توصيف إنزيم الـ β – Galactosidase المستخلص والمنقى من ضرع البقر

إياد نافع يحيى[1] و علي نوري عبد[1]
و هبة عدنان إبراهيم عزة[1]

تاريخ الإيداع 2014/10/26
قبل للنشر في 2015/02/16

الملخص

درست بعض خصائص إنزيم β-galactosidase المستخلص والمنقى من ضرع البقر في مختبر الدراسات العليا في قسم العلوم – كلية التربية الأساسية – المستنصرية، وتوصلت الدراسة إلى أن الإنزيم من نوع بروتين سكري Glycoprotein، إذ كانت مكونات الجزء الكربوهيدرات (20.5%)؛ وذلك بالاعتماد على طريقة فينول- حمض الكبريتيك. وكان الوزن الجزيئي للإنزيم 176.620 كيلو دالتون مقدراً بطريقة الترشيح الهلامي.

وبلغت الفعالية الإنزيمية 3000 وحدة /مل عند درجة الحموضة 5.5، وهي المُثلى لفعاليته، ولوحظ فقدان الفعالية الإنزيمية كلياً عند درجة الحموضة 9، كما أظهر الإنزيم استقرارية عالية عند درجة الحموضة بين 4 و6.5. وأظهرت النتائج أن درجة الحرارة المُثلى لفعالية الإنزيم كانت 55 م° عند درجة الحموضة المُثلى، وبلغت الفعالية الإنزيمية (1800) وحدة/ مل. أمّا درجة حرارة الثبات للفعالية الإنزيمية فقد راوحت بين 30- 60 م°. وبحساب كمية الغلوكوز المتحررة بطريقة Glucose Enzymatic Calorimetric (GOD-PAP) تبيّن قدرة الإنزيم على حلمهة سكر اللاكتوز Lactose بمقدار راوح بين 22% بعد 30 دقيقة إلى 92% بعد 270 دقيقة.

الكلمات المفتاحية: إنزيم، بيتا-كالاكتوسايديز، لاكتيز، توصيف الإنزيمات، لاكتوز، ضرع البقر.

[1] قسم العلوم، كلية التربية الأساسية، الجامعة المستنصرية، العراق.

Characterization of β - Galactosidase Extracted and Purified from Bovine Udder

A. Yehea[1] ; A. Abed[1] and H. Assa[1]

Received 26/10/2014
Accepted 16/02/2015

Abstract

Some characteristics of the enzyme β-galactosidase extracted and purified from the udder of cowswere studiedin the laboratory of Graduate Studies in the Department of Science - College of Basic Education - University of AL-Mustansiriya. This study had confirmed that this enzyme is glycoprotein in which the carbohydrate part constitutes (20.5%) according to phenol –sulfate acid method, and its molecular weight was 176.620 KD as estimated by gel filtration.

The total enzymatic effectiveness was(3000) units/ ml at the optimized pH5.5, for enzyme activity, the enzyme had lost its activity completely at pH (9), and showed high stability at the pH (4 - 6.5).

The results showed that the optimum temperature for the highest enzyme activity (1800 Units/ ml)was (55)C° at the optimized pH, The temperature stability of the effectiveness of the enzyme ranged between (30-60)C °.

And the ability of the enzyme to hydrolyze lactose, ranged between (22%) after (30) minutes to (92%) after (270) minutes.

Keywords: Enzyme, β-Galactosidase, Lactase, Characterization, Lactose, Cow Udder.

[1] Science Department, College of Basic Education, University of AL-Mustansiriya, Iraq.

المقدمة

ينتمي إنزيم الـ β –غالاكتولاز Galactosidase –β إلى إنزيمات الحلمهة، وله رقم التصنيف 3.2.1.23 .EC، يتخصص هذا الإنزيم بحلمهة Hydrolysis الروابط الغليكوزيدية Galactosides التي يسهم بتشكيلها سكريد β– الغالاكتوز β-Galactose في أنواع المركبات جميعها مثل سكر اللبن Lactose، إذْ يطلق على الإنزيم عندها اسم لاكتاز Lactase. فضلاً عن حلمهة الروابط β – الغالاكتوزيدية في كل من البروتينات السكرية Glycoprotein's والشحوم السكرية Lipoproteins، وكذلك تفكيك بشكل أقل كل من الفوكوزيدات Fucosides والأرابينوزيدات Arabinosides، كما يستعمل هذا الإنزيم في الصناعات الغذائية لمشتقات الحليب.

يعد إنزيم اللاكتاز من الإنزيمات الأساسية في جسم الإنسان، ويُسبّب نقصه الحساسية المفرطة لسكر الحليب Lactose Intolerance، لذلك ينتج تجارياً من سلالات من الفطريات تابعة للجنس *Aspergillus* (Zhuofu وآخرون، 2013)، وكذلك من الخمائر التابعة للجنس *Kluyveromyces* (Barbara وآخرون، 2011) لاستعماله مكملاً غذائياً لأولئك الأشخاص.

أجريت عدة دراسات لتوصيف إنزيم اللاكتاز، فقد ذكر Nagy وآخرون (2001) أنَّ أفضل فعالية للإنزيم المعزول والمنقى من عفن الخبز *Penicillium chrysogenum* كانت بين 27 و37 م°، وأصبح الإنزيم فاقد الفعالية عند درجة حرارة 50 م°. في حين وجد Haider وHusain، (2007) أن درجة الحرارة 50 م° هي المثلى لفعالية الإنزيم المستخلص والمنقى من اللوز، أما Manuela وآخرون، (2009) فقد بيّنوا أنّ درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم المستخلص والمنقى من العنب Grape Berry هي 65 م°، وذكروا أنّ درجة حرارة ثبات الإنزيم كانت أقل بكثير من تلك الدرجة.

ووجد Desire وآخرون، (2007) أنَّ درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم المعزول من بكتريا *Rhynchophorus palmarum* كانت 55 م°.

وأشار Abed، (2010) عند توصيفه لإنزيم β-galactosidase المستخلص من دماغ الغنم حديثة الولادة إلى أنَّ درجة الحرارة المُثلى لفعالية الإنزيم كانت 50 م°. وذكر يحيى وآخرون، (2011) أن تأثير درجة الحرارة في نشاط إنزيم β-galactosidase المستخلص من دماغ المعز حديثة الولادة وردود فعله، قد أجري في إطار درجة حرارة راوحت بين 30–80 م°، وقد بينوا ظهور زيادة في الفعالية الإنزيمية في درجات حرارة عالية نسبياً، إذْ كانت 1590 وحدة/ مل عند درجة حرارة (55) م°، بعد ذلك بدأت الفعالية الإنزيمية تنخفض بارتفاع درجة الحرارة، وقد بلغت 383 وحدة/ مل في درجة حرارة (70) م° وقد اختفت تماماً الفعالية الإنزيمية في درجة حرارة 80 م° ولاحظوا أنّ الإنزيم يحتفظ بكامل فعاليته الإنزيمية في درجات حرارة راوحت بين 30 إلى 60 م°، وقد أشار Mozumder وآخرون، (2012) إلى أنه تم تحديد

تأثير درجة الحرارة في نشاط الإنزيم المعزول من بكتريا *Lactobacillus* في درجات حرارة تراوح من 10 إلى80 م°، ولاحظوا أنَّ أفضل فعالية كانت عند درجة 70م° وأعطت فعالية 111.11وحدة/مل فيما انخفضت الفعالية إلى 79.23 وحدة/ مل عند درجة 80 م°.

