

## التنقية الجزئية لاستيراز حمض هيدروكسي السيناميك ودراسة فعاليته في اصطناع الإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك

غسان أبوشامة<sup>(1)</sup> وهيفاء العظمة<sup>(2)</sup> وفادي خضر<sup>(3)</sup>

تاريخ الإيداع 2012/12/04

قبل للنشر في 2013/03/04

### الملخص

جرت تنقية جزئية لاستيراز حمض هيدروكسي السيناميك (Hydroxycinnamic acid esterase, HCAE) فطري المنشأ من *Humicola sp.* وذلك بترسيبه إمّا باستخدام سلفات الأمونيوم أو الأستون. جرى الحصول على أعلى مردود للفاعلية الإنزيمية (91%) بعد الترسيب باستخدام الأستون. وهو أكبر بثلاثة أضعاف تقريباً من مردود الفاعلية (30%) المقيس مع الترسيب بسلفات الأمونيوم. أبدى الإنزيم فاعلية مثلى عند كل من درجة الحرارة 50 °م وقيمة الـ pH 6.5. اصطنع الإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك باستخدام الفاعلية الإنزيمية بعد الترسيب بالأستون. كما درس أثر الماء في تفاعل الأسترة ونتج أعلى مردود لهذا التفاعل (95.7%) عندما بلغت نسبة الماء في المزيج التفاعلي 2%.

**الكلمات المفتاحية:** استيراز حمض هيدروكسي السيناميك، حمض الفيروليك، الفاعلية الإنزيمية، تنقية الإنزيمات، الترسيب، التحفيز الحيوي.

(1) طالب ماجستير، (2) أستاذ مشرف، (3) أستاذ مشرف مشارك، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

## Partial purification of hydroxycinnamic acid esterase and study of its activity in the synthesis of ferulic acid ethyl ester

Gh. Abo chameh<sup>(1)</sup>, H. Al-azmeh<sup>(2)</sup>  
and F. Kheder<sup>(3)</sup>

Received 04/12/2012

Accepted 04/03/2013

### ABSTRACT

A partial purification was performed for the fungal hydroxycinnamic acid esterase (HCAE) from *Humicola* sp. by precipitation using either ammonium sulfate or acetone. The highest activity yield (91%) was obtained after the precipitation by acetone, which was nearly three times higher than the activity yield (30%) measured after the precipitation by ammonium sulfate. The enzyme showed optimal activity at 50 °C and pH 6.5. Enzymatic synthesis of ferulic acid ethyl ester was achieved using the enzyme issued from the precipitation by acetone. The effect of water on the esterification reaction was studied, and the result showed that the highest esterification yield (95.7%) was obtained when the percentage of water was 2% in the reaction mixture.

**Key words:** Hydroxycinnamic acid esterase, Ferulic acid, Enzyme activity, Enzyme purification, Precipitation, Biocatalysis.

---

<sup>(1)</sup> MSC., Student, <sup>(2)</sup>Supervisor, <sup>(3)</sup> Associated Supervisor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

## المقدمة

تشكل حموض هيدروكسي السيناميك (Hydroxycinnamic acid, HCA)، جزءاً كبيراً من الحموض الفينولية التي تدخل في تركيب جدار الخلية النباتية، حيث توجد هذه الحموض مؤسّرة مع البوليميرات السكرية في الجدار الخلوي النباتي [1,2]. يرتبط حمض 4-هيدروكسي-3-ميتوكسي السيناميك (حمض الفيروليك) مع البوليميرات السكرية في الجدار الخلوي النباتي بأشكال مختلفة من الروابط الإستيرية [3-5]. ويقوم بربط سلاسل البوليميرات السكرية الواحدة مع الأخرى أو حتى مع الليغنين؛ ممّا يؤدي إلى زيادة صلابة الجدار النباتي [6]. يدخل حمض الفيروليك في عمليات التحول الحيوي من أجل إنتاج الفانيلين المنكه الأكثر استخداماً في مجال الصناعات الغذائية عالمياً. كما أن صفاته المضادة للتأكسد فتحت له المجال أمام العديد من التطبيقات الدوائية، فهو يسهم في الحماية من أمراض تصلب الشرايين وبعض الأمراض القلبية والسرطانية [7,8]. من ناحية أخرى فإن الإستر الإيتيلي لهذا الحمض يحمي الخلايا العصبية من بعض الجزيئات السامة [9].

تمتلك حموض هيدروكسي السيناميك وأهمها حمض الكافريك والفيروليك أهمية صناعية كبيرة. ويعود ذلك لما تتمتع به من خصائص مضادة للتأكسد. لكن انحلاليتها المعتبرة في الماء والضعيفة جداً في الأوساط الدسمة يحد من استثمارها في مجال الصناعات الغذائية والتجميلية والدوائية. ولذلك فقد دُرست إمكانية ربط حموض هيدروكسي السيناميك مع جزيئات أخرى مثل الكحوليات الأليفاتية من أجل تحسين انحلاليتها في الأوساط الدسمة باستخدام إنزيمات الليباز. وقد تبين أن هذه الإنزيمات غير قادرة على تحفيز تفاعلات الأسترة تلك بسبب وجود وظيفة مانحة للإلكترونات مقترنة مع الوظيفة الكربوكسيلية لحموض هيدروكسي السيناميك [10-12]. لذا كان لا بدّ من اعتماد إنزيمات أخرى أكثر نوعية من الليباز تجاه HCA مثل إنزيمات إستيراز حمض هيدروكسي السيناميك (Hydroxycinnamic acid esterase, HCAE) من أجل تحفيز تفاعلات أسترة هذه الحموض [13-17].

