استخلاص وتنقيه إنزيم التربسين من القناة الهضمية لسمك الجري *Siluris glanis* ودراسة بعض صفاته واستعمالاته التطبيقية

هند كمال علي خالدة عبد الرحمن شاكر

الملخص

عزل التربسينوجين من القناة الهضمية لسمك الجري بواسطة محلول الفوسفات الدارئ بتركيز0.2 مولار ورقم هيدروجيني 6.0 الحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 6% وفي درجة حرارة 4°م. نشط المستخلص الخام بخفض رقمه الهيدروجيني إلى 1.8 ثم عدل إلى 6، وتمت تنقيته بعد ترسيبه بملح كبريتات الامونيوم بنسبة تشبع 50%، وذلك باستخدام عمود كروماتوكرافي التبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose تبع ذلك كروماتوكرافي الترشيح الهلامي خلال عمود Sephadex G-100. كانت الفعالية النوعية والحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية النهائية بواقع 120 وحدة/ملغم و31.57% و145.27 مرة على التوالي. ثم درست بعض من صفاته، إذ بلغ وزنه الجزيئي 23442 دالتون عند تعيينه بطريقة الترشيح الهلامي بأستخدام عمود Sephadex G-100، وكان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم 5.5. امتلك الانزيم ثباتاً في مدى من قيم الارقام الهيدروجينية تراوحت بين 4.5-6.5 وأبدى الانزيم المنقى أقصى فعالية في درجة حرارة 40°م. اشارت نتيجة دراسة الثبات الحراري الى احتفاظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه في درجات حرارة تراوحت بين 20-40°م لمدة 15 دقيقة. وفي المجال التطبيقي تم استعمال المستخلص الخام في تحضير الجيلاتين من جلد السمكة ذاتها ومقارنتها بتلك المستحصلة بالطريقة الحامضية وبلغت الحصيلة للجيلاتين المنتج بالطريقة الإنزيمية 7.61%. أما بالطريقة الحامضية فقد كانت بواقع 4.03%.

أشارت نتائج دراسات الخصائص للجيلاتين المنتج إلى أن اللزوجة، والذوبانية وامتصاص الماء كانت بواقع 10.52mposie و94 % و0.5 مل/غم على التوالي للجيلاتين المنتج بالطريقة الإنزيمية و10.03mposie و91% و0.3 مل/غم على التوالي للجيلاتين المنتج بالطريقة الحامضية.

المقدمة

تعد الإنزيمات المحللة للبروتينات ذات أهمية صناعية فهي تمثل أكثر من نصف الإنزيمات المسوقة للأغراض التجارية. ويعد التربسين من اهم أنواع العائلة السيرينية الموجودة في القناة الهضمية للفقريات واللافقريات جميعها والتي تؤدي عملاً رئيسياً في الفعاليات الحيوية كعمليات الهضم وتنشيط الصورة غير الفعالة لإنزيم الكايموتربسين والإنزيمات الأخرى وهي تحلل البتيدات والاسترات للأحماض الامينية مثل اللايسين والارجنين. ويعد تربسين الأسماك الأكثر أهمية، إذ انه يكون مناسباً لعدد كبير من عمليات التصنيع الغذائي لذلك تركزت الدراسات على هذا الإنزيم إذ إن نمو الأسماك يعتمد مثل باقي الحيوانات على كفاءة هضم البروتين بواسطة الإنزيمات الهاضمة التي تشمل التربسين والكايموتربسين والايلاستيز وجميعها تقع في القناة الهضمية وهذه الإنزيمات الثلاثة تؤدي عملاً أساسياً في تحويل البروتينات المهضومة إلى أحماض امينية مفردة تمتص عبر النسيج الطلائي للمعي (30). وكما هو معروف أن أحشاء الأسماك ترمى كفضلات مما يساهم في تلوث البيئة لذلك جاءت هذه الدراسة في محاولة جديدة لاستغلال الفضلات السمكية في إنتاج إنزيمات محللة للبروتين التي بإمكانها أن تكون بدائل محلية مناسبة لمثيلاتها المستوردة بالعملة الصعبة والمستخدمة في عمليات التصنيع الغذائي.

جزء من رسالة ماجستير للباحث الأول.

كلية الزراعة – جامعة بغداد– بغداد، العراق.

المواد وطرائق البحث

استخلاص الإنزيم

اجري استخلاص الانزيم من القناة الهضمية لسمك الجري وحسب الطريقة الموصوفة من قبل حمادي (4) باستعمال محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 6.0 الحاوي على 6% كلوريد الصوديوم بعد تنظيفها بالماء البارد وحفظها بالتجميد لمدة 24 ساعة في درجة حرارة -18°م ، استبعدت الاجزاء اللحمية باستعمال قماش الململ، ثم أجريت عملية النبذ المركزي المبرد على سرعة 2800 xg لمدة 15 دقيقة/ 4°م ثم اخذ الراسب (precipitate) وقدر حجمه والفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين وحسبت الفعالية النوعية.

الفعالية الإنزيمية

قدرت فعالية إنزيم التربسين تبعاً لطريقة Schwert and Takenaka(32) و Walsh and Wilcox (33) باستعمال الاسترات كمادة اساس وقد استعمل نوعان من الاسترات لتقدير الفعالية وهما benzoyl–L arginine ethyl ester (BAEE) و P– toluenesulfonyl – L–arginineethyl ester(TAME).

تركيز البروتين

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل Bradford (7) لتقدير البروتين.

تنقية الإنزيم

نقي الإنزيم الخام بترسيبه باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسب إشباع تراوحت بين 20-50% تبعتها خطوة التبادل الأيوني باستخدام DEAE-Cellulose ذي ابعاد (2.5×40 سم) تمت الموازنة باستخدام محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 0.02 مولار ورقم هيدروجيني 6.0 واستردت الأجزاء المرتبطة بالمبادل بمحلول الموازنة نفسه والمحتوي على تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم تراوحت 0-1 مولار. جمعت الاجزاء المحتوية على الفعالية الانزيمية وجرت عملية التنافذ الغشائي مقابل محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.02 مولار على درجة حرارة 4°م، قدرت فعالية الانزيم وحدد تركيز البروتين فيه وتم تركيزه باستخدام PEG-10000 البولي اثلين كلايكول ثم مرر على عمود Sephadex G-100 بأبعاد 1.8×70سم كخطوة تنقية اضافية وجمعت الاجزاء الانزيمية لاكمال الخطوات التالية في هذه الدراسة.