تبدي درجة الحموضة تأثيراً كبيراً في فعالية الإنزيم عن طريق تأثيرها في مكونات الإنزيم، إذْ إنّ مكونات الإنزيم هي بروتينية تحوي مجموعات وظيفية متعددة ومتنوعة من هذه المجموعات الوظيفية مجموعة الأمين والكربوكسيل والثيول والهيدروكسيل، وتؤثر درجة الحموضة في تأين هذه المجاميع في الموقع الفعال للإنزيم، فضلاً عن تأثيرها في تأين الركيزة ومعقد الإنزيم– الركيزة، ومن ثم تأثيره في سرعة التفاعل الإنزيمي (Whitaker، 1972؛ المظفر، 1983).

لاحظ Haider وHusain (2007) خلال استخلاصهما إنزيم اللاكتاز من اللوز أن درجة الحموضة المُثلى للإنزيم المنقى هي 5.5. وبشكل عام تراوح درجة الحموضة المُثلى لثبات فعالية إنزيم اللاكتاز المستخلص أو المعزول من مصادر مختلفة بين 3 – 7.

وقدر يحيى وآخرون، (2011) درجة الحموضة المُثلى لفعالية إنزيم اللاكتاز المستخلص من دماغ المعز حديثة الولادة، بمدى من الأرقام راوح بين 4 و8.5، ولاحظوا أنَّ فعاليته تزداد بنقصان درجة الحموضة، باتجاه حمضية الوسط، وتبلغ الحد الأقصى عند الدالة الحمضية 5.5، وهذا الرقم لدرجة الحموضة كان الأفضل لفعالية الإنزيم، في حين لاحظوا انخفاض فعاليته عند انخفاض درجة الحموضة إلى أقل من 5.5، ولوحظ أيضا اختفاء نشاط الإنزيم تماماً في درجة حموضة بلغت 8.5. وعزل Mozumder وآخرون، (2012) إنزيم اللاكتاز من بكتريا *Lactobacillus* ووجدوا أن درجة الحموضة المُثلى كانت عند درجة 6، وذكروا أن اختلاف درجة الحموضة المُثلى يعود إلى استخلاص الإنزيم أو عزله من مصادر مختلفة فضلاً عن اختلاف المواد الكيمياوية والطرائق المستخدمة في الفصل والتنقية.

هدفت هذه الدراسة إلى توصيف إنزيم β – غالاكتولازيداز β-galactosidase المستخلص والمنقى من ضرع البقر المحلية، الذي استخلص باستعمال محلول 0.2 مول/لتر حمض الخليك (Acetic acid)+0.2 مول/ لتر من حمض الأسكوربيك (Ascorbic acid)، ورُسّب باستعمال محلول (50%) من الكحول الأثيلي (Ethyl alcohol)، بعد ذلك اتبعت عدة خطوات في تنقية الإنزيم، والتأكد من نقاوة الإنزيم بواسطة الترحيل الكهربائي.

مواد البحث وطرائقه

1.الوزن الجزيئي Molecule Weight

عُيّن الوزن الجزيئي لأنزيم اللاكتاز المنقى بطريقة الترشيح الهلامي بحسب الطريقة التي وصفها AL-Hassnawi، (2007)، وقد استعملت المواد والمحاليل الآتية:

أ – محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.01 مول/لتر بدرجة حموضة 7.

ب– محلول الدكستران الأزرق (2000)، حضر بتركيز 3 ميلي غرام لكل مل من محلول فوسفات الصوديوم الدارئ.

ج– محاليل البروتينات القياسية.

حضرت محاليل البروتينات القياسية المعلومة الأوزان الجزيئية التي اشتملت على اللايسوزايم Lysozyme، وألبومين المصل البقري Bovine serum Albumin، Urease، Trypsine، Catalase، المجهزة من شركة BDH البريطانية، إذْ حضّرت بإذابة 25 ميلي غراماً من البروتين القياسي في 5 مل من محلول (أ). وتضمنت طريقة العمل الخطوات الآتية:

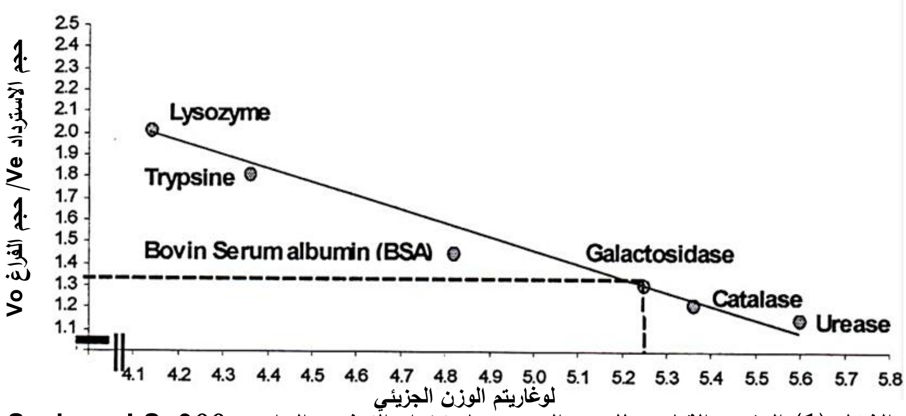
- **تعيين حجم الفراغ للعمود: Determination of void volume For column**

استعمل عمود السيفاكريل S– (S-200 200Sephacryl) (1.6×58) سم الذي سبقت موازنته بمحلول فوسفات الصوديوم Sodium Phosphate، ومرر فيه الدكستران الأزرق (2000)، وجرى امتصاص الضوء للأجزاء المنفصلة بطول موجي 600 نانومتر باستعمال المطياف الضوئي المجهز من شركة techcomp الإسبانية، ثم قدر حجم الفراغ Voide Volume (Vo) للعمود في حساب مجموع الأجزاء المنفصلة عند إمرار محلول الدكستران الأزرق من أول جزء إلى الجزء الذي يمثل قمة امتصاص الدكستران الأزرق.