تعدّ إنزيمات HCAE من أهم إنزيمات الحلمهة المسؤولة عن تحطيم الروابط الإستيرية وتشكيلها بين حموض هيدروكسي السيناميك والسلاسل الجانبية للبوليميرات السكرية في الجدار الخلوي النباتي.

اكتشفت الفاعلية الإنزيمية HCAE أول مرة في خلايا *Streptomyces olivochromogenes* الجرثومية عام 1987 [18]. جرى بعد ذلك عزل الإنزيم وتنقيته من هذه الخلايا عام 1991 [19]. ثم توالت الدراسات عن إمكانية وجود إنزيمات HCAE في مصادر بيولوجية مختلفة ووجد أن عدداً لا بأس به من المكروبات يتمتع بهذه الفاعلية

الإنزيمية خاصة الفطريات مثل *Aspergillus awamori* [20] و *Aspergillus niger* [21-23]. تتميز إنزيمات HCAE بثباتيتها وعدم حاجتها إلى التماثل الإنزيمية (Co-enzyme)، كما أنها تحافظ على فاعليتها في الأوساط العضوية [24]. تستخدم حالياً إنزيمات HCAE في العديد من المجالات التطبيقية والصناعية فتدخل مثلاً في صناعة الورق مع غيرها من إنزيمات الحلمة مثل الكسيلاناز، مما يساعد على عملية استخلاص الليغنين التي تؤدي إلى التقليل من استهلاك الكلور من جهة والحصول على عجينة أكثر بياضاً من جهة أخرى [25].

نظراً إلى عدم توافر إنزيمات HCAE بشكل نقي تجارياً، هدف بحثنا إلى إجراء تنقية جزئية لأحد هذه الإنزيمات الموجود ضمن مستحضر إنزيمي خام يحتوي على عدة إنزيمات حلمة، ومن ثم دراسة الشروط المثلى لعمل هذا الإنزيم مثل درجة الحرارة و pH الوسط، وأخيراً اختبار فاعليته في تحفيز تفاعل الأسترية بين حمض الفيروليك والإيتانول وتحديد التركيب الأمثل للوسط التفاعلي.

### مواد البحث وطرقه

#### المواد المستخدمة

يوضح الجدول (1) المواد الكيميائية والمذيبات العضوية التي استخدمت من أجل إنجاز هذا البحث.

الجدول (1) المواد الكيميائية والمذيبات العضوية المستخدمة في هذا البحث.

النقاوة	الوزن الجزيئي	المصدر	المادة
≥98%	194.18	Fluka	حمض الفيروليك
≥98%	222.24	Aldrich	الاستر الإيتيلي لحمض الفيروليك
≥99.0%	132.14	Sigma-aldrich	سلفات الأمونيوم
≥96%	163.94	Sigma-aldrich	فسفات الصوديوم
≥99%	165.01	Sigma-aldrich	فسفات أحادية الصوديوم
≥99.5%	177.99	Sigma-aldrich	فسفات ثنائية الصوديوم
≥99.8%	46.07	Sigma-aldrich	الإيتانول
≥99.9%	32.04	Sigma-aldrich	الميتانول
≥99.9%	58.08	Sigma-aldrich	الأسيتون

#### المستحضر الإنزيمي (Depol™ 740L)

يتميز هذا المستحضر بكونه مزيجاً تجارياً لعدة إنزيمات حلمة مستخلصة من الفطر *Humicola sp.* حيث يشكل إستيراز حمض الفيروليك المكون الرئيسي له. يُسوّق هذا

المستحضر من قبل شركة Biocatalysts البريطانية على شكل سائل لزج بني اللون، ويملك فاعلية حلمهة عند مجال لدرجة الحرارة 40-65 °م وقيم للـ pH من 4 إلى 6.

