تنقية وتوصيف انزيم بيتا – كالاكتوسيديز المنتج من عزلة محلية من العفن الآلف للحرارة العالية *Rhizomucor pusillus IB8*

خالد جابر الزويني*[1] , غازي منعم عزيز[1]و محمد عمر[2]

[1] قسم التقنيات الاحيائية , كلية العلوم , جامعة بغداد , بغداد ,العراق.

[2] قسم علوم الأغذية و التقانة الإحيائية . كلية الزراعة, جامعة بغداد , بغداد, العراق.

الخلاصة

نقي أنزيم بيتا–كالاكتوسيديز الخارج خلوي والمنتج من العزلة المحلية للعفن *Rhizomucor pusillus IB8* بعدة خطوات اشتملت على الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 80 % وكروماتوغرافيا التبادل الايوني بعمود DEAE–Cellulose ، ومن ثم الترشيح الهلامي في عمود Sepharose CL– 6B وبلغ عدد مرات التنقية 42.2 مرة بحصيلة مقدارها 24.8 %. بينت نتائج توصيف الانزيم ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم تراوح بين 4.5– 5 في حين كان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بين 5 – 5.5 ، ان درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم هي 60 م. وتبين ان الانزيم ذو ثبات حراري عال إلى حد ما اذ احتفظ الأنزيم بحوالي 98 % من فعاليته عند حضنة مدة 60 دقيقة في درجة حرارة 60 م في حين فقد حوالي 25 % عند حضنه مدة 120 دقيقة في درجة الحرارة نفسها . بلغت قيمة طاقة التنشيط لتحويل المادة الأساس ONPG إلى ناتج 6.15 كيلو سعرة/مول بينما بلغت قيمة طاقة التنشيط لمسخ الأنزيم 99.3 كيلو سعرة / مول . وبلغ الوزن الجزيئي للأنزيم 232000 دالتون عند تقديرة بطريقة الترشيح الهلامي وكانت معدلات قيم ثابت ميكالس Km والسرعة القصوى V_{max} للأنزيم هي 0.46 ملي مولار و 223 مايكرومولار/دقيقة على الترتيب باستخدام ONPG بوصفها مادة أساس .

Purification and Properties of β-Galactosidase From A Thermophilic Fungus *Rhizmmucor Pusillus* IB8.

Khalid Jaber Alzwany[1]*, Ghazi M Aziz [1]and Mohammed Omer[2]

[1]Department of Biotechnology , Collage of Science, University of Baghdad,Baghdad,Iraq.

[2] Deparment of Food Science and Biotechnology ,College of Agriculture, University of Baghdad , Baghdad,Iraq.

Abstract

An extracellular β-galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor Pusillus* IB8 has been purified via several steps included precipitation by ammonium sulphate at 80 % saturation, DEAE- Cellulose Ion exchange chromatography and

*Email:Khalidluti@yahoo.com

gel filteration on sepharose CL-6B column. The Final purification folds and the yield of the enzyme were 42.5 and 24.8 % respectively. The purified β-galactosidase has an optimum pH for its activity between 4.5 to 5, while the optimum pH for enzyme stability was between 5 to 5.5. Futhermore, it was found that the optimum temperature for its activity was 60 C°. The purified enzyme retained approximatly 98% of its original activity when incubated at 60 C° for 60 min. However, 25 % of its activity was lost when incubated for 120 min at the same tmperaure. Activation energy for conversion of the substrate ONPG to products was 6.15 Kcal / mol, whereas, for enzyme denaturation it was 99.3 Kcal / mol. The molecular weight of the purified enzyme was 232000 dalton as determined by gel filtration on sepharose CL-6B. Kinetic studies showed that the Michaelis constant (Km) and maximum velocity (Vmax) values for the purified enzyme using ONPG as a substrate were 0.46 mM and 223 µM /min respectively.

المقدمة

ينتمي أنزيم بيتا –كالاكتوسيديز (EC 3.2.1.23) الى مجموعة أنزيمات التحلل المائي Hydrolase اذ يحفز تحلل الاصرة الكلايكوسيدية من نوع β– galactoside ، ويسمى تبعا للجنة الانزيمات التابعة للاتحاد العالمي للكيميائيين الحياتين β– D–galactosidase galactohydrolase . يعمل الأنزيم على تحلل سكر اللاكتوز وهو المادة الأساس الطبيعية التي يعمل عليها الأنزيم بـكسر الاصرة الكلايكوسيدية β– 1,4 الرابطة لوحدتي السكر الكلوكوز والكالاكتوز محررا اياهما [1].

