مجلة الزراعة العراقية مجلد15 عدد1 ص154-167 شباط/2010

إنتاج اللاكتيز من العفن *Aspergillus aculeatus* ودراسة بعض صفاته

3- تعيين الظروف المثلى لإنتاج اللاكتيز الداخل خلوي Intracellular وتنقيته جزئياً و دراسة بعض خصائصه وتطبيقاته

اكرم ثابت الراوي* سمر صالح الطائي* سعود رشيد العاني**

الملخص

درست الظروف المثلى لإنتاج اللاكتيز الداخل خلوي (**Intracellular**) فضلاً عن تعيين التركيبة المثلى لوسط إنتاج الإنزيم وكانت افضل الظروف لانتاج الانزيم من العفن ***Aspergillus aculeatus*** عند مدة تخمر **168** ساعة ورقم هيدروجين ابتدائي **5.0** وحجم لقاح **1** × 10^6 بوغ / مل وسرعة دوران الحاضنة الهزاز **150** دورة/ دقيقة ودرجة حرارة تخمر **30**°م. أما أفضل وسط لإنتاج اللاكتيز الداخل خلوي فانه يتمثل بالشرش المزال منه البروتين والمدعم مع $(NH_4)_2SO_4$ بتركيز **0.1**% (وزن/حجم) و K_2HPO_4 بتركيز **0.1** (وزن/حجم) ومستخلص الخميرة بتركيز **0.01**% (وزن/حجم) واللاكتوز بتركيز **10**% (وزن/حجم) . نقي اللاكتيز الداخل خلوي تنقية جزئية بخطوتين هما: الديلزة والتبادل الأيوني باستعمال المبادل الأيوني (**DEAE-cellulose**) وكانت الحصيلة الإنزيمية وعدد مرات التنقية **67.69**% و **2.63** مرة على التوالي. ودرست بعض خصائصه اذ كان رقم الهيدروجين الأمثل للثبات يتراوح بين **5-7** واحتفظ الإنزيم المنقى جزئياً بمقدار **94**% من فعاليته عند درجة حرارة **50**م / **30** دقيقة وفقد فعاليته تماماً عند **60**°م للمدة ذاتها. كما وجد إن الفعالية الإنزيمية للإنزيم المنقى جزئياً قد ثبطت بوجود الكالاكتوز. وأشارت نتائج التطبيق التقني للإنزيم باستعمال اللاكتيز الخام الداخل خلوي قبل وبعد ديلزته في تحليل لاكتوز الحليب الفرز إلى زيادة في معدلات تطور الحموضة باستعمال بادئ اللبن الرائب مقارنةً مع استعمال الحليب غير المعامل بالإنزيم. كما اظهر الشرش المعامل (متحلل اللاكتوز باستعمال اللاكتيز الخام) قدرة في دعم نمو خميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** وذلك بزيادة الكتلة الحيوية بما يقارب دورة لوغاريتمية واحدة . وكان لبروتينات الشرش تأثير تحفيزي في الفعالية الإنزيمية في حين كان لكازينات الحليب دور تثبيطي.

المقدمة

يعاني معظم البالغين من الحساسية تجاه اللاكتوز أو ما يسمى بحالة عدم تحمل اللاكتوز (**Lactose intolerance**) بسبب النقص الوراثي للاكتيز (**Lactase defținciency**) والذي يقف حائلاً بين هذه الفئات من تناول الحليب ومنتجات الألبان عموماً ويعد الحليب احد الركائز الأساسية في التغذية السليمة.لذا وجب توفيره مع خفض محتواه من اللاكتوز عن طريق تحليله إنزيمياً إلى مكوناته من السكريات الأحادية (الكلوكوز والكالاكتوز) مما يسهل استهلاكه فضلاً عن زيادة الحلاوة والذائبية والذي يفضي بدوره إلى إخفاء بعض العيوب في بعض منتجات الألبان وتحديداً ما يدعى بعيب الترمل (**Sandiness**) (**25, 26**).

وقد استعمل اللاكتيز (**β- galactosidase E.C.23.3.2.1**) المنتج من الأحياء المجهرية سواء كان النقي منه أو الخام في العديد من التطبيقات منها على سبيل المثال إنتاج لبن رائب (**Yoghrt**) واجبان منضجة امتازت بنكهة مستساغة وقوام جيد وثباتية عالية فضلاً عن اختزال المدة اللازمة لتطور الحموضة ووقت العملية الإنتاجية (**18،20**)

جزء من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

* كلية الزراعة-جامعة بغداد , العراق.

** وزارة العلوم والتكنولوجيا - بغداد , العراق.

كذلك استعمل اللاكتيز بصيغته في تحليل لاكتوز الشرش والذي شجع بدوره على استعمال هذه المادة الحيوية في العديد من المجالات منها صناعة الشرابت والمعجنات والحلويات والمثلجات القشدية كما استعمل كبديل عن المولاس في تحضير الأعلاف (13) وبهذا الخصوص تعد الأعفان احد أهم المصادر المايكروبية المعتمدة في إنتاج العديد من الإنزيمات ومن بينها اللاكتيز (β- galactosidase) (5 ، 17) .

ويستعمل الشرش المتحلل اللاكتوز في إنتاج الايثانول وخميرة الخبز *S. cerevisiae*، وان هذه الخميرة لا تستطيع النمو في الشرش غير متحلل اللاكتوز لكونها تفتقر للإنزيم الذي يعمل على تحليل اللاكتوز إلى مكوناته من السكريات الأحادية وقد اعتمدت هذه الطريقة من قبل الشركات المعنية ومنها شركة **Nutrisearch** الأمريكية (4، 10،11،19).

وتهدف هذه الدراسة إلى تحديد الظروف المثلى لإنتاج اللاكتيز الداخل خلوي من العفن *A. aculeatus* المعزول محلياً وتنقيته جزئياً مع دراسة بعض صفاته وتطبيقاته.

المواد وطرائق البحث

الوسط الامثل للانتاج

وسط التخمر العام **Czapek –Dox** استعمل الوسط المحور بإضافة مستخلص الخميرة (**Yeast extract**) وبتركيز **0.01** % واحلال اللاكتوز بوزن **20** غم بديلا عن السكروز (**30**) غم اساساً للمعاملات المدرجة ادناه:

1- التركيز الأمثل في الوسط باستعمال **5** ، **10** ، **15** ، **20** و**25** غم/لتر من اللاكتوز .

2- دراسة المصدر النتروجيني الأمثل باستعمال المصادر $(NH_4)_2SO_4$ و $(NH_4)_2HPO_4$ و $NaNO_3$ و الببتون وبنسبة **0.2** % (وزن/حجم) لكل منها.

الشرش كوسط للإنتاج

مصدر الشرش: أستعمل شرش جبن طري من معمل ألبان كلية الزراعة – جامعة بغداد.

تحضير الشرش: عدل رقم الهيدروجين إلى **5.0** بوساطة حامض اللاكتيك(**20**%) ثم عرض لمعاملة حرارية (**121**° م/**5** دقائق) بعدها فصلت بروتينات الشرش المترسبة بالترشيح تحت التفريغ وباستعمال أوراق ترشيح (**Whatman No.4**) ليصبح جاهزاً لتدعيمه وفقاً لما ياتي:

1- شرش مزال منه البروتين (**Deproteinized whey**) والمدعم مع $(NH_4)_2SO_4$ بتركيز **0.1**%.