- **تعيين حجم استرداد البروتينات القياسية والإنزيم**

Determination of Elution for standard proteins and enzyme

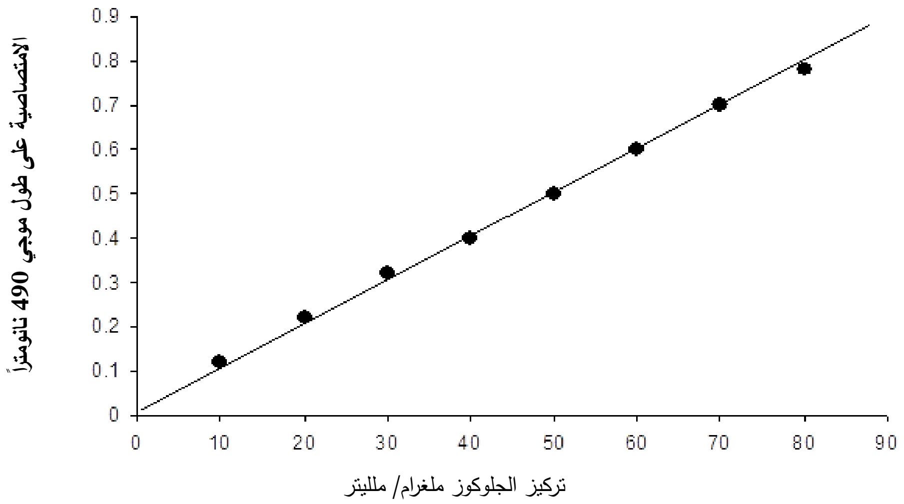
أُمرِّت محاليل البروتينات القياسية المحضرة مسبقاً، كلٌّ على انفراد، في عمود السيفاكريل S-200 (Sephacryl s-200)، وجرى الاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم، بعدها قِيسَ الامتصاص الضوئي للأجزاء الناتجة على طول موجي 420 نانومتراً للأجزاء المنفصلة، ومنها حسبت قيم حجم الاسترداد (Ve) لكل بروتين على حدة، ثم حُسبَ (Ve) للإنزيم المعزول والمنقى من ضرع البقر. بعد ذلك حُسبتْ نسبة (Ve/Vo) لكل من البروتينات القياسية واللاكتاز، رسمت العلاقة بين حجم الاسترداد لكل بروتين قياسي إلى حجم استرداد الدكستران الأزرق (Vo 2000) مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية، وبعد رسم المنحنى القياسي (شكل 1) عُيّن الوزن الجزيئي لإنزيم اللاكتاز المنقى.



الشكل (1) المنحى القياسي للوزن الجزيئي باستخدام الترشيح الهلامي Sephacryl S-200

2.تقدير الكربوهيدرات Estimation of carbohydrates

لتقدير الكربوهيدرات في الإنزيم قيد الدراسة إِستُخدمتِ الطريقة التي وصفها Dubois وآخرون (1956) وذكرها AL-Hassnawi (2007) وهي طريقة الفينول – حمض الكبريتيك، وقد أُعدَّ منحنى قياسي لتراكيز معلومة من محلول الغلوكوز راوحت من 0 – 80 ميلي غرام/ مل بتخفيف محلول الغلوكوز الخزين بالماء المقطر. يؤخذ في أنابيب اختبار 1مل من محلول الغلوكوز، وترقم أنابيب الاختبار بحسب تسلسل التخافيف (التمديدات) وأضيف إلى كلٍ منها 1مل من محلول الفينول ومزج جيداً، بعد ذلك أُضيفَ 5مل من حامض الكبريتيك مع المزج الجيد، وتُرك المحلول لكي يبرد. قِيست امتصاصية الضوء على طول موجي 490 نانومتراً ورسم المنحنى القياسي لقيم الامتصاص مقابل تراكيز الغلوكوز، (الشكل2). قدر تركيز الكربوهيدرات في مل واحد من محلول الإنزيم بمعاملته بحسب الخطوات المذكورة سابقاً وبالاستعانة بالمنحنى القياسي للغلوكوز، ثم استُخرجت النسبة المئوية للكربوهيدرات في الإنزيم .ومن أجل التحقق من وجود ارتباط تساهمي بين الجزء الكربوهيدراتي والبروتيني مرر إنزيم اللاكتاز على هلام Sephacryl S- 200 مع استرداد الأجزاء بقوة أيونية عالية باستخدام فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مول/ لتر الحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.3 مول/ لتر.



الشكل (2) المنحنى القياسي للكلوكوز باستخدام (0 – 80) ملغرام/ مل

3. الدالة الحمضية المُثلى لفعالية الانزيم:

The Optimum pH for the effectiveness of the enzyme

حضرت ثلاثة أنواع من المحاليل الدارئة (Buffer) بتركيز 0.2مول/لتر على مدى من درجة الحموضة 3–9 لتعيين درجة الحموضة المُثلى لفعالية الإنزيم وثباته، وحضرت كما ذكرت في Cambridge،(1985) والموصوفة من قبل Pollard، (2010).

أ– محلول دارئ الخلات 0.2 مول/لتر بمدى درجة حموضة من3.5 – 5.5.

ب– محلول دارئ الفوسفات 0.2 مول/لتر بمدى درجة حموضة من6–8.

ج– محلول 0.2 مول/لتر من Tris-HCl بمدى درجة حموضة من 8.5–10.

خلط (1) مل من المستخلص الإنزيمي المنقى بتركيز 25 ملغم/ مل مع 1 مل من كل من المحاليل الدارئة سابقة الذكر في أنابيب اختبارTest tube، حضنت في حمام مائي مجهز من شركة Scuco.Inc البريطانية، وبدرجة حرارة 30 م° مدة 15 دقيقة، قدرت الفعالية الإنزيمية في كل نموذج لتحديد درجة الحموضة المُثلى للفعالية الإنزيمية.

4. الدالة الحمضية المُثلى للثبات:

The Optimum pH for the stability of the enzyme

حضن محلول الإنزيم مع كل من المحاليل الدارئة المذكورة آنفاً في أنابيب اختبار في حمام مائي بدرجة حرارة 37م° مدة 30 دقيقة، ثم نقل إلى حمام ثلجي.

بعدها قُدّرت الفعالية المتبقية للإنزيم، ورُسمت العلاقة بين درجة الحموضة والنسب المئوية للفعالية المتبقية للإنزيم لتعيين درجة الحموضة المُثلى لثبات فعالية الإنزيم.

5.درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم:

The optimum temperature for the effectiveness of the enzyme

استعمل مدى من درجات الحرارة راوح بين 10 –80م° لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم (Segel، 1976). حضن محلول الإنزيم ضمن المدى الحراري 10 –80 م° مدة 15 دقيقة، ثم قدرت فعالية الإنزيم لتعيين درجة الحرارة المثلى للإنزيم.

6.تعيين الثبات الحراري للإنزيم:

Determination the thermal stability of the enzyme

أذيب الإنزيم النقي في محلول الفوسفات الدارئ بدرجة حموضة 8.5، وبتركيز 0.2 مول/لتر وحضنت كمية من الإنزيم بدرجات حرارة مختلفة راوحت بين 10–90م° مدة 15 دقيقة، ثم نقل إلى حمام ثلجي، وقدرت فعالية الإنزيم المتبقية بعد تلك المعاملات الحرارية.

7.اختبار حلمهة لاكتوز المصل The test of hydrolyzed lactose whey

حُضّر المصل (Whey) بإضافة حمض الهيدروكلوريك (HCl) تركيز 1 مول/ لتر إلى الحليب، وضُبطتْ درجة الحموضة بحيث تكون 5.5، وفُصل البروتين المتخثر باستعمال ورق الترشيح (Whatman No.1)، ثم وُضع المصل في أوعية معقمة لغرض إجراء الاختبار.

وتضمنت طريقة الاختبار أُخذ 1 مل من المحلول الإنزيمي مزجت مع 10 مل من المصل وحضن في درجة 55 م°، ثم كان يسحب كل 30 دقيقة كمية من المحلول توضع في أنبوبة مختبرية نظيفة ومعقمة، ثم توضع في حمام مائي مباشرةً في درجة 100 م° مدة 15 دقيقة لغرض إيقاف نشاط الإنزيم، ثم تحسب كمية الغلوكوز المتحررة بطريقة Glucose Enzymatic Calorimetric (GOD–PAP) وبحسب تعليمات الشركة (Biomaghreb Company). أذْ أُخذ 10 مايكرولترات من العينة، ومزجت مع 1 مل مع محلول Glucose Enzymatic Calorimetric، ثم حُضّن المزيج مدة 10 دقائق في درجة 37 م°، بعدها قيست الامتصاصية على طول موجي 510 نانو مترات.