توصيف الانزيم شمل اجراء الاختبارت التالية للانزيم المنقى

تقدير الوزن الجزيئي لانزيم التربسين بطريقة الترشيح الهلامي Gel filtration

استخدم عمود هلام السيفادكس (Sephadex G- 100) بأبعاد 1.8×70سم. قدر حجم الفراغ (Vo) للعمود بإمرار محلول الدكستران الأزرق (بتركيز 5 ملغم/ملتر) واحتسبت مجموع حجوم الأجزاء المنفصلة من بداية إمرار محلول الدكستران إلى قمة امتصاصه على طول موجي 600 نانومتر. أما حجوم الاسترداد (Ve) للبروتينات القياسية (Bovine Serum Albumin, 67000)، (Pepsin, 35000)، (Trypsin, 23000)، HEW (Lysozyme 14400) والأنزيم فقد قدرت بجمع الاجزاء بالطريقة نفسها وقراءة الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانومتر ثم اعتمدت العلاقة الخطية بين نسبة حجم استرداد كل بروتين قياسي إلى حجم الفراغ (Ve/Vo) مقابل لوغاريتم وزنه الجزيئي لتقدير الوزن الجزيئي.

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الانزيم

لتعيين الأرقام الهيدروجينية المثلى لفعالية الانزيم وثبات الانزيم استخدمت ثلاثة أنواع من المحاليل الدارئة بتركيز 0.2 مولار وهي محلول خلات الصوديوم الدارئ وبأرقام هيدروجينية تراوحت بين 3.5-5.5، محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بأرقام هيدروجينية تراوحت بين 6.0- 7.5، محلول Tris-HCL الدارئ وبرقم هيدروجيني 8.0 باستخدام محلول المادة الأساس (BAEE) وذلك بتحضين المستخدم عادة كركيزة لعمل الأنزيم مع المحاليل الدارئة (3.5-8.0) في أنابيب اختبار لمدة 15 دقيقة في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي واستخدم كركيزة لقياس الفعالية الأنزيمية ثم رسمت العلاقة بين الفعالية الإنزيمية والرقم الهيدروجيني لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم.

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم

تم حضن حجم معين من الأنزيم النقي في حجم مساوٍ له من المحاليل الدارئة ذات قيم الأرقام الهيدروجينية المختلفة (3.5- 8.0) المذكورة في الفقرة السابقة في أنابيب اختبار لمدة 15 دقيقة في حمام مائي بدرجة 37°م ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي وبعدها جرى قياس فعالية الأنزيم المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الأنزيم غير المعامل ثم رسمت العلاقة بين الفعالية الإنزيمية المتبقية (%) مقابل الأرقام الهيدروجينية لمحلول الأنزيم لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم.

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

قدرت فعالية الأنزيم على درجات حرارية مختلفة تراوحت بين 20-60°م عند الرقم الهيدروجيني الأمثل للتفاعل حسب طريقة Schwert and Takenaka (32) وWalsh and Wilcox (33).

دراسة الثبات الحراري للانزيم

حضن الأنزيم في حمام مائي في درجات حرارية مختلفة تراوحت (20-60م) لمدة 15 دقيقة ثم بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي وأضيف لها محلول التفاعل (BAEE) بالرقم الهيدروجيني الأمثل وجرى تقدير الفعالية الأنزيمية المتبقية ورسمت العلاقة الخطية بين فعالية الإنزيم المتبقية (%) اتجاه درجات الحرارة المختلفة لتعيين درجة الحرارة المثلى لثبات الإنزيم.

استخدام الإنزيم المنقى جزئياً في تصنيع الجيلاتين من جلود الأسماك ذاتها

استعمل التربسين المستخلص من القناة الهضمية لسمك الجري بعد خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم في تصنيع الجيلاتين وقورنت الخواص الكيميائية والفيزيائية للجيلاتين المصنع مع الجيلاتين المصنع بالطريقة الحامضية باستعمال حامض الهيدروكلوريك وتحت الظروف نفسها وحسب الطريقة الموصوفة من قبل البياتي (1).

التحليل الكيميائي Chemical Analysis

البروتين Protein

تم تقدير النتروجين الكلي حسب طريقة نصف مايكروكلدال Semi-Micro Kjeldahl والموضحة في Pearson (28) وضرب الناتج في ثابت الجيلاتين 5.55.

الخواص الوظيفية Functional Properties

الذوبان Solubility: اتبعت طريقة Betschart (8) في تقدير قابلية البروتين على الذوبان.

امتصاص الماء Water absorption: اتبعت طريقة Beuchat (9) في تقدير قابلية البروتين على حمل الماء.

خاصية الاستحلاب **Emulsification Property**: اتبعت طريقة **Hindi** (16) في تقدير قابلية البروتينات على الاستحلاب.

اللزوجة **Viscosity**: اتبعت طريقة **Sathe and Salunkhe** (31) في تقدير لزوجة البروتينات واستخدام جداول خاصة (17) لاستخراج الكثافة النوعية ولزوجة الماء عند درجات حرارية مختلفة.

التهليم **Gelation**: اتبعت طريقة **Miller and Groninger** (26) في تقدير قابلية البروتينات على تكوين الهلام.

