استخلاص إنزيم β – Galactosidase وتنقيته من ضرع البقر

إياد نافع يحيى[1] و علي الحصناوي[1]
و هبة عدنان ابراهيم عزة[1]

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

الملخص

استخلص إنزيم β-galactosidase من ضرع البقر(عينة البحث من مجزرة الشعلة في بغداد)، وذلك باستعمال ست طرائق، ونُقّي باستعمال أربع طرائق للترسيب، وقد وجد أن طريقة 0.2 مول/ لتر من حمض الخليك +0.2 مول/ لترمن حمض الأسكوربيك ودرجة الحموضة 5، هي الطريقة المثلى لاستخلاص الإنزيم مقارنة بالطرائق الأخرى. وقد وجد أن استعمال الكحول الأثيلي بتركيز 50% هي الطريقة الفُضلى للترسيب، وعليه كان معامل التنقية نحو 6.53 مرة، والحصيلة الإنزيمية نحو 89.36% عند استخدام الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 (الخطوة الثانية).

الكلمات المفتاحية: ضرع البقر، استخلاص الإنزيمات وتنقيتها، لاكتوز، إنزيمات، بيتا – كالاكتوسايديز، بغداد.

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

Extraction and Purification of the Enzyme β – Galactosidase from Udder of cows

A. Yehea[1] ; A. Hesnawe[1] and H. Assa[2]

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

Abstract

β-galactosidase enzyme was extracted from the udder of cows by using six methods, and purified using four different methods. It was found that the method of 0.2 mol/L of acetic acid+ 0.2 mol/L ascorbic acid pH 5 was the best and gave the highest specific activity of crude enzyme in comparison with other used methods. The use of ethanol50%was found the best way of purification.

Using gel filtration Sephacryl S-200 (second step), allowed to have purificationfactor6.53 times and the yields was 89.36%.

Key words: Enzyme, Enzyme isolated, Enzyme purification, Lactase, β – galactosidase, Cows udder, Baghdad.

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

المقدمة

يصنف إنزيم β– غالاكتوزيداز β–galactosidase (EC 3.2.1.23) مع إنزيمات الصف الثالث الذي يضم إنزيمات الحلمهة (Hydrolysis)، وهو يفكك الروابط β– غلاكتوزيدية β – Glycosidic bond، التي يسهم بتشكيلها سكريد β– الغالاكتوز، ويطلق على هذا الإنزيم اسم لاكتاز Lactase عندما يكون المداد (الركيزة Substrate) المتفاعل هو اللاكتوز (Barbara وآخرون، 2011).

يقوم هذا الإنزيم بتفكيك (حلمهة) الروابط الغالاكتوزيدية، والروابط الفوكوزيدية Fucosides التي يشكلها سكر الفوكوز Fucose والروابط الأرابينوزيدية Arabinosides التي يشكلها سكر الأرابينوز Arabinose (Stamp، 2012) ويسهم هذا الأنزيم في دماغ الماعز حديثة الولادة بتفكيك الروابط الغالاكتوزيدية في المعقدات الغالاكتو – شحمية (Galacto- lipid) (يحيى وآخرون، 2011). وأشار Hermida وآخرون، (2007) إلى أنه يشارك في أيض الغالاكتو– شحمية مثل β-D-galactosyl diacylglycerol المنتشر في النباتات.

وتزيد سرعة فعالية هذا الإنزيم ستة أضعاف على سرعته العادية عندما يكون السوبسترات المتفاعل هو سكر اللاكتولوز Lactulose (الحاوي على الفروكتوز بدل الغلوكوز في جزيئته). كما يستطيع الإنزيم تفكيك البروتينات السكرية Glycoprotein's والشحوم السكرية Glycolipids (Itahana وآخرون، 2007).

لا يحتوي بيتا الغالاكتوزيداز على عامل إنزيمي متمم Cofactor، لأنه أحادي التكوين ويتألف كلياً من البروتين، وتصفه معظم المصادر العلمية بأنه بروتين سكري Glycoprotein لاحتوائه على نسبة من الكربوهيدرات ترتبط مع البروتين، ويكون الجزء الكربوهيدراتي على نوعين من السلاسل قصيرة وأخرى طويلة، وأشار Abed، (2010) إلى أن اختلاف نسب الكربوهيدرات المقدرة في الإنزيم، تختلف بحسب المصدر المستخلص منه، وراوحت بين 9.9% عند استخلاصه من *A. oryzae* إلى 22.3% عند استخلاصه من كبد الدجاج، و32.5% عند استخلاصه من *Aspergillus niger*.

تقسم الوظائف الفيزيولوجية للإنزيم تبعاً لموقعه الخلوي إلى قسمين رئيسين، أولهما يوجد الإنزيم في الأغشية المخاطية للأوعية الشعرية للأمعاء الدقيقة، وعادة يتركز في الجزء العلوي من الأمعاء، ويقوم بمهاجمة الروابط الغالاكتوزيدية β-1,4- Galactosidic الموجودة في الغذاء المتناول (وخصوصاً سكر اللاكتوز) في أثناء مروره بالأمعاء. ويتضمن ثانيهما الإنزيم الموجود في اللايسوسوم (الجسيم الحال) Lysosome ويكون له دور في مهاجمة المواد الحاوية على مجاميع الـ Glycoside، مثل: Glycoprotein و Glycolipids و Mucopolysaccharide (Abed، 2010)، وينتمي الإنزيم المستخلص من ضرع البقر في

هذه الدراسة إلى هذا القسم، بقصد توفير سكر الغالكتوز (Galactose) للأنسجة اللبنية المتخصصة بتخليق سكر اللاكتوز، وخاصة في ظروف الإنتاج العالي للبن.

أمَّا من حيث انتشار هذا الإنزيم، فمن المعروف أنه يوجد عند الإنسان، وينتج في الجهاز الهضمي للرضع والبشر البالغين، كما يوجد لدى الكائنات الحية الأخرى جميعها بدءاً من البكتريا وصعوداً حتى الحيوانات الراقي (Wong وHartel، 2014)، وأشار Samin وMaryam، (2014) إلى وجود الأنزيم في الفواكه المختلفة كالخوخ، والتفاح، والمشمش، وثمار المانجو وفي عصير أوراق نبات الطماطم. كما وجده Neubert وآخرون (2004) في البازلاء والخيار والخشخاش، واستخلصه Haider وHusain، (2007) من اللوز.

أمَّا في المصادر الحيوانية ومع قلة الدراسات التي تستخلص الإنزيم من المصادر الحيوانية، إلا أنه يوجد في أنواع مختلفة من الثدييات الصغيرة السن، كالعجول والخرفان والمعز والأرانب، كما لوحظ وجود الإنزيم بأوزان جزيئية مختلفة في مشيمة الإنسان وكبده ولعابة وطحال الخنزير وفي كبد الدجاج، كذلك لوحظ وجود الإنزيم في أنواع مختلفة من القواقع Snails والحشرات (Marcel وBradley، 2014).