2-شرش كامل (**Whole whey**) مدعم مع $(NH_4)_2SO_4$ بتركيز **0.1**%.

3-شرش مزال منه البروتين والمدعم مع $(NH_4)_2SO_4$ وبتركيز **0.1**% و K_2HPO_4 بتركيز **0.1**% ومستخلص الخميرة بتركيز **0.01**% ، لاكتوز بتركيز **5** و**10**%.

4-شرش مزال منه البروتين والمدعم مع لاكتوز وبتركيز **5** و**10**%.

5-شرش مزال منه البروتين والمدعم مع K_2HPO_4 بتركيز **0.1**% ومستخلص الخميرة بتركيز **0.01**% و $(NH_4)_2SO_4$ و $(NH_4)_2HPO_4$ و $NaNO_3$ و الببتون) وبتركيز **0.1**% كل على حدة.

وزع الشرش المعامل والمدعم في دوارق سعة **300** مل وبواقع **100** مل/ دورق ثم عقم بالمؤصدة بدرجة **121**° م / **15** دقيقة . وأجريت التجارب المتعلقة بتحديد تركيبة الوسط المثلى تحت الظروف الآتية: مدة تخمر **168** ساعة واستعمل حجم لقاح يساوي **1** × 10^6 بوغ /مل ودرجة **30**° م وكانت سرعة الحاضنة الهزازة **150**دورة/ دقيقة ورقم هيدروجين ابتدائي (**7.0**).

اختيار الظروف المثلى للإنتاج

درست المعايير الآتية لتعيين الظروف المثلى للإنتاج

مدة تخمر (24 ، 48 ، 72 ، 96 ، 120 ، 144 ، 168 و216) ساعة و رقم هيدروجين ابتدائي للوسط الغذائي الانتاجي (3.0 ، 3.5 ، 4.0، 4.5 ، 5.0 ، 5.5 ، 6.0 ، 7.0 و 8.0) ، حجم لقاح (1 ، 10 ، 10^2، 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 و10^6 ×2) بوغ/مل ، سرعة دوران الحاضنة الهزازة (100 ، 150 و 200) دورة/دقيقة، درجة حرارة التخمر (25 ، 30 ، 35 ، 40 و45)° م.

استخلاص الانزيم

استخلص الانزيم وقيست فعاليته مع تقدير البروتين في المستخلص الانزيمي وفقاً للطريقة المذكورة في الراوي والطائي (3) وتعرف وحدة الفعالية الانزيمية بانها كمية الانزيم التي تحرر مايكروغرام (واحد) من الكلوكوز في الساعة الواحدة وتحت ظروف التجربة.

التنقية الجزئية للإنزيم الداخل خلوي

أجريت بخطوتين شملت الديلزة (التنافذ الغشائي) مقابل دارئ الخلات ذي التركيز (0.01) مولاري واس هيدروجيني (5.0) ولمدة 24 ساعة تم خلالها تغيير دارئ الخلات عدداً من المرات قيست بعدها الفعالية الإنزيمية والبروتين والحجم ثم أضيف المستخلص الإنزيمي المديلز إلى عمود (DEAE-cellulose) بعدان تم تنشيطه تبعا للطريقة الموصوفة (29) وكانت أبعاد العمود (8 ×2.2 سم) والذي تمت موازنته مسبقاً بدارئ الخلات ذي التركيز0.01 مولاري ورقم هيدروجين (5.0). جرت عملية الاسترداد للبروتينات المرتبطة على المبادل باستخدام محاليل مختلفة من دارئ الخلات 0.01 مولاري ورقم هيدروجين (5.0) والمحتوية على تراكيز متدرجة من NaCl (0.01 و 0.05 و 0.1 و 0.15 و 0.2 و 0.3 و 0.5 و 1.0) مولاري.

دراسة بعض خواص الإنزيم المنقى جزئياً

حدد رقم الهيدروجين الأمثل لثبات الإنزيم بحضن الإنزيم المنقى جزئياً مع المحاليل الدارئة ذوات ارقام هيدروجين 2.0 ، 3.0 ، 4.0 ، 5.0 ، 6.0، 7.0 و8.0 في أنابيب اختبار لمدة أربع ساعات وفي درجة حرارة 30° م ثم بردت مباشرةً في حمام ثلجي وقيست الفعالية الإنزيمية المتبقية .كما قدر الثبات الحراري للإنزيم بدرجات حرارة مختلفة (20 ،30 ، 40 ، 50 ، 60 ، 70 ، 80 و90) م عند رقم الهيدروجين الأمثل للثبات لمدة 30 دقيقة. نقلت بعدها الأنابيب إلى حمام ثلجي ثم قيست الفعالية المتبقية.كما درس تأثير الكالاكتوز في الفعالية الإنزيمية وذلك بتقدير الفعالية الإنزيمية للإنزيم المنقى جزئياً بإضافة الكالكتوز إلى محلول التفاعل الإنزيمي وبالتراكيز 2 ، 5 ، 10 مايكرومولر.

التطبيق التقني للإنزيم الخام

قياس نشاط بكتريا بادئ اللبن الرائب: أجريت للحليب معاملة إنزيمية باللاكتيز الداخل خلوي الخام مرة قبل ديلزة الإنزيم وأخرى بعدها .حيث أضيف الإنزيم بعد تعقيمه باستعمال (Microbiological Filter) من نوع (Gelman) ذي فتحات بقطر 0.22 مايكرومتر إلى الحليب المحضر والمعقم مسبقاً وبتركيز 10 وحدات انزيمية ووضع في الثلاجة لمدة 18 ساعة مع التحريك المستمر بالمحرك المغناطيسي ثم أوقف بعدها التفاعل بالغليان لمدة 15 دقيقة وقدر الكلوكوز باستعمال العدة التقديرية (3). بعد ذلك لقح الحليب ببادئ اللبن الرائب عند درجة حرارة 42°م وتم متابعة تطور الحموضة الكلية المتكونة حسب الطريقة المذكورة في Egan وجماعته (12) واستعمل نموذج الحليب غير المعامل إنزيمياً للمقارنة.

إنتاج الكتلة الحيوية لخميرة *S. cerevisiae* من الشرش: استعمل اللاكتيز الداخل خلوي الخام في معالجة الشرش. ثم استعمل الشرش المعامل إنزيمياً في إنتاج الكتلة الحيوية (**Biomass**) من خميرة الخبز ***S. cerevisiae***. واستعملت لهذا الغرض خميرة الخبز الجافة التجارية المجهزة من شركة **Pakmaya** التركية ، إذ نشطت الخميرة باستعمال الوسط السائل **Davis's Yeast salt** (**16**) وباستعمال الحاضنة الهزازة بسرعة **150** دورة/ دقيقة وحرارة **30**ْ م ولمدة **24** ساعة. ثم لقحت أوساط صلبة مائلة (**Slants**) معدة مسبقاً من الوسط نفسه بالخميرة المنشطة وحضنت في حرارة **30**ْ م لمدة **48** ساعة ثم عمل عالق الخلايا باستعمال محلول فسيولوجي معقم **0.85 %** **NaCl** وحسب عدد الخلايا بشريحة العد المجهري (**Hemocytometer**). حضر الشرش حسب الطريقة الموصوفة في الطائي والراوي (**4**) ودعم مع $(NH_4)_2SO_4$ بتركيز **0.1**% وK_2HPO_4 بتركيز**0.1**% وعومل حرارياً بدرجة **85**ْ م / **30** دقيقة (**15**) وبعد تبريده أضيف له الإنزيم وكما في معاملة الحليب المذكورة أعلاه وبعد تقدير الكلوكوز المتحرر أضيف **1** مل من اللقاح المحضر أعلاه والمحتوي (5×10^5) وحدة مكونة للمستعمرات / مل) إلى كل من الشرش المعامل وغير المعامل إنزيمياً وبعد حضن الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة**150** دورة /دقيقة وبحرارة **30**ْ م ولمدة **72** ساعة جرى حساب عدد الخلايا باستعمال **Hemocytometer** واستعمل نموذج الشرش غير المعامل إنزيمياً للمقارنة.