ينتشر هذا الانزيم بكثرة في الطبيعة وفي مصادر متباينة حيث اكدت الدراسات وجوده في النباتات والحيوانات وفي مختلف الأحياء المجهرية [2] . وقد حظي الأنزيم من المصادر المايكروبية بالاهتمام الاكبر مقارنة بالمصادر الاخرى ، اذ اجريت العديد من الدراسات المتعلقة بإنتاجيته وتنقيته وتوصيفه وتعد الاحياء المجهرية المصادر التجارية لهذا الانزيم وذلك لاسباب عدة منها سهولة التعامل مع الاحياء المجهرية ووفرة انتاجها من الانزيم فضلا عن سرعة وقلة تكاليف الانتاج . استخدمت طرائق متنوعة في تنقية انزيم بيتا – كالاكتوسيديز من ألاعفان ففي دراسة لتنقية الأنزيم الخارجي من العفن *Aspergillus niger* والمنتج باسلوب تخمرات الحالة الصلبة رسب الانزيم أولا من المستخلص الخام باستخدام كبريتات الامونيوم وبنسبة اشباع 80 % ثم كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادلات DEAE Sephadex A– 50 ثم CM– Cellulose تلاه عمود DEAE Sephade A– 50 وقد تم الحصول على عدد مرات تنقية مقدارها 252.3 [3] وفي دراسة اخرى تمت تنقية الانزيم المنتج من الفطر *Fusarium oxysporium* بخطوات شملت كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل DEAE Cellulose ثم الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G–100 وتم الحصول على عدد مرات تنقية وحصيلة أنزيمية مقدارها 36 مرة و 11 % على التوالي [4] . نقي الأنزيم المنتج من العفن *Aspergilus nidulans* بالترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 40 % ثم كروماتوغرافيا الألفة والترشيح الهلامي على العمود Sephacry S–300 وقد حصل الباحث على عدد مرات تنقية بلغت 34.5 وبحصيلة أنزيمية مقدارها 9.6 % [5] . وتمت تنقية الأنزيم المنتج من العفن *Rhizomucor sp.* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة لحد التجانس بخطوات شملت الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع 80% وكروماتوغرافيا التبادل الايوني على العمود DEAE–Cellulose وعلى مرحلتين ومن ثم الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephacryl S–300 وعلى مرحلتين ايضا وقد امكن الحصول على عدد مرات تنقية بلغت 60 وبحصيلة انزيمية مقدارها 32 % [6]. يهدف هذا البحث الى تنقية انزيم بيتا– كالاكتوسيديز المنتج من العزلة المحلية للعفن *Rhizomucor pusillus IB8* ودراسة بعض خواصة الكيموحيويه .

المواد وطرق العمل

1–العزلة المستخدمة وظروف الانتاج

استخدمت العزلة المحلية *R hizomucar pusillus IB8* الآلفة للحرارة العالية لانتاج الأنزيم والتي تم الحصول عليها في دراسة سابقة [7] . تم إنتاج الأنزيم بطريقة تخمرات

الحالة الصلبة باستخدام وسط كسبة فول الصويا المرطبة بمحلول الشرش المخفف بنسبة 50 % وبنسبة ترطيب (1 : 1.5) (وزن : حجم) وبرقم هيدروجيني ابتدائي 6 عند درجة حرارة 40 م بعد تلقيح الوسط بلقاح حجمة 10^6 بوغا/غم من الوسط بعد فترة حضانة لمدة 6 ايام [7, 8] .

2- استخلاص الانزيم

اجريت عملية الاستخلاص بعد انتهاء مدة التخمر باستخدام ماء مقطر وبنسبة (1:5)(حجم : وزن) رشح المستخلص خلال قطعة شاش نظيفة ونبذ الراشح بسرعة 8000 دورة في الدقيقة ولمدة 15 دقيقة وفي ظروف مبردة واعتبر الرائق المستخلص الخام للانزيم .

3- تقدير فعالية الانزيم

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل park وجماعته [9] في تقدير فعالية أنزيم بيتا-كالاكتوسيديز باستخدام المادة الأساس ONPG(O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) عرفت وحدة الفعالية الأنزيمية (Unit) بأنها كمية الأنزيم التي تحرر 1 مايكرومولار من ONP في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة .

4- تقدير تركيز البروتين

اتبعت طريقة Lowry وجماعته [10] لتقدير تركيز البروتين .

5- تنقية الانزيم

استعملت بعض التقنيات الكروماتوغرافيه في تنقية الانزيم تبعا لما ذكر في [11] مع بعض التحورات التي تخدم التجربه

5-1 التركيز بكبريتات الامونيوم

اضيفت كبريتات الامونيوم الى المستخلص الانزيمي الخام تدريجيا بدرجة حرارة 4 م مع التحريك المستمر للوصول الى نسبة اشباع 80 %. بعدها اجريت عملية النبذ المركز بسرعة 10000 دورة في الدقيقة ولمدة 15 دقيقة . فصل الرائق واذيب الراسب في اقل كمية ممكنة من الماء المقطر . بعد ذلك تمت ديلزة المحلول مقابل الماء المقطر .

