من A. fumigates شملت الترسيب بكبريتات الأمونيوم ومن ثم التبادل الأيوني بواسطة DEAE Sephacel– أعقبها الترشيح الهلامي باستعمال Sephacryl S (200)ومن ثم Sepharose وحصل على عدد مرات تنقية بلغت (25) مرة. كما إستخدم [5] أربع خطوات لتنقية الأنيولينيز المنتج من Penicil-lum janczewskii إذ رسب البروتينات أولاً باستعمال كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع (80–30 ٪) وحصل على عدد مرات تنقية بلغت (1.75) وبعد الديلزة مرر الخليط على عمود المبادل الأيوني MonoQ وحصل على قمتين بفعالية واضحة، لتبلغ عدد مرات التنقية للأولى (0.7) والثانية (1.8)، ثم إستخدم عمود Butyl–Toyopearl وللقمتين البروتينيتين (الانزيم) كلاً على حده لتبلغ عدد مرات التنقية لها (1.7) و(6) على التوالي. ومن ثم مررهما على عمود الترشيح الهلامي (12) HR Superose لتبلغ عدد مرات التنقية لها (15 و24) على التوالي. في حين نقى [23] الأنيولينيز من Aspergillus niveus بثلاث خطوات إبتدأها بالترسيب بكبريتات الأمونيوم فحصل على عدد مرات تنقية بلغت (2.63) وبحصيلة أنزيمية مقدارها (73.8٪)، ومن ثم إستخدام المبادل الأيوني DE–52 فظهرت لديه عدد من القمم البروتينية، بيد أن قمة بروتينية واحدة تطابقت مع الفعالية ، ومررت حصيلة هذه القمة

على عمود الترشيح الهلامي Sephadex G75 ليبلغ عدد مرات التنقية (34.65) مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها (53.63٪). وأعتمد الباحث [24] ثلاث خطوات أيضاً لتنقية أنزيم الأنيولينيز المنتج من Rhizoctonia solani، كانت الأولى باستعمال الديلزة والتركيز بوساطة هلام السليكا ثم مرر الخليط على عمود DAEA-Cellulose وحصل على عدد مرات تنقية بلغ (5.21) وبحصيلة أنزيمية مقدارها (17.93٪)، بعدها مرر الناتج على عمود Sephadex G150 فحصل على عدد مرات تنقية بلغ (21.2) وبحصيلة أنزيمية مقدارها (11.67٪). كما إستخدم]25[ثلاث خطوات لتنقية الأنيولينيز (4083) A. terreus CCT شملت الترشيح الفائق كخطوة أولى، أعقبها التبادل الأيوني باستعمال عمود CM-Sepharose ومن ثم باستعمال عمود Phenyl-Sepharose كخطوة أخيرة، فحصل على عدد مرات تنقية بلغت (179) مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها (32٪). في حين مرر 26) الأنزيم من بكتريا Bacillus cereus

بخطوتين للتنقية تمثلت بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (80٪) وتبادل ايوني على عمود DAEA-Cellulose وحصل على عدد مرات تنقية بلغت (25) مرة وحصيلة انزيمية مقدارها (27.26٪). ولابد من الإشارة أن درجة النقاوة التي يتوخى الباحثون الوصول إليها بالنسبة للأنزيمات التجارية، تختلف بإختلاف الاغراض التي تستخدم فيها هذه الأنزيمات والتي تتباين بين الاستعمالات الطبية والصناعية.

المصادر

[1] Bedi, G.S.; Bedi, M.K. and Bedi, A. Effect of Intermittent Dosing on Production of inulinase from dahlia tubers using Kluyveromyces marxianus . World Jou of Phar and Pha sciences. 3 (7) :716-723, (2014).

[2] Treichel, H.; Mazutti, M.A. ; Filho, F. M. and Rodrigues, M.I. Technical viability of the production,partial purification and characterisation of inulinase using pretreated agroindustrial residues. Bioprocess Biosyst Eng.

[3] Yuan, B. ; Hu, N. ; Sun, J. ; Wang, S. A. and Li, F.L. Purification and characterization of a novel extracellular inulinase from a new yeast species Candida kutaonensis sp.nov.KRF1T. Applied Microbiology and Biotechnology. 1517-1526. .(2012)

[4] Rocha, J.R.; Catana, R.; Ferreira, B.S.; Cabral, J.M.S. and Fernandes, P. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. Food Chemistry. 95: 77-82. (2006).