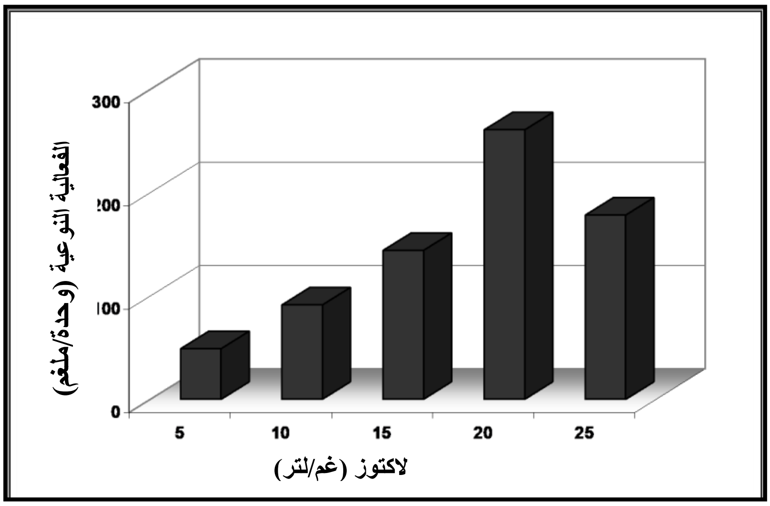
تأثير كازينات الحليب وبروتينات الشرش في الفعالية الإنزيمية: تم التعرف على تأثير كازينات الحليب وبروتينات الشرش في الفعالية الإنزيمية للاكتيز الداخل خلوي الخام، بإضافة **10** وحدات إنزيمية من اللاكتيز الداخل خلوي الخام لكل من نماذج (الحليب الفرز والشرش الكامل و الشرش المزال منه البروتين). ولا بد من الإشارة إلى إن الشرش المستعمل في هذه التجربة استحصل عليه بعد معاملة نموذج الحليب الفرز بالمنفحة التجارية المعدة لتجبن الحليب لتوحيد الوجبات المستعملة . ولوحظ تأثير كازينات الحليب وبروتينات الشرش من خلال المقارنة بين كمية الكلوكوز المتحرر في كل نموذج من النماذج الثلاثة وبالاسلوب ذاته والمشار إليه اعلاه.

النتائج والمناقشة

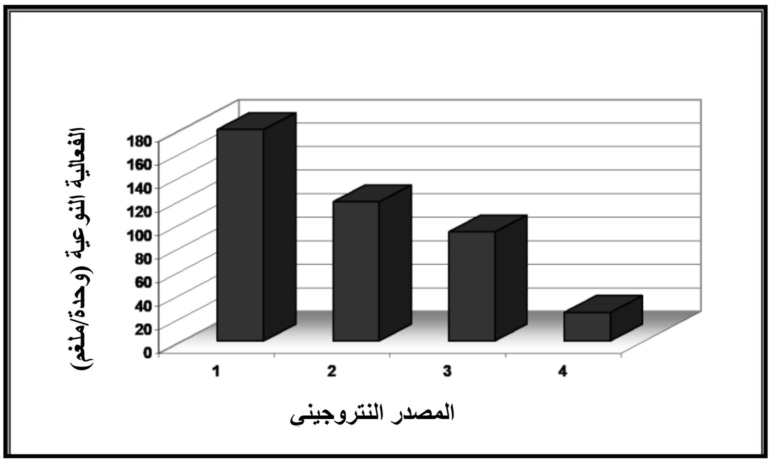
اشارت النتائج الخاصة بدراسة التركيبة المثلى لوسط إنتاج اللاكتيز الداخل خلوي (شكل **1**) الى إن أفضل تركيز للاكتوز هو **20** غم/لتر إذ كانت الفعالية النوعية **260.33** وحدة/ملغم في حين انخفضت الفعالية النوعية إلى **178.43** وحدة/ملغم عند تركيز **25** غم/لتر لاكتوز.

وبخصوص المصدر النتروجيني الأمثل للإنتاج تظهر النتائج (شكل**2**) إن الببتون كان الأفضل مقارنةً مع المصادر الأخرى يعقبه $(NH_4)_2SO_4$ ثم **NaNO3** واخيراً $(NH_4)_2HPO_4$ حيث كانت الفعالية النوعية **118.07**، **179.61** ، **92.50** و**24.11** وحدة/ملغم على التوالي. وقد يعزى سبب ارتفاع الفعالية باستعمال الببتون إلى ما يحويه هذا المصدر النتروجيني العضوي من مركبات (أحماض امينية حرة) تحفز نمو الكائن المجهري وإنتاج الإنزيم بصورة أفضل مقارنةً بالمصادر الأخرى.

وكانت أفضل صيغة تركيبية للوسط المعد للإنتاج (شكل **3**) هي: الشرش المزال منه البروتين المدعم مع $(NH_4)_2SO_4$ **0.1**% ، K_2HPO_4 **0.1**% ومستخلص الخميرة **0.01**% ولاكتوز **10**% حيث ارتفعت الفعالية النوعية إلى **305.66** وحدة/ملغم مقارنةً بالمعاملات الأخرى.



شكل **1**: تركيز اللاكتوز الأمثل لإنتاج اللاكتيز الداخل خلوي من العفن ***A. aculeatus***.



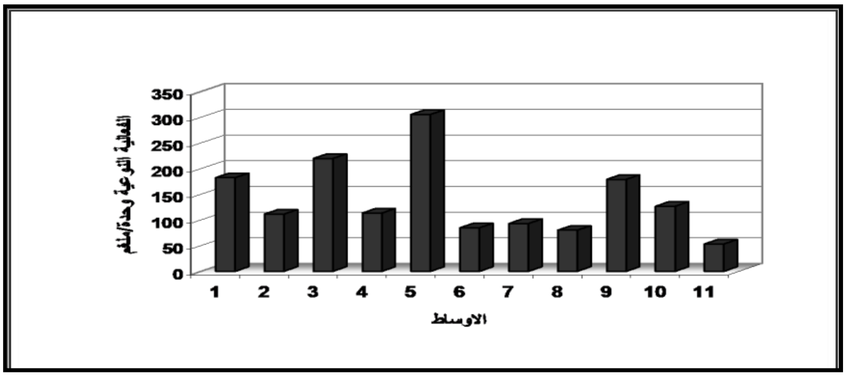
شكل **2**: مصدر النتروجين الامثل لانتاج اللاكتيز الداخل خلوي من العفن ***A. aculeatus***.