#### قياس الفاعلية الإنزيمية وتركيز البروتينات

قيست الفاعلية الإنزيمية HCAE بتحديد كمية حمض الفيروليك المتحررة من تفاعل الحلمهة الإنزيمية للإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك؛ وذلك ضمن وسط تفاعلي يحوي 1995 ميكرو لتر من محلول هذا الإستر [1.33 ميلي مول/لتر محضر ضمن محلول موق من فسفات الصوديوم (70 ميلي مول/لتر - pH: 6.5)] بعد إضافة 5 ميكرو لتر من المستحضر الإنزيمي. أجري تفاعل الحلمهة عند الدرجة 40 °م مدة دقيقتين. ثم أخذ 100 ميكرو لتر من المزيج التفاعلي، ومددت 100 مرة باستخدام محلول ميثانول/ ثلاثي فلور حمض الخل (TFA) بنسبة حجمية (0.01/100) مع تحريك العينة بالمزج الرجاج (Stuart SA8 Vortex, UK Mixer) مدة 20 ثانية وبسرعة 2500 دورة/دقيقة، نبذت العينة بعد ذلك مدة 5 دقائق باستخدام مثقلة ميكرونية (Hermle:Z 160 M Centrifuge, Germany) وبسرعة تثفيل 13400 دورة/دقيقة، ثم رُشحت باستخدام مرشح سلولوزي (0.22 ميكرومتر). عُينت كمية كل من حمض الفيروليك المتحرر وإستره الإيتيلي باستخدام تقانة الاستشراب السائل رفيع الإنجاز (HPLC Agilent technologies 1260 infinity) والمؤلف من مضخة وحاقن آلي ومكشاف المصفوفات (Photodiode array detector)، وجرت معالجة المعطيات البيانية من خلال البرنامج الحاسوبي Chemstation.

فُصلت العينات وفق مبدأ الطور العكوس باستخدام العمود (Agilent HC-) (C18 ; 4.6X250 mm - 5µ). حيث حُقن 50 ميكرو لترًا من كل عينة وحُد طول الموجة 322 نانومترًا لكشف حمض الفيروليك وإستره الإيتيلي [26].

استخدم طور متحرك مؤلف من محلين مختلفين هما:

المحل A: ميثانول

المحل B: ميثانول/ ماء/TFA (V/V/V 0.01/50/50)

بتدفق 0.6 مل/دقيقة وفق التدرج الآتي:

0-5 min	5-10 min	10-16 min	16-20 min	20-25 min
20% B	50% B	80% B	20% B	20% B

جرى التعبير عن الفاعلية الإنزيمية HCAE بالوحدة (U) وتعرف بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحرير 1 ميكرومول من حمض الفيروليك من إستره الإيتيلي خلال دقيقة واحدة عند الدرجة 40 °م وقيمة الـ pH 6.5.

عُين المحتوى البروتيني ضمن المستحضر الإنزيمي التجاري وباقي العينات وفق طريقة حمض البيسانكونينيك (bicinchoninic acid kit, BCA -Sigma) باستخدام ألبومين المصل البقري كمحلول قياسي [27].

### التنقية الجزئية للإنزيم

#### 1- الترسيب بسلفات الأمونيوم

أجريت تنقية جزئية لإنزيم HCAE بترسيب 1مل من المستحضر الإنزيمي Depo1™ 740L باستخدام سلفات الأمونيوم بتركيز 20% من حد الإشباع؛ وذلك عند درجة الحرارة 4 °م مدة ساعة. أعيدت الخطوة السابقة من أجل تراكيز أخرى لسلفات الأمونيوم هي 40% و50% و60% و80% و100% من حد الإشباع. نبذت العينات بعد ذلك باستخدام المنبذة المكروية مدة 5 دقائق بسرعة 13400 دورة/دقيقة، ثم فصلت الرشاحة عن كل راسب من الرواسب الستة بالإبانة، وأذيب كل راسب بـ 1 مل من محلول دارئة فسفات الصوديوم (70 ميلي مول/لتر - pH: 6.5). أخذ بعد ذلك 5 مكرو لتر من كل من المحاليل الناتجة من أجل قياس الفاعلية الإنزيمية HCAE وتركيز البروتينات فيها.

#### 2- الترسيب بالأسيتون

رُسب 1مل من المستحضر الإنزيمي Depo1™ 740L بإضافة 4 مل أسيتون في درجة الحرارة - 18 °م مدة ساعة. نبذت العينة بعد ذلك باستخدام المنبذة المكروية مدة 5 دقائق بسرعة 13400 دورة/دقيقة، ثم فصلت الرشاحة عن الراسب بالإبانة، ومن ثم أُذيب الراسب بـ 1 مل من محلول دارئة فسفات الصوديوم (70 ميلي مول/لتر - pH: 6.5) ثم أخذ 5 مكرو لتر لقياس الفاعلية الإنزيمية HCAE وتركيز البروتينات.

#### تعيين الشروط المثلى (درجة الحرارة والـ pH) لعمل إنزيم HCAE

رُسب 1مل من المستحضر الإنزيمي بالأسيتون ثم أُذيب الراسب بـ 1 مل من دارئة فسفات الصوديوم (70 ميلي مول/لتر - pH: 6.5). أخذت عينات حجم كل منها 5 مكرو لتر لتحديد درجة الحرارة المثلى لعمل الإنزيم، إذ قيسَت الفاعلية الإنزيمية تجاه حلمهة الإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك في درجات حرارة مختلفة 20-75 °م وعند قيمة الـ pH 6.5. أمّا من أجل تحديد قيمة الـ pH المثلى لعمل الإنزيم فقد أخذت عينات حجم كل منها 5 مكرو لتر من المحلول الإنزيمي السابق، الناتج عن الترسيب بالأسيتون، وقيست الفاعلية الإنزيمية لها ضمن عدة محاليل للإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك (1.33 ميلي مول/ لتر) مختلفة قيم الـ pH [4-10] في درجة الحرارة 40 °م. حيث جرى استخدام دارئة سترات- فسفات ثنائية الصوديوم (100 ميلي مول/ لتر) من أجل قيم الـ pH 4 و5 وجرى استخدام دارئة فسفات 70 ميلي مول/ لتر من أجل قيم الـ pH من 5

إلى 8 واستخدمت دائرة غليسين- هيدروكسيد الصوديوم (100 ميلي مول/ لتر) من أجل قيم الـ pH 9 و 10.