النتائج والمناقشة

الوزن الجزيئي:

بلغ الوزن الجزيئي لإنزيم اللاكتاز المستخلص والمنقى من ضرع البقر المحلية 176.620 كيلو دالتون، وهذه القيمة قريبة إلى الوزن الجزيئي للإنزيم المستخلص والمنقى

من دماغ الغنم حديثة الولادة حيث كان 185.942 كيلو دالتون (Abed، 2010)، والوزن الجزيئي للأنزيم المستخلص والمنقى من دماغ المعز حديثة الولادة إذْ كان 187.437 كيلو دالتون (يحيى وآخرون، 2010).

فيما وجد Chunli وآخرون (2010) أنَّ الوزن الجزيئي كان 335 كيلو دالتون، لإنزيم اللاكتاز المعزول والمنقى من خميرة *psychrotolerant* المعزولة من الرواسب البحرية في القطب الجنوبي، ووجد Ajay وآخرون (2013) أنَّ الوزن الجزيئي لإنزيم اللاكتاز المستخلص والمنقى من اللوز كان 62 كيلو دالتون باستعمال طريقة الترشيح الهلامي.

وقدر Sadaf وShajrul، (2012) الوزن الجزيئي لإنزيم اللاكتاز المستخلص والمنقى من ثمار المشمش (Apricots) بـ 44.15، 34.70 و23.71 كيلو دالتون باستعمال ثلاث مواد هي β-gel، β-gel II وβ–gel III على التوالي، وبطريقة الترشيح الهلامي. وقدر Mariana وآخرون (2014)، الوزن الجزيئي للإنزيم اللاكتاز بـ 125 كيلو دالتون عندما عُزل ونُقّي من سلالة جديدة للـ *Aspergillus niger* من غابات الأمازون بطريقة الترشيح الهلامي.

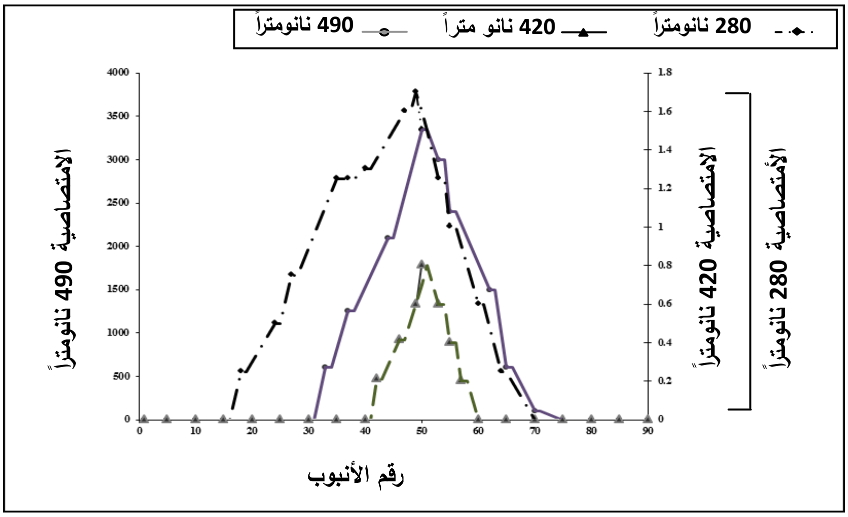
وأشار Eric (2010) إلى أن تفاوت الوزن الجزيئي لإنزيم اللاكتاز يعود إلى تفاوت مصدر الإنزيم فضلاً عن الطريقة المستعملة في التقدير، إذ اعتمدت معظم الدراسات إمّا على طريقة النبذ المركزي الفائق السرعة بتقدير معامل الترسيب ومنه حساب الوزن الجزيئي بمعادلات خاصة وإمّا على طريقة الترشيح الهلامي، وإمّا على طريقة الترحيل الكهربائي بوجود العوامل الماسخة للبروتين وغيرها.

تقدير الكربوهيدرات

وجد أن إنزيم لاكتاز ضرع البقر يحتوي على 20.5% كربوهيدرات، وهذه النسبة كانت مقاربة لنسبة الكربوهيدرات في إنزيم اللاكتاز المستخلص والمنقى من كبد الدجاج المحلي، إذْ بلغت نسبة الكربوهيدرات 21.5% (Abed، 2007)، وكانت مقاربة لنسبة الكربوهيدرات (22.1%) في إنزيم اللاكتاز المستخلص والمنقى من دماغ المعز حديثة الولادة (يحيى وآخرون، 2011). في حين وجد Abed Ali (1989) نسبة الكربوهيدرات في الإنزيم نفسه المعزول والمنقى من *Aspergillus's Niger* 32.5%.

أظهرت النتائج تطابق قمة البروتين على الطول موجي 280 نانومتراً، وقمة الكربوهيدرات على طول موجي 490 نانومتراً، مع قمة فعالية الإنزيم على طول موجي 420 نانومتراً، والشكل (3) يوضّح وجود ارتباطات تساهمية بين الكربوهيدرات والبروتين، ولأنّ الدارئ المستخدم في موازنة العمود كان ذا قوة أيونية عالية تكفي لفك الارتباطات اللاتساهمية التي لو كانت موجودة لظهرت قمة الكربوهيدرات بسلوك مغاير لقمة البروتين والفعالية (Abed, 2010). ومن الجدير بالذكر أنَّ وجود الكربوهيدرات في الإنزيمات قد

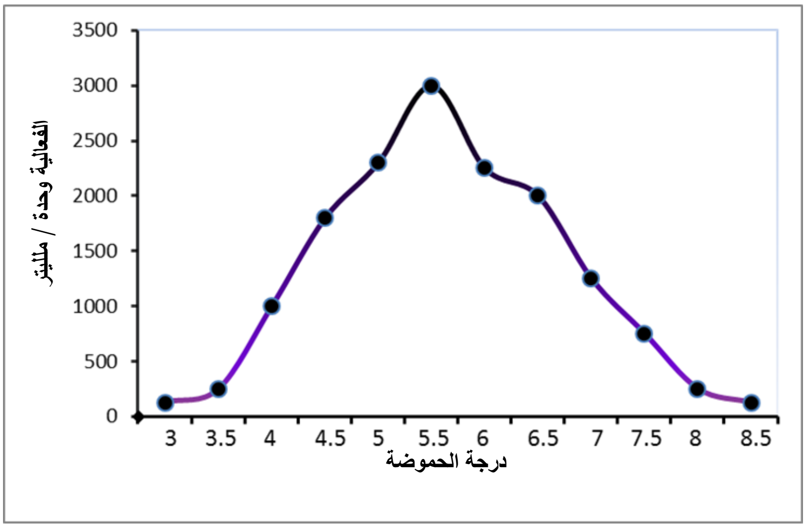
يجعلها أكثر ثباتاً وأكثر ذوباناً في الماء ،لذا أجريت بعض الدراسات لربط إنزيمات معينة مع مواد كربوهيدراتية معقدة كالدكستران لزيادة ثباتها الخزني والحراري ومنع تأثير المثبطات فيها، علماً بأنَّ نسبة الكربوهيدرات تختلف في إنزيم اللاكتاز من مصدر إلى آخر (Timothy، 2012)، وهذا يؤثر في قيمة الوزن الجزيئي للإنزيم.