. (NH4)2HPO4 -4. NaNO3 -3. (NH4) 2SO4 -2. Peptone -1

أما بخصوص المعايير الأخرى المؤثرة في إنتاج اللاكتيز الداخل خلوي ومنها مدة التخمر المثلى (شكل **4**) فقد وجد إن مدة **168** ساعة هي المثلى لإنتاج اللاكتيز الداخل خلوي إذ ارتفعت الفعالية النوعية إلى **216.06** وحدة/ملغم ويلاحظ حدوث انخفاض في الفعالية الإنزيمية إلى **150.45** وحدة/ملغم عند **216** ساعة وهذا يعود إلى التغيرات الحاصلة مع تقدم مدة التخمر فضلاً عن إمكانية حدوث تحلل ذاتي لخيوط العفن والذي يكون مصحوباً عادةً بإطلاق البروتيزات ومواد أخرى تأثر سلباً في الفعالية الإنزيمية (**6**). وكان رقم الهيدروجين الابتدائي الامثل لوسط الإنتاج هو **5.0** إذ بلغت الفعالية النوعية **411.71** وحدة/ملغم (شكل **5**) وقد أشار احمد والنوواي (**1**) إلى إن معظم الفطريات تنمو عند رقم هيدروجيني يتراوح بين **4.0 – 7.0** إذ إن البيئة المائلة للحموضة تكون ملائمة لإنبات ابواغ الأعفان ويظهر الشكل تذبذباً في إنتاج الإنزيم ضمن مدى من الرقم الهيدروجيني تراوح بين **3.0 – 8.0** وقد يعزى سبب ذلك إلى وجود أكثر من صورة إنزيمية للإنزيم قيد الدراسة (**7**).

وكان أفضل حجم لقاح لإنتاج الإنزيم **1** × 10^6 بوغ/مل (شكل **6**) إذ بلغت الفعالية النوعية **352.50** وحدة/ملغم. ثم انخفضت إلى **288.88** وحدة/ملغم عند مضاعفة هذا الحجم من اللقاح والذي ربما كان سببه التنافس في طلب المواد الغذائية, وقد أوضحت الخفاجي (**2**) إن حجم العملية الإنتاجية ونوعها يحددان حجم اللقاح المستعمل وان حجم اللقاح لا بد إن يتناسب مع كمية الوسط الغذائي المستخدم بهدف التقليل من وقت التأخير في بدء الإنتاج.

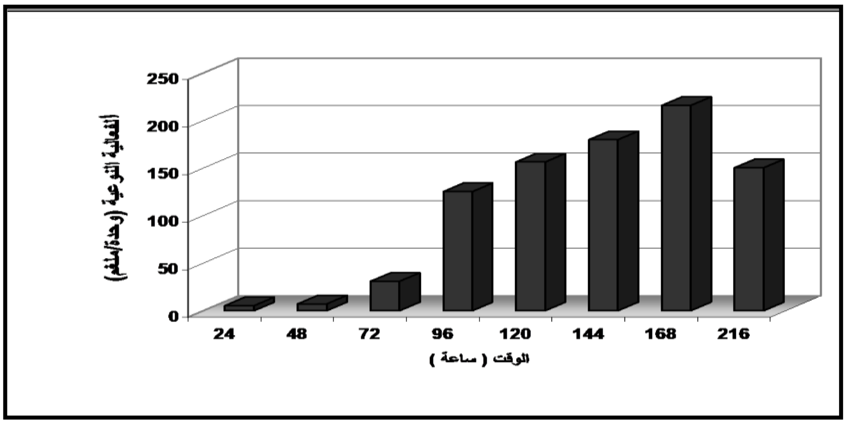
وكانت السرعة المثلى لدوران الحاضنة الهزازة لإنتاج الإنزيم **150** دورة/دقيقة إذ بلغت الفعالية النوعية **267.44** وحدة/ملغم (شكل**7**), وتشير معظم الفرضيات بهذا الخصوص إن للأوكسجين دوراً مباشراً في تثبيط الإنزيمات الأساسية عن طريق الاتحاد بها أو أكسدتها وتشير أخرى إلى أكسدة المرافقات الإنزيمية مثل (**Ferrodoxin**) ومن ثم تثبيط الإنزيمات (**23**).



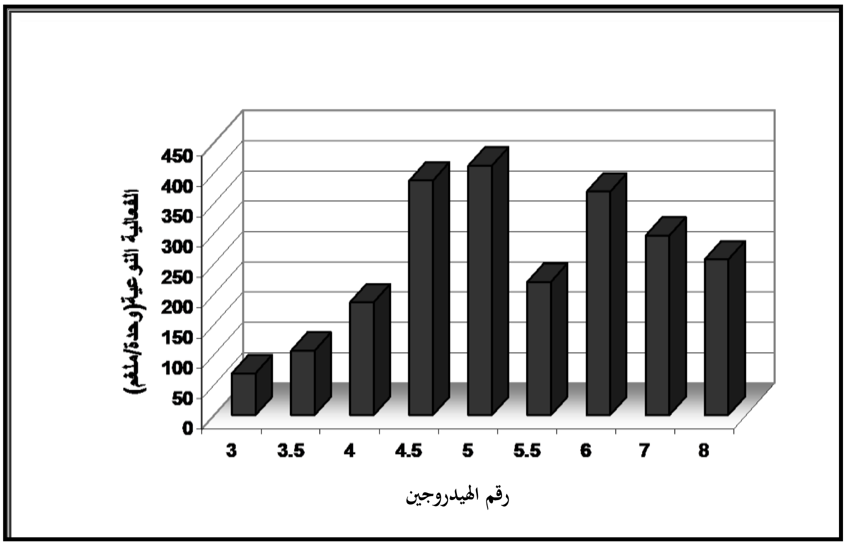
شكل **3**: اختيار الوسط الامثل لانتاج اللاكتيز الداخل خلوي من العفن ***A. aculeatus***.

1– وسط التخمر العام.
2– شرش كامل + $(NH_4)_2SO_4$ **0.1%**.
3– شرش مزال منه البروتين + $(NH_4)_2SO_4$ **0.1%**.
4– شرش مزال منه البروتين + $(NH_4)_2SO_4$ **0.1%**+ K_2HPO_4 **0.1%** + مستخلص الخميرة **0.01%** + لاكتوز **5%**.
5– شرش مزال منه البروتين + $(NH_4)_2SO_4$ **0.1%**+ K_2HPO_4 **0.1%**+مستخلص الخميرة **0.01%** + لاكتوز **10%**.
6– شرش مزال منه البروتين + لاكتوز **5%**.
7– شرش مزال منه البروتين + لاكتوز**10%**.
8– شرش مزال منه البروتين + $(NH_4)_2SO_4$ **0.1%** + K_2HPO_4 **0.1%** + مستخلص الخميرة**0.01%**.
9–شرش مزال منه البروتين + $(NH_4)_2HPO_4$ **0.1%** + K_2HPO_4 **0.1%** + مستخلص الخميرة**0.01%**.
10–شرش مزال منه البروتين +$NaNO_3$ **0.1%** + K_2HPO_4 **0.1%** + مستخلص الخميرة**0.01%**.
11– شرش مزال منه البروتين +**Peptone** **0.1%** + K_2HPO_4 **0.1%** + مستخلص الخميرة**0.01%**.