النتائج والمناقشة

استخلاص الإنزيم

استخلاص وتركيز وتنقية الإنزيم

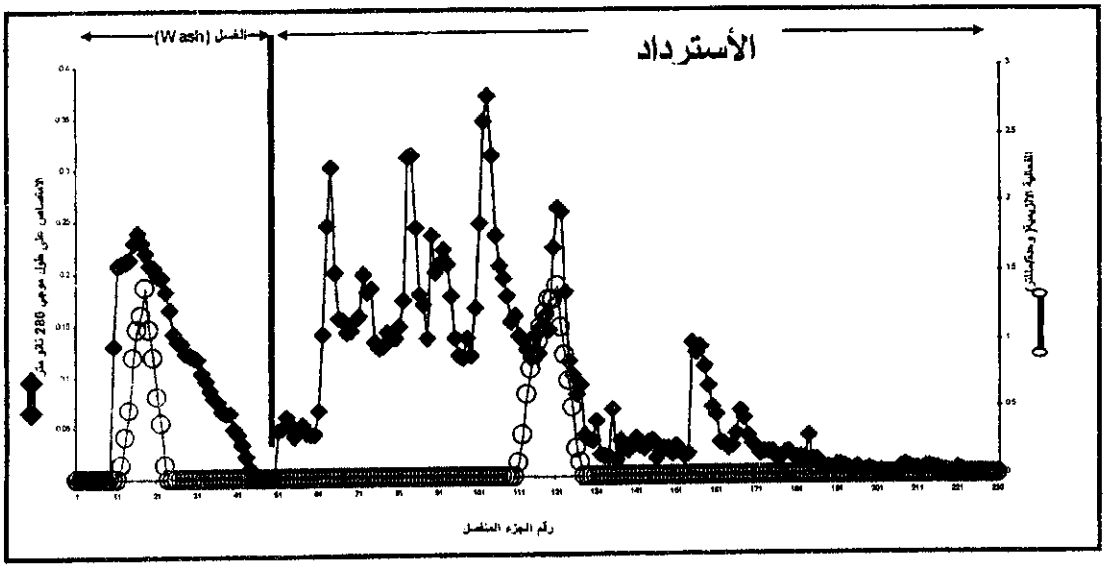
يبين جدول (1) طريقة التنقية بخطواتها نتائجها والتي تضمنت تركيز الانزيم الخام باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين20-50 % واتضح من النتائج ان نسبة الاشباع 20-50% اعطت اعلى فعالية انزيمية ثم تلتها خطوة استخدم فيها المبادل الايوني السالب **DEAE-Cellulose** ونتيجة لهذه الخطوة من التنقية تم الحصول على عدة قمم بروتينية (شكل 1) ظهرت قمة واحدة منها في جزء الغسل والتي تمثلت في الانابيب (12–23) التي اعطت فعالية أتجاه (BAEE) ولم تظهر اية فعالية أتجاه (TAME) ويمكننا القول بان انزيم الكايموتربسين، إذ انه لايعمل على تحليل (TAME)، كما يلاحظ من الشكل نفسه ظهور قمم بروتينية عدة في مرحلة الاسترداد (Elution) وقد استردت هذه البروتينات باستخدام التدرج الملحي الخطي (Gradiant) لملح كلوريد الصوديوم بتراكيز تراوحت 0-1 مولار. وبعد جمع الاجزاء التي اظهرت فيها فعالية انزيم التربسين مع بعضها التي تمثلت في الانابيب (111–127) اجريت لها عملية التنافذ الغشائي أتجاه الماء المقطر وكانت الفعالية النوعية وعدد مرات التنقية والحصيلة الانزيمية لهذه الخطوة من التنقية هي 35 وحدة/ملغم، 42.37 مرة و36.84% على التوالي، ويعد ظهور الفعالية الانزيمية في جزء الاسترداد من عمود المبادل الايوني السالب **DEAE-Cellulose** تأكيداً على ان الانزيم يرتبط بالمبادل و يحمل حصيلة شحنة سالبة. ثم استكملت عملية التنقية باستخدام تقنية الترشيح الهلامي في عمود **Sephadex G-100** وكانت الفعالية النوعية وعدد مرات التنقية والحصيلة الانزيمية الناتجة عن هذه الخطوة هي120 وحدة/ملغم و145.27 مرة و31.57% على التوالي جدول (1).

جدول 1: خطوات تنقية إنزيم التربسين المستخلص من القناة الهضمية لسمك الجري

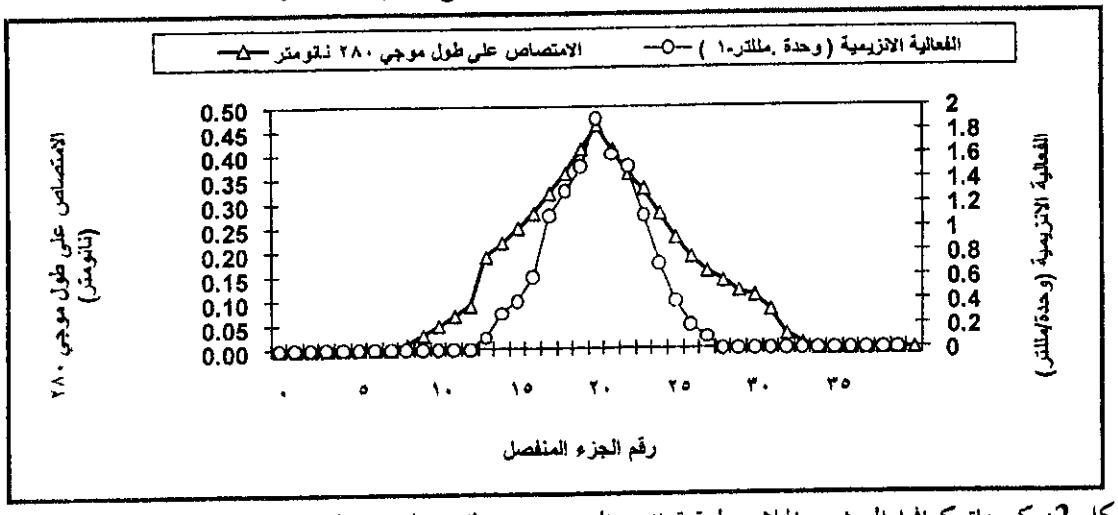
خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية (%)
المستخلص الخام	200	1.9	2.30	0.826	380	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم (20–50%)	20	16	1.33	12.03	320	14.56	84.21
المبادل الأيوني DEAE- Cellulose	10	14	0.40	35	140	42.37	36.84
الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G - 100	10	12	0.10	120	120	140.27	31.57

استخدمت تقنية التبادل الأيوني والترشيح الهلامي في العديد من الدراسات الخاصة بتنقية إنزيم التربسين من مصادرة المختلفة إذ استعملت تقنية التبادل الأيوني باستعمال **DEAE-Cellulose** في تنقية إنزيم التربسين من مسارق الأعور البوابي لسمك (***Pomatomus saltatrix***) **bluefish**، وقد حققت فعالية نوعية وتركيز بروتين وعدد

مرات تنقية وحصيلة انزيمية بواقع 9.44 وحدة/مل، 8.4 ملغم/مل، 85.5 مرة و22% (22). واستعملت تقنية الترشيح الهلامي باستعمال هلام Sephadex G-100 في تنقية انزيم التربسين من أمعاء الكارب العشبي grass carp (*Cienopharyngodon idellus*) وسمك bigeye (*Priacanthus macracanthus*) snapper وقد حققت هذه الخطوة فعالية نوعية وتركيز بروتين وعدد مرات تنقية وحصيلة انزيمية بواقع 4.40 وحدة/مل، 1.57 ملغم/مل، 15.7 مرة و23% للنوع الاول، و4.47 وحدة/مل و4.3 ملغم/مل و40.6 مرة و53.2 % للنوع الثاني على التوالي (15، 34).



شكل 1: كروماتوكرافي التبادل الأيوني لتنقية إنزيم التربسين من القناة الهضمية لسمك الجري باستخدام المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بأبعاد 2.5×40 سم تمت الموازنة بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 6 استرد الإنزيم بالمحلول الدارئ نفسه والحاوي على كلوريد الصوديوم وبتراكيز تراوحت بين 0.1 – 1 مولار وبسرعة جريان 30 مل/ساعة بواقع 3 مل للجزء الواحد

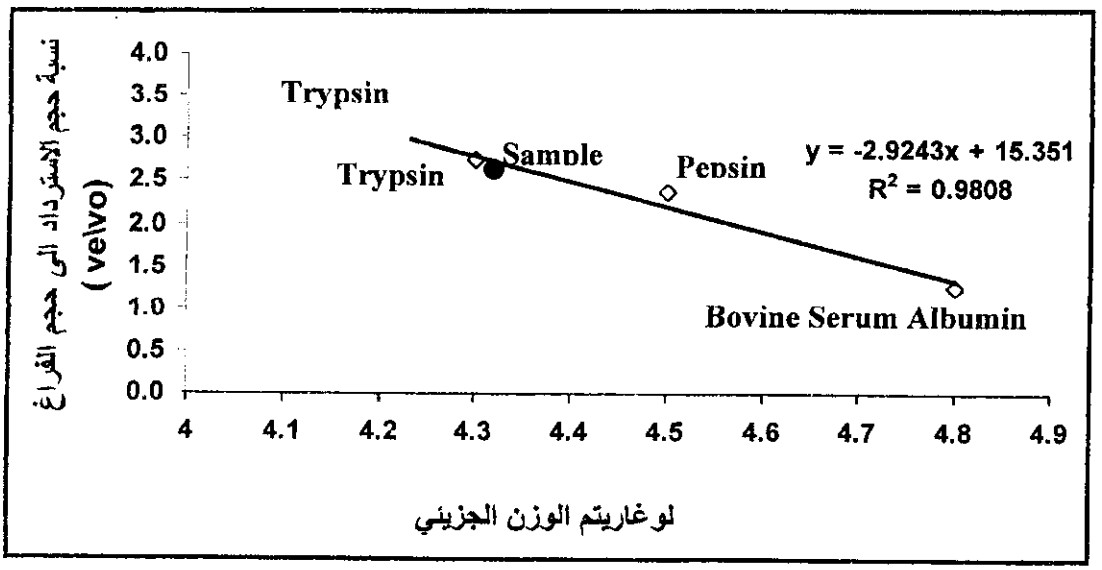


شكل 2: كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي لتنقية إنزيم التربسين من القناة الهضمية لسمك الجري باستخدام عمود من هلام السيفادكس Sephadex G- 100 بأبعاد 1.8×70 سم لتنقية أنزيم التربسين تمت الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0. 02 مولار وبرقم هيدروجيني 6 بسرعة جريان 20 مل/ساعة بواقع 3 مل للجزء الواحد

توصيف الإنزيم

الوزن الجزيئي

قدرالوزن الجزيئي للأنزيم المنقى بطريقة الترشيح الهلامي، إذ استخدم عمود **Sephadex G - 100** ومن خلال رسم العلاقة ما بين نسبة حجم الاسترداد إلى حجم الفراغ للبروتينات القياسية ولوغاريتم الوزن الجزيئي شكل (3) كانت قيمة الوزن الجزيئي المستحصلة لأنزيم التربسين الذي تم إنزاله على العمود السابق نفسه هي **23442** دالتون وعند مقارنة نتيجة هذه الدراسة مع نتائج دراسات سابقة أجريت بصدد موضوع تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم التربسين وجد أن الوزن الجزيئي للأنزيم يختلف باختلاف المصادر التي استخدمت لعزلة إلاّ إنّها كانت مقاربة للنتيجة التي وجدها **Hau** و **Benjakul** (15) الذي ذكر إن الوزن الجزيئي لأنزيم التربسين المنقى من مساريق الأعور البوابي لسمك (***Priacanthus macracanthus***) **bigeye snapper** هي **23800** دالتون باستعمال **SDS-PAGE**، والوزن الجزيئي لتربسين سمك (***Tilapia nilotica***) **Boltfish** بلغ **23000** دالتون (11).بينما تختلف عن النتيجة التي استحصلت سابقاً (22، 23) من إن الوزن الجزيئي لتربسين اسماك (***Sarda sarda***) **Atlantic bonito** بلغ **29000** دالتون واسماك (***Pomatomus saltatrix***) **Blue fish** بلغ **28000** دالتون.



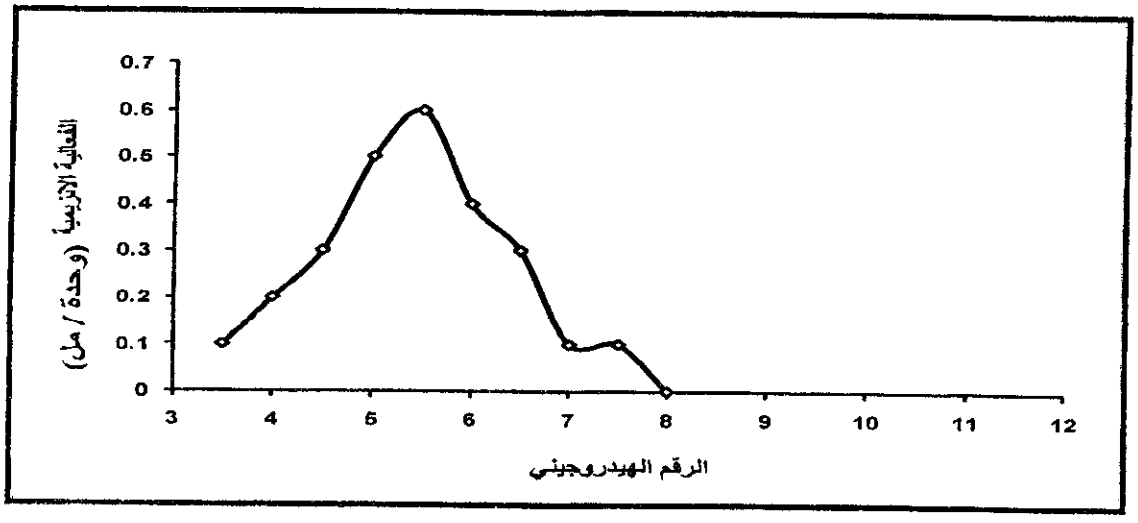
شكل 3: المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لإنزيم التربسين بطريقة الترشيح الهلامي في عمود السيفادكس **Sephadexs G -100** بأبعاد (1.8×70) سم

الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم التربسين

بينت النتائج الموضحة في شكل (4) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم كان عند **5.5** بينما شهدت الفعالية الأنزيمية انخفاضاً عند الأرقام الهيدروجينية المتطرفة **3.5** و**8.0**، إذ يؤثر الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في الحالة الأيونية للمجاميع الحفزية **Catalytic group** الموجودة في الموقع الفعال للأنزيم او يؤثر في الحالة الأيونية لمعقد المادة الأساس والإنزيم [ES] ومعقد الإنزيم والناتج [EP].

جاءت النتيجة مقاربة إلى النتيجة التي توصل لها **Diaz** (10) من ان اعلى فعالية اظهرها انزيم التربسين المستخلص من اسماك (***Epinephilis guttatus***) **Red hind** كانت عند رقم هيدروجيني **6.0**. واختلفت مع

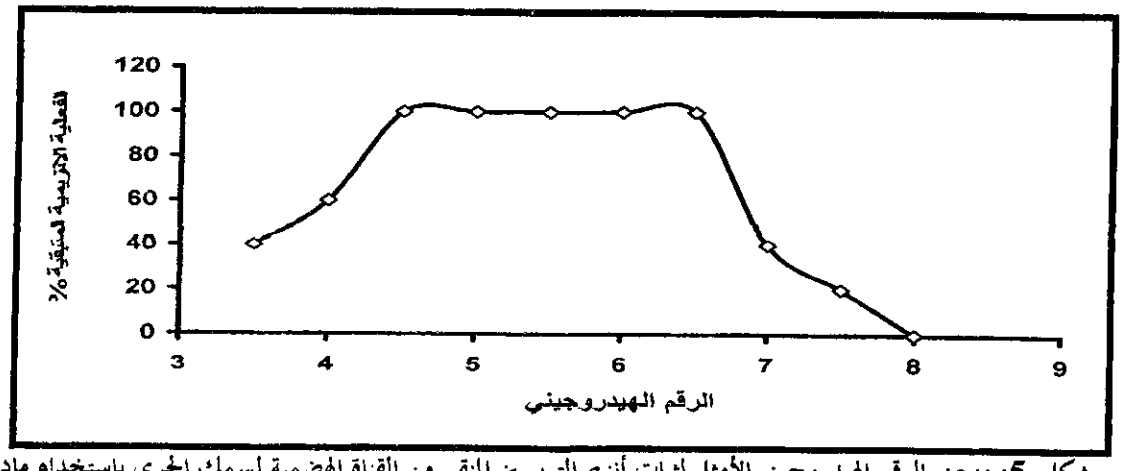
ماذكره Zhong وجماعته (34) من إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم التربسين من أمعاء الكارب العشبي grass carp *Cienopharyngodon idellus* يبلغ 8.5.



شكل 4: منحنى الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم التربسين المنقى من القناة الهضمية لسمك الجري باستخدام مادة التفاعل (BAEE) وأرقام هيدروجينية تراوحت بين (3.5 – 8) وبدرجة حرارة 37°م

الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم التربسين

يتضح من شكل (5) الذي يمثل ثبات أنزيم التربسين أتجاه الأرقام الهيدروجينية المختلفة أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم يتراوح بين 4.5-6.5، إذ احتفظ الأنزيم 100% من فعاليته عند حضنه على الأرقام الهيدروجينية المذكورة لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 37°م. بعدها انخفضت الفعالية الانزيمية في الأرقام الهيدروجينية المتطرفة، وهذا يعني ان الانزيم يكون ثابتاً في الاوساط الحامضية والمتعادلة. ولم تتفق نتيجة الدراسة الحالية مع نتائج دراسات أخرى تناولت إنزيم التربسين من مصادر سمكية مختلفة، فقد ذكر Kristjansson (24) بأن الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم التربسين المنتج من التراوت القزحي (*Oncorhynchus mykiss*) rainbow trout كان بمدى يتراوح بين 5.4–8. ويعزى الاختلاف في نتائج الدراسة الحالية عن الدراسات ذات العلاقة الى ان تربسين سمك الجري يتميز بارتفاع محتواه من الحامض الاميني (Glutamine) مما يجعله من البروتيزات الحامضية وليست القاعدية كتربسين الأبقار والخنازير والأسماك الأخرى الذي يكون قاعدياً.

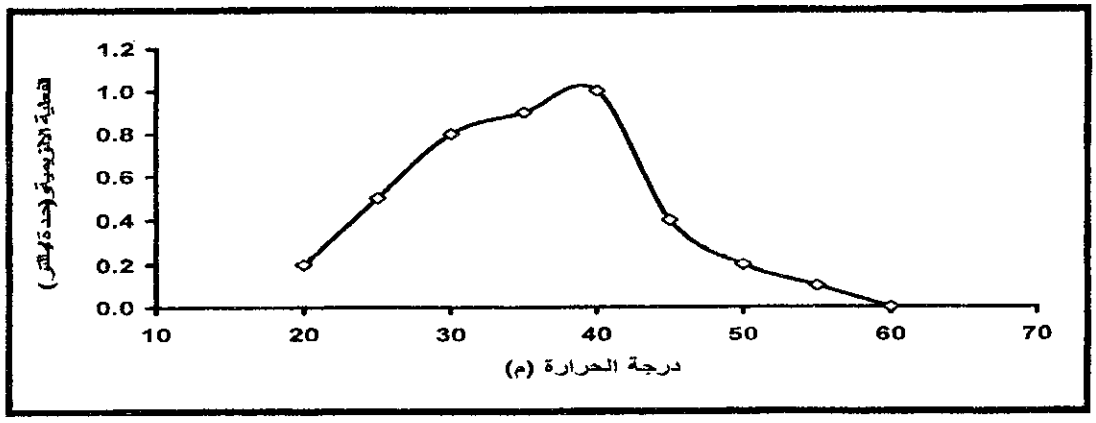


شكل 5: منحنى الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات أنزيم التربسين المنقى من القناة الهضمية لسمك الجري باستخدام مادة التفاعل (BAEE) وأرقام هيدروجينية تراوحت بين (3.5 – 8) وبدرجة حرارة 37 م

تأثير درجة الحرارة في فعالية انزيم التربسين

يلاحظ من شكل (6) زيادة الفعالية الانزيمية بارتفاع درجة الحرارة لتصل الى اقصاها عند درجة حـــرارة 40°م ثم أخذت بالانخفاض التدريجي عند ازدياد درجة الحرارة عن تلك الدرجة ويلاحظ إن الإنزيم فقد فعاليته بالكامـــل عنـــد حرارة 60°م جاءت النتيجة متوافقة مع ما وجده **Reguel** (29) من ان اعلى فعالية ابداها انزيم التربسين المنقى مـــن اسماك **White grunt** (***Haemulon plumierii***) كانت على درجة حرارة 40°م.

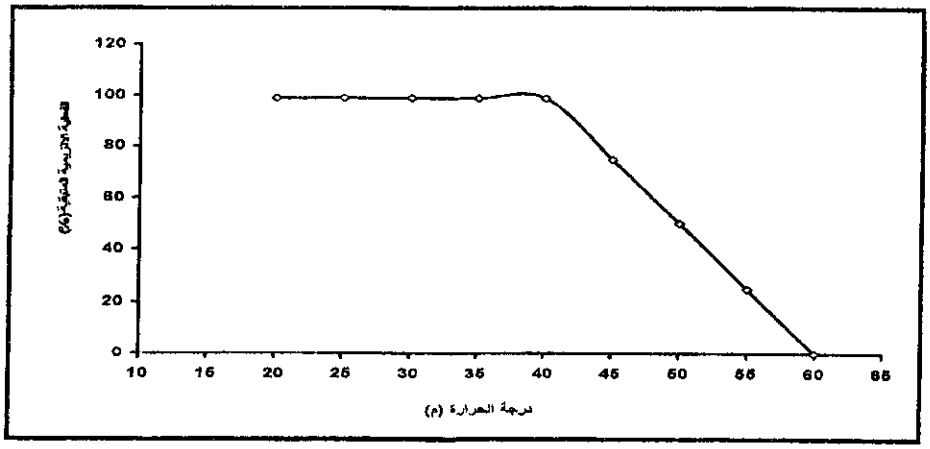
ولم تتفق النتيجة مع ما وجده **Jeong** وجماعته (19) من ان درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم التربسين المنقـــى من مساريق الاعور البوابي **Crawfish (pracambarus clarkia)** بلغت 60°م.



شكل 6: منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم التربسين المنقى من القناة الهضمية لسمك الجري باستخدام مادة التفاعل **BAEE** ودرجات حرارة تراوحت بين 20–60°م وبرقم هيدروجيني 5.5

تأثير درجة الحرارة في الثبات الحراري لأنزيم التربسين

يتضح من النتائج ان الانزيم احتفظ بمقدار 100% من فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة بين 20-40°م لمدة 15 دقيقة بعدها بدأت الفعالية الانزيمية بالانخفاض التدريجي بارتفاع درجات المعاملة الحرارية لتصل الى 80% من فعاليته الكلية بعد حضنه على 45°م لمدة 15 دقيقة و50% عند معاملة الانزيم بدرجة حرارة 50°م لمدة 15 دقيقة وفقد الانزيم قيد الدراسة فعاليته كاملة عند حضنه على 60°م لمدة 15 دقيقة. وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع مـــا أشـــارت إليها دراسات أخرى تناولت تأثير درجة الحرارة في ثبات أنزيم التربسين إذ ذكـــر **Kishimura** و **Hayashi** (20) بأن أنزيم التربسين المنتج من مساريق الأعور البوابي لسمك **starfish** (***Asterim Pectinifera***) يحـــتفظ بفعاليتـــه كاملة عند حضنه في درجات حرارة تراوحت بين 20– 40°م لمدة 15 دقيقة. في حين لم تتفق النتائج مع مـــا ذكـــره **Kishimura** وجماعتـــه (21) بأن أنزيم التربسين المنتج من مساريق الأعـــور البـــوابي **Sardina** (***Sardinops melanostictus***) يكون ثابت بدرجات حرارة تراوحت بين 20– 50°م بينما يكون أنزيم التربسين المنتج من مساريق الأعور البوابي **arabesque greenling** (***Pleuropramnus ozonus***) يكون ثابت بدرجات حرارة اقل مـــن 20°م ويبدأ بفقدان فعاليته بسرعة بدرجات حرارة أعلى من 30°م.



شكل 7: منحنى درجة الحرارة المثلى لثبات إنزيم التربسين المنقى من القناة الهضمية لسمك الجري باستخدام مادة التفاعل (BAEE) ودرجات حرارة تراوحت بين 20-60 م وبرقم هيدروجيني 5.5.

التركيب الكيميائي للجيلاتين

جدول 2: قيم النتروجين غير البروتيني للجيلاتين المنتج بالمعاملة الإنزيمية والمعاملة الحامضية ولمدد زمنية مختلفة وكذلك يوضح نسبة البروتين في كلتا المعاملتين ونسبة الحاصل

الزمن (ساعة)	النتروجين غير البروتيني (%)	المعاملة الإنزيمية (%)	المعاملة الحامضية (%)
2	NPN	0.0336	0.028
4	NPN	0.0532	0.0308
6	NPN	0.056	0.0364
-	البروتين	85.4	81.5
-	الحاصل	7.61	4.03

* علما إن نسبة النتروجين غير البروتيني في الجلد بلغت 0.0028 %

الخواص الوظيفية للجيلاتين

الذوبانية

بلغت النسبة المئوية لذوبان الجيلاتين المحضر بالمعاملة الإنزيمية والحامضية 94 و91% على التوالي، جاءت النتيجة مقاربة إلى النتيجة التي توصل اليها البياتي (1) عند دراسة لخاصية الذوبان للجيلاتين المنتج من جلود سمك الجري اذ بلغت 90.5%. ان إذابة البروتين او قابليته على الذوبان تتأثر بعوامل عدة منها درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني ونسبة أملاح كلوريد الصوديوم، إذ أن ارتفاع الرقم الهيدروجيني ودرجة حرارة الاستخلاص للبروتينات وانخفاض نسبة أملاح كلوريد الصوديوم يؤدي الى ارتفاع قابلية ذوبان البروتينات بشكل كبير وان قابلية الذوبان للبروتينات لها علاقة كبيرة مع محتوى هذه البروتينات من الأحماض الامينية. فقد بين ان محتواه من الأحماض الامينية المحبة للماء تجعل منه بروتيناً ذائباً وبدرجة كبيرة، اما اذا احتوى على نسبة اقل من هذه الأحماض الامينية الذي يكون على حساب زيادة نسبة الأحماض الامينية الكارهة للماء فانه يكون ممتصاً للماء وغير ذائباً فيه (25).

اللزوجة

قدرت اللزوجة لمحلول الجيلاتين بتركيز 1% وكانت **10.52** ملي بويز للجيلاتين المحضر بالمعاملة الإنزيمية و**10.03** ملي بويز للجيلاتين المحضر بالمعاملة الحامضية. تتأثر اللزوجة بعوامل عدة منها الرقم الهيدروجيني، ودرجة الحرارة، وعدد الجزيئات وحجمها وشكلها، والتفاعلات بين الجزيئات، ووجود المواد المتآينة (الأملاح) (**14**). وقد بين **Fernandez-Diaz** وجماعته (**12**) عند دراستهم لخاصية اللزوجة للجيلاتين الناتج من جلود الأسماك بان الجيلاتين المنتج يستخدم لزيادة اللزوجة في الأنظمة المائية وعلى هيئة هلامات مائية، اذ ان الجيلاتين السمكي يمتاز بلزوجته العالية جداً مع قدرة اضعف من جيلاتين اللبائن الأخرى لتكوين الهلام فهو يذوب او يتفكك بالحرارة بشكل أسرع وهذا يعني إمكان استعماله في التطبيقات ذات الحاجة لمحاليل عالية اللزوجة التي لا تتطلب تكوين هلام. كما لوحظ ان خاصية اللزوجة للجيلاتين المنتج من جلود الأسماك تعتمد على تركيب الأحماض الامينية لاسيما محتواه من **imino acid** وكذلك على الوزن الجزيئي (**13**).

التهليم

توضح النتائج في جدول (3) تأثير تركيز الجيلاتين في خاصية التهليم، إذ أن الهلام يكون ضعيفاً عند تركيز **1** و2% بينما يكون قوياً متماسكاً عند تركيز 3، 4 و5%، وهذا يعود إلى أن الجيلاتين المحضر من جلد سمك الجري يمتاز بقابلية ضعيفة على تكوين الهلام بسبب محتوى جيلاتين الأسماك من الأحماض الامينية لاسيما الكلايسين والبرولين والهيدروكسي برولين يكون منخفضاً مقارنة بجيلاتين اللبائن، إذ أن وجود الحامضيين الأمينين البرولين والهيدروكسي برولين ونسبة وجودهما فضلاً عن الأواصر الهيدروجينية والقوة الايونية والقوى الكارهة لماء تعطي صفات الثبات والقوة والقابلية على تكوين الهلام في محاليل الجيلاتين (**14**). وجاءت هذه النتيجة مقاربة لما وجده **Osborne** وجماعته (**27**) من أن هلام جيلاتين الأسماك يكون اقل ثباتية وأنه يذوب ويتفكك بدرجات حرارية منخفضة. وتبين النتائج أيضا ان لزيادة تركيز الجيلاتين الأثر البالغ في زيادة القدرة على تكون الهلام الصلب المتماسك، إذ يلاحظ إن الجيلاتين أعطى هلاماً صلباً في تركيز 3، 4 و5% وجاءت هذه النتيجة مقاربة لم جاء به العكيدي (3) الذي أكد أن زيادة التركيز والوقت لهما الأثر البالغ في تماسك وصلابة الهلام المتكون الذي يعبر عنه بقوة الهلام.

جدول 3: زمن تكوين الهلام

التركيز	المعاملة الإنزيمية	المعاملة الحامضية
%0.5	لم يتجلتن	لم يتجلتن
%1	لم يتجلتن	لم يتجلتن
%2	2.16 ساعة	4 ساعة
%3	1.1 ساعة	2.5 ساعة
%4	52 دقيقة	1.35 ساعة
%5	41 دقيقة	1.3 ساعة

امتصاص الماء

بلغت امتصاصية الماء للجيلاتين المحضر بالمعاملة الإنزيمية **0.5** مل/غم وبلغت **0.3** مل/غم للجيلاتين المحضر بالمعاملة الحامضية وقد يعلل هذا الاختلاف في قابلية الجيلاتين لامتصاص الماء باختلاف الطريقة المستخدمة في إنتاجه إلى المحتوى البروتيني في الجيلاتين الناتج وقابلية هذه البروتينات على الذوبان، إذ أن البروتينات غير الذائبة بصورة كاملة تزيد من قابلية الامتصاص إما البروتينات الذائبة فتعمل على تقليل كمية الماء الممتصة (25). كانت هذه النتائج متفقة مع

ماذكر سابقاً (5) عند قياس قابلية حمل الماء في الجيلاتين، إذ تبين بان الجيلاتين ليس له القدرة العالية على امتصاص الماء لأنه ذائباً فيه وجاءت هذه النتائج متفقه مع مابينه عبد الرحيم (6)، إذ أوضحت أن خاصية امتصاص الماء تتناسب تناسباً عكسياً مع الذوبانية. وعند دراسة قابلية حمل الماء للجيلاتين التجاري لوحظ أنها **0.4** مل ماء/غم جيلاتين وأنها مقاربة بدرجة كبيرة لقابلية حمل الماء في أنواع الجيلاتين قيد الدراسة.

الاستحلاب

بينت النتائج المستحصل عليها ثبات المستحلب للجيلاتين المحضر بالمعاملة الانزيمية لمدة ثلاث ساعات ونصف، ولمستحلب الجيلاتين المحضر بالمعاملة الحامضية ساعتين ونصف. إن زيادة قابلية البروتينات على الذوبان تعمل على زيادة ثباتية مستحلباتها من خلال توازن البروتينات المحبة للماء **hydrophilic** والبروتينات الكارهة للماء **hydrophobic** (18). كما توجد ان هنالك عوامل عدة تؤثر وبدرجة كبيرة في خاصية الاستحلاب ومنها درجة الحرارة أثناء تكوين المستحلب، ونوع المستحلب، وحجم القطرات الدهنية، ولزوجة المستحلب فضلاً على حركة واهتزاز المستحلب (2).

المصادر

1- البياتي، محمود احمد (2005). انتاج الجيلاتين من المخلفات الحيوانية ودراسة صفاتة النوعية على فترات خزنية مختلفة.اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة–جامعة البصرة–البصرة، العراق.

2- الجليلي، زهير فخري؛ عطاء الله سعيد وعزيز، سلوى ليلو (1985). إنتاج وحفظ اللحوم. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. كلية الزراعة– جامعة البصرة–البصرة، العراق.

3- العكيدي، حسن خالد حسن (1982). التروي بالجيلاتين. مجلة الصناعات الغذائية، العددان 1و2 السنة الثالثة.

4- حمادي، دينا سعاد (2001). فصل وتنقية وتوصيف البيبسين من معدة اسماك الجري ***Siluris glanis***. رسالة ماجستير– كلية الزراعة – جامعة بغداد– بغداد، العراق.

5- عبد الرحيم، بتول عبد الرحيم احمد والطائي، منيرعبود جاسم (2002). دراسة الخواص الحسية والكيميائية والوظيفية لفترات خزن مختلفة للجيلاتين المستخرج من عظام الطيور. مجلة البصرة للعلوم الزراعية. **15** (4): 117–128.

6- عبد الرحيم، بتول عبد الرحيم أحمد (2003). تحضير مركز بروتين الألياف العضلية لسمك الجري ***Silurus triostegus*** ودراسة تركيبه الكيميائي وخواصه الوظيفية والحسية مجلة أبحاث الطب البيطري .**1** (1،2): 51 – 58.

7- **Bradford, M.M. (1976). Arapid and sensitive method for the quantition of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protion-dyebinding. analytical biochemistry, 72 :248-254.**

8- **Betschart, A.A. (1974). Nitroigen Solubility of alfalfa protein concentrate as influenced by various factors .J. Food Sci.,39:1110-1115.**

9- **Beuchat, L.R. (1977). Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins. J. Agric. Food chem., 25:258-261.**

10- **Diaz, L. (1999). Trypsin in The Pyloric Caeca of The Grouper, (*Epinephelus guttatus)* Masters Thesis .University of Puerto Rico -Mayaguez Campus.**

11- **EL-Beltagy, A. E.; T.A. El-Adawy; E.H. Rahma and A.A. El-Bedawway (2005). Purification and characterization of alkaline protease from the viscera of bolti (*Tilapia nilotica*). J. Food Biochem, 29 :445-458.**

12- **Fernandez-Diaz, M.D.; P. Montero and M.C. Gomez-Guillen (2001). Gel properties of collagens from skins of cod and hake and their modification by the conhancers magnesiume sulphate, glycerol and transglutaminase. Food Chemistry, 74 :161-167.**

13- Gomez–Guillen, M.C. and P. Montero (2001). Extraction of gelatin fom megrim *(Lepidorhombus boscii)* skins with several organic acids . Journal of Food Science. 66 (2): 213-216.

14- Gomez-Guillen, M.C.; J. Turnay; M.D. Fernandez-Diaz; N. Ulmo; M.A. Lizarbe and P. Montero (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. Food Hydrocolloids, 16: 25-34.

15- Hau, P.V. and S. Benjakul (2006). Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (priacanthus macyacanthus) J. Food Biochem, 30: 478-495.

16- Hindi, M.J. (1979). The recovery of functional protein from fish waste. Ph.D. thesis. Loughborough University of Technology. England, p: 264.

17- Hodgman, C. D.; R.C. Weast and S.M. Selby (1962). Handbook of chemistry and physics. Chemical Rubber publishing Co., Ceveland, Ohio.

18- Huang, Y.T. and J.E. Kinsella (1987). Effect of phosphorylation on emulsifing and foaming properties and digestibility of yeast protein. J. Food Sci. 52:1684-168.

19- Jeong,Y.; C.I. Wei; J.F. Preston and M.R. Marshall (2000). purification and characterization of proteases from hepatopancrease of craw fish (*procambarus clarkii*) J. Food Biochem, 42: 311-332.

20- Kishimura, H. and K. Hayashi (2002). Isolation and characteristies of trysin from Pyloric Caeca of the starfish (*Asterim Pectinifera*). Com. Biochem. Physiol, B 132: 485-490.

21- Kishimura, H.; K. Hayashi; Y. Miyashita and Y. Nonami (2006). characteristies of trypsin from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and The pyloric caeca of arabesgue greenling *(Pleuroprammus ozomus*).Food Chem., 97: 65-70.

22- Klomklao, S.; S. Benjakul; W. Visessanguan; K. Kishimura and B.K. Simpson (2007b). Trypsin from the pyloric caeca of bluefish *(Pomatomus saltatrix)* .comp. Biochem. Physiol, 148 B:382-389.

23- Klomklao, S.; S. Benjakul; W. Visessanguan; H. Kishimura and B.K. Simpson (2007c). A29KDa protease from the digestive glands of Atlantic bonito (*Sarda sarda*):Recovery and characterization. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 55: 4548-4553.

24- Kristjansson, M.M. (1991). Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorchynchus mykiss*). J. Agric. Food Chem., 39:1738-1742.

25- Liu, H.; Li, D. and S. Guo (2008). Rheological properties of channel catfish (*Ictalurus punctaus*) gelatin from fish skin preserved by different methods. LWT-Food Science and Technology, 41: 414-419.

26- Miller, R. and H.S. Groninger (1976). Functional properties of enzyme-modified acylated fish protein derivatives, J. Food Sci., 41:268-271.

27- Osborne, R.; M.N. Voigt and D.E. Hall (1990). Utilization of Lumpfish (*Cyclopterus lumps*) Carcasses for The Production of Gelatin. In: Advances in fisheries technology and Biotechnology for Increased profitability. Voight M.N. Botta J.K. editors. Lancaster. Technomic publishing Co., 143 -153.

28- Pearson, D. (1970). The chemical analysis of food. Chemical publishing company, Inc. New York.

29- Reguel, A. (2004). Purification and Kinetic Characterization of Trypsin from The Intestine and Pyloric Caeca of The White Grunt (*Haemulon plumierii*). Masters Thesis. University of Puerto Rico, Magaguez, P.R. 29.

30- Rivera, M. (2003). Purificition and Characterizeation of Trypsin from Intestinal and Pyloric Caecal Tissues of The Silk Snapper, (*Lutianus vivanus*) Masters Thesis. Uuniversity of Puerto Rico, Mayaguez, P.R. 40.

31- Sathe, S.K. and D.K. SalunKhe (1981). Functional properties of the great northern bean (Phasolus Vulgaris) proteins: emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. J. Food Sci., 46:71-74.
32- Schwert, G.W. and Y. Takenaka (1955). Aspectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin .Biochim Biophys Acta. 16: 570-575.
33- Walsh, K. A. and P.E. Wilcox (1970). Serine Proteases, In: Methods in Enzymology (G, E. Perlmann and L,Lorana. eds.,). Academic press, New York, 19: 31-42.
34- Zhong,Y.; W. Liu; Li, G, Shi, B.; Y. Miao and X. Wu (2007). Isolation and partial characterization of trypsin from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Food Chemistry, 103: 906-912.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF TRYPSIN FROM THE ALIMENTARY CANAL OF *SILURIS GLANIS* AND STUYDING SOME OF ITS PROPERTIES AND APPLICATION

K.A. SHAKER H.K. ALI

ABSTRACT

Trypsinogen was isolated from *Siluris glanis* alimentary canal by 0.02 M phosphate buffer pH 6.0 containing 6% NaCl at 4°C, activated by reducing the pH to 1.8 and readjusting pH to 6.0. The activated extract was concentrated by gradual addition of $(NH4)_2SO_4$ (50%) saturation, the enzyme purifid by the Ion-exchange column Diethy amino ethyle Cellulose (DEAE), followed by gel filtaration on Sephadex G-100 Column. Specific activity, purification folds and the enzyme yield were 120 unit/mg, 31.57% and 145.27 fold respectively. The results of enzyme characterization showed that the molecular weights were 23442 Da as determined by gel filtration. The optimum pH for the enzyme activity was 5.5 and was stable at pH values ranged between 4.5-6.5. The enzyme exhibited the maximum activity at 40°C. The study of heat stability revealed that the enzyme retained entire activity when incubated for 15 min at 20-40 C.

The crude enzyme was utilized in manufacture of gelatin from *Siluris glanis* skin and compared with that manufactured by acidic treatment, the yield of enzymic gelatin was 7.16% while for acidic gelatin was 4.03%. The results of functional properties assessment showed that the viscosity, solubility and the water holding capacity for enzymic gelatin were 10.52 mpoise, 94% and 0.5 g/ml respectively while for acidic gelatin were 10.03 mpoise, 91% and 0.3g/ml respectively.

Part of M.Sc thesis of the first Author.
Collage of Agr.- Baghdad Univ.- Baghdad, -Iraq.