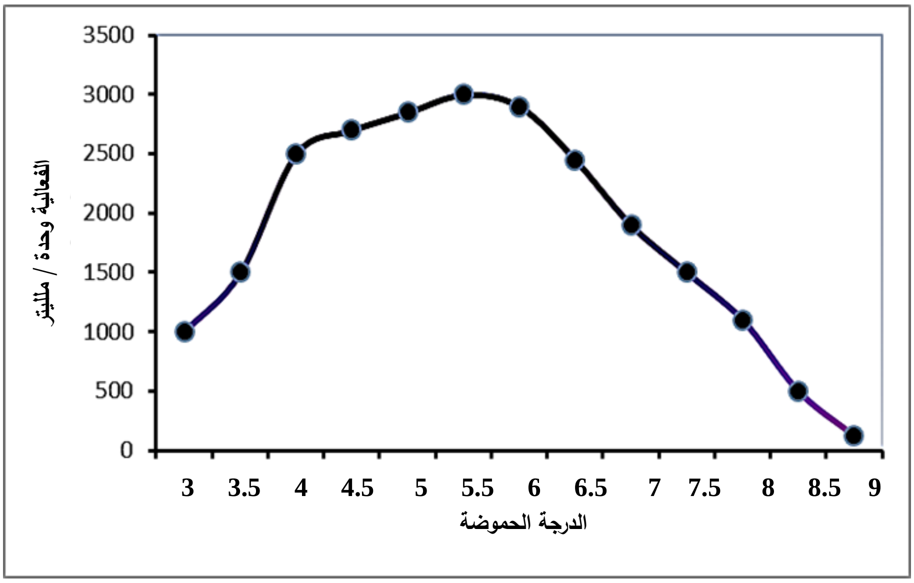
الشكل (3) إثبات وجود ارتباط تساهمي بين الجزء الكربوهيدراتي وأنزيم β-galactosidase المعزول والمنقى من ضرع البقر باستخدام الترشيح الهلامي في عمود Sephacryl S – 200.

الدالة الحمضية

قدرت درجة الحموضة المُثلى لفعالية إنزيم اللاكتاز بمدى من الأرقام راوح بين 3–9، ويوضح الشكل (4) أنَّ فعالية الإنزيم تزداد بزيادة درجة الحموضة باتجاه حمضية الوسط، وتبلغ الحد الأقصى عند الدالة الحمضية 5.5، إذْ كانت الفعالية الإنزيمية 3000 وحدة/ مل وهي الدالة الحمضية الفُضلى لفعالية الإنزيم، في حين لوحظ انخفاض فعالية الإنزيم عند انخفاض الدالة الحمضية إلى أقل من 5.5، ولوحظ أيضاً اختفاء نشاط الإنزيم تماماً في درجة حموضة بلغت 8.5 أو أكثر. ولوحظ أنَّ درجة الحموضة المُثلى لفعالية الإنزيم كانت بين 4–6.5 إذْ إن استقرار الإنزيم قد انخفض خارج هذا النطاق (شكل 5)، وقد لوحظ انخفاض ثباتية الإنزيم عند درجة الحموضة الحمضي والقاعدي المتطرف البعيد عن هذا المدى.



الشكل (4) درجة الحموضة (pH) المُثلى لفعالية إنزيم β-galactosidase المعزول والمنقى من ضرع البقر



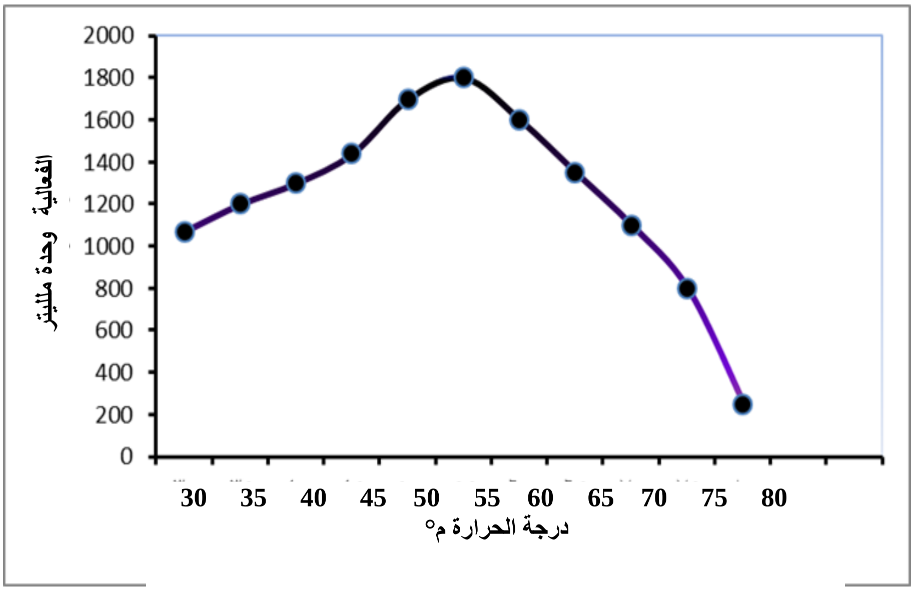
الشكل (5) منحنى درجة الحموضة المُثلى لثبات إنزيم اللاكتاز المعزول والمنقى من ضرع البقر

إنَّ درجة الحموضة يمكن أن يكون لها تأثير في حالة تأين الأحماض الأمينية الحمضية أو القاعدية، الأحماض الأمينية الحمضية لها مجموعات الكربوكسيل وظيفية (COOH-)، والأحماض الأمينية القاعدية لديها المجموعات الوظيفية الأمينية (NH2-)، إذا غُيَّرتْ حالة تأين الأحماض الأمينية في البروتين الإنزيمي، فإنَّ الروابط الأيونية التي تساعد على تثبيت بنية البروتين (الشكل الثالثي Tertiary structure) يمكن أنَّ تتغير، ومن ثمَّ يؤدي إلى أن يصبح الإنزيم أكثر فاعلية عند تغيير درجة الحموضة للوسط باتجاه المثلى لفعالية الإنزيم.