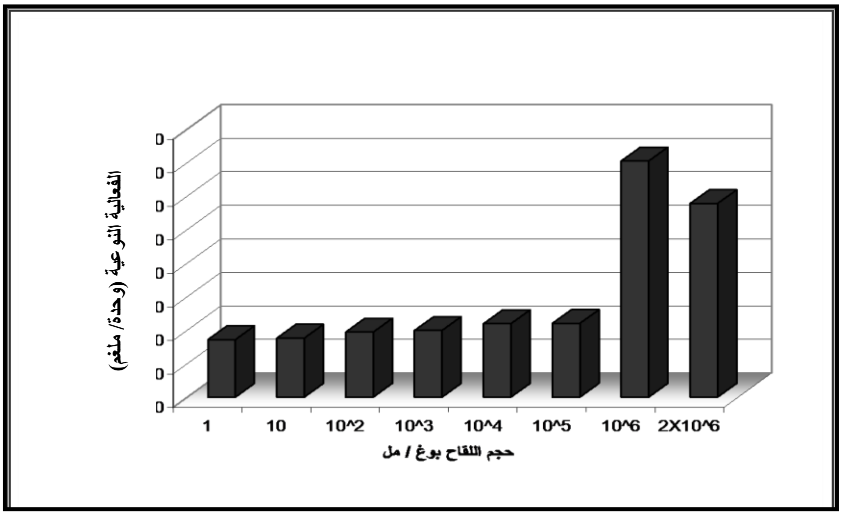
وفيما يتعلق بدرجة الحرارة المثلى للتخمر (شكل**8**) فقد كانت درجة حرارة **30** م هي الأمثل في إنتاج الإنزيم حيث كانت الفعالية النوعية **233.95** وحدة/ملغم تعقبها درجة حرارة **25** م حيث بلغت الفعالية النوعية **195.00** وحدة/ملغم مع ملاحظة انخفاضها إلى **107.50** و **41.79** وحدة/ملغم عند درجتي حرارة **35** م و**40** م على التوالي، وعدم ظهور أية فعالية نوعية عند درجة **45** م وهذا يدل على إن العزلة المستعملة في هذه الدراسة غير متحملة للحرارة المرتفعة.إن لكل نوع فطري درجة حرارة مثلى لنموه تختلف من نوع إلى آخر فعلى سبيل المثال تنمو الأنواع التابعة لجنس ***Aspergillus*** بصورة أفضل عند **30**° م لذا فإنها تنتشر في المناطق المعتدلة الحرارة (**1**).



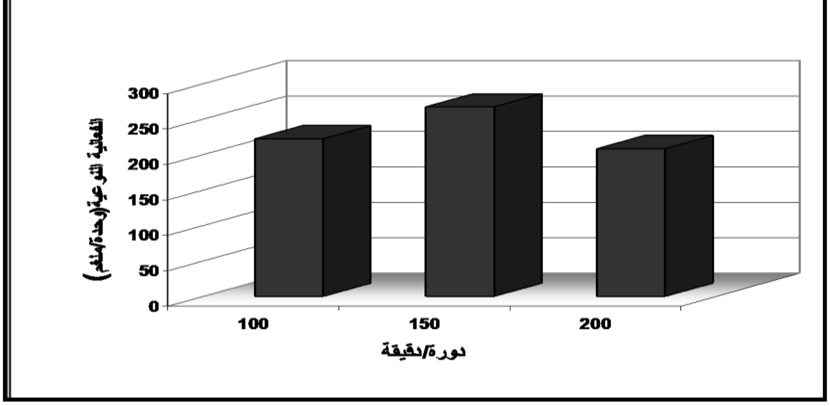
شكل **4**: مدة التخمر المثلى لانتاج اللاكتيز الداخل خلوي من العفن ***A. aculeatus***.



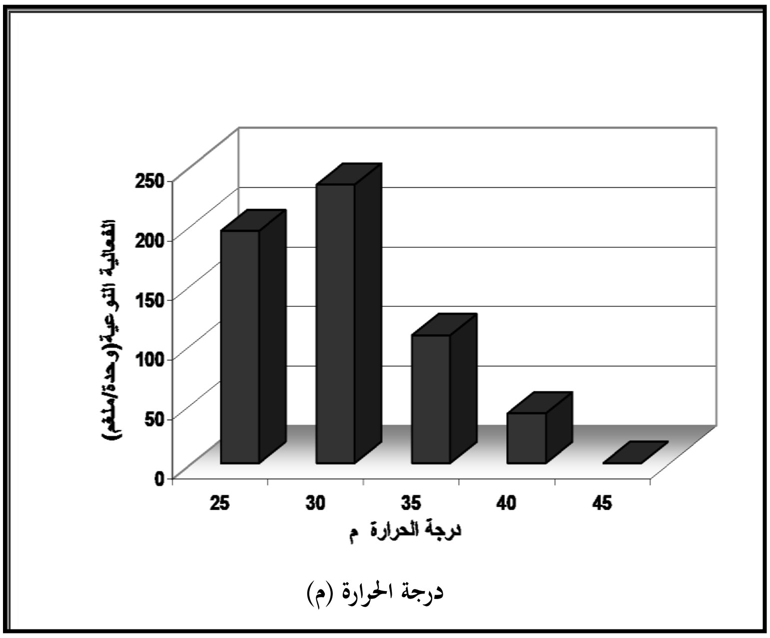
شكل **5**: علاقة رقم الهيدروجين الابتدائي بانتاج اللاكتيز الداخل خلوي من العفن ***A . aculeatus*** .



شكل **6**: علاقة حجم اللقاح بانتاج اللاكتيز الداخل خلوي من العفن ***A. aculeatus*** .



شكل **7**: علاقة سرعة الدوران بانتاج اللاكتيز الداخل خلوي من العفن ***A. aculeatus*** .



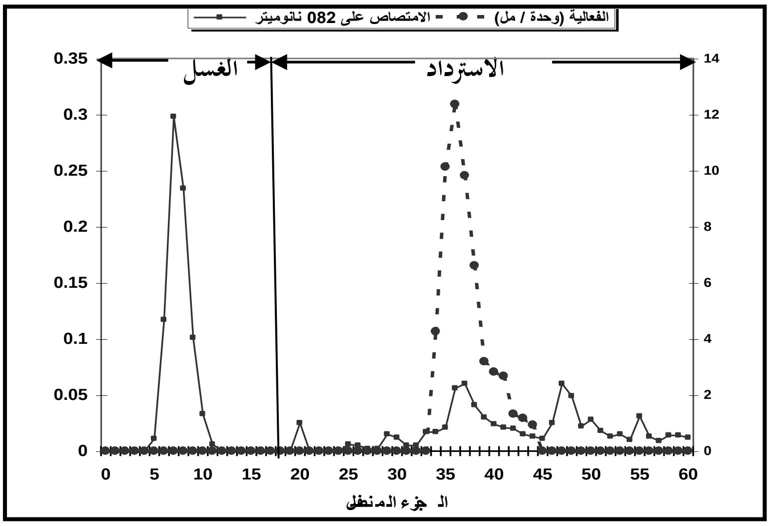
شكل **8**: درجة الحرارة المثلى لانتاج اللاكتيز الداخل خلوي من العفن ***A. aculeatus*** .

ويوضح جدول (**1**) خطوات التنقية الجزئية للاكتيز الداخل خلوي الخام والتي تحققت بخطوتين اولاهما الديلزة وثانيهما كروماتوكرافي التبادل الأيوني باستعمال المبادل الأيوني (**DEAE-cellulose**) بحصيلة إنزيمية وعدد مرات تنقية **67.69** % و **2.63** مرة على التوالي.