[5] Pessoni, A. B. and Rosmeire, A. Purification and properties of exo-inulinases from penicillium janczewskii growing on disrinct carbon source. J. Mycologia. 99(4): 493-503. (2007)

[6] Pandey, A. ; Soccol, C.R. ; Selvakumar, P. ; Soccol, V.T. ; Krieger, N. and Fontana, J.D. Recent developments in microbial inulinases, Applied Biochemistry and Biotechnology. (81): 35-52. (1999)

[7] Gurjeet, S. B. ; Maheshwari, S. and Bedi, M. K. Influence of variable agitation and aeration on inulinase production from Kluyveromyces marxianus. Inter J of Biotech (112): 350-357. (2014).

[8] Harisingh ; Hement, G and Harisingh . production and proprtties of inulinase from penicillium sp.NFCC 2768 grown on inulin-rich vegetal infusions. Bioct Biotran (13):1-8. (2015)

[9] Jing, Y.; Jiaxi, J.; wangming; J. and Yuyang, L. glucose-free fructose production from Jerusalem artichoke using a recombinant inulinant inulinase –secrething saccharomyces cerevisiae strain. Biotech let (33): 147-152. (2011)

[10] Sahira , N. M. Cytotoxic effect of the purified inulinase from locally Isolate Staphylococcus aureus on Hep-2cancer cell line in vitro. J if Bio. Agriu and health. 4 (25): 1-7. (2014).

[11] Zhang, S. ; Yang, F. ; Wang, Q. and Zongbao, K.Z. High-level secretory expression and characterization of the recombinant Kluyveromyces Marxianus inlunase. J. Process Biochemistry (47) :151-155. (2012) .

[12] Lim, S. H.; Ryu, J.M.; Lee, H.; Jeon, J.H.; Sok, D.E. and Choi, E.S. Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using Saccharomyces cerevisiae KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis. Bioresource Technology. (102): 2109-2111. (2011)

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

[14] Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein dye binding. Analytical. Bioch. (72):248-254. (1976).

[15] Volesky, B. and Luong, I. Microbiol enzymes productions, purification and isolation. CRc (Critical Reviews in Biotechnology) . 2: 119-146. (1985).

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

[17] El-souod, S.M .A. ; Mohamed, T.M. ; Enab, M.M. Partial Purification of extracellular exo-inulinase from Ulocladium atrum. J of Genetic Engin and Biotech 12 (15): 15-20. (2014).

[18] Laowklom, N. ; Chantanaphan, R. ; and Pinphanichakarn, P. Production Purification and Charaterization of Inulinase from A newly Isolated Streptomyces sp.CP01. Natural Resourcse . (3): 137-144. (2012).

[19] الظويهري، ناجح هاشم كاظم .انتاج وتنقية وتوصيف الانيولينيز من الفطر Aspergillus niger المعزول محليا . اطروحة دكتوراه أكلية الزراعة – جامعة البصرة (2011)

[20] عبد الامير، زينب وليد.أنتاج وتوصيف إنزيم الانيولينيز المنتج من العفن Aspergillus niger بواسطة تخمرات الحالة الصلبة . أطروحة دكتوراه أكلية العلوم –جامعة بغداد. (2008)

[21] Cao, T.S. ; Wang, G.Y.; Chi, Z.; wang, Z.P and Chi, Z.M. Cloning, characteriza-

tion and heterologous expression of the 1NU1 gene from Cryptococcus aureus HYA .J. Gene(516) :255-262. (2013)

[22] Gill, P. K. ; Manhas, R.K. ; Singh, J. and Singh, P. Purification and characterization of an Exoinulinase from Aspergillus fumigatus. Applied Biochemistry and Biotechnology. 117(1): 19-32. (2004).

[23] Motta, C. M.S.; Cavalcanti, M.A. D. and Porto, F.L .A. Aspergellus nivrus Blochwitz 4128URM: New Source for inulinase production. J.Brazilian Archives of Biology and Tech.(3)343-350. (2005)

[24] Ertan, F.; Sanal, E.; Ayesegul, C. and Tulin, K. (2005). Some properties of Inulnase from Rhizoctionia Solani. J. of Biological Sci. 5(3): 330-334.

[25] Coitinho, J.B. ; Valeria, M. ; and Daniel, L. Characterization of am Exoinulinase Product by Aspergillus terreus CCT 4083 Grown on Sugar Cane Bagasse. J. Agric. Food Chem. (58) :8386-8391. (2010)

[26] Meenakshi, S.; Umayaparvathi, S.; Manivasagan, P.; Arumugam, M .; and Balasubramanian, T. Purification and characterization of inulinase from marine bacterium Bacillus cereus MU-31. Ind .J. Geo-Marine Sci. 42 (4): 510-515. (2013).