5-2 كروماتوغرافيا التبادل الايوني

مرر المحلول الأنزيمي المركز بكبريتات الامونيوم على عمود المبادل الايوني DEAE – Cellulose 20 x 2 سم وجرت عملية غسل الجزء غير المرتبط من مكونات المحلول الأنزيمي بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.02 مولار برقم هيدروجيني 7.2 وبسرعة جريان 30 مل / ساعة وبواقع 5 مل للجزء الواحد . وعند وصول الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر الى الخط الاساس او الصفري جرت عملية استرداد البروتينيات المرتبطة على المبادل الايوني باستخدام تدرج ملحي من كلوريد الصوديوم (0 -1) مولار مع خفض الرقم الهيدروجيني من 7.5 الى 5.8 . تمت متابعة الامتصاصية على طول موجي 280 نانومتر للأجزاء المفصولة من عمليتي الغسل والاسترداد ، كما قدرت فعالية الانزيم في تلك الاجزاء . جمعت الأجزاء ذات الفعالية العالية وقيس حجمها وقدرت الفعالية وتركيز البروتين فيها .

5-3 كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

اضيف المحلول الانزيمي الناتج من خطوة التبادل الايوني بعد تركيزة بالسكروز لمدة 3 ساعات على عمود الترشيح الهلامي Sepharose CL – 6B بابعاد (1.5 x 50) سم واجريت عمليتا الموازنة والاسترداد بوساطة محلول فوسفات الصوديم الدارئ بتركيز 0.02 مولار وبرقم هيدروجيني 7.2 وبسرعة جريان 30 مل/ساعة وبواقع 5 مل للجزء الواحد وتمت متابعة الامتصاصية للاجزاء المنفصلة على طول موجي 280 نانومتر فضلا عن تقدير الفعالية الانزيمية . جمعت الاجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين فيها وركزت بالسكروز ليصل الحجم الى حوالي 3 مل . مرر بعد ذلك على نفس العمود وبنفس الظروف السابقة تماما . جمعت الاجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت الفعالية وتركيز البروتين فيها وحفظت بالتجميد بدرجة – 20 م .

6- توصيف الانزيم

6-1 تعين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم

حضرت محاليل المادة الأساس ONPG بتركيز 0.005 مولار بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 3.5-8 . قدرت فعالية الأنزيم المنتج في المحاليل المذكورة ورسمت العلاقة بين

الارقام الهيدروجينية المختلفة مقابل فعالية الانزيم لتعين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم [4].

6-2 تعين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم

درس تاثير الرقم الهيدروجيني على ثبات الانزيم المنتج وذلك بحضنة مع محاليل دارئة مختلفة تراوحت بين 3.5– 8 (3.5 ولمدة 20 دقيقة وعلى درجة حرارة 40 م[2].

6-3 تعين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم

قدرت فعالية الانزيم المنتج وعلى مدى من درجات الحرارة تراوحت بين 25–90 م . ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة مقابل فعالية الانزيم لتعين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم[4] .

6-4 تعين الثبات الحراري للانزيم

حضن المحلول الأنزيمي بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 25–90 م ولمدة 15 دقيقة اعقبها تبريد مفاجيء ثم قدرت فعالية الأنزيم المتبقي ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة المختلفة مقابل النسبة المئوية % للفعالية المتبقية للأنزيم لتعين درجة الحرارة المثلى لثبات الأنزيم . كما وتم دراسة ثبات الأنزيم عند درجة حرارة 60 م على فترات زمنية مختلفة وذلك بحضن محلول الانزيم في درجة حرارة 60 م ولمدة ساعتين ثم التبريد المفاجيء مع قياس الفعالية الأنزيمية المتبقية كل 10 دقائق والتي عبر عنها كنسبة مئوية من فعالية الأنزيم غير المعامل [12].

6-5 تقدير طاقة التنشيط للأنزيم

قدرت طاقة التنشيط لتحويل المادة الأساس إلى نواتج Activation energy وطاقة مسخ الأنزيم بقياس ثابت سرعة التفاعل الملاحظ (Kobs) على مدى من درجات الحرارة تراوح بين (25–90) م° ورسمت العلاقة بين مقلوب درجة الحرارة المطلقة (1 / T) مقابل $2.303 \log k_o$ ومنها تم حساب طاقة التنشيط وفقا لمعادلة ارينيوس [13] .

6-6 تعين الوزن الجزيئي للانزيم

تم تعين الوزن الجزيئي للانزيم بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sepharose CL-6B بابعاد 50 x 1.5استعمال البروتينات القياسية (Trypsin 23000 D Bovin serum albumin 66200 D Catalase 232000 D , Ferritin 440000 D) بالاضافة الى محلول الدكستران الازرق 2000 [12] .