جدول **1**:التنقية الجزئية باستعمال المبادل الايوني **DEAE – Cellulose** للاكتيز الداخل خلوي من العفن ***A. aculeatus***

الخطوة	الحجم (مل)	بروتين (ملغم / مل)	الفعالية الحجمية (وحدة / مل)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الإنزيمي الخام	**18.00**	**0.038**	**11.05**	**290.78**	**198.90**	**1.00**	**100.00**
الديلزة	**15.00**	**0.026**	**15.97**	**614.23**	**239.55**	**2.11**	**120.43**
كروماتوكرافي التبادل الايوني **DEAE – cellulose**	**22.00**	**0.008**	**6.12**	**765.00**	**134.64**	**2.63**	**67.69**

ويوضح شكل (**9**) القمم البروتينية المحصل عليها باستعمال المبادل الأيوني (**DEAE-cellulose**) إذ تمثل القمة الأولى البروتينات غير المرتبطة بينما تمثل القمم الأخرى البروتينات المرتبطة والتي اظهر بعضها وجود فعالية إنزيمية وخاصةً الأجزاء المحصورة بين (**35–45**) عند تقدير الفعالية لها, ولا بد من الإشارة إلى الارتفاع المتميز للفعالية الإنزيمية بعد خطوة الديلزة والذي ربما كان سببه التخلص من بعض الايونات والمركبات المثبطة. أوضح **Brandor** وجماعته (**9**) خطوتين لتنقية اللاكتيز المنتج من العفن ***Fusarium oxysporum* var. *lini*** وهي كروماتوكرافي التبادل الأيوني وعلى المبادل (**DEAE-cellulose**) أعقبها الترشيح الهلامي على هلام (**Sephadex G-100**).



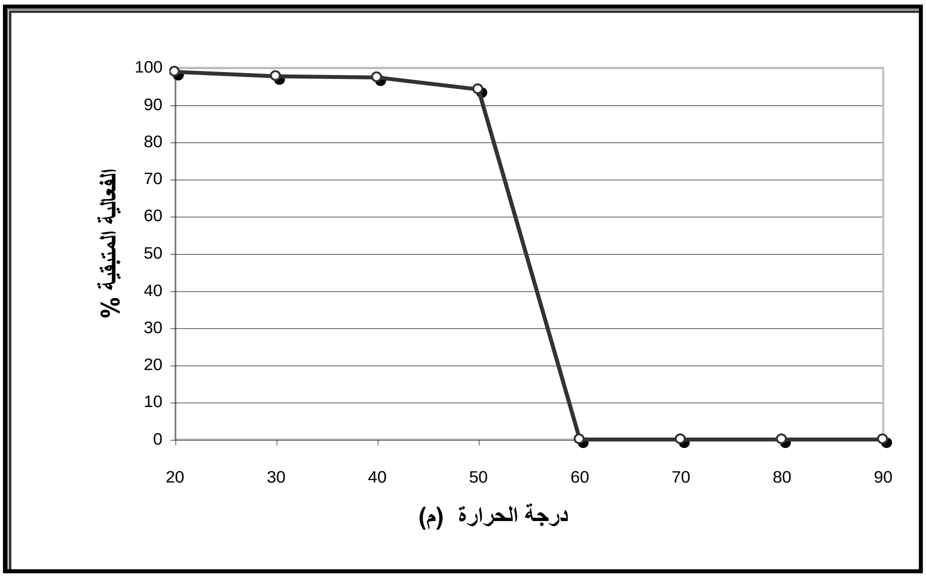
شكل 9: كروماتوكرافيا التبادل الايوني للمستخلص الانزيمي الداخل خلوي بوساطة عمود **DEAE - Cellulose** تمت الموازنة بوساطة محلول دارئ الخلات بتركيز **0.01** مولر و ذو الأس الهيدروجيني 5.0 و الاسترداد من خلال محاليل مختلفة من دارئ الخلات بتركيز **0.01** مولر و ذو الأس الهيدروجيني 5.0 و المحتوية على تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم (**0.01** ، **0.05** ، **0.1** ، **0.15** ، **0.2** ، **0.3** ، **0.5** و **1**) مولاري في عمود بابعاد (**8** x **2.2** سم) و بواقع **5** مل / جزء و بسرعة جريان **60** مل / ساعة.

أظهرت دراسة بعض الخواص للإنزيم المنقى جزئياً إن رقم الهيدروجين الأمثل لثبات الإنزيم يتراوح بين **5.0 – 7.0** (شكل **10**) ولقد وجد إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات اللاكتيز المنتج من العفن ***Penicillium citrinum*** يتراوح بين **4.5 – 7.0** (27). أما بشان الثبات الحراري للإنزيم فقد كان ضمن مدى يتراوح بين **20 – 50**°م (شكل **11**) إذ احتفظ الإنزيم بواقع **97**% و**94**% من فعاليته عند درجتي حرارة **30**°م و**50**°م على التوالي لمدة **30** دقيقة في حين فقد فعاليته تماماً عند **60**°م وللمدة نفسها وقد توصل جاسم (5) إلى إن الثبات الحراري للاكتيز المنقى والمنتج من العفن ***A. niger*** كان ضمن مدى يتراوح ما بين **30 – 60**°م ولمدة **30** دقيقة إذ فقد الإنزيم **82.8**% من فعاليته عند حرارة **65**°م للمدة نفسها وفقد فعاليته تماماً عند **70**°م.

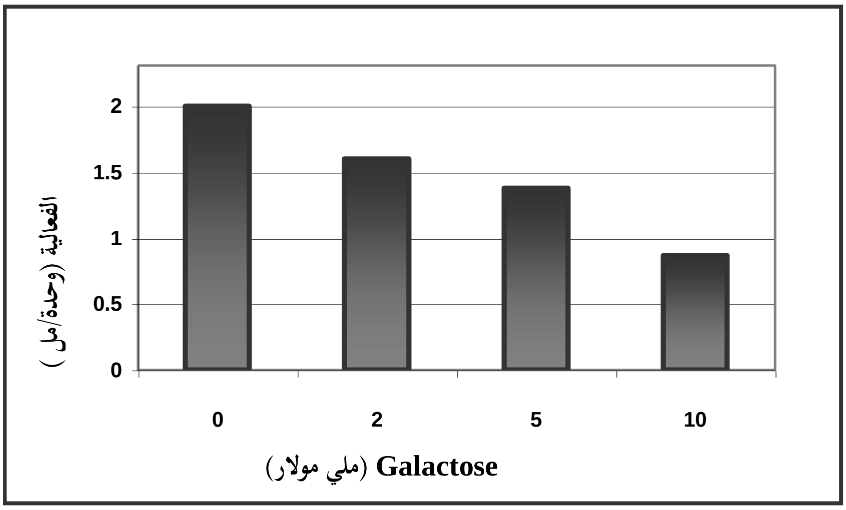
وفيما يتعلق بتأثير الكالاكتوز في الفعالية الإنزيمية (شكل **12**) فيلاحظ حدوث تثبيط للفعالية الإنزيمية ولجميع التراكيز المستعملة من هذا السكر وكان التثبيط يتناسب طردياً مع تركيز الكالاكتوز إذ بلغت أعلى نسبة من التثبيط عند تركيز **10** ملي مولر. وقد أشارت دراسة **Goncalves** و**Castillo** (**15**) الى إن اللاكتيز المنتج من خميرة ***Kluyveromyces marxianus*** يثبط تنافسياً بالكالاكتوز.