### الاصطناع الإنزيمي للإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك

جرى تحفيز تفاعل اصطناع الإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك باستخدام إنزيم HCAE الناتج عن التنقية الجزئية بالترسيب بالأسيتون وبعد تجفيفه بتيار من غاز الأزوت (99.9%). أذيب 5 ميكرومول من حمض الفيروليك في 500 ميكرو لتر من الإيتانول المطلق ضمن أنبوب مكروي (صغري)، ثم أضيف 5 مغ من إنزيم HCAE. حُضِن المزيج التفاعلي في الدرجة 50 °م باستخدام الحاضنة الهزازة (Stuart, SI500) بسرعة 150 دورة/ دقيقة مدة 200 ساعة جرى خلالها سحب عينات حجمها 5 ميكرو لتر ومددت 200 مرة باستخدام محلول الميتانول/TFA بنسبة حجمية (0.01/100)، ثم حُللت باستخدام جهاز الاستشراب السائلي الرفيع الانجاز HPLC.

أعيد إجراء التفاعل السابق ثلاث مرات من أجل دراسة أثر الماء باستبدال الإيتانول المائي (98%، 95%، 85%) بالإيتانول المطلق. وجرى إيقاف التفاعل بعد 200 ساعة، ثم حُللت العينات باستخدام جهاز الـ HPLC وحسب مردود تفاعل الأسترة كما يأتي:

$$\text{مردود تفاعل الأسترة (\%)} = \frac{(\text{حمض الفيروليك})_0 - (\text{حمض الفيروليك})_{200\text{h}}}{(\text{حمض الفيروليك})_0} \times 100$$

إذ: (حمض الفيروليك)<sub>0</sub>: تركيز حمض الفيروليك الإبتدائي.

(حمض الفيروليك)<sub>200h</sub>: تركيز حمض الفيروليك بعد 200 ساعة من بدء تفاعل الأسترة.

تجدد الإشارة إلى أنه جرت إعادة كل تجربة ثلاث مرات وأخذ متوسط الحسابات وأدرج في النتائج.

## النتائج والمناقشة

### أولاً- التنقية الجزئية لإنزيم HCAE

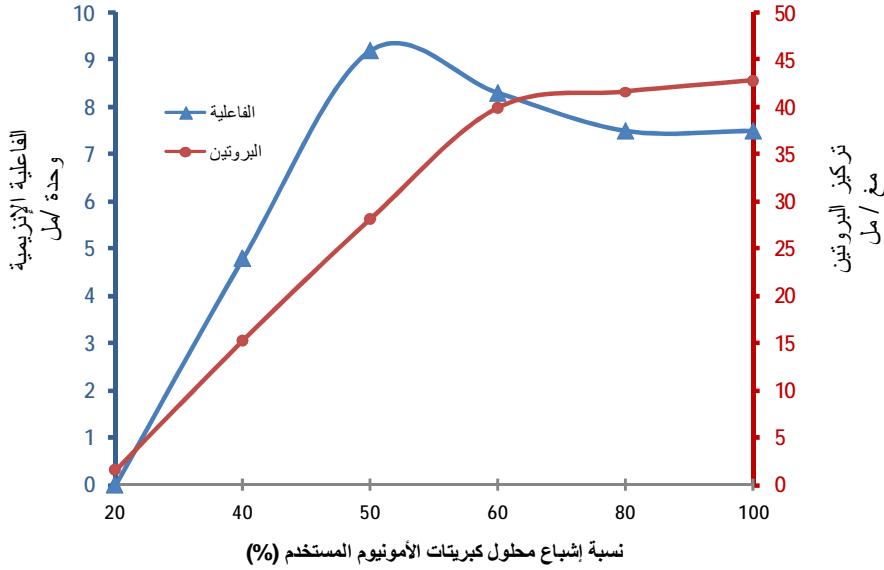
أجريت تنقية جزئية لإنزيم إستيراز حمض هيدروكسي السيناميك HCAE ذي المنشأ الفطري من *Humicola sp.* الموجود ضمن المستحضر الإنزيمي Depol 740L وفق طريقتين مختلفتين من طرائق الترسيب. اعتمدت الطريقة الأولى استخدام سلفات الأمونيوم في حين استخدم الأسيتون لإجراء الترسيب في الطريقة الثانية.