6-7 تعين الثوابت الحركية للانزيم

استخدمت تراكيز مختلفة من المادة الاساس ONPG تراوحت بين (0.05 – 0.7) ملي مولار لاجل تقدير قيم ثابت ميكالس (Km) والسرعة القصوى (V_{max}) من خلال رسم العلاقة بين السرعة الاولية وتركيز مادة الاساس ONPG باربعة طرائق [14].

النتائج والمناقشة

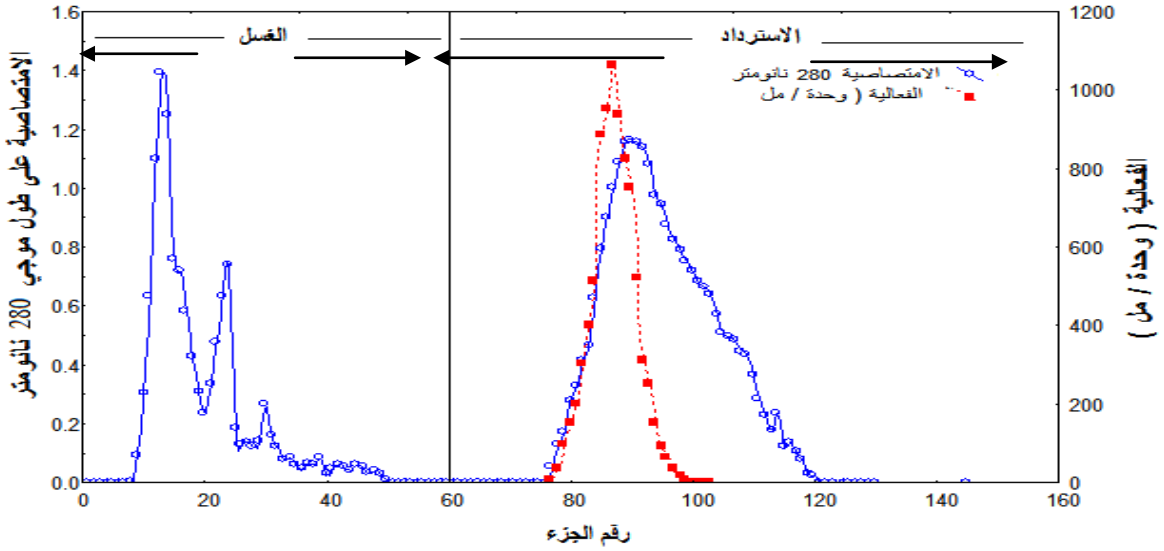
1- تنقية الانزيم

اخضع المستخلص الأنزيمي الخام لسلسلة من خطوات التنقية تمثلت الخطوة الأولى منها بتركيز الأنزيم باستخدام كبريتات الامونيوم وبنسبة اشباع 80 % وقد حققت هذه الخطوة تنقية جزئية للأنزيم بلغت 3.9 مرة وبحصيلة انزيمية مقدارها 54.5 % مع ارتفاع واضح في الفعالية النوعية للانزيم لتصل الى 671 وحدة / ملغم بروتين (جدول رقم 1) . ثم أعقب ذلك خطوة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل الايوني DEAE – Cellulose وبعد ان تم امرار المحلول الأنزيمي المركز على عمود المبادل الايوني قيست الامتصاصية على طول موجي 280 نانومتر لوحظ خلو الأجزاء غير المرتبطة بالمبادل (اجزاء الغسل) من الفعالية الانزيمية تماما مما يؤكد ارتباط الأنزيم بالمبادل الايوني السالب وان محصلة الشحنات المحمولة على الأنزيم في الظروف المستخدمة في هذه الخطوة سالبة (شكل رقم 1) . ويوضح الجدول رقم 1 ان عدد مرات التنقية التي امكن الحصول عليها بهذه الخطوة من الاجزاء المستردة من المبادل بلغ 9.3 مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها 50.5 % مع ارتفاع في الفعالية النوعية لتصل إلى حوالي 1583 وحدة /ملغم بروتين .ثم استكملت تنقية الأنزيم بخطوة الترشيح الهلامي بوساطة عمود