ولسهولة التعامل مع الأحياء المجهرية ووفرة إنتاجها لهذا الإنزيم، وتكيفها السريع للنمو على مواد رخيصة ومتوافرة في الطبيعة، فضلاً عن سرعة الإنتاج وقلة التكاليف، فقد حظيت الأحياء المجهرية ومنها الفطريات بدراسة مستفيضة للإنزيمات، مثل إنزيم اللاكتاز تتقدمها الأعفان التابعة للجنس *Aspergillus*، والخمائر التابعة للجنس *Kluyveromyces* (EL-Gindy، 2003 وDugdale، 2010) وينتج تجارياً من سلالات تابعة للجنس *Aspergillus* و*Kluyveromyces*، وأهم تطبيقاته في الصناعة في الصناعات اللبنية. إن التكلفة العالية لاستخلاصه أو عزله وتنقيته تحول دون التوسع في تطبيقاته الصناعية، وذكر Pereira-Rodriguez وآخرون، (2011) أن نجاح الحصول عليه من فطر *Aspergillus niger*، ومن الخميرة *Kluyveromyces lactis* (الاسم التجاري للإنزيم المنتج من هذه الخميرة هو Maxilact) يُساعد على التوسع في التطبيقات الصناعية لاستعماله، وقد أيد ذلك Pereira-Rodriguez وآخرون، (2012). وقد عُزل أيضاً من الفطريات *Aspergillus oryzae*.

ومن أنواع البكتريا التي تعدُّ مصدراً مهماً لهذا الإنزيم:

Bacillus stearothearothemophilus وE.Coli وأيضاً البكتريا*Bifidobacteuim bifiidum* و*Lactobacillus acidophilus*، (Goulas وآخرون، 2009). وأُجريت دراسات عدّة من أجل الحصول على إنزيم ثابت حرارياً (Thermo stable) من بكتيريا محبة للحرارة Thermopiles bacteria، ومنها دراسة Chen وآخرون، (2009) إذْ تمكنوا من عزل الإنزيم من بكتريا *Bacillus stearothermophilus*، درجة الحرارة المثلى لفعاليته تراوح بين55و60 م°.

يستعمل الإنزيم مكملاً غذائياً لدى الأشخاص الذين يعانون من حالة عدم تحمل اللاكتوز، أو الحساسية المفرطة منه Lactose Intolerance، كما يضاف هذا الأنزيم إلى

اللبن لإنتاج لبن خالٍ من اللاكتوز، أو إلى منتجات اللبن الأخرى (Järvelä وآخرون، 2009؛ Mattar وآخرون، 2012).

ونظراً إلى عدم وجود دراسات كافيه عن استخلاص إنزيم اللاكتاز وتنقيته وتوصيفه من أعضاء الحيوان وأنسجته. ولأهمية الأنزيم كمكل غذائي، أُجريت عدة دراسات كان هدفها استخلاص الإنزيم أو عزله وتنقيته وتوصيفه هذا من مصادر مختلفة منها الأنسجة الحيوانية التي يمكن استخدامها غذاءً للإنسان كالكبد والعضلات والمخ، وعليه هدفت هذه الدراسة إلى استخلاص هذا الإنزيم وتنقيته من ضرع البقر (الذي لا يستخدم غذاءً للإنسان، ويعدُّ من مخلفات المجازر) بهدف أن يكون مصدراً متاحاً للإنزيم، وللتخلص من الأعراض التي يسببها نقص هذا الإنزيم للإنسان، المهم صناعياً وغذائياً وإمكانية استخدامه بوصفه منتجاً يقلل من الأعراض لدى الأشخاص المصابين بحالة الحساسية الفرطة لسكر اللاكتوز Lactose Intolerance..

مواد البحث وطرائقه

استخدم في العمل ضرع البقر المحلي المستحصل من مجزرة الشعلة في بغداد، بتقطيعه إلى قطع صغيرة وضعت في أكياس بلاستيكية، أغلقت بإحكام وعُلمت وحفظت بدرجة حرارة −20 م° إلى حين إجراء التحاليل الكيميائية عليها.

التحاليل الكيميائية:

أجريت التحاليل الكيميائية بمكررين اثنين على عينات الدراسة، بحسب الطريقة المذكورة في .A.O.A.C، (1999)، فقد قدرت الرطوبة، والرماد، والألياف الخام، وقُدّرتْ نسبة البروتين باستخدام جهاز Micro–kjeldahl، واستعمل العامل (6.25) لتحويل نسبة النتروجين الكلي إلى النسبة المئوية للبروتين، واستخدم مذيب الإيثر البترولي Petroleum ether في عملية تقدير نسبة الدهن بحسب طريقة Soxhelt التي وصفها McNichol، (2012). وقدرت نسبة الكربوهيدرات كما ذكرها Pearson، (1976) و وصفها Odoemelam، (2005) على أساس أنَّ الكربوهيدرات هي المواد المتبقية بعد طرح نسبة الرماد والألياف والبروتين والدهن من (100). وقد قيست الدالة الحمضية بحسب طريقة Myers، (2010)، باستعمال جهاز pH− ميتر من نوع PYe-unicam. وحسبت القيمة الحرارية وفق المعادلة:

$$\text{القيمة الحرارية (كيلو سعرة/100 غم)} = (P \times 4) + (F \times 9) + (c \times 3.75)$$

إذْ إنَّ:

P: النسبة المئوية للبروتين، F: النسبة المئوية للدهن، C: النسبة المئوية للكربوهيدرات.

وينتج غرام واحد من المواد البروتينية والدهنية والكربوهيدراتية (4، 9، 3.75) كيلو سعرة على التوالي في الجسم عند احتراقها. (Osborne وVoogt، 1987).

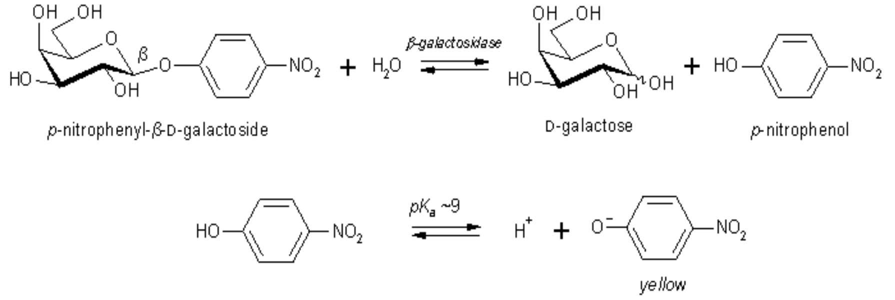
استخلاص إنزيم اللاكتاز

من أجل تحديد أفضل طريقة لاستخلاص الإنزيم تعطي أعلى فعالية إنزيمية استخدمت طرائق ذكرها Abed، (2010) و AL-Shammary، (2011) متضمنة الاستخلاص:

- بالماء المقطر
- محلول كربونات الصوديوم 5% (Na2CO3 5%)
- محلول كلوريد الصوديوم 20% (NaCl %20)
- محلول 0.2 مول/ لتر حمض الخليك (Acetic acid) ودرجة الحموضة5 .
- محلول 0.2 مول/ لتر حمض الأسكوربيك (Ascorbic acid) ودرجة الحموضة 5
- محلول 0.2 مول/ لتر حمض الخليك + 0.2 مول/ لتر حمض الأسكوربيك ودرجة الحموضة 5.