#### 1- الترسيب باستخدام سلفات الأمونيوم

طبقت هذه الطريقة على 1 مل من المستحضر الإنزيمي الخام باستخدام سلفات الأمونيوم بنسب إشباع مختلفة. ويوضح الشكل (1) تبدل تركيز البروتينات والفاعلية

الإنزيمية مع نسبة إشباع محلول سلفات الأمونيوم. يُلاحظ أن أعلى قيمة للفاعلية الإنزيمية HCAE سجلت عند استخدام سلفات الأمونيوم بتركيز 50% من حد الإشباع.

من جهة أخرى، تؤدي زيادة نسبة إشباع محاليل سلفات الأمونيوم فوق 50% إلى انخفاض الفاعلية الإنزيمية المقيسة. ويمكن تفسير ذلك بأن زيادة نسبة سلفات الأمونيوم قد يكون له تأثير مُثبط في الفاعلية الإنزيمية HCAE. ويلاحظ من منحنى تبديل تركيز البروتينات ترسيب بروتينات أخرى غير البروتين الإنزيمي عند نسب إشباع لسلفات الأمونيوم أكبر من 50% الأمر الذي ينعكس سلباً على كفاءة الترسيب ومن ثمّ يمكن القول: إنّ أفضل تركيز لسلفات الأمونيوم من أجل ترسيب إنزيم HCAE هو 50% من حد الإشباع.



الشكل (1) تبديل تركيز البروتينات والفاعلية الإنزيمية بدلالة نسبة الإشباع بمحلول سلفات الأمونيوم.

يبين الجدول (2) فقدان 70% من مردود الفاعلية الإنزيمية عند استخدام سلفات الأمونيوم بتركيز 50% من حد الإشباع، مع أنه التركيز الموافق لأعلى قيمة للفاعلية الإنزيمية 9.2 U/ml، وهذا ما يؤكد الأثر السلبي لوجود سلفات الأمونيوم. في الفاعلية الإنزيمية HCAE الذي يمكن أن يتجلى بتنشيط الإنزيم أو إعاقته التفاعل المطبق لحساب الفاعلية.



الجدول (2) أثر نسبة الإشباع بسلفات الأمونيوم في الفاعلية الإنزيمية وتركيز البروتينات.

نسبة إشباع محلول سلفات الأمونيوم المستخدم	الفاعلية الإنزيمية (U/مل)	تركيز البروتينات (مغ/مل)	الفاعلية الإنزيمية النوعية (U/مغ)	معامل التنقية	مردود الفاعلية الإنزيمية (%)
المستحضر الإنزيمي الخام	31.1	64.6	0.48	1	100
20 %	0	1.5	0	—	—
40 %	4.8	15.3	0.31	0.65	15
50 %	9.2	28.2	0.33	0.69	30
60 %	8.3	40.0	0.21	0.44	27
80 %	7.5	41.7	0.18	0.38	24
100 %	7.5	42.9	0.17	0.35	24

من ناحية أخرى، يشير الجدول 2 إلى عدم تسجيل أي قيمة لمعامل التنقية تزيد على 1 ومن ثم لا يمكن عدُّ الترسيب باستخدام سلفات الأمونيوم خطوة ناجحة من أجل تنقية إنزيم HCAE المدروس، في حين أكدت الدراسات ضرورة استخدام هذا الملح كخطوة أولى من أجل تنقية إنزيمات HCAE. سُجِّلَ مثلاً مردود 69% للفاعلية الإنزيمية HCAE التي تتميز بها الخلايا الفطرية *Aspergillus niger* عند الترسيب بسلفات الأمونيوم بنسبة إشباع 80% كمرحلة أولى من مراحل تنقية هذا الإنزيم [28].

وأشارت دراسة أخرى إلى قيمة مرتفعة نسبياً لمعامل التنقية (6.5) لدى استخدام سلفات الأمونيوم بنسبة إشباع 80% من أجل ترسيب إنزيم HCAE الذي تفرزه الخلايا الجرثومية *Lactobacillus acidophilus* [29].

يمكن أن يعود سبب اختيار ترسيب الإنزيمات بالتمليح إلى عدة أسباب أهمها انخفاض تكلفة هذه الطريقة، فضلاً عن أن تفاعل ذوبانها ماصٌ للحرارة، مما يسهم في المحافظة على الفاعلية الإنزيمية في أثناء الترسيب، ومع ذلك لا يمكن اعتماد تقنية الترسيب بالتمليح في هذه الدراسة من أجل ترسيب إنزيم HCAE الخاص بفطر *Humicola* sp. نظراً إلى الانخفاض الشديد في الفاعلية الإنزيمية الناتجة (الجدول 2). لذا كان لا بدَّ من اللجوء إلى طريقة تنقية أخرى لترسيب هذا الإنزيم كاستخدام المذيبات العضوية مثل الأسيتون.