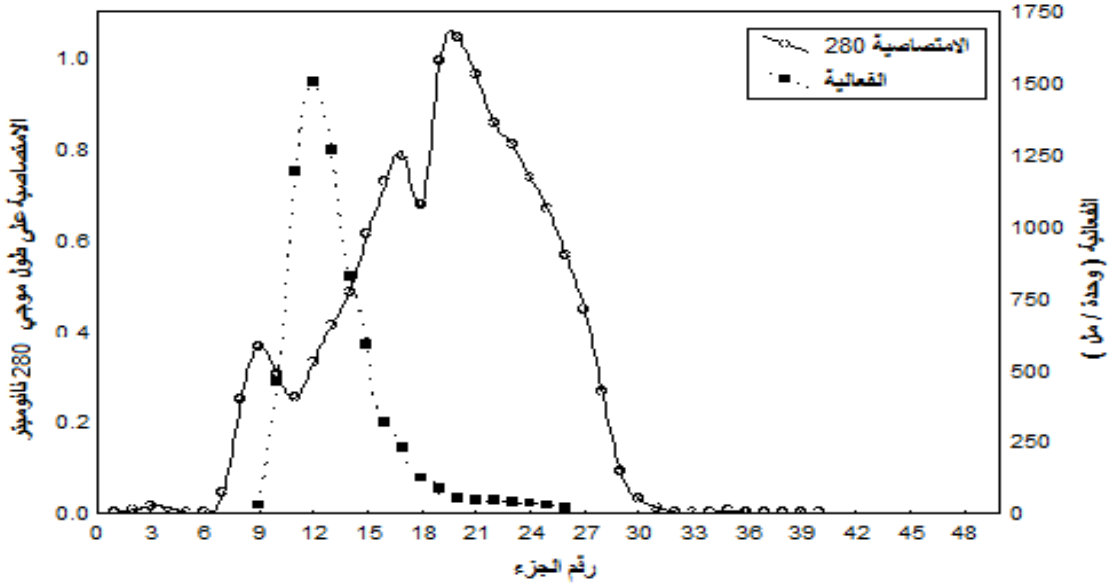
هلام Sepharose CL –6B حيث لوحظ ظهور ثلاث قمم للبروتين في الأجزاء المستردة من عمود الترشيح الهلام وقمة فعالية واحدة مع ملاحظة ان الفعالية الأنزيمية قد تركزت في الأجزاء المستردة (10 –16) (شكل رقم 2) ، ارتفع عدد مرات التنقية اثر هذه الخطوة إلى 37.3 بحصيلة أنزيمية مقدارها 29.9 % مع ارتفاع واضح في الفعالية النوعية حيث بلغت 6323 وحدة/ ملغم . وينبغي الإشارة إلى ان الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sepharose CL – 6B كانت خطوة موفقة في التخلص من الصبغات التي رافقت الأنزيم خلال خطوات التنقية السابقة بحيث أمكن الحصول على المحلول الأنزيمي بشكل رائق وعديم اللون . جمعت الأجزاء ذات الفعالية الأنزيمية وركزت بوساطة السكروز ومررت على نفس العمود وتحت الظروف نفسها لوحظ أن الأجزاء المستردة من الهلام تضمنت قمتين للبروتين كانت الفعالية الأنزيمية مركزة في القمة الأولى الكبيرة أما القمة الثانية الصغيرة فكانت خالية من الفعالية تماما (شكل رقم 3) . ارتفع عدد مرات التنقية بعد هذه الخطوة إلى 42.5 بحصيلة أنزيمية مقدارها 24.8 % وزيادة في الفعالية النوعية لتصل الى 7205.8 وحدة/ملغم (جدول رقم 1) .

جدول 1– خطوات تنقية أنزيم بيتا–كالاكتوسيديز المنتج من العفن *Rhizomucor pusillus IB8*