قياس فعالية الإنزيم

قيست فعالية الإنزيم بطريقة Miller، (2013) باستخدام-Ortho-nitrophenyl-β-D galactopyranoside (ONPG) بطريقة الامتصاص (المستحلب، Emulsion) وقيست الامتصاصية في طول موجي 420 نانومتراً، ويفضل استخدام الـ NPG عند قياس الفعالية الإنزيمية لأنَّ سرعة تفككه بواسطة الإنزيم أعلى من سرعة تفكك اللاكتوز الطبيعي، فضلاً عن استقرار تلك المادة في المحاليل الموقية (المنظمة)، ويمكن تصنيعها تجارياً بطرائق بسيطة. وتحلّل هذه المادة إلى سكر اللاكتوز والـ ONP والحد الأقصى للامتصاص (420) نانومتراً وتعطي اللون الأصفر (Mozumder وآخرون، 2012)، ويوضح الشكل (1) معادلة التفاعل.



الشكل (1) يوضّح تحلل ONPG (Boon وآخرون، 2000)

تقدير تركيز البروتين

قدر تركيز البروتين بطريقة Bradford (1976) باعتماد منحنى ألبومين المصل البقري القياسي (Bovine Serum Albumin , B.S.A.).

التنقية الجزئية

رُسّب المستخلص الإنزيمي بأربع طرائق، لتحديد الطريقة المثلى لترسيب الإنزيم التي تعطي أعلى فعالية نوعية Specific activity، وأعلى نسبة مئوية من الحصيلة الإنزيمية (Yield) وشملت: الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$، والأسيتون البارد Cold acetone، والكحول الأثيلي Ethyl alcohol، والترشيح الفائق Ultra-filtration

تنقية الإنزيم

شملت خطوات تنقية الإنزيم المدروس بشكل كامل عدة خطوات، وهي كالآتي:

1. **كروماتوغرافيا التبادل الأيوني: Ion Exchange chromatography**

- **المواد والمحاليل المستخدمة:**

أ- المبادل الأيوني DEAE Cellulose – Sephadex A 50

ب- محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) 0.25 مول/ لتر الحاوي على كلوريد الصوديوم 0.25 مول/لتر.

جـ- محلول حمض الهيدروكلوريك 0.25HCl مول/لتر.

د- محلول فوسفات الصوديوم الدارئ Sodium phosphate buffer 0.01 مول/لتر وبدرجة حموضة 7 .

هـ- محلول كلوريد الصوديوم 1مول/لتر.

- **إعداد عمود المبادل الأيوني:**

أُعدَّ المبادل الأيوني DEAE Cellulose – Sephadex A 50 بالطريقة التي وصفها Whitaker، (1972)، إذْ مُزج 30 غراماً من مسحوق المبادل DEAE Cellulose – Sephadex A 50 في (500 مل) ماءً مقطراً، وتُرك مدة 30 دقيقة إلى أن تركد حبيبات المبادل الأيوني، ثم أُعيد غسل المبادل عدة مرات حتى يصبح السائل العلوي رائقاً، ثم غُسل بعدها بالمحلول (ب) ومن ثم بالماء المقطر؛ وبعد ذلك غُسل بالمحلول (جـ) ثلاث مرات، ثم أُعيد غسله بالماء المقطر وصولاً إلى درجة حموضة متعادلة (pH7)، ثم أُعيد غسله بمحلول الدارئ (د)، بعدها عُبّئ المبادل الأيوني في عمود زجاجي ذي أبعاد (1.6×58 سم). وأُجريت عملية الموازنة للعمود بمحلول الدارئ نفسه حتى اليوم التالي، وبسرعة جريان 5 مل/ دقيقة.

- **إضافة النموذج**

أضيف المحلول الإنزيمي المرسب بالكحول الأثيلي البارد إلى عمود المبادل DEAE Cellulose – Sephadex A 50، ثم جمعت الأجزاء التي لم ترتبط بالمبادل الأيوني المتدفقة من العمود في أنابيب اختبار بمعدل (5 مل)، وبسرعة جريان 5/4 مل/ دقيقة، غسل العمود بمحلول الدارئ (د). ثم أجريت عملية الاسترداد باستخدام المحلول الملحي

متدرج التركيز Linear Salt Gradient باستخدام المحلول (ب) و(هـ)، ثم قُرئت الامتصاصية على 420 نانومتراً لتحديد القمم المفصولة، ولغرض إجراء هذه العملية اِستُخدم جامع الأجزاء المتدفقة Fraction collector من نوع Ultroac 2070.

2. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel-Filtration

حضر عمود الترشيح الهلامي G-100 المكون من مادة السيفاديكس (SephadexG-100) من إنتاج شركة Pharmacia السويدية، بحسب تعليمات الشركة المنتجة إذ علقت حبيبات المادة بالماء المقطر بنسبة (1 : 10) (وزن/ حجم)، وبعد ركود الهلام سكب السائل العلوي بهدوء، وبعدها غسل الهلام بمحلول الدارئ (فوسفات الصوديوم الدارئ) 0.01 مول/لتر وبدرجة حموضة 7، بعد ذلك عُبّئ المزيج في عمود زجاجي بأبعاد 1.6×58 سم، وأجريت موازنة العمود بالمحلول السابق نفسه حتى اليوم التالي وبسرعة جريان 3 مل/ دقيقة.

مرر المحلول الإنزيمي المركز الذي حصل عليه من خطوة التنقية السابقة (التبادل الأيوني) إلى سطح هلام Sephadex G-100، استردت الأجزاء بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ نفسه بسرعة جريان 5/9 مل/ دقيقة، ثم قيس الامتصاص الضوئي في طول الموجة 420 نانومتراً لتحديد القمم المفصولة، وتحديد الفعالية في القمم المفصولة. ثم مرر الإنزيم على عمود Sephacryl-S 200 كخطوة أولى (استخدمت مادة Sephacryl S-200 من إنتاج شركة Pharmacia السويدية، وحضر الهلام بحسب تعليمات الشركة المنتجة)، بعدها مرر على العمود نفسه ضمن الظروف المتبعة في الخطوة الأولى نفسها كخطوة ثانية.

تعيين نقاوة الإنزيم Designate the purity of the enzyme

اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد أكريل أمايد بغياب العوامل الماسخة (Poly acryl amid electrophoresis under non denatured condition) التي ذكرها (Garfin، 1990).

النتائج والمناقشة

يظهر الجدول(1) مستوى عالياً من الرطوبة، والبروتين، والدهن، والكربوهيدرات، ودرجة الحموضة، والقيمة الحرارية، فضلاً عن مستوى منخفض من الرماد في ضرع البقر. وقدرت نسبة الكربوهيدرات بـ 10.30%، وهذه النتائج هي مقاربة لتلك التي توصل إليها Abed، (2010) ويحيى وآخرون، (2011)، فيما يخص تقدير المكونات الكيميائية لبعض أنسجة الحيوان، حين استخلصوا إنزيم اللاكتاز من دماغ الغنم والمعز حديثة الولادة.