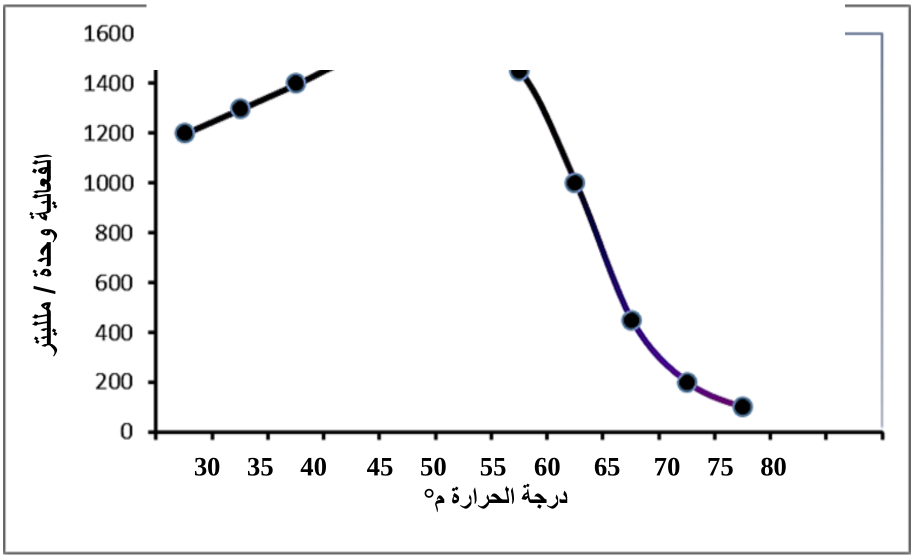
وقد لاتؤثر التغيرات في درجة الحموضة في شكل إنزيم فقط ولكن قد تغير من شكل الركيزة (Substrate)، ومن ثمَّ يمكن لها أنْ ترتبط على الموقع الفعال أو تصبح غير قادرة على الارتباط بالموقع الفعال وبحسب التغيير الحاصل في درجة الحموضة نتيجة لتغير بنية المركز الفعّال أو هندسته أو تغيّر شكل الركيزة التي يعمل عليها الإنزيم. وفي علم الإنزيمات الجينية فإنّ درجة الحموضة المُثلى ليست بالضرورة هي نفسها للأنزيمات كلها وللإنزيم الواحد في المصادر المختلفة (Eric، 2010). وقدر يحيى وآخرون، (2011) درجة الحموضة المُثلى لفعّالية إنزيم اللاكتاز المستخلص من دماغ المعز حديثة الولادة، في مجال من قيم الحموضة راوح بين 4 و8.5، ولاحظوا أنَّ فعالية الإنزيم تزداد بزيادة درجة الحموضة باتجاه حمضية الوسط، وتبلغ الحد الأقصى عند درجة الحموضة 5.5، وقدر Chunli وآخرون، (2010) درجة الحموضة المُثلى لإنزيم اللاكتاز بـ 4 عند عزلهم لنوع من الخمائر من القطب الجنوبي، ووجد Jayashree وآخرون (2012) أنَّ درجة الحموضة المُثلى لفعالية إنزيم اللاكتاز المعزول من *Bacillus sp.* المعزولة من الحليب السائل هي 7.

درجة الحرارة:

في الشكلين (6 و7) تظهر زيادة في الفعالية الإنزيمية في درجات حرارة عالية نسبياً، فقد بلغت الفعالية 1800 وحدة/ مل عند درجة 55 م°، وهي الدرجة الحرارية المثلى لفعالية الإنزيم، فيما انخفضت الفعالية كلما ارتفعت درجة الحرارة إذ بلغت الفعالية 1370 وحدة/ مل في درجة حرارة 70 م°.



الـ ... رع البقر



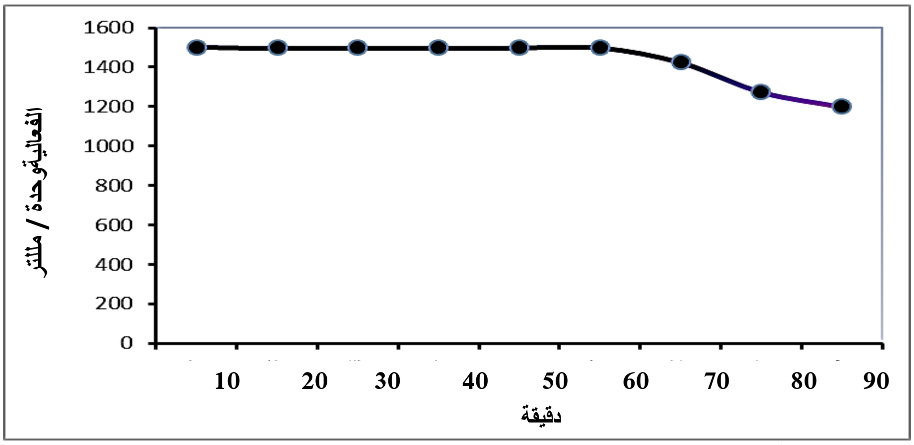
الشكل (7) تـأثير درجـة الحرارة (الثبـات الحراري) فـي فعاليـة إنـزيم اللاكتـاز المعزول والمنقـى مـن ضرع البقر.

ويلاحظ اختفاء الفعالية الإنزيمية عند درجة الحرارة 80 م°. كما أنَّ الإنزيم يحتفظ بفعاليته الإنزيمية في درجات حرارة راوحت بين 30 – 60 م°، وقد فقد الإنزيم 70% من فعاليته الإنزيمية بدرجة حرارة 70 م° وفقد كامل فعاليته الإنزيمية في درجة حرارة 80 م°. وقد وجد Princely وآخرون، (2013) أنَّ درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم اللاكتاز المعزول من *Streptococcus thermophilus* التي نميت في مصل اللبن هي 40 م°. وذكر Yüksel وآخرون (2013) أن أنزيم اللاكتاز المعزول من بكتريا *Thermus oshimai* (صنف DSM 12092) كان إنزيماً مقاوماً للحرارة، إذ حافظ على 70% من فعاليته الإنزيمية في درجة 90 م° مدة ثلاث ساعات، وأشاروا إلى أن درجة الحرارة المثلى لفعاليته الإنزيمية كانت 75 م°. ووجد Ram وآخرون، (2013) أن درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم اللاكتاز المستخلص من بكتريا*Antarctic haloarchaeon Halorubrum lacusprofundi* كانت 50 م°، ووجدوا أنّه يحافظ على فعاليته الإنزيمية بين درجة حرارة –5 و60 م°. وذكرت Amal وآخرون، (2012) أنَّ درجة الحرارة المثلى كانت 35م° لإنزيم اللاكتاز المعزول من بكتريا *Bacillus subtilis*، وأنَّ الفعالية الإنزيمية حافظت على مستواها مدة ساعتين في درجة حرارة 30 – 35 م°.

في قياس الطاقة الحركية للجزيئات فإنّ ارتفاع درجة الحرارة يعني أن الجزيئات تتحرك أسرع وتصطدم بشكل متكرر أكثر، وينطبق هذا المفهوم على اصطدام بين جزيئات الإنزيم والركيزة وزيادة درجة الحرارة تؤدي إلى زيادة تحفيز رد فعل الإنزيم؛ ممّا يؤدي إلى زيادة سرعة معدل التفاعل الإنزيمي. وعند ارتفاع درجات الحرارة إلى ما بعد النقطة التي تحدد درجة الحرارة المثلى للإنزيم، تؤدي زيادة الطاقة إلى تغيرات بنيوية تمس البنية الثالثية للإنزيم (tertiary protein structure) ومن ثمَّ تؤدي إلى انخفاض في فعالية الإنزيم، كلما ارتفعت درجة الحرارة عن درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم، وتؤدي درجات الحرارة العالية إلى مسخ بروتين الإنزيم (Denaturation) ومن ثمَّ يفقد الإنزيم فعاليته كلياً (Stephen، 2012).