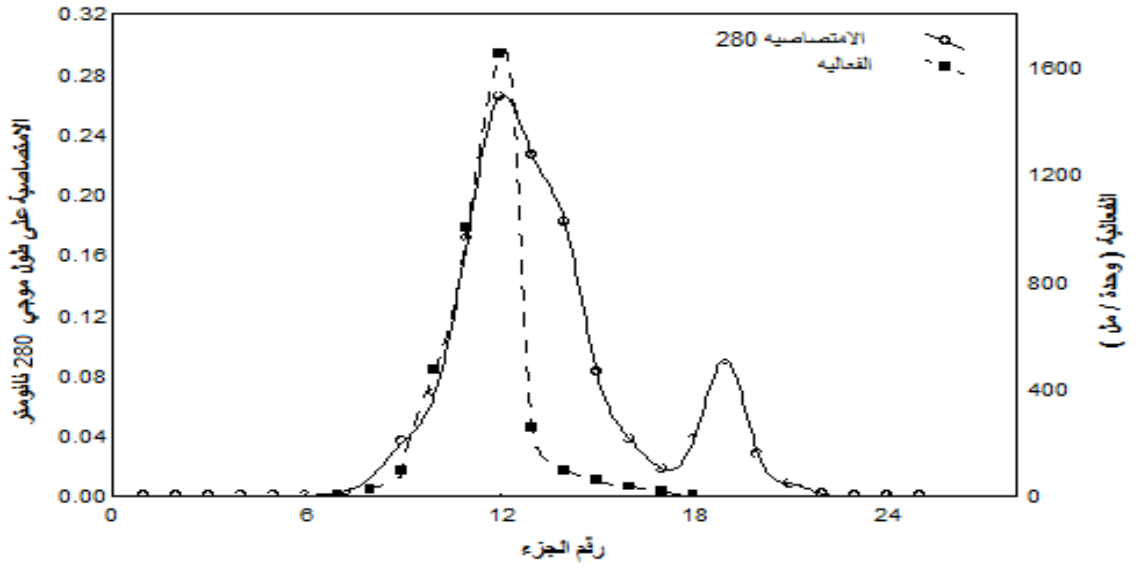
خطوة التقنية	حجم (مل)	الفعالية وحدة /مل	تركيز البروتين ملغم /مل	فعالية نوعية وحدة /ملغم $x10^2$	الفعالية الكلية وحدة $x10^3$	عدد مرات التنقية	الحصيلة %100
المستخلص الخام	70	1410	8.33	1.693	98.7	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة أشباع 8%	21	2550	3.8	6.71	53.55	3.9	54.2
التبادل الايوني بأستعمال DEAE– cellulose (الاجزاء المستردة)	70	712.5	0.45	15.83	49.87	9.3	50.9
الترشيح الهلامي Sepharose CL–6B (المرحلة الأولى)	36	822.1	0.13	63.23	29.59	37.3	29.98
الترشيح الهلامي Sepharose CL–6B (المرحلة الثانية)	20	1225	0.17	72.058	24.5	42.5	24.8



الشكل 1– كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية الانزيم بيتا– كالاكتوسيديز المنتج من العفن IB8 *Rhizomucor pusillus* باستخدام عمود DEAE Cellulose بابعاد (2 X 20) سم.



الشكل 2- كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية الانزيم بيتا- كالاكتوسيديز المنتج من العفن *Rhizomucor pusillus* IB8 باستخدام عمود Sepharose CL-6B (المرحله الاولى).



الشكل 3- كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية الانزيم بيتا- كالاكتوسيديز المنتج من العفن *Rhizomucor pusillus* IB8 باستخدام عمود Sepharose CL-6B (المرحله الثانيه).

2- توصيف الأنزيم

2-1 خصائص الأنزيم الأساسية

يوضح الجدول رقم 2 نتائج توصيف انزيم بيتا- كالاكتوسيديز المنتج من العزلة المحلية *Rhizomucr pusillus IB8* حيث وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الأنزيم يتراوح بين 4.5 –5 في حين لوحظ انخفاض فعالية الأنزيم عند الأرقام الهيدروجينية التي هي أدنى من 4.5 وانعدامها تماما في الأرقام الهيدروجينية المتطرفة 8 أو اكثر . وتبين ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم تراوح بين 5.5 5 – ولوحظ انخفاض ثبات الأنزيم عند الأرقام الهيدروجينية البعيدة عن هذا المدى حيث احتفظ الأنزيم بحوالي 62 % من

فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 3.5 وأظهرت النتائج انخفاضا ملحوظا في الفعالية عند الأرقام الهيدروجينية المتعادلة والقريبة من القاعدية إذ احتفظ الأنزيم بحوالي 28 % من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 7.5 وفقد كامل فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 8 . ويعود هذا الانخفاض الى تاثير الرقم الهيدروجيني في تركيب جزيئه الأنزيم وتغير تركيبة الثانوي والثالثي وتغير الهيئة المتأينة
للموقع الفعال مع احتمال حدوث مسخ لاعكسي للأنزيم في المحاليل شديدة الحامضية او القاعدية [13] وقد أشار عدد من الدراسات إلى ان الفعالية المثلى لانزيم بيتا–كالاكتوسيديز المنتج من ألاعفان تقع ضمن الارقام الهيدروجينية المنخفضة وتتراوح في الغالب بين 5 – 2.5 [12] .
وللتعرف على تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيم بيتا–كالاكتوسيديز قيد الدراسة اجري التفاعل الأنزيمي بدرجات حرارة تراوحت من (25 – 90) م وأظهرت النتائج ازدياد فعالية الأنزيم بزيادة درجة الحرارة اذ بلغت أقصاها عند 60 م فكانت الفعالية الأنزيمية عند هذه الدرجة 1625 وحدة/ مل . ثم بدأت بعدها بالانخفاض تدريجيا بزيادة درجة الحرارة لتصل عند درجة حرارة 90 م الى 121.8 وحدة / مل . وتأتى هذه النتيجة متفقة مع ما توصل إلية Shaikh وجماعته [12] من ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم المنتج من العفن *Rhizomucor sp.* هي 60 م . أن زيادة سرعة التفاعل الأنزيمي مع ارتفاع درجة الحرارة والى حد معين يعزى الى زيادة التصادمات بين جزيئات الانزيم والمادة الاساس نتيجة زيادة الطاقة الحركية للجزيئات بفعل زيادة درجة الحرارة [14] فبينما تسبب درجات الحرارة العالية انخفاضا في فعالية الأنزيم بشدة بسبب ما يحدث للأنزيم من مسخ Denaturation نتيجة تأثير الحرارة في تركيب الانزيم وتغير هيئة الموقع الفعال مما يؤدي الى فقدان فعاليتة.

وبينت نتائج حضن الأنزيم بدرجات حرارة تراوحت بين (25 – 90) م لمدة 15 دقيقة ان الأنزيم قد احتفظ بكامل فعاليته عند حضنة بدرجة حرارة (25–60)م° ثم بدأت الفعالية بعدها بالانخفاض الحاد مع ارتفاع درجة الحرارة اذ احتفظ الأنزيم بحوالي 60 % من فعاليته عند حضنه بدرجة 65 م وبلغت الفعالية أوطأ مستوى لها عند درجة الحرارة 75 م اذ فقد الأنزيم ما يقارب 98 % من فعاليته . درس الثبات الحراري للأنزيم عند درجة حرارة 60 م لمدد زمنية مختلفة فلوحظ ان الأنزيم احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بدرجة 60 م لمدة 50 دقيقة ولم يفقد سوى 2 % من فعاليته عند حضنه في تلك الدرجة مدة 60 دقيقة . كما لوحظ ان الأنزيم احتفظ بحوالي 75 % من فعاليته بعد مرور 120 دقيقة من المعاملة. فتبين من هذه النتائج ان الأنزيم قيد الدراسة ذو ثباتية عالية عند درجة حرارة 60م وتشير الأدبيات العلمية الى ان انزيمات بيتا–كالاكتوسيديز المنتجة من الاعفان تمتاز بتحملها لدرجات الحرارة العالية مقارنة بالأنزيمات المنتجة من المصادر الاخرى فقد وجد ان الانزيم المنتج من العفن *Rhizomucor sp.* يحتفظ بفعاليتة عند حضنة بدرجة 60 م مدة 4 ساعات [12] ، وفي دراسة اخرى وجد ان الانزيم المنتج من العفن *Aspergillus niger* يحتفظ بفعاليتة عند درجة حرارة 55 م مدة 8 ساعات كما يحتفظ بفعاليتة عند 60 م مدة 4 ساعات [2].

وتم حساب طاقة التنشيط لأنزيم بيتا – كالاكتوسيديز المنتج لتحويل المادة الاساس ONPG الى ناتج تبعا لمعادلة ارينيوس وقد وجد انها تساوي 6.15 كيلوسعرة / مول . وكانت طاقة التنشيط لمسخ الانزيم 99.3 كيلوسعرة / مول وتعطي هذه القيمة فكرة عن مدى ثبات الانزيم بدرجات الحرارة العالية فكلما كانت هذه القيمة عالية كلما كان ثبات الأنزيم اكثر وتتراوح طاقة التنشيط لمسخ الانزيمات بين 35 – 175 كيلوسعر/ مول [13] ، وتتفق هذه النتائج مع ما اشير إلية في الفقرة السابقة الخاصة بالثبات الحراري للانزيم والتي كانت عالية بدرجة يمكن معها اعتبار الانزيم من الانزيمات الثابتة حراريا Thermostable.
تم تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم بيتا – كالاكتوسيديز المنتج بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sepharose CL – 6B فكان 232000 دالتون وتاتي هذه النتيجة مقاربة لما توصل إلية Shaikh وجماعتة [12] من ان الوزن الجزيئي لانزيم بيتا–كالاكتوسيدبز المنتج من العفن *Rhizomucor sp sp.* يبلغ 250000 دالتون باستخدام تقنية الترشيح الهلامي بينما توصل Ismail وجماعتة [11] الى ان الوزن الجزيئي للانزيم المنتج ممن العفن *Mucar pusillus* يساوي 129000 دالتون باستخدام تقنية PAG–SDS.

2 -2 الثوابت الحركية للانزيم

ولغرض تعين قيم ثابت ميكالس Km والسرعة القصوى V_{max} لانزيم بيتا – كالاكتوسيديز المنتج استخدمت اربع طرائق لرسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتراكيز مختلفة من ONPG ويبين الجدول رقم 3 نتائج هذه القيمة ويتضح مدى التقارب بين الثوابت الحركيه المستحصله من الطرائق الأربعة فقد بلغ معدل القيم للثوابت الحركية Km و V_{max} 0.46 ملي مولار و 223 مايكرومول/ دقيقة على الترتيب . وعموما يلاحظ انخفاض قيمة ثابت ميكالس المستحصل عليها في هذه الدراسة مقارنة بما تذكرة المراجع العلمية حول قيم هذا الثابت للأنزيم المنتج من الاعفان .

جدول 2 – صفات انزيم بيتا – كالاكتوسيديز المنتج من ا لعزلة المحلية *Rhizomucor pusillus IB8*

الصفة	القيمة
PH الامثل للفعالية	4.5 – 5 .
PH الامثل لثبات الانزيم	يحتفظ الانزيم بفعاليتة في الارقام الهيدروجينية 5.5–5 لمدة 20 دقيقة .
درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم	60 م
الثبات الحراري للانزيم	احتفظ الانزيم بكامل فعاليتة عند حضنة بدرجة حرارة (25 – 60) م لمدة 15 دقيقة . احتفظ الانزيم بحوالي 98 % من فعاليته عند حضنة في درجة 60 م لمدة 60 دقيقة . احتفظ الانزيم بحوالي 75 % من فعاليتة بعد مرور 120 دقيقة عند حضنة في 60 م .
طاقة التنشيط لتحويل المادة الاساس ONPG الى ناتج	6.15 كيلو سعرة / مول .
طاقة التنشيط لمسخ الانزيم	99.3 كيلو سعرة / مول .
الوزن الجزيئي	232000 دالتون .

الجدول 3– الثوابت الحركية لانزيم بيتا–كالاكتوسيديز المنتج من العزلة المحلية للعفن *Rhizomucor Pusillus IB8* تجاه المادة الاساس ONPG

V_{max} µM / min	(mM) Km	الطريقة
222.2	0.45	طريقة لاينويفر –بيرك Linewaver–Burk reciprocal plot
224	0.45	طريقة وولف–أوغستنسون–هافستي The Woolf–Augustinsson Hofstee plot
223.8	0.47	طريقة هانس–وولف Hanes– Woolf plot
222	0.45	طريقة أيدي –سكاتجارد The Eadie– Scathard plot
223	0.46	المتوسط الحسابي

المصادر

1. Whitaker, J. R. **1972.** *Principles of enzymology for the food sciences*. Mercel Dekker, inc. New York .
2. Manzanares, p.; *de*Graaff, L. H. and visser, J. **1998 .** Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of noval α-galactosidase activity. *Enzyme.Microb. Technol*., **22**,pp:383-390.
3. Park, Y. K.; Santi, M. S. S. and Pastore, G. M**. 1979 .** Production and characterization of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of food science***,44** (1),pp:100 - 103
4. Brandao, R. L.; Nicoli, J. R. and Fijrueirede, A.F.D. **1987.** Purification and characterization of β-galactsidae from *Fusarium oxysporium* var. lini. *J. Dairy Sci.,* **70** (7),pp: 1331-1337
5. Diaz, M.; Pedregosa,A. M.; De lucas, J. R.; Torralba, S.; Monistrol, I.F. and laborda, F. **1996.** Purification and properties of β-galactosidase from *Aspergillus nidulans. Microbiologia*, **12**,pp:585-592.
6. Shaikh, S. A.; Khire, J. M. and Khan, M. I. **1997.** Production of β-galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 19,pp: 239 – 245.
7. الزويني ، خالد جابر .**2003**. توصيف انزيم بيتا–كالاكتوسيديز المنتج من فطريات آلفة للحرارة العالية بطريقة تخمرات الحالة الصلبة . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد
8 الزويني ، خالد جابر وعزيز، غازي منعم ومحي الدين ، محمد عمر .**2006**. تعين الظروف المثلى لانتاج انزيم بيتا–كالاكتوسيديز من عزلة محلية لعفن *Rhizomucor Pusillus IB8* الآلف للحرارة العالية بطريقة تخمرات الحالة الصلبة . مجلة ابحاث التقانه الحيويه, المجلد الثاني (2) 38–53.
9 Park, Y. K.; Santi, M. S. S. and Pastore, G. M. **1979.** Production and characterization of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of food science***, 44** (1),pp: 100 - 103
10 Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. **1951.** Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. **193**,pp: 265-275 .
11 Ismail, S. A.; Mabrouk, S. S. and Mahoney, R. R. **1997.** Purification and characterization of β - galactosidase from *Mucor pusillus*. *J. Food Biochem.*, **21** (2) ,pp: 145 - 162.
12 Shaikh, S. A.; Khire, J. M. and Khan, M. I. **1999 .** Characterization of a thermostable extracellular β-galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Biochemica et. Biophysica Acta***, 1472**,pp: 314 - 322
13 Whitaker, J. R. and Bernhanrd, R. A. **1972.** *Experiments For : An Introduction to Enzymology*. The Whiber Press. Davis.
14 Segel, I. H. **1976.** *Biochemical calculation*. 2nd edition, John Wiley and Sons. New York .