الجدول (1) مكونات ضرع البقر

المكونات	النسبةالمئوية%
الرطوبة	59.9
البروتين	23.20
الدهن	5.00
الكربوهيدرات	10.30
الرماد	1.60
المجموع الكلي	100.00
القيمة الحرارية (كيلو سعره/ 100غرام)	176.42
الدالة الحمضيةpH	5.90

استخلاص الأنزيم:

يشير الجدول (2) إلى أنَّ الاستخلاص بمحلول 0.2 مول/لتر من حمض الأسكوربيك + 0.2 مول/ لتر من حمض الخليك بدرجة حموضة5، هي الطريقة المثلى لاستخلاص الإنزيم مقارنة بالطرائق الأخرى، فقد بلغت الفعالية النوعية والفعالية الكلية للإنزيم 577.42 وحدة/ ملي غرام بروتين و75200 وحدة على التوالي. وقد أشارت النتائج في الجدول(2) إلى المستوى العالي للفعالية النوعية والفعالية الكلية، ويتضح من النتائج أنَّ درجة الحموضة الحمضية، كانت الفُضلى في استخلاص الأنزيم من ضرع البقر، إذ تعود قابلية هذه المحاليل وتأثيرها في الاستخلاص إلى قدرتها على فك الترابط الموجودة بين الإنزيم والمواد الخلوية الأخرى، إذ كانت القوة الأيونية لمحلول 0.2 مول /لتر لحمض الاسكوربيك + 0.2 مول/لتر من حمض الخليك، ودرجة الحموضة 5 كافية لفك الترابط بين الإنزيم والمواد الخلوية الأخرى، مما أدى إلى انحلالية الإنزيم في محلول الاستخلاص ومن ثمَّ إلى زيادة فعاليته النوعية (سعود، 2009).

يظهر الجدول (3) طرائق ترسيب الإنزيم، ومنها استخدام محلول كبريتات الأمونيوم التي تعدُّ من الطرائق الكلاسيكية المعروفة تماماً منذ مدة بعيدة، وتستعمل استعمالاً واسعاً.

يعدُّ الترسيب بالأملاح المتعادلة من العمليات الضرورية في تنقية الإنزيمات للتخلص من البروتينات غير المرغوب فيها الموجودة مع الإنزيم وفي تقليص حجم المستخلص الخام والحصول على الإنزيم بدرجة عالية من النقاوة، وأملاح كبريتات الأمونيوم فعالة في ترسيب البروتينات بسبب انحلاليتها العالية فضلاً عن انعدام تأثيرها في البروتينات (Mahn وIsmail،2011) يحدث الترسيب بالأملاح بفعل معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والإخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين، ممَّا يؤدي إلى انخفاض انحلاليتها وترسبها، وتسمى هذه العملية بالتمليح Salting out (Duong وGabelli، 2014). ويزداد تركيز ملح كبريتات الأمونيوم المضاف تدريجياً من 30 إلى 60 %.

الجدول (2) طرائق استخلاص إنزيم β-galactosidase

الطريقة	الحجم (مل)	الفعالية (مل)	تركيز البروتين (ميلي غرام/ مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ميلي غرام بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)
الماء المقطر	47	177	7.66	23.107	8319
Na2CO3 (5%)	47	149	8.10	18.39	7003
NaCl (10%)	47	703	3.60	195.27	33041
حمض الخليك 0.2 مول / لتر pH5	47	769	4.31	178.40	36143
0.2 مول/ لتر حمض الأسكوربيك pH 5	47	1113	3.20	347.80	52311
حمض الخليك 0.2 مول/ لتر+ حمض الأسكوربيك 0.02 مول/ لتر pH 5	47	1600	2.80	577.42	75200

وقد استخدم جاسم (2004) هذه الطريقة في تنقية إنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الترمس بنسب إشباع مختلفة، واستخدمها أيضاً Abed (2010) في تنقية إنزيم اللاكتاز بنسب إشباع تراوح بين 20–70%، وكذلك استعملها الشيخلي (2004) في تنقية إنزيم α-amylase من بكتريا *Bacillus lichenforimis* R_5 بنسبة إشباع 80%.

وكانت فعالية إنزيم اللاكتاز المستخلص من ضرع البقر (430 – 1097) وحدة/ ميلي غرام مع الإشباع التدريجي بنسبة (30-60) % من محلول كبريتات الأمونيوم، وكانت الفعالية النوعية للمستخلص الخام للإنزيم (70.84 – 266.09) وحدة/ ميلي غرام، وبلغ معامل التنقية (عدد مرات التنقية) باستخدام محلول كبريتات الأمونيوم مع نسبة إشباع (30–60 %) (0.460–0.722) مرة، وبلغت الحصيلة الإنزيمية (المردود) (8.5–21 %) وهذه النسبة كانت منخفضة مقارنةً بالطرائق الأخرى المستعملة في التنقية؛ لذلك يمكن إهمال هذه الطريقة في التنقية.

الجدول (3) طرائق تركيز الإنزيم من المستخلص الخام (التنقية الجزئية)

الطريقة	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/ مل)	تركيز البروتين (ميلي غرام/ مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ميلي غرام)	الفعالية الكلية (وحدة)	معامل التنقية	الحصيلة الإنزيمية (المردود)%
المستخلص الخام	47	1600	2.80	577.42	75200	1.000	100
كبريتات الأمونيوم %30	15	430	6.07	70.84	6450	0.722	8.500
%60	15	1097	4.7	266.09	16365	0.460	21.000
الأسيتون البارد 50%	15	2630	3.04	365.73	39450	1.490	52.460
الكحول الأثيلي %50	15	2970	1.98	1500	44550	2.590	59.242
الترشيح الفائق Ultra filtration	12	1409	2.34	602.13	16908	1.040	22.480

كذلك اِستُعمل خمس نسب من الأسيتون البارد لترسيب الأنزيم، وهي :

1 : 0.5، 1 : 1، 1 : 2، 1 : 3، 1 : 4 (حجم/ حجم)، وقد بيّنت النتائج أنَّ حجم 1 : 2 كان الأفضل من حيث الفعالية النوعية للإنزيم؛ لذلك استعمل هذا الحجم في ترسيب الإنزيم من مستخلصاته. وأشار Ajaykumar وآخرون (2012) وكذلك Silvia وآخرون (2014) إلى أنّه يمكن توضيح فائدة الأسيتون البارد في الترسيب بأنه يحدث تكتلاً لجزيئات البروتين مع بعضها بارتباط المجاميع المشحونة، ومن ثم زيادة قوة التجاذب Attraction Force، إذ يؤدي خفض قيمة ثابت الفصل الكهربائي إلى زيادة قوة التجاذب، ونظراً إلى أن قيمة ثابت الفصل للمذيبات العضوية (الإيثانول، والميثانول، والأسيتون) هي30 وهي أقل من قيمة ثابت فصل الماء 80 فسوف يؤدي ذلك إلى مضاعفة قوة التجاذب ومن ثم إلى ترسيب البروتين. ويستخدم الأسيتون البارد لتفادي حدوث تمسخ للبروتينات (الإنزيمات) Denaturation عند استخدام المذيبات العضوية نتيجة كسر الروابط الكارهة للماء Hydrophobic bonds الموجودة في التركيب الجزيئي للبروتين. وقد أسهم الأسيتون البارد في تحقيق معامل تنقية جزئية للإنزيم بلغت 1.49 مرة، وبحصيلة إنزيمية مقدارها (52.460%). وأشارت النتائج (جدول 3) إلى أنَّ ترسيب الإنزيم من مستخلصاته باستخدام الأسيتون البارد والكحول أعطت أفضل النتائج مقارنة بالطرائق الأخرى المستخدمة. وقد استخدم هذه الطريقة كثير من الباحثين في تنقية الإنزيم، إذ استخدمها السلطان وآخرون، (2004) في تنقية الإنزيم من الفول السوداني، وحصلوا على فعالية نوعية (65.58) وحدة/ميلي غرام، ومعامل تنقية 2.35 مرة، وحصيلة إنزيمية بلغت (45.64%)، وأكدوا أنَّ ترسيب إنزيم الليبوكسيجينيز Lipoxygenase من الفول السوداني باستخدام الأسيتون البارد والكحول هي أفضل الطرائق.