وبهدف تسليط الضوء على كفاءة الإنزيم الخام قيد الدراسة استعمل هذا الإنزيم في بعض التطبيقات منها معاملة الحليب بالإنزيم الخام الداخل خلوي (مديلز وغير مديلز) جدول (**2**) وكانت كمية الكلوكوز المتحررة في الحليب المعامل باللاكتيز الداخل خلوي (مديلز وغير مديلز) **22.92** ، **20.57** مايكروغرام/مل على التوالي. وجاءت هذه النتائج مؤكدة لما سبق ذكره بخصوص ارتفاع الفعالية الإنزيمية بعد الديلزة. وعند متابعة تطور الحموضة للحليب المعامل وغير المعامل إنزيمياً لوحظ ارتفاع النسبة المئوية لحامض اللاكتيك المتكون وبالتالي سرعة تخثر الحليب المعامل إنزيمياً مقارنةً بالحليب غير المعامل ويعود هذا إلى توفر كمية من السكريات الأحادية السهلة الاستهلاك والتمثيل من قبل بكتريا البادئ, وقد أجريت العديد من الدراسات (**22** ، **24**) حول استعمال اللاكتيز الميكروبي في تحليل لاكتوز الحليب واستعمال الحليب المعالج إنزيمياً في تصنيع العديد من المنتجات.

شكل **10**: تاثير رقم الهيدروجين في ثبات اللاكتيز المنقى جزئيا قدر الرقم الهيدروجيني الامثل للثبات في درجة **30**°م و لمدة اربع ساعات.



شكل **11**: تاثير درجات الحرارة في ثبات اللاكتيز المنقى جزئيا قدرت درجة حرارة الثبات عند رقم هيدروجين **pH** الامثل للثبات و لمدة نصف ساعة.



شكل 12: تاثير تراكيز مختلفة من الكالاكتوز في فعالية اللاكتيز المنقى جزئيا من العفن *A. aculeatus*.

جدول2: استعمال اللاكتيز الداخل خلوي الخام قيد الدراسة (مديلز وغير مديلز) في معاملة الحليب
*** LH milk:lactose hydrolysed milk**

الزمن (ساعة)	اللاكتيز الداخل خلوي من دون ديلزة: حامض اللاكتيك% control	اللاكتيز الداخل خلوي من دون ديلزة: حامض اللاكتيك% *LH milk	اللاكتيز الداخل خلوي بعد الديلزة: حامض اللاكتيك % control	اللاكتيز الداخل خلوي بعد الديلزة: حامض اللاكتيك % LH milk	حالة الحليب
0.0	0.1	0.1	0.14	0.14	
0.5	0.16	0.20	0.18	0.23	
1.0	0.18	0.25	0.20	0.26	
1.5	0.19	0.29	0.22	0.31	
2.0	0.21	0.32	0.25	0.38	
2.5	0.23	0.38	0.29	0.44	تخثر الحليب المعامل باللاكتيز
الكلوكوز المتحرر20.57 مايكروغرام/مل			الكلوكوز المتحرر 22.92 مايكروغرام/مل		

أما بالنسبة لتأثير استعمال الشرش المتحلل اللاكتوز في نمو خميرة الخبز ***Saccharomyces cerevisiae*** (جدول3) يلاحظ من متابعة تطور الكتلة الحيوية لكل من نموذجي الشرش المعامل وغير المعامل إنزيمياً إن هنالك زيادة في عدد خلايا الخميرة مقداره دورة لوغاريتمية واحدة تقريباً إذ بلغ عدد الخلايا 1.04×10^6 وحدة مكونة للمستعمرات / مل في الشرش المعامل إنزيمياً مقارنةً بالشرش غير المعامل والذي لم يظهر تطوراً في أعداد الخلايا المضافة إليه ويؤكد هذا حقيقة إن خميرة ***S.cerevisiae*** لا تمتلك القدرة على تحليل اللاكتوز واستهلاكه. ان استعمال اللاكتيز قيد الدراسة في تحليل اللاكتوز وتحرير السكريات الأحادية المتمثلة بالكلوكوز **29.89** مايكروغرام/مل نجم عنه زيادة ملحوظة في الكتلة الحيوية للخميرة ويعد هذا مؤشراً إضافياً على كفاءة اللاكتيز قيد الدراسة في تحليل اللاكتوز وأشارت دراسة مماثلة (**1**، **14**،**30**) نجاح استعمال الشرش المتحلل اللاكتوز في إنتاج الكتلة الحيوية لخميرة الخبز.

وبخصوص تأثير كازينات الحليب وبروتينات الشرش في الفعالية الإنزيمية (جدول**4**) يلاحظ ان لبروتينات الشرش تأثيراً ايجابياً في رفع الفعالية الإنزيمية إذ تعمل على تنشيطها وهذا يتضح من كمية الكلوكوز المتحررة في نموذج الشرش الكامل والبالغة **57.10** مايكروغرام/مل مقارنةً بنماذج الشرش المزال منه البروتين وهذا يتفق مع ما جاءت به دراسة **Mahoney** و**Adamchuk** (**21**) إن لبروتينات الشرش دوراً في تنشيط اللاكتيز المنتج من خميرة

Kluyveromyces fragilis ويلاحظ من (جدول4) إن لكازينات الحليب دوراً مثبطاً للاكتيز إذ اختزلت كمية الكلوكوز المتحررة في الحليب الفرز بمقدار **39.71**% مقارنةً بالشرش الكامل وقد بينت دراسة **Bigelis** (**8**) إن كازينات الحليب تعمل على تثبيط فعل اللاكتيز المنتج من مصادر مختلفة, وعزت دراسة **Wendorff** وجماعته (**28**) سبب ذلك إلى ارتفاع تركيز المواد الصلبة إذ أشارت هذه الدراسة الى إن فعالية الإنزيم تعتمد على نوع المادة المحتوية على اللاكتوز فكلما زاد تركيز المواد الصلبة انخفضت الفعالية الإنزيمية.

جدول **3**: انتاج الكتلة الحيوية من خميرة ***S. cerevisiae*** من الشرش المعامل باللاكتيز قيد الدراسة

الزمن (ساعة)	شرش غير معامل CFU/ml	شرش معامل بالانزيم CFU/ml
Zero time	$10^5 \times 5$	$10^5 \times 5$
72	$10^4 \times 4$	$10^6 \times 1.04$
الكلوكوز المتحرر في الشرش **29.89** مايكروغرام/مل		

جدول **4**: تأثير بروتينات الحليب والشرش في فعالية الإنزيم عند تحليل اللاكتوز فيهما

المركب	الكلوكوز (مايكروغرام/مل)	عدد الوحدات الإنزيمية المضافة
حليب فرز	**22.68**	**10**
شرش كامل	**57.10**	**10**
شرش مزال منه البروتين	**52.18**	**10**

المصادر

1- احمد، محمد علي؛ محمد عبد الرزاق النوواي (**1999**). الفطريات الصناعية . الدار العربية للنشر والتوزيع.

2- الخفاجي، زهرة محمود (**1990**). التقنية الحيوية. مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر – جامعة بغداد،العراق.