ويلاحظ من الشكل (8) أنَّ الإنزيم حافظ على الفعالية الإنزيمية عندما حُضّن في درجة حرارة 55م° مدة 60 دقيقة، وقد فقد الإنزيم 5% فقط من فعاليته الإنزيمية عندما حُضّن في درجة الحرارة نفسها مدة 70 دقيقة، ولوحظ أيضاً أنَّ الفعالية الإنزيمية أصبحت 60% بعد 90 دقيقة من حضنها في درجة الحرارة نفسها. ومن هذه النتائج فقد ظهر واضحاً أنّ الإنزيم قيد الدراسة كان مستقراً في درجة حرارة 55 م° مدة 60 دقيقة، ممَّا يدلُّ على تحمله للحرارة بقدرٍ كافٍ، ويدل ذلك على أنّه إنزيم مستقر حرارياً. وتأتي هذه النتائج متفقة مع ما توصل إليه Abed، (2010) ويحيى وآخرون، (2011). في حين وجد EunSook وJongKun، (2011) أن إنزيم اللاكتاز المعزول من بكتريا *Pseudoalteromonas (sp. KNOUC808)* من القطب الجنوبي بوصفه مصدراً لإنزيم اللاكتاز المتكيف مع البرودة، أن درجة الحرارة

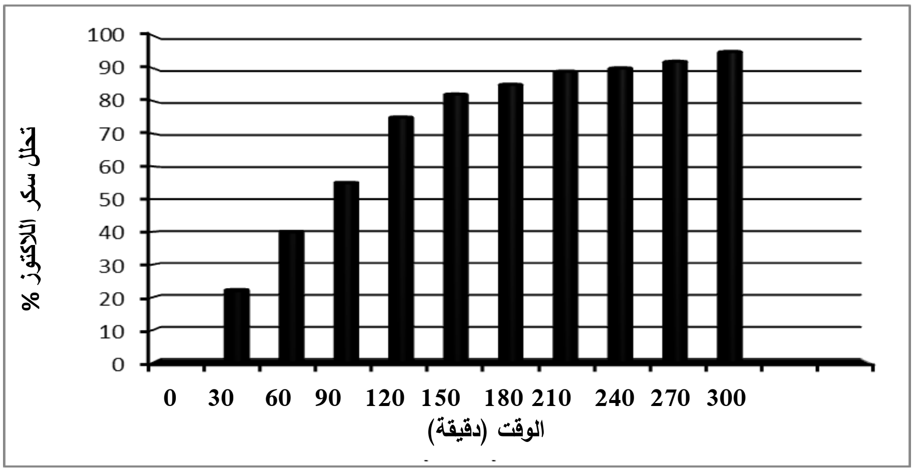
المُثلى لفعالية الإنزيم كانت 20 م° وحافظ الإنزيم على فعاليته في درجة 4 م° مدة 7 أيام، ولكن فقد 50% من فعاليته عند درجة الحرارة 37 م° خلال سبعة أيام.



الشكل (8) تأثير المدة الزمنية للمعاملة الحرارية (الثبات الحراري) في فعالية إنزيم اللاكتاز المعزول والمنقى من ضرع البقر عند حضنه في درجة حرارة 55 م° وبمدد زمنية مختلفة.

اختبار حلمهة لاكتوز المصل

أظهر الإنزيم قدرة على حلمهة سكر اللاكتوز Lactose إلى سكر الغلوكوز Glucose الأحادي وسكر الغالاكتوز Galactose الأحادي، قد زاد من 22% بعد 30 دقيقة إلى 92% بعد 270 دقيقة بعد إضافة إنزيم اللاكتاز المستخلص والمنقى من ضرع البقر إلى سكر اللاكتوز (شكل 9)، وهذا يدل على إمكانية استخدامه علاجاً لمشكلة عدم تحمل اللاكتوز Lactose Intolerance، والمصابون بها نسبة عالية من سكان الأرض؛ وذلك عن طريق إضافته إلى اللبن ومنتجات الألبان مما يساعد على تخفيض نسبة اللاكتوز فيها عن طريق تحلل سكر اللاكتوز بواسطة الإنزيم إلى سكر الغلوكوز الأحادي وسكر الغالاكتوز الأحادي. وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه Graciette وآخرون، (2008) إذْ أشاروا إلى أن إنزيم اللاكتاز المعزول من *Kluyveromyces fragilis* يستطيع ان يحلمه 70–80% من لاكتوز اللبن خلال ساعتين إلى ثلاث ساعات، وتتفق هذه النتيجة مع توصل إليه Abed (2010) إذْ أشار إلى أن إنزيم اللاكتاز المعزول من كبد الغنم يحلمه 95% من لاكتوز اللبن بعد 270 دقيقة. وذكر Horner وآخرون، (2011) أن الإنزيمات الأكثر نشاطاً، هي التي تعمل بفعالية عالية عند درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم، وأشاروا إلى تحلمه أكثر من 98% من اللاكتوز في 24 ساعة وفي درجة حرارة 2 م°، وهذه النتيجة تدل على حلمهة سكر اللاكتوز في أثناء التخزين المبرد للبن ومنتجاته باستخدام الإنزيمات المتاحة حالياً والمعزولة من بكتريا القطب الجنوبي، إذْ تكون إنزيماتها متكيفة مع البرودة.



الشكل (9) تحلل سكر اللاكتوز بفعل إنزيم β–galactosidase المعزول والمنقى من ضرع البقر

الاستنتاج

إنزيم اللاكتاز المستخلص والمنقى من ضرع البقر هو بروتين سكريGlycoprotein إذ بلغت نسبة الكربوهيدرات فيه 20.5%، ويعطي أعلى فعالية إنزيمية بدرجة حموضة 5.5 وبدرجة حرارة 55 م°، وأظهر الإنزيم استقراراً في فعاليته الإنزيمية عند درجة الحموضة التي كانت قيمتها بين 4–6.5، وكانت درجة الثبات الحراري للإنزيم بين 30–60 م°. وقد أظهر الإنزيم المستخلص والمنقى قدرته على تحليل 92% من سكر اللاكتوز خلال 270 دقيقة.

كذلك نستنتج أنَّ الإنزيم المستخلص من ضرع البقر يعمل على روابط الـ Galactosides كلّها عدا الروابط في سكر اللاكتوز المخلق في أنسجة الضرع، لذلك يُعتقد بوجوده في أماكن تخزين الدهون في الغدة اللبنية Mammary gland، ولا يتوقع وجوده في الأسناخ Alveolus التي هي الوحدات الرئيسة المفرزة للحليب في الغدة الثديية. ولو لم يظهر الإنزيم المستخلص في هذه الدراسة القدرة على تحليل سكر اللاكتوز بكفاءة عالية، لاستنتج أنّ الإنزيم مخلق جينياً بحيث لا يعمل على كسر الروابط في سكر اللاكتوز. ويعمل على تزويد أنسجة الضرع بالسكريات الأحادية اللازمة لإنتاج سكر اللاكتوز، وخصوصاً المرتبطة بالدهون أو البروتينات، ونعتقد أن تركيز الإنزيم في أنسجة الضرع يزداد كلما كانت كمية اللبن المفرزة عالية.

نوصي بإجراء المزيد من البحوث لتحديد إمكانيات استخدام هذا الإنزيم في غذاء الأطفال الذين يعانون من الحساسية المفرطة للاكتوز، أو لتحديد إمكانيات استخدامه في مصانع إنتاج الألبان لغرض تحليل سكر الحليب، كذلك إجراء دراسات للإفادة من مخلفات المجازر الأخرى لاستخلاص مختلف الأنزيمات وإنتاجها تجارياً.