نتائج ترسيب الإنزيم باستخدام الكحول الأثيلي (جدول3)، إذ كانت الفعالية النوعية 1500 وحدة/ ميلي غرام بروتين للإنزيم المركز بالكحول الأثيلي 50%، وبمعامل تنقية بلغ 2.59 مرة. ومن الجدير بالذكر أن عملية الترسيب بفعل الكحول الأثيلي القابل للامتزاج بالماء (Water Miscible) تعتمد على ثابت الفصل الكهربائي Dielectric constant لهذا المذيب العضوي التي هي أقل من الماء بكثير؛ ممَّا يؤدي إلى انخفاض كبير في قيمة هذا الثابت، وارتفاع قيمة القوة التي تجذب الجزيئات بعضها إلى بعض، وتكوين كتل تترسب في المحلول. ومع أنَّ كثيراً من الباحثين (Lazan وآخرون، AL-Shammary; 2004، 2011 ;Abdulla، 2013) استخدموا كبريتات الأمونيوم في ترسيب الإنزيمات ومنها الليبوكسيجينيز، إلا أن بعضهم أكَّد كفاءة التركيز بالمذيبات العضوية مثل الكحول الأثيلي والأسيتون، وفضَّل عدد كبير منهم ترسيب الإنزيمات من مستخلصاتها الخام بالمذيبات العضوية دون اللجوء إلى الترسيب بالأملاح؛ لذلك اعتمدت هذه الطريقة في تنقية الأنزيم في

هذه الدراسة. وكانت نتائج هذه الدراسة متطابقة مع ما توصل إليه Abed، (2010) عندما استخدم المذيبات العضوية في تركيز مستخلص إنزيمβ-galactosidase من كبد الغنم.

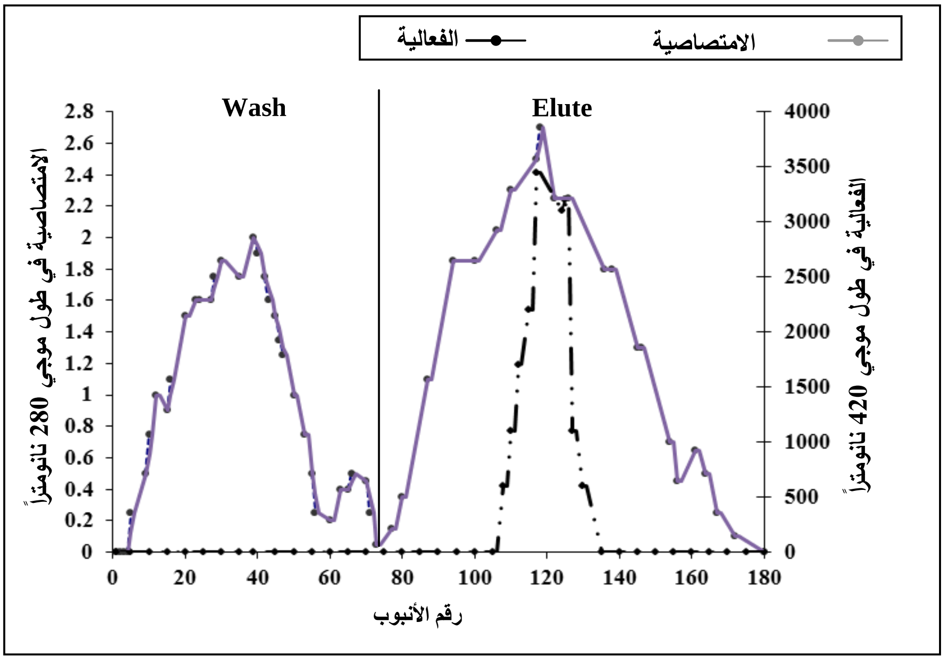
وعند استخدام طريقة الترسيب بالترشيح الفائق التي تعدُّ من الطرائق المستخدمة على نطاق واسع على المستويات المخبرية والصناعية، ولاسيّما تنقية الإنزيمات؛ وذلك لأنَّ هذه الطريقة لا تحتاج إلى مواد كيميائية كثيرة، ويجري العمل على درجات حرارية منخفضة، ولا يحدث تغيير في طور البروتين، أي لا يحدث تحول من ذائب إلى راسب، فكانت الفعالية 1409 وحدة/ ميلي غرام من البروتين، وبمعامل تنقية 1.04 مرة، وبحصيلة أنزيمية 22.48%. وهذه النتائج جاءت مطابقة لما توصل إليه Munoz وBarceló، (1995)، Javeri وUhlenbruck، (2004)، محيسن وآخرون، (2008)، Abed، (2010)، عندما استخدموا الطريقة نفسها في ترسيب إنزيمات Amylase، β-galactosidase وLipoxygenase، β- galactosidase على التوالي. ويمكن إن نستخلص في هذه الدراسة إلى أنَّ ترسيب إنزيم β-galactosidase باستخدام الكحول الأثيلي كانت أفضل الطرائق؛ لأنها أعطت أعلى فعالية وأكبر حصيلة إنزيمية مقارنة بالطرائق الأخرى.

والجدول (4) يوضح خطوات تنقية إنزيم اللاكتاز المستخلص من ضرع البقر، وتضمنت ثلاث خطوات رئيسة، وهي الاستخلاص للحصول على الإنزيم الخام، والترسيب بالكحول الأثيلي ثم إمرار الإنزيم المنقى جزئياً على عمود المبادل الأيوني السالب DEAE Cellulose Sephadex-A50 الذي أُجريت موازنته بداريء فوسفات الصوديوم بتركيز 0.01 مول/ لتر بدرجة حموضة 7 (0.01 mol /L Sodium phosphate buffer pH7)، ثم قيست الامتصاصية في طول موجي (280) نانومتراً.

أظهرت النتائج أنَّ المستخلص الخام المنقى بالكحول الأثيلي 50%، وباستخدام المبادل الأيوني DEAE Cellulose Sephadex-A50 قد أعطى حصيلة إنزيمية (91.80%) ومعامل تنقية 3.83 مرة. ويوضّح الشكل (2) ظهور ثلاث قمم (Peaks) في مرحلة التنقية، كانت منها قمة في مرحلة الغسل Washing، وكانت خالية من الفعالية الإنزيمية تماماً؛ ممَّا يؤكد ارتباط الإنزيم بالمبادل الأيوني السالب، إن محصلة الشحنات المحمولة على الإنزيم في أحوال الاسترداد هي شحنات سالبة تتنافر مع شحنة الإنزيم؛ لذلك تخرج في مرحلة الغسل. أمَّا في مرحلة الاسترداد (Elution) فنلاحظ ظهور قمتين، الأولى كانت نشطة وتحتوي على الفعالية التي تؤكد وجود الإنزيم في هذه المرحلة، والقمة الثانية كانت غير فعالة، جمعت الأجزاء الحاوية على فعالية عالية وقيس حجمها والفعالية وتركيز البروتين فيها.