## 2- الترسيب باستخدام الأسيتون

رُسِبَ 1 مل من المستحضر الإنزيمي الخام باستخدام 4 مل أسيتون. ويوضح الجدول (3) النتائج التي جرى التوصل إليها عند مقارنة الترسيب باستخدام كل من سلفات الأمونيوم بنسبة إشباع 50% والأسيتون. يلاحظ ارتفاع قيمة مردود الفاعلية الإنزيمية (91%) باستخدام الأسيتون مقارنة بالمردود الذي جرى تسجيله (30%) عند استخدام سلفات الأمونيوم. كما استحصل على معامل تنقية 2.7، عند الترسيب بالأسيتون وهو أكبر بأربعة أضعاف من معامل التنقية الذي نتج من استخدام سلفات الأمونيوم.

الجدول (3) نتائج ترسيب المستحضر الإنزيمي التجاري باستخدام سلفات الأمونيوم 50% أو الأسيون.

خطوة الترسيب	الفاعلية الإنزيمية (U/مل)	تركيز البروتينات (مغ/مل)	الفاعلية الإنزيمية النوعية (U/مغ)	معامل التنقية	مردود الفاعلية الإنزيمية (%)
المستحضر الإنزيمي الخام	31.1	64.6	0.48	1	100
سلفات الأمونيوم 50%	9.2	28.2	0.33	0.69	30
الأسيون	28.3	22.0	1.29	2.7	91

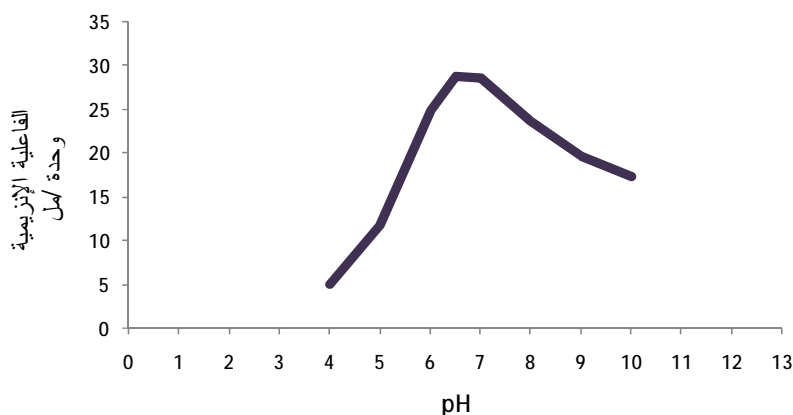
وهكذا بيّنت هذه الدراسة أن استخدام الأسيون كخطوة أولى لتنقية إنزيم HCAE الخاص بفطر *Humicola sp.* أفضل من استخدام طريقة الترسيب بالتمليح. وتعدّ هذه النتيجة معاكسة لما توصلت إليه بعض البحوث التي أكدت أن طريقة الترسيب بالتمليح أفضل من الترسيب بالمذيبات العضوية لتنقية الإنزيمات. لوحظ مثلاً أعلى مردود لفاعلية الكرياتيناز التي يتمتع بها فطر *Aspergillus oryzae* عند ترسيبه بسلفات الأمونيوم مقارنة بطريقة الترسيب باستخدام الأسيون أو الإيتانول [30].

نظراً إلى أن طريقة الترسيب باستخدام الأسيون أدت إلى رفع قيمة معامل التنقية، فسيُستخدم إنزيم HCAE الناتج عن هذه الخطوة في المراحل اللاحقة من البحث.

### 3- أثر درجة الحرارة و الـ pH في الفاعلية الإنزيمية HCAE

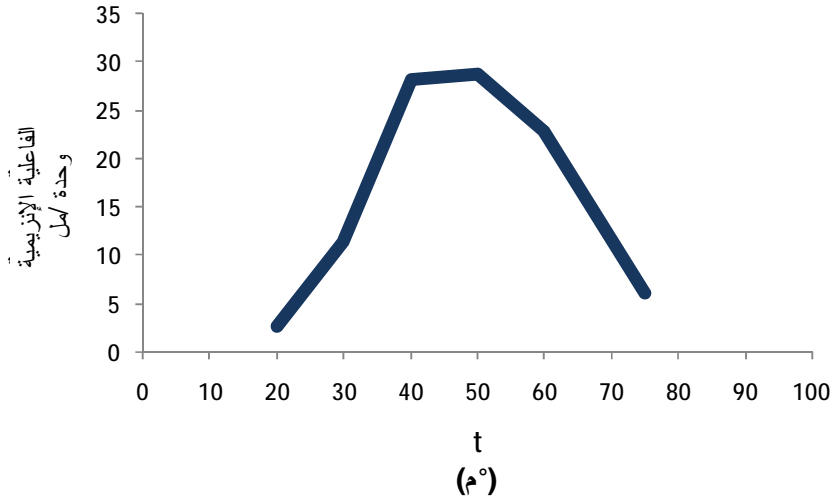
أجري تفاعل حلمة الإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك باستخدام الفاعلية الإنزيمية HCAE الناتجة عن الترسيب بالأسيون عند قيم الـ pH من 4 إلى 10 مع تثبيت درجة حرارة التفاعل عند القيمة 40 °م؛ وذلك لتعيين قيمة الـ pH المثلى لعمل الإنزيم (الشكل 2).

كما أُجري التفاعل ذاته في درجات حرارة ترواح من 20 إلى 75 °م، مع تثبيت pH الوسط عند القيمة 6.5، وذلك بهدف تعيين درجة الحرارة المثلى للإنزيم (الشكل 3).



الشكل (2) أثر الـ pH في الفاعلية الإنزيمية لـ HCAE.

يظهر من الشكل (2) أن إنزيم HCAE المنقى جزئياً بالترسيب بالأسيتون أبدى قيمة مرتفعة للفاعلية الإنزيمية عند قيم الـ pH من 6.5 إلى 7 إذ كانت قيمة الفاعلية بين 28.8 وحدة/مل و 28.7 وحدة/مل، على الترتيب. كما يُلاحظ أيضاً أن الإنزيم أكثر ثباتاً في الأوساط القلوية ( $pH < 8$ ) مقارنة بالأوساط الحمضية ( $pH > 6$ ). من جهة أخرى قيست أعلى قيمة للفاعلية الإنزيمية (28.8 وحدة/مل) عند الدرجة 50 °م التي يمكن عدّها درجة الحرارة المثلى لعمل الإنزيم (الشكل 3).

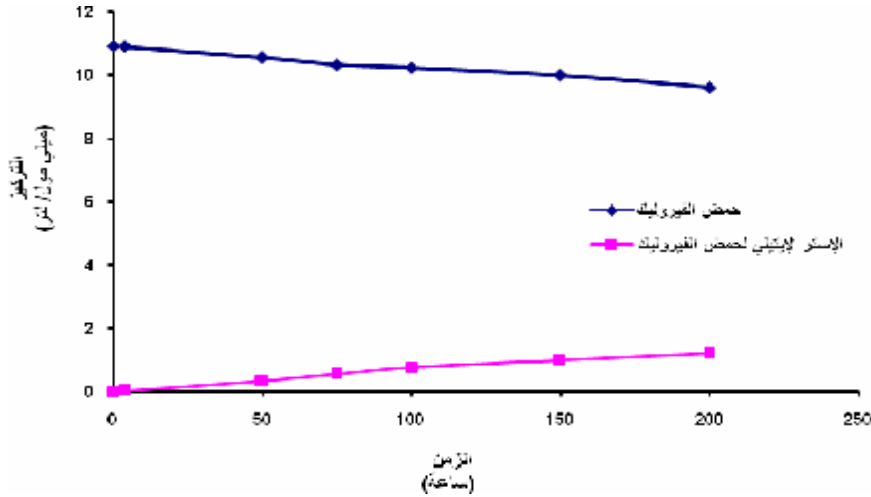


الشكل (3) أثر درجة الحرارة في فاعلية إنزيم HCAE.

أشارت معظم البحوث إلى أن أغلب إنزيمات HCAE فطرية المنشأ تتميز بقيم مثلى للـ pH (في المجال 6.5–7.5). وتكون درجة الحرارة المثلى لعملها قريبة من 50 °م [31-34]. ويتفق ذلك مع النتيجة التي تم التوصل إليها في هذا البحث بالنسبة إلى إنزيم HCAE الموجود ضمن المستحضر الإنزيمي التجاري Depol 740L.

#### ثانياً - اصطناع الإستر الإبتيلي لحمض الفيروليك إنزيمياً:

دُرست فاعلية إنزيم HCAE في تحفيز بعض تفاعلات الاصطناع وذلك من خلال أسترة حمض الفيروليك مع الإيتانول. إذ حُضِن الإنزيم المنقى جزئياً (الناتج عن الترسيب بالأسيتون) مع الإيتانول المطلق مدة 200 ساعة في الدرجة 50 °م وبسرعة 120 دورة / الدقيقة. ويوضح الشكل 4 تبدل تركيز كل من حمض الفيروليك المتبقي وإستره المتشكل مع الزمن.



الشكل (4) تبدل تركيز كل من حمض الفيروليك المتبقي وإستره المتشكل مع زمن تفاعل الأسترة.

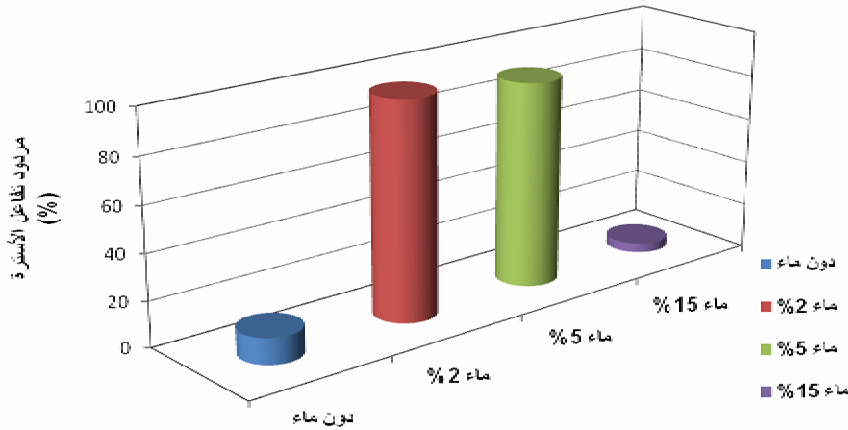
يُلاحظ أن أعلى قيمة لمردود تفاعل الأسترة (12%) نتجت بعد مرور 200 ساعة من زمن التفاعل. ويمكن أن يُعزى هذا الانخفاض إلى فعل تثبيطي للإيتانول على فاعلية إنزيم HCAE المستخدم. إذ تبين سابقاً أن المذيبات العضوية كالميتانول والإيتانول والبروبانول قد تعيق فاعلية بعض إنزيمات HCAE فطرية المنشأ في حلمة الإستر الميتيلي لحمض الفيروليك [35]. ومن ثمَّ يمكن أن يكون لهذه المذيبات أثر مثبط لفاعلية هذه الإنزيمات تجاه تفاعلات الاصطناع.

كما أظهرت دراسات أخرى أن عملية تجفيف (Dehydration) الإنزيمات في المذيبات العضوية يمكن أن ينشأ عنه تبدل بسيط في البنية الإنزيمية، نتيجة لنزع الماء المرتبط من طبقة الإماهة (Hydration layer) حول الإنزيم، مما يؤدي إلى تثبيط جزئي للإنزيم [36]. ومن الجدير ذكره أن آلية هذا التثبيط ما تزال غير واضحة بالنسبة إلى إنزيمات الإسترزاز، ولكنه مستقل عن كل من الخصائص الفيزيائية – الكيميائية للمذيب وعن حالة التمييه و عن درجة الحرارة أيضاً [37].

#### دراسة أثر الماء في تفاعل الأسترة

أجريت عدة تفاعلات لاصطناع الإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك بتبديل التركيز الابتدائي للماء ضمن وسط التفاعل. ويوضح الشكل 5 تبدل مردود تفاعل الأسترة بعد

200 ساعة تبعاً لنسب الماء المدروسة (0-15%). ويُلاحظ من هذا الشكل أن أعلى مردود للأسترة (95.7%) جرى الحصول عليه من أجل نسبة الماء 2% في وسط التفاعل، ومع ازدياد هذه النسبة إلى 5% تناقص مردود تفاعل الأسترة حتى 90.7%، وبزيادة نسبة الماء إلى 15% ازداد تناقص المردود حدة حتى القيمة 4.2%، في حين لم يتجاوز مردود التفاعل 12% عند استخدام الإيتانول المطلق (نسبة الماء 0%).



الشكل (5) أثر تركيز الماء في تفاعل اصطناع الإستر الإيتيلي لحمض الفيروليك

من المعروف أن تفاعل الأسترة تفاعل عكوس ينتج عنه الماء، ومع ازدياد النسبة الابتدائية للماء فإن التوازن الترموديناميكي للتفاعل ينزاح بالاتجاه الذي يؤدي إلى تخفيض إنتاج الماء ومن ثم يصبح تفاعل الحلمهة هو المفضل والسائد.

درس الباحث Topakas وفريق عمله في العام 2003 أثر تركيب وسط التفاعل في الأسترة الإنزيمية لحمض باراهيدروكسي فينيل الأسيتيك (*p*-hydroxyphenylacetic acid) مع البروبانول-1 ضمن أوساط تفاعلية مؤلفة من نظامي الهكسان/البروبانول-1/الماء بالنسب الحجمية الآتية: 2.0/50.8/47.2، 2.5/38.5/59.0، 6.3/47.8/45.9، على الترتيب. وكانت نتيجة دراسته مشابهة لما جرى التوصل إليه في هذا البحث، إذ أظهرت أن السلوك التحفيزي لإنزيم HCAE المدروس يتأثر بتركيب الوسط التفاعلي، وأن أعلى مردود للاصطناع ينتج عند استخدام الوسط المتميز بأقل كمية للماء (2.0/50.8/47.2). [38].

مع أن دور الماء في تفاعلات الأسترة الإنزيمية التي تجرى ضمن الأوساط العضوية لا يزال غير واضح، إلا أن وجود كمية محددة من الماء ضمن الوسط التفاعلي ضروري جداً من أجل تنشيط الإنزيم، إذ يمكن أن يؤدي الماء دوراً في ربط المجموعات الوظيفية المشحونة بالمركز الفعال للإنزيم. وهذا ما جرى تأكيده عند اصطناع أسيتات الجيرانيل (geranyl acetate) من خلال الأسترة التبادلية بين الجيرانيلول (geraniol) وأسيتات الإيثيل بوجود إنزيم إستيراز كبد الخنزير (Pig Liver Esterase) [39].

### الاستنتاجات

بيّنت نتائج هذه الدراسة أن ترسيب المستحضر الإنزيمي الخام Depol 740L باستخدام الأسيتون أكثر كفاءة من استخدام سلفات الأمونيوم 50%، إذ نتج مردود لفاعلية إنزيم HCAE المرسب بالأسيتون أكبر بثلاثة أضعاف تقريباً من مردود الفاعلية المقيس بعد استخدام سلفات الأمونيوم. من جهