انتاج شراب عالي الفركتوز بطريقة التحلل الأنزيمي من الانيولين المستخلص من بعض النباتات الجذرية

اسراء عبيد جياد* اسوان حمدالله البيار**
ربى عبد المنعم* وفاء هادي صالح*

الملخص

هدفت الدراسة الى استخدام طرق متعددة لاستخلاص الانيولين من نباتات محلية مجففة ومجمدة بهدف انتاج شراب عالي الفركتوز بطريقة التحلل الأنزيمي باستخدام الانيولينيز المنتج من عزلة فطرية محلي. جرى استخلاص الانيولين من بعض النباتات المحلية وهي درنات الألمازة المجففة والمجمدة ونبات الهندباء البري باستخدام الغليان وإجراء عملية التركيز وبدونهما لاستخدامه في انتاج شراب عالي الفركتوز بواسطة انزيم الأنيولينيز المنتج من عزلة محلية لعفن *Aspergillus oryzae* بالمقارنة مع الانيولين النقي، ولوحظ ان الهندباء المجففة اعطت اعلى نسبة فركتوز بعد اضافة الأنزيم قبل اجراء عملية الغليان والتركيز 32.6 ملغم/مل وتلت الانيولين النقي بعد الغليان والتركيز فبلغت 42.4 ملغم/مل في حين بلغت نسبة الفركتوز باستخدام الانيولين النقي 47.79 ملغم/مل. جرى تقدير رقم الهيدروجين ونسبة المواد الصلبة الكلية (Brix %) لمستخلصات الانيولين قيد الدراسة ولوحظ أرتفاع رقم الهيدروجين بعد 24 ساعة من التحلل لمستخلص الألمازة المجمدة مقارنة مع جميع المستخلصات اذ بلغ 6.7 بينما تراوح لباقي المستخلصات الأخرى بين 5.2– 5.6، وازداد تركيز المواد الصلبة لمستخلص الهندباء المجففة فبلغ 8% بعد الغليان والتركيز.

المقدمة

الأنيولين هو عبارة عن فركتان متعدد في النباتات يتكون من سلسلة مستقيمة من جزيئات الفركتوز المرتبطة بآصرة β-(2→1) ترتبط بجزيئة سكروز طرفية ، هذا المركب الخزني ذو اهمية كبيرة في كونه مادة اساس لإنتاج شراب الفركتوز (5). يستخدم الانيولين ومنتجاته المتحللة في كثير من البلدان ويصنف كغذاء او مكونات غذائية (10).

انزيمات الأنيولينيز (2, 1-β-D-fructanfructanohydrolase, EC 3.2.1.7) تحفز تحلل الانيولين منتجة سكريات متعددة يطلق عليها Inulo-oligosaccharides فضلاً عن الفركتوز والكلوكوز كمركبات رئيسة. يمكن ان تقسم انزيمات الأنيولينيز الى قسمين (exo-inulinase) و(endo-inulinase)، الأول يزيل جزيئات الفركتوز الطرفية من النهاية غير المختزلة للأنيولين، بينما يعمل الثاني على الارتباطات الداخلية لجزيئة الانيولين ولكنه يفتقر الى فعالية انزيم الانفرتيز (4). تستخدم انزيمات الانيولينيز في مجالات واسعة في التطبيقات الصناعية منها الحصول على شراب عالي الفركتوز من الانيولين، انتاج الايثانول الحيوي ، انتاج السكريات المتعددة، انتاج زيت وبروتين احادي الخلية وانتاج بعض المواد الكيميائية مثل حامض الستريك وحامض اللاكتيك والكحولات وغيرها (3، 4، 6).

تعد النباتات والأحياء المجهرية مثل الأعفان والخمائر والبكتريا من اهم المصادر المعروفة لإنتاج انزيمات الانيولينيز (12). يمكن ان يستخلص هذا الأنزيم من النباتات والخضروات ولكن يصعب الحصول على كميات كافية منه فضلاً عن الكلفة العالية لإنتاجه، لذا قدمت انزيمات الانيولينيز المايكروبية بديلاً جيداً واصبحت

* دائرة البحوث الزراعية، وزارة الزراعة ، بغداد، العراق.
** كلية الزراعة ،جامعة بغداد، بغداد، العراق.

تمثل جزءاً مهماً من الأنزيمات الصناعية (11). وتتميز انزيمات الانيولينيز المنتجة من الأعفان بأنها تتكون من مزيج من الأنزيمات المحللة للانيولين بفعالية وثباتية عاليتين (2).

هدفت هذه الدراسة الى استخلاص الانيولين من مصادر نباتية مختلفة ومقارنة محتواها منه باستخدام طريقتين للاستخلاص بالغليان وبدونه ثم اضافة انزيم الانيولينيز المنتج من عزلة محلية من عفن *Aspergillus oryzae* وانتاج شراب الفركتوز وتركيزه لإنتاج شراب عالي الفركتوز ومقارنة كمية الفركتوز الناتجة من النماذج المستخدمة للوصول إلى مصدر ذي جدوى اقتصادية.

المواد وطرائق البحث

تم الحصول على الألمازة من الأسواق المحلية في العراق أما الهندباء البري فمن الحقول التابعة لكلية الزراعة / جامعة بغداد/ابو غريب. جرى استخلاص الأنيولين من درنات الألمازة والهندباء البري على وفق طريقة **Ronkart** وجماعته (9)، ولم تجر عملية التنقية لتعذر القيام بذلك كما تم تحوير الطريقة المذكورة بتجفيف المستخلص بدل من تجميده للمقارنة بين النتائج.

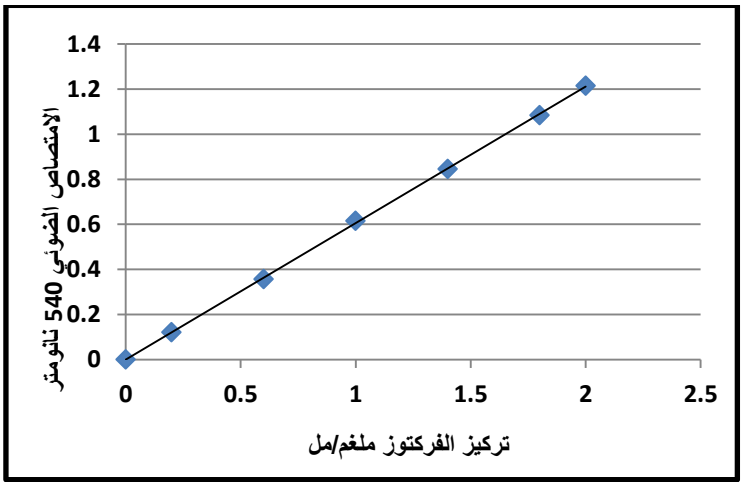
تم تنشيط العزلة الفطرية المحلية *Aspergillus oryzae* المعزولة سابقاً من القرغولي (1) وتنميتها على وسط **Potato Dextrose Agar (PDA)** على درجة حرارة **45** مْ لمدة **7** أيام واستعملت لقاحاً في انتاج الأنيولينيز بطريقة تخمرات الحالة الصلبة (**Solid State Fermentation**) إذ استعملت دوارق سعة **300** مل مزودة بسدادات قطنية تحتوي على الكوالح المجروشة كمادة ساندة (**Support**) وبواقع **10**غم/لكل دورق والمرطبة بوسط **Czapex-Dox** السائل والمحور باستبدال مصدر الكاربون (السكروز) بالانيولين وبنسبة **1%**، وبنسبة ترطيب **2:1** (وزن:حجم) وكان رقم الهيدروجين بعد التعقيم مساوياً **pH 6.8** ، ومما تجدر الاشارة اليه أن تعقيم كل من المادة الساندة وسائل الترطيب كان بشكل منفصل ثم حضنت الدوارق الملقحة على درجة حرارة **45**مْ لمدة **7** أيام وبعد انتهاء مدة التخمر تم استخلاص الأنزيم باستعمال **50** مل من محلول دارئ خلات الصوديوم (ذي تركيز **0.1** مولاري ورقم هيدروجين **5.0**) لكل دورق إذ مزجت المحتويات جيداً بواسطة خلاط مغناطيسي لمدة **15** دقيقة ، ثم رشحت من خلال منظومة ترشيح معقمة باستعمال القطن تبعتها خطوة ترشيح ثانية باستعمال ورق الترشيح **Whatman No.1** وتحت التفريغ ، أعقبتها عملية نبذ مركزي تحت التبريد (**3000** دورة/ الدقيقة) لمدة **10** دقائق، وأخذ الرائق الذي يمثل المستخلص الأنزيمي الذي حدد حجمه وفعالية الانيولينيز الخام فيه بأستعمال:

1. كاشف **3`،5`**– ثنائي نايترو حامض السالسليك **Dinitro Salicylic Acid -`3`,5** (**DNSA**) وحضر هذا الكاشف وفق طريقة كل من **Whitaker** و**Bernhard** (**13**).
2. محلول الفركتوز الخزين (**Stock Solution**) حضر بإذابة **0.2** غم من الفركتوز النقي في كمية من الماء الخالي من الايونات، اكمل بعدها الحجم الى **100** مل بالماء الخالي من الايونات واستعمل في تحضير منحنى الفركتوز القياسي وكما يأتي: أضيفت الحجوم الآتية من محلول الفركتوز الخزين الى أنابيب اختبار ثم أضيف اليها حجوم مناسبة من الماء الخالي من الأيونات ليصبح التركيز النهائي للفركتوز في كل أنبوبة (جدول **1**).

جدول 1: التراكيز المختلفة للفركتوز لتحضير المنحنى القياسي

رقم الأنبوبة	حجم محلول الفركتوز الخزين (مل)	حجم الماء الخالي من الايونات المضاف (مل)	تركيز الفركتوز (ملغم/مل)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.1	0.9	0.2
3	0.3	0.7	0.6
4	0.5	0.5	1.0
5	0.7	0.3	1.4
6	0.9	0.1	1.8
7	1.0	0.0	2.0

أضيف لكل أنبوبة مما تقدم 1 مل من محلول كاشف DNSA عرضت بعدها للغليان لمدة 5 دقائق في حمام مائي ثم بردت مباشرة بالماء الجاري أعقبها اضافة 10 مل من الماء المزالة منه الأيونات لكل أنبوبة مع الرج الجيد، ثم قيس الامتصاص الضوئي باستعمال جهاز المطياف Spectrophotometer وعلى طول موجي 540 نانومتراً، وكانت الأنبوبة رقم 1 بمثابة أنبوبة التصفير (Blank) ، إذ حصل على المنحنى القياسي الذي يمثل العلاقة الخطية بين قيم الامتصاص الضوئي وتركيز الفركتوز (شكل 1).



شكل 1 : المنحنى القياسي للفركتوز

محلول مادة التفاعل (الانيولين):حضر محلول الانيولين (كمادة تفاعل) بنسبة 0.5% وذلك باذابة 0.5 غم من الانيولين في كمية من دارئ خلات الصوديوم (0.1 مولاري ورقم هيدروجيني 5.5) ثم مزج جيداً بواسطة خلاط مغناطيسي ثم أكمل الحجم الى 100 مل بدارئ خلات الصوديوم ، إذ تم تقدير فعالية الأنيولينيز الخام على وفق طريقة Mandels وجماعته (7) ، وتعرف وحدة الفعالية الأنزيمية بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتحرير 1 ملغم/مل من الفركتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

انتاج شراب الفركتوز:

اتبعت الخطوات التالية في انتاج شراب الفركتوز وفق الطريقة المذكورة في Ronkart وجماعته (9). إذ وزن 25 غم من الأنيولين المستخلص من (الألمازة والهندباء البري والأنيولين النقي) واذابته في محلول دارئ خلات الصوديوم 0.1 مولاري وبرقم هيدروجين 5.5 واكمل الحجم الى 500 مل وأصبح التركيز 5%. اضيف الانزيم الخام المنتج من العزلة *Aspergillus oryzae* بمقدار 0.16 وحدة/مل ورقم الهيدروجين للأنزيم 5 ، بعدها وضع المزيج

في حاضنة هزازة بدرجة حرارة **50** مْ وعدد دورات **200** دورة/ دقيقة لمدة **24** ساعة ثم عومل حرارياً بالغليان بالمايكروويف ثم تم تركيز المنتج باستخدام فرن **Oven** بدرجة حرارة **40** مْ لمدة **24** ساعة.

تقدير الفركتوز بطريقة السستئين– كاربازول (Cysteine-carbazole):

قدر تركيز الفركتوز في الشراب المنتج في أعلاه بطريقة (السستئين–كاربازول) **Wiley** و**Sons** **(14)** (شكل **2**).

المحاليل المستعملة :

1. محلول **1.5** % سستئين: حضر باذابة **1.5** غم من السستئين في كمية قليلة من الماء المقطر واكمل الحجم الى **100** مل.
2. محلول **0.12** % كاربازول: حضر هذا المحلول بنسبة **0.12** % **(وزن/حجم)** في الايثانول المطلق.
3. محلول حامض الكبريتيك بتركيز **70%**.
4. محلول الفركتوز الخزين (**stock solution**): حضر محلول الفركتوز الخزين بإذابة **0.02** غم من الفركتوز النقي في كمية من الماء المقطر ، اكمل بعدها الحجم الى **100** مل بالماء المقطر واستعمل في تحضير منحنى الفركتوز القياسي وكما يأتي:

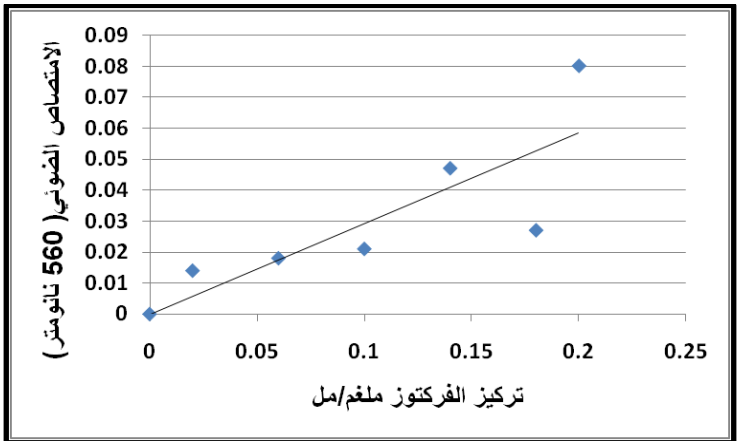
أضيفت الحجوم التالية من محلول (**4**) الى أنابيب اختبار ثم أضيف اليها حجوم مناسبة من الماء المقطر ليصبح التركيز النهائي للفركتوز في كل أنبوبة (جدول **2**).

جدول **2** :التراكيز المختلفة للفركتوز لتحضير المنحنى القياسي (طريقة كاربازول)

رقم الأنبوبة	حجم محلول الفركتوز الخزين (مل)	حجم الماء المقطر (مل)	تركيز الفركتوز (ملغم/مل)
1	**0.0**	**1.0**	**0.00**
2	**0.1**	**0.9**	**0.02**
3	**0.3**	**0.7**	**0.06**
4	**0.5**	**0.5**	**0.10**
5	**0.7**	**0.3**	**0.14**
6	**0.9**	**0.1**	**0.18**
7	**1.0**	**0.0**	**0.20**

اضيف **0.2** مل من محلول **1.5%** سستئين ثم اضيف **6** مل من محلول حامض الكبريتيك **70%** وبعد المزج الجيد اضيف **0.2** مل من محلول **0.12%** كاربازول وسخن الخليط الى **60** مْ لمدة **20** دقيقة ثم تبريد المحلول الناتج وقياس الامتصاص الضوئي بطول موجي **560** نانومتراً.

تم قياس رقم الهيدروجين لشراب الفركتوز المنتج بعد **24** ساعة من التحلل باستعمال جهاز **pH-meter** وقياس نسبة **Brix**.



شكل 2: المنحنى القياسي للفركتوز (طريقة كاربازول)

النتائج والمناقشة

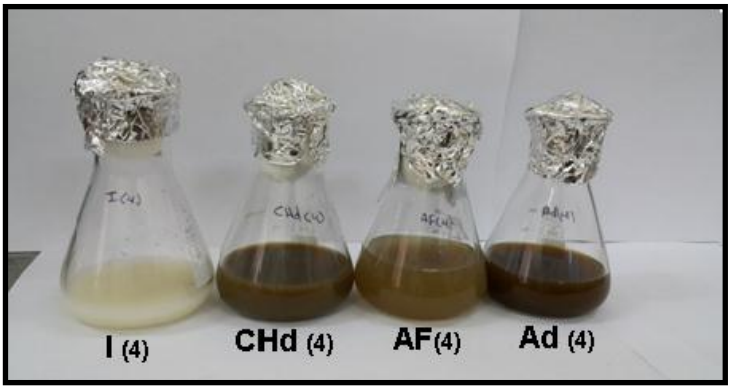
تم إنتاج شراب عالي الفركتوز باستخدام المستخلصات قيد الدراسة وهي مستخلص الانيولين من الهندباء المجففة (**CHd**) ومستخلص الانيولين من الألمازة المجففة (**Ad**) والانيولين النقي (**I**) ومستخلص الانيولين من الألمازة المجمدة (**Af**) ثم جرى تقدير نسبة الفركتوز الناتجة بعد **24** ساعة من إضافة انزيم الانيولينز الخام المنتج من العزلة ***A.oryzae*** للمستخلصات الاربع في حالاتها التي تتمثل بالأرقام التالية:

1. قبل إجراء عملية الغليان والتركيز للمستخلص .
2. قبل إجراء عملية الغليان للمستخلص وبعد تركيزه.
3. بعد إجراء عملية الغليان للمستخلص قبل تركيزه.
4. بعد اجراء عملية الغليان للمستخلص وبعد تركيزه.

يوضح جدول **3** إن اعلى نسبة للفركتوز كانت في الحالة رقم **4** لجميع المستخلصات قيد الدراسة مقارنة بالحالات الثلاثة الأخرى، إذ اعطى إنموذج الانيولين النقي اعلى نسبة للفركتوز ،فبلغت **47.79** ملغم/مل يليها مستخلص الهندباء البري المجففة إذ بلغت **42.4** (ملغم /مل) بينما كانت نسبة مستخلص الالمازة المجففة والمجمدة (**11.15**، **31.27** ملغم/مل) وعلى التوالي، نستنتج من هذا الانزيم الخام ادى إلى تحرير الفركتوز بعد **24** ساعة من اضافته. يوضح شكل **3** شراب الفركتوز المنتج باستخدام انزيم الانيولينيز الخام.

جدول **3** :نسبة الفركتوز بعد إضافة الانزيم الخام لحالات المستخلصات قيد الدراسة

الأنموذج	نسبة الفركتوز ملغم /مل			
	قبل الغليان		بعد الغليان	
	قبل التركيز (1)	بعد التركيز (2)	قبل التركيز (3)	بعد التركيز والتخلص من 40 % من حجمه (4)
هندباء مجففة CHd	32.6	23.6	23.86	42.4
ألمازة مجففة Ad	27.32	21.7	18.21	31.27
انيولين نقي I	29.15	25.41	24.21	47.79
ألمازة مجمدة Af	9.88	9.18	8.33	11.15



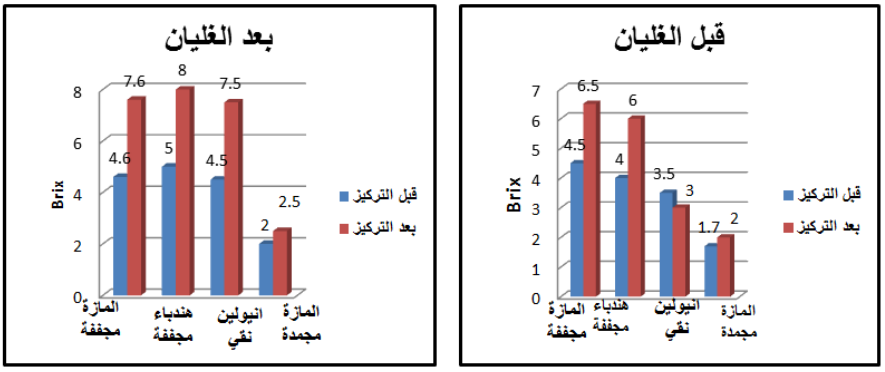
شكل 3 :شراب الفركتوز المنتج باستخدام انزيم الانيولينيز الخام المنتج من العزلة *A. oryzae* بعد الغليان وبعد التركيز.

يوضح جدول 4 رقم الهيدروجين ونسبة المواد الصلبة الكلية (% Brix) لمستخلصات الانيولين قيد الدراسة فنلاحظ ان رقم الهيدروجين بعد 24 ساعة من التحلل لمستخلص Af كان اعلى من المستخلصات جميعها ، اذ بلغ 6.7 في حين بلغت القيم لباقي المستخلصات الأخرى بين 5.2– 5.6 ، على الرغم من إن رقم الهيدروجين المستخدم لاذابة المستخلصات كان 5.5 والأنزيم المضاف كان عند رقم الهيدروجين 5 Pennsylvania Avenue وWashington (8) إلى ان رقم الهيدروجين لشراب الذرة عالي الفركتوز تراوح بين (3.5– 5.5) وقد يعزى هذا الاختلاف إلى نوع المصدر المنتج منه الشراب أو اختلاف التركيز المستخدم واجري هذا الفحص للتأكد من إن عمل الانزيم كان عملاً انزيمياً بحتاً ولم يكن هناك تفاعل حامضي بفعل رقم الهيدروجين وهذا يدل على عدم وجود حامض اخر قد يكون انتجه الكائن اثناء عملية الإنتاج أو بسبب الحرارة العالية المستخدمة فوجود انخفاض في رقم الهيدروجين مع حرارة عالية يسبب تحللا كيميائياً وليس انزيمياً ، اما نسبة المواد الصلبة الكلية (%Brix) فقد جرى قياسها لحالات المستخلصات الاربعة (1,2,3,4) أذ نلاحظ من جدول 4 زيادة تركيز المواد الصلبة لمستخلص CHd في الحالة رقم 4 بلغت 8 % مقارنة بتركيز المستخلص نفسه في الحالة رقم 2 الذي بلغ 6 % فيما كانت النسبة 4 % و 5% في الحالتين الاولى والثالثة على التوالي وهذا دلالة على إن عملية الغليان ساعدت في استخلاص المواد الصلبة وزيادة نسبتها في حين بلغت نسبة المواد الصلبة في المستخلص Ad 6.5 % في الحالة رقم 2 وارتفعت الى 7.6% في الحالة رقم 4 وكذلك الحال بالنسبة لمستخلص Af ولكنه انخفض بشكل كبير عن مستخلص Ad ، وقد يعود السبب إلى تأثير التجميد في انخفاض نسبة المواد الصلبة الكلية فكانت نسبة المواد الصلبة الكلية 1.7 % في الحالة رقم 1 ارتفعت لتصل الى 2% في الحالة رقم 3 (بعد الغليان) اما نسبتها فكانت 2% في الحالة رقمي 2 و2.5 في الحالة رقم 4 كما موضح في شكل 4.

جدول 4 رقم الهيدروجين ونسبة المواد الصلبة الكلية (% Brix) للمستخلصات قيد الدراسة

الانموذج	pH بعد 24 ساعة	Brix % (20^{0}C)			
		قبل الغليان		بعد الغليان	
		قبل التركيز (1)	بعد التركيز (2)	قبل التركيز (3)	بعد التركيز (4)
هندباء مجففة (CHd)	5.2	4.0	6.0	5	8
المازة مجففة (Ad)	5.4	4.5	6.5	4.6	7.6
انيولين نقي (I)	5.6	3.5	3	4.5	7.5
المازة مجمدة (Af)	6.7	1.7	2	2	2.5

*رقم الهيدروجين قبل المعاملة =5.5



شكل **4**: تأثير عملية الغليان في نسبة المواد الصلبة الكلية المستخلصة (**Brix**)% قبل وبعد تركيز المستخلص.

المصادر

1– القرغولي، اسراء عبيد جياد (**2012**). إنتاج الانيولينيزات من العزلة الفطرية المحلية ***Aspergillus oryzae*** بوساطة تخمرات الحالة الصلبة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة – جامعة بغداد.

2 -Balayan, L. M.; I. A. Pivazian; R. N. Khachaturian; I. G. Afrikianand and V. A. Abelian (1996). Inulinases from Penicilliumpalitans and Penicilliumcyclopium. Biochemistry, 61:645–650.

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

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

5-Coussement; P. A. A. (1999). Inulin and oligofructose: Safe intakes and legal status. J. Nutr. (Suppl. 7),129: 1412–1712.

6-Liu, X. Y.; Z. hi; G. L. Liu; F. Wang; C. Madzak and Z. M. Chi (2010). Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surfaceengineeredYarrowialipolytica displaying inulinase, Metabolic Engineering, 12: 469-476.

7-Mandels, M.; R. Andreotti and C. Roche (1976). Measurement ofsaccharifying cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp,6:17-23.

8-Pennsylvania Avenue, N. W. and D. C. Washington (2006). Nutritive Sweeteners From Corn 8th. Corn Refiners Assciationnn,202-331-1634.

9-Ronkart, S. N.; C. S. Blecker; H. Fourmanori, C. Fougnies; C. Deroanne; J.Van Herck and M. Paquot (2007). Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolosis. Analytica Chimica Acta, 604:81-87.

10-Sangeetha, P. T.; M. N. Ramesh and S. G. Prapulla (2005). Recent trends in microbial production, analysis, and applications of fructooligosaccharides, Trends Food Sci. Technol,16:442–457.

11-Vandamme, E. J. and D. G. Derycke (1983). Microbial inulinases: Fermentation process, properties and applications. Adv. Appl. Microbiol., 29: 139–176.

12-Vuyo, B. M. (2004). Isolation purification and characterization of inulin and fructooligosaccharides from chicoriumintybus and inulinase from aspergillus niger. M. Sc. Rhodes of University.

13-Whitaker, J. R. and R. A. Bernard (1972). Experiment for An introduction to Enzymology. The Wiber Press. Davis.

14-Wiley, J. and Sons (1978). Production of fructose syrups from Inulin-containing plants. Inc. Biotechnology and Bioengineering, 20(3):447-450.

PRODUCTION OF HIGH FRUCTOSE SYRUP BY ENZYMATIC ANALYSIS OF INULIN EXTRACT FROM SOME ROOT PLANTS

I. O. Chyad* **A. H. Al-Bayyar****
R. Abd-Elminaam* **W. H. Salih***

ABSTRACT

The aim of this study is using different methods to extract inulin from local dried and freezed plants to produce high fructose syrup by enzymatic method with local fungal inulinase. Inulin of some local plants, include dried and frozen Jerusalem artichoke and wild Dandelion was extracted by using boiling method and concentration and without both methods in producing high fructose syrup by inulinase produced by Aspergillus oryzae in comparison with pure inulin. Dried Dandelion gave the high fructose concentration after enzyme adding before boiling and concentration (32.6 mg/ml), and after boiling and concentration was (42.4 mg/ml) which was the second after pure inulin (47.79 mg/ml). pH and total solids (Brix%) for inulin extracts were measured, it is found that after 24 hours of analysis, the frozen Jerusalem artichoke extract record pH= 6.7 while other extracts were between 5.2- 5.6, total solids percentage was increased for dried Dandelion which was 8% after boiling and concentration.

* Directorate Agric. Res., Ministry of Agric., Baghdad, Iraq.
** College of Agric., Baghdad Univ., Baghdad, Iraq.