الجدول (4) خطوات تنقية إنزيم β-galactosidase المستخلص

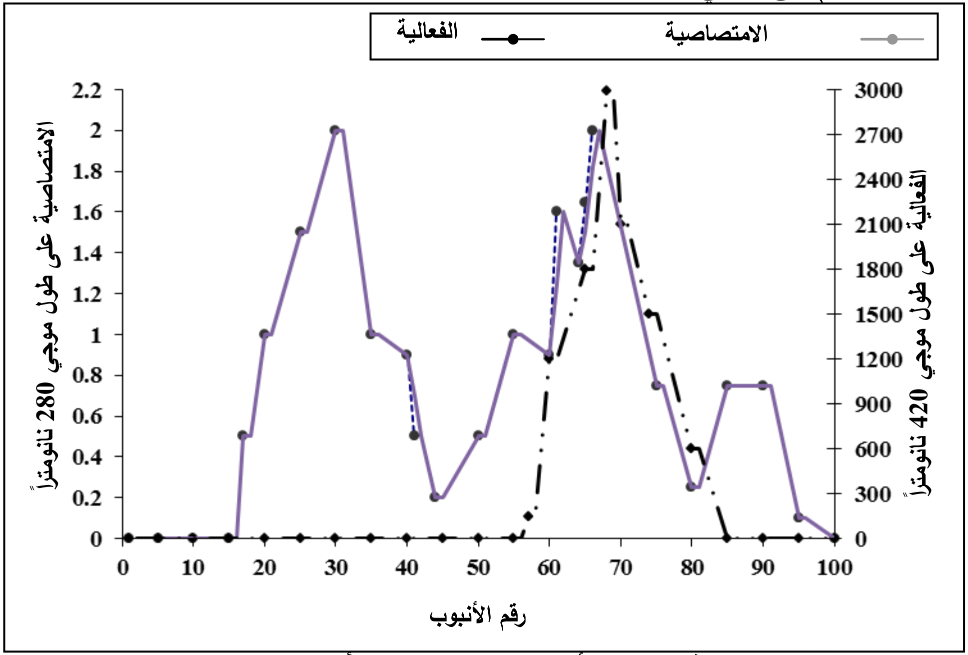
خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/ مل)	تركيز البروتين (ميلي غرام /مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ميلي غرام)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية%
المستخلص الخام	47	1600	2.80	577.42	75200	1.0000	100
تركيز بالكحول الأثيلي50%	15	2970	1.98	1500.00	44550	2.5900	59.242
المبادل الأيوني DEAE-Cellulose	20	3452	1.56	2272.82	69040	3.8300	91.80
الترشيح الهلامي Sephadex G-100	20	2997	1.47	2125.53	59940	3.6810	79.70
الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 الخطوة الأولى	20	3210	0.93	3451.61	64200	5.9000	85.37
الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 الخطوة الثانية	20	3360	0.87	3885.28	67200	6.5300	89.36



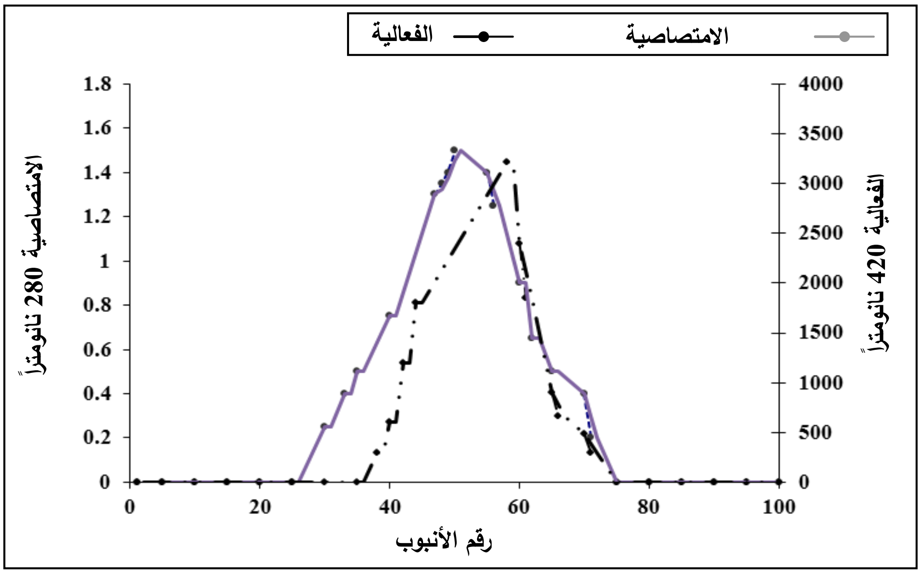
الشكل (2) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

مـرر المحلـول الإنزيمـي النـاتج مـن الخطـوة السـابقة علـى عمـود الترشـيح الهلامـي SephadexG-100. في هذه الخطوة أمكن الحصول على قمة بروتينية ذات فعالية عالية، والشكل (3) يوضّح أنَّ قمة الفعالية تكاد تكون متطابقة تقريباً مع قمة البروتين، تدلُّ هذه الخطوة على نقاوة الإنزيم، وكان معامل التنقية في هذه الخطوة 3.6810 مرة، وبحصيلة إنزيمية مقدارها 79.70%، وتعبّر النسبة المئوية على كفاءة الفصل الجيد.

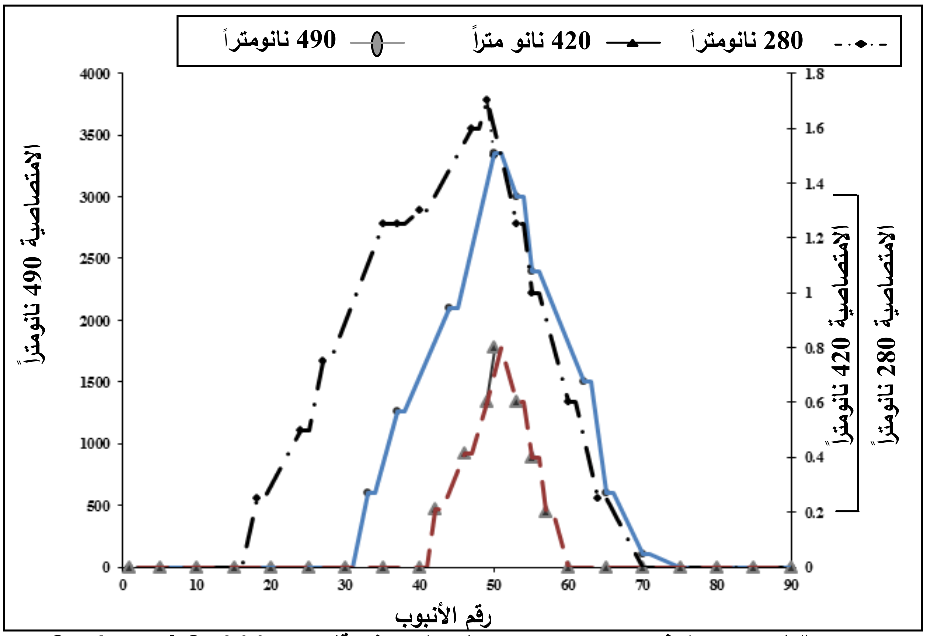
ويلاحظ من الجدول (4) عندما يمرر الإنزيم من خلال Sephacryl S-200 (الخطوة الأولى) فإن معامل التنقية والحصيلة الإنزيمية بلغت 5.9 و85.37 % على التوالي، والقمتان الرئيستان تظهران في الشكل (4)، القمة الأولى تظهر لا وجود لنشاط إنزيمي، في حين تظهر القمة الثانية النشاط الإنزيمي، وذروة النشاط الإنزيمي قد يكون مطابقاً للقمة الثانية من البروتين، ومن أجل التأكد من أن ذروة النشاط الإنزيمي مطابقة للقمة الثانية من البروتين ذات الفعالية العالية فقد مرر محلول الإنزيم خلال Sephacryl S-200 (الخطوة الثانية) وضمن الظروف نفسها في الخطوة الأولى، إذْ ظهرت قمة واحدة للبروتين (الشكل 5)، وتبيّن أنَّ ذروة النشاط الإنزيمي مطابقة تماماً للنشاط البروتيني؛ ممَّا يدلُّ على نقاوة الإنزيم، إذْ بلغ عدد مرات التنقية والحصيلة الإنزيمية في الخطوة الثانية (6.53 و89.36%)على التوالي.



الشكل (3) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الهلامي من خلال أعمدة Sephadex G-100

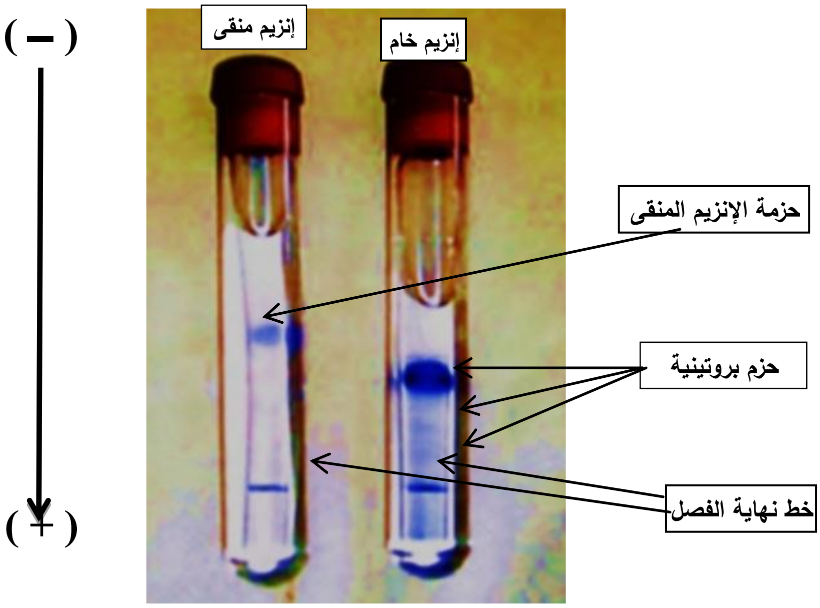


الشكل (4) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (الخطوة الأولى) بعمود Sephacryl S-200



الشكل (5) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (الخطوة الثانية) بعمود Sephacryl S-200

استخدم الترحيل الكهربائي بغياب العوامل الماسخة Denaturation Factors لتعيين نقاوة الأنزيم وخلوه من بروتينات أخرى، فلوحظ ظهور حزمة بروتينية واحدة (One band) في هلام متعدد أكريل أميد Poly acryl amid Gel بعد أن كانت 4 حزم في المستخلص الإنزيمي المرسب بالكحول الأثيلي 50%، كما في الشكل (6)؛ ممَّا يشير إلى نقاوة الإنزيم وتجانسه Sawheney و Singh، (2005). فضلاً عن السلوك الكروماتوغرافي للإنزيم المنقى خلال الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل S-200 الخطوة الثانية (الشكل 5) إذ كانت قمة الفعالية متطابقة تطابقاً تاماً مع قمة الامتصاص على طول موجي 280nm.



الشكل (6) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) بهلام الأكريل أميد بغياب العوامل الماسخة لإنزيم اللاكتاز المنقى من ضرع البقر بتركيزين مختلفين، إذ تمثل الحزمة العليا الإنزيم المنقى في حين تشير الحزمة السفلى إلى حزمة نهاية الفصل (حزمة الصبغة) في الترحيل الكهربائي.

الاستنتاج

تعدُّ طريقة الاستخلاص باستعمال 0.2 مول/ لتر من حمض الخليك + 0.2 مول/ لتر من حمض الأسكوربيك بدرجة حموضة للمحلول (5)، هي الطريقة الفُضلى في استخلاص الإنزيم، إذْ أعطت فعالية نوعية وفعالية كلية للإنزيم 577.42وحدة / ميلي غرام من البروتين و75200 وحدة على التوالي. وكان استخدام الكحول الأثيلي(50%) هو الأفضل في ترسيب الإنـزيم الـذي أعطـى فعاليـة نوعيـة وفعاليـة كليـة 1500 وحـدة/ ملـي غـرام مـن البـروتين و44550 وحـدة علـى التـوالي. وبلـغ معامـل التنقيـة (6.53) مـرة، والحصـيلة الإنزيميـة (89.36%) عند استخدام الترشيح الهلامي Sephacryl S-200(الخطوة الثانية).

وتبيّن من خلال الترحيل الكهربائي ظهور حزمة بروتينية واحدة (One band) في هلام متعدد أكريل أميد Poly acryl amid Gel بعد أن كانت 4 حزم في المستخلص الإنزيمي المركز بالكحول الأثيلي 50%؛ ممَّا يدلُّ على نقاوة الأنزيم، كما لوحظ في المنحى (5) أنَّ ذروة نشاط الإنـزيم مطابقة تماماً لنشاط البروتين؛ ممَّا يدلُّ على نقاوة الإنـزيم المنقى في الخطوة الثانية من الترشيح الهلامي.

وقد استطعنا من خلال هذه الدراسة أنْ نستخلص وننقي إنزيم اللاكتاز من ضرع البقر أول مرة، إذْ لم يسبق استخلاصه من ضرع البقر، ومن مخلفات المجازر بالاعتماد على عدة تقنيات كيميائية – حيوية والحصول عليه بدرجة عالية من النقاوة وبفعالية إنزيمية عالية، ليكون مصدراً متاحاً للتطبيقات الصناعية.

References المراجع

جاسم، صنوبر محمد أحمد. 2004. استخلاص إنزيم الليبوكسيجينيز وتنقيته وتوصيفه من بذور الترمس *Lupinus termis* L.. رسالة ماجستير. كلية التربية (ابن الهيثم) – جامعة بغداد.

سعود، أسماء محمد. 2009. استخلاص إنزيم البيروكسيديز الذائب من ثمرة الطماطة المحلية *Lycopersicon esculentum* L. وتنقيته جزئياً. المجلة العراقية للعلوم 50 (2): 175-181.

السلطان، أحلام مكي عبد الجبار؛ الجميلي، طالب خماس حسن والأعرجي، سند باقر محمد. 2004. فصل وتنقية وتوصيف أنزيم الليبوكسيجينيز من فستق الحقل، مجلة العلوم الزراعية العراقية.35 (5):112- 103.

الشيخلي، رنا عبد الله حسين. 2004. إنتاج إنزيم ألفا أميليز من البكتريا *Bacilluslichenforimis* R_5 المعزولة محلياً وتنقيته ودراسة صفاته. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

محيسن، ابتسام كريم؛ يحيى، اياد نافع والأعرجي، سند باقر. 2008. أ- أستخلاص وتنقية إنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الفول السوداني *Arachis hypogea* L.. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية 24 (2): 109-133.

يحيى، إياد نافع؛ الحصناوي، علي نوري؛ محيسن، ابتسام كريم وعلي، حسين عبد الأمير (2011). استخلاص وتنقية إنزيم β-galactosidase المستخلص من دماغ الماعز حديثة الولادة. مجلة جامعة دمشق 27(1): 49 - 64.

Abdulla, Q. L. 2013. Extraction Purification and Characterization of Lipoxygenase from Pleurotus ostreatus. PhD. Thesis College of Sciences, University of Baghdad.

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

Ajaykumar, M. and Shweta, N. 2012. Isolation, Characterization and Purification of α-Galactosidase from Peas. Journal of Advanced Laboratory Research in Biology, 3(3):164-170.

Al-Shammary, Mohammed H. 2011. Production, Purification and Characterization of Lipoxygenase from Fusarium proliferatum. Ph. D. Thesis College of Sciences, University of Baghdad.

Association of official Analytical chemists (A.O.A.C.). 1999. Official methods of analysis 15th ed. Washington Pc.

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.

Boon, M. A.; Janssen, A. E. M. and van't Riet, K. 2000. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. Enz. Microb. Technol. 26: 271-281.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and Sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilization the principle of protein dye binding analytical biochemistry 72(99): 248-256.

Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Yang, J., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H. and Zhang, H. 2009. Immobilization of recombinant thermo stable β-galactosidase from Bacillus stearothermophilus for lactose hydrolysis in milk. Journal of Dairy Science 92(2): 491–498.

Dugdale, M. L., 2010. Importance of Arg-599 of b-galactosidase (E. coli) as an anchor for the open conformations of Phe-601 and the active-site loop. Biochem. Cell Biol. 88: 969–979.

Duong, L. and Gabelli, S.,2014. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. Methods Enzymol. 541: 85-94.

EL-Gindy, A., 2003. Production partial purification and some properties of β-galactosidase from Aspergillus carbonarius. Folia Microbiologica, 48(5): 581- 584.

Garfin, DE. 1990. One-dimensional gel electrophoresis. Methods Enzymol 182: 425–441.

Goulas, T., Goulas, A., Tzortzis, G. and Gibson, G. ,2009. Comparative analysis of four β-galactosidase from Bifidobacteuim bifidum NCIMB41171: purification and biochemical characterization. Appl Microbiol Biotechnol, 82(6): 1079-1088.

Haider, T. and Husain, Q. 2007. Preparation of lactose- free milk by using salt-fractionated almond J. Sci. Food Agric., Vol. 87, No.7, pp. 1278- 1283.

Hermida, C., Corrales, G., Cañada, FJ., Aragón, JJ. and Fernández-Mayoralas, A., 2007. Optimizing the enzymatic synthesis of beta-D-galactopyranosyl-D-xyloses for their use in the evaluation of lactase activity in vivo. Bioorg. Med. Chem. 15(14): 4836– 4840.

Itahana, K., Campisi, J. and Dimri, GP., 2007. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. Methods Mol. Biol. Methods in Molecular Biology, 371: 21–31.

Järvelä, I., Torniainen, S. and Kolho, KL., 2009. Molecular genetics of human lactase deficiencies . Annals of Medicine, 41(8): 568–575.

Javeri, S. and Uhlenbruck, G., 2004. Isolation of B-galactosidase. J. Clin. chem. clin Biochem. 22: 735 – 739.

Lazan, H., Ng, S., Goh, L. and Ali, Z. 2004. Papaya beta- galactosidase/ galactanaseiso forms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. Plant Physiol Biochem, 42: 847–853.

Mahn, A. and Ismail, M., 2011. Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by ammonium sulfate precipitation for 2D-PAGE analysis. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 879(30): 3645-3648.

Marcel, F. and Bradley, T., 2014. Chemical Zoology. Vol: VII – Mollusaca: 234-280.

Mattar, R., de Campos Mazo, DF. and Carrilho, FJ. 2012. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. Clin Exp Gastroenterol, 5:113-121.

McNichol J. A., 2012. Critical evaluation of various solvents systems used for the quantification of micro algal fatty acids with lyophilized samples has been reported. Lipids J. 47: 195-210.

Miller Manual, Miller School of Albemarle,2013. ONPG ASSAY of β-GALACTOSIDASE. p. 61-75 .Charlottesville, Virginia, USA .

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.

Munoz, R. and Barceló, R. A. 1995. Enzymes in: Hand Book of Food Analysis (eds: Nollet, L. M. L.), Marcel Dekker New York. 2: 317 – 319.

Myers, J. 2010. One-Hundred Years of pH. Journal of Chemical Education, 87: 30-35.

Neubert, K., stano, J., Micieta, K. and Korenova, M. 2004. Study of extracellular plant lactase. Engineering in Life Sciences, 4(3): 281- 283.

Odoemelam, S. A., 2005. Proximate Composition and Selected Physicochemical Properties of the Seeds of African Oil Bean (Pentaclethra marcrophylla). Pakistan Journal of Nutrition, 4(6): 382-383.

Osborn, D. R., and Voogt, P., 1987. The Analysis of Nutrients in Food. Food science and technology, Academic press, London, New York. San Francisco.

Pereira-Rodriguez, A., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M., Cerdán, M., Becerra, M. and Sanz-Aparicio, 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.

Pereira-Rodriguez, A., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M. Cerdán, M., Becerra, M. and Sanz-Aparicio, J., 2012. Structural basis of specificity in tetrameric Kluyveromyces lactis β - galactosidase. J. Struct. Biol. 177(2):392-401.

Pearson, D., 1976. The chemical Analysis of Food seventh Edition, Churchill, Livingstone, Edinburg hard, N. Y.

Samin, S. and Maryam, D., 2014. Comprehensive analysis of beta-galactosidase protein in plants based on Arabidopsis thaliana. Turk. J. Biol. 38:140-150.

Sawheney, S. K. and Singh Randhir., 2005. Introdictory practical Bio chemistry. Narosa publishing House. London.

Silvia, C., Belén, I., Javier, P. and Pilar, D., 2014. Fast and economic immobilization methods described for non-commercial Pseudomonas lipases. BMC Biotechnology,14: 27- 42.

Stamp, S., 2012. Alcohol dehydrogenase. Fastbleep.com Biochemistry Chapter.

Whitaker , J. R., 1972 . Principle of Enzymology for the Food Science page 607, Marcel Dekker, INC, New York.

Wong, SY. and Hartel, RW., 2014. Crystallization in lactose refining-a review. J. Food Sci., 79(3): 257-272.