References المراجع

المظفر، سامي عبد المهدي. (1983). حركيات الإنزيمات. جامعة بغداد.

يحيى، اياد نافع؛ الحصناوي، علي نوري؛ محيسن، ابتسام كريم وعلي، حسين عبد الأمير (2011). توصيف إنزيم β–galactosidase المنقى والمستخلص من دماغ الماعز حديثة الولادة. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، 27(1):35-48.

Abed, A. N., 2010. Isolation and Purification of β-galactosidase From New Born Sheep Brain. Iraqi Journal of Science, 50(3): 437-443.

Abed, A. N., 2007. Isolation, Purification and Characterization of β-galactosidase From Local Chicken liver. Ph. D. Thesis. University of Baghdad- Education Collage. Iraq.

Abed, Ali., 1989. Purification of beta – galactosidase enzyme (Aspergillus niger) and studies of its kinetics. M.Sc. thesis. College of Sciences–University of Baghdad.

Ajay, P.; Melita, L. and Farhath, K., 2013. Extraction, Purification and Thermodynamic Characterization of Almond (Amygdalus communis) b-Galactosidase for the Preparation of Delactosed Milk. Food Technol. Biotechnol. 51(1): 53–61.

AL-Hassnawi, A. N. A., 2007. Isolation, purification and characterization of B-galactosidase From local chicken Liver and its medical Application. A thesis to the college of Education University of Baghdad. ph. D. m. Biochemistry.

Amal, S.; Shahat, A.; Mohammad, A.; Ahmed, A.; Said, M.; Abdel, A. and Mohammad, I., 2012. Characterization of partially purified β-galactosidase from Bacillus subtilis. J. of Applied Sciences Research. 8(4): 2379-2385.

Barbara, R.; Miguel, A. and Francisco, J., 2011. Production of Galacto-oligosaccharides by the β-Galactosidase from Kluyveromyces lactis: Comparative Analysis of Permeabilized Cells versus Soluble Enzyme. J. Agric. Food Chem. 59(19):10477–10484.

Cambridge, D. E. C., 1985. Studies in Inorganic chemistry phosphorus, An Outline of its Chemistry, Bio chemistry and Technology (third Edition). University of Cambridge, Cambridge, England.

Chunli, S.; Guang-Lei, L.; Jin-Li, X. and Zhen-Ming, C., 2010. Purification and characterization of extracellular β-galactosidase from the psychrotolerant yeast Guehomyces pullulans 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. Process Biochemistry. 45(6):954–960.

Desire, Y. ; Sebastien, L. and Lucien, P., 2007. Biochemical characterization of a strictly specific beta-galactosidase from the digestive juice of the palm weevil Rhynchophorus palmarum larvae. Cutomological Science. 10:343-352.

Dubios, M., Gilles, K. A., Hamiton, J. K, Robers, D. A and Smith, F. ,1956. Colorimetric method For determination of Sugar and related substance. Anal. Chem. 288(3): 35-45.

Eric J., 2010. Advances in Enzymology: And Related Areas of Molecular Biology. 75: 1-132. Wiley .UK.

EunSook, N. and Jong Kun, A., 2011. Antarctic marine bacterium Pseudoalteromonas sp. KNOUC808 as a source of cold-adapted lactose hydrolyzing enzyme. Braz. J. Microbiol. 42(3): 82 – 93.

Graciette, M,; Flávio, F. and Gisella, M., 2008. Operational stability and kinetics of lactose hydrolysis by β-galactosidase from Kluyveromyces fragilis. Health Sciences. 25(1): 7-12.

Haider, T. and Husain, Q., 2007. Prparation of lactose- free milk by using salt-fractionated almond J. sei Food Agric., 87(7): 1278- 1283.

Horner, T.; Dunn, M.; Eggett, D. and Ogden, L., 2011. β-Galactosidase activity of commercial lactase samples in raw and pasteurized milk at refrigerated temperatures. J. Dairy Sci. 94(7): 3242-3249.

Jayashree, N.; Christobell, C.; Mukesh, K.; Balakumaran, M.; Ravi, M.; and Kalaichelvan, P., 2012. Isolation and Characterization of β-Galactosidase Producing Bacillus sp. from Dairy Effluent. World Applied Sciences Journal, 17(11): 1466-1474

Manuela, P.; Edgar, T. and Francisco, G., 2009. Triton X-II4-aided Extraction and Partial Characterization of β-galactosidase from Grape Berry Pulp. Am. J. Enol. Vitic. 60(3): 368-372.

Mariana, T.; Rosangela, D.; Priscila, D.; Georgia, D.; Alexander, M. and Cristiane, S., 2014. Isolation and characterization of a β-galactosidase from a new Amazon forest strain of Aspergillus niger as a potential accessory enzyme for biomass conversion. Biocatalysis and Biotransformation, 32(1):13-22.

Mozumder, N.; Akhtaruzzaman, M.; Bakr, M. and Fatema-Tuj-Zohra, 2012. Study on Isolation and Partial Purification of Lactase (β-Galactosidase) Enzyme from Lactobacillus Bacteria Isolated from Yogurt. J. Sci. Res. 4(1):239-249 .

Nagy, Z.; Keresztessy, Z., Szentirmai, A. and Biro, S., 2001. Carbon source regulation of β- galactosidase biosynthesis in Penicillium chrysogenum. Journal of Basic Microbiology, 41(6): 351-362.

Pollard, m.; Batt, c.; Stern, B. and Young, S., 2010. Analytical Chemistry in Archaeology Cambridge University Press. Cambridge UK. :47-69.

Princely, S.; Saleem, N.; Basha, J.; John, K. and Dhanaraju, D., 2013. Biochemical characterization, partial purification, and production of an intracellular beta-galactosidase from Streptococcus thermophilus grown in whey. European Journal of Experimental Biology, 3(2):242-251.

Ram, K.; Melinda D.; Priya, D. and Shiladitya, D., 2013. Cloning, over expression, purification, and characterization of a polyextremophilic β-galactosidase from the Antarctic haloarchaeon Halorubrum lacusprofundi. BMC Biotechnology. 13: 3-13.

Sadaf, G, and Shajrul, A., 2012. Kinetic Studies on β-Galactosidase Isolated from Apricots (Prunus armeniaca kaisa). American Journal of Plant Sciences, 3: 636-645.

Segel, I. H., 1976. Biochemical calculations. 2nd Edition, John and Sons. Inc. New York.

Stephen, H., 2012. Organic and Biological Chemistry. Six edition. Mary finch.USA.

Timothy, B., 2012. Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry. Amazon's Kindle. UK.

Whitaker, J. R., 1972. Principles of Enzymology for the food sciences. Mercel Dekker, inc. New York.

Yüksel, G.; Bahattin, T. and Rengin, E., 2013. Some characteristics and isolation of novel thermostable β-galactosidase from Thermus oshimai DSM 12092. Food Science and Biotechnology Volume 22, Issue 1, pp. 63-70.

Zhuofu, W.; Zhi Wang, b.; Buyuan Guan, A.; Xue Wang, A.; Ye Zhang, A.; Yu Xiao, A.; Bo Zhi, A.; Yunling Liu, A.; Zhengqiang, L. and Qisheng Huo, A., 2013. Paper Improving the properties of β-galactosidase from Aspergillus oryzae via encapsulation in aggregated silica nanoparticles. New J. Chem., 37: 3793-3797.