3- الراوي، أكرم ثابت وسمر صالح الطائي (**2007**). إنتاج اللاكتيز من العفن ***Aspergillus aculeatus*** ودراسة بعض صفاته . **1**- عزل العفن المنتج للإنزيم .مجلة العلوم الزراعية العراقية: **12** (**4**):**161-167**.

4- الطائي، سمر صالح وأكرم ثابت الراوي (**2007**). إنتاج اللاكتيز من العفن ***Aspergillus aculeatus*** ودراسة بعض صفاته. تعيين الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم الخارج خلوي **Extracellular**. مجلة العلوم الزراعية العراقية. **12**(**4**):**168-175**.

5- جاسم، علي عبد الكاظم (**1986**). إنتاج إنزيم البيتا – جالاكتوسايديز من الفطر ***Aspergillus niger*** ودراسة بعض صفاته. رسالة ماجستير-كلية الزراعة – جامعة البصرة،العراق.

6- محمد سعيد، أكرم ثابت (**1996**). إنتاج الاميليزات من الفطر (***Aspergillus orratus*** **group**) المتحمل للحرارة العالية بوساطة تخمرات الحالة الصلبة. أطروحة دكتوراه –كلية الزراعة – جامعة بغداد،العراق.

7- Agrawal, S.; H. M. Sonawat and S. M. Duha (1982). Thermostable beta-galactosidase from fungi.J.Dairy. Sci.,65 (5):866-870.

8- Bigelis, R. (1973). Carbohydrates .In : Enzymes in food processing, 3rd. edi .(ed by G. Reed and T. Nagodawithana) pp.139-142. Academic Press.

9- Brandor, R. L.; J. R. Nicoli and A. E. D. Figueiredo (1987). Purification and characterization of a B- galactosidase from *Fusarium oxysporum var.lin*i. J.Dairy. Sci., 70 (7):1331-1337.

10- Castillo, F. J. (1990). Lactase metabolism by yeast. In: Yeast biotechnology and biocatalysis.(ed-by H.Varachtert and R.De Mot). Maccel Dekker, New York.

11- Champagane, C. P. and J. Goulet (1988). Growth of baker's Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in lactase hydrolysis-cheese whey ultrafiltterate. Can. Ins. Food. Sci. Tech., 21:545-548.

12- Egan, H.; R. S. Kirk and R. Sawye (1985). Person's Chemical Analysis of Food. 18th, ed.Churchill Livingstone. London.

13- Gekas, V. and M. Lopez-Leiva (1985). Hydrolysis of lactase,A Literature Reviwe: Proc. Biochem., 20:2-12.

14- Giacin, J. R.; J. Jakubowski; J. G. Leeder; S. G. Gilbert and D. H. Kleyn (1974). Characterization of lactase immobilized on collagene conversion of whey lactase by soluble and immobilized lactase. J. Food. Sci., 39:751-754.

15 - Goncalves, J. A. and F. J. Castillo (1982). Partial purification and characterization of B-D-galactosidase from *K.marxianus*.J. Dairy Sci., 65(11):2088-2094.

16 - Harrigan, W. F. and M. E. McCane (1976). Laboratory Methods In Food and Dairy Microbiology.London.New York. Academic Press.

17- Ismail, S. A.; S. S. Mabrouk and R. R. Mahoney (1997). Purification and characterization of B- galactosidase from *Mucor pusillus*. J. Food Biochemistry, 21:145-162.

18- Keum, J. S. and J. W. Kim (1991). Effect of lactase on the quality of cheddar cheese. Korean J. Dairy Sci., 13(1).

19- Kosikowski, F. V. (1979). Whey utilization and whey products. J. Dairy Sci., 62(7):1149-1160.

20- Kosikowski, F. V. and L. E. Wierzbicki (1971). Low lactase yogurt from microbial lactase (B-D-galactosidase) applications. J. Dairy Sci., 54(5)764.

21- Mahoney, R. R. and C. Adamchuk (1980). Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from K. fragilis.J. Food Sci., 45:962-964.

22- O´ Leary, V. S. and J. H. Woychik (1976). A comparison of some chemical properties of yogurt made from control aand lactase – treated milks. J. Food Sci., 41:791-793.

23- Pirt, S. J. (1975). Principles of Microbe and cell cultivation, BlackWell Scientific Publication. Oxford, London.

24- Rand, A. G. (1973). The use of enzyme for the reduction of lactose level in milk products. Australian J. Dairy Tech., 28:63-67.

25- Sieber, R. (2000). Lactase intolerance and milk consumption. Mljkartstvo, 50 (2):151-164.

26- Siso, M. I. G. and S. S. Doval (1994). Kluyveromyces lactase immobilization on corn girts for milk whey lactose hydrolysis. Enzyme Microb.Tech., 16:303-310.

27- Watanabe, Y.; Y. Kibesaki; S. Takenishi; K. Sakai and Y. Tsujisaka (1979). Purification and properties of B-galactosidase from *Penicillium citrinum*. Agric.Biol.Chem., 43(5):943-950.

28- Wendorff. W. L.; C. H. Amundson and N. F. Olson (1971). Use of Yeast B-galactosidase in milk and milk products. J. Milk Food. Tech., 34(6):294-299.

29- Whitaker, J. R. and R. A. Bernhard (1972). Experiments for : introduction and enzymology. The Whiber Press, Davis.

Iraqi J. Agric. Vol.15 No.1 pp.154–167 Feb./2010

EXAMINING THE PROPERTIES OF LACTASE PRODUCED FROM THE MOLD *Aspergillus aculeatus* 3. DETERMINATION OF THE OPTIMUM CONDITIONS FOR THE INTRACELLULAR

ENZYME PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION WITH STUDYING SOME OF IT'S PROPERTIES AND APPLICATIONS

A. T. Al-Rawi*   S. S. Al-Taáy*   S. R. Alani**

ABSTRACT

The optimum condition and best medium for the production of intracellular lactase were studied.The best conditions for the enzyme production from the mold *Aspergillus aculeatus* were found as : period of fermentation 168h., initial follows pH 5.0, size of inoculums 1×10^6 spore/ml., speed of shaking incubator 150 r.p.m., temp. of fermentation 30°C. The best medium for the intracellular lactase production was: deproteinized whey fortified with $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% (W/V), K_2HPO_4 0.1% (W/V), yeast extract 0.01% (W/V) and lactose 10% (W/V).

The intracellular lactase was partially purified by two steps that included: dialysis and ion exchange column chromatography (DEAE-cellulose) the yield and fold of purification was 67.69 and 2.63% respectively. The Properties of the partially. purified lactase were investigated. It was found that the pH stability ranged between 5-7. The enzyme retained 94% of it's original activity after incubation at 50°C for 30 min. And the complete loss of the activity was at 60°C for the same peiod. The enzyme activity was inhibited by D- galactose.

Some technical applications of the crude lactase were investigated. It was found that there was a development in the rate of lactic acid production in lactase hydrolyzed milk by dialyzed and non dialyzed lactase during fermentation by starter of yoghurt in comparison with control milk. Lactase hydrolyzed whey by crude intracellular lactase was used in the production of biomass from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. There was a raise in biomass by one log. cycle after incubation for72 h. Whey proteins were around activators for crude lactase activity, while milk caseins were strong inhibitors.

Part of M. Sc. Thesis for the second author.

*** College of Agric.- Univ. of Baghdad. Baghdad,Iraq.**
****Ministry of Sci. and Tech.- Baghdad,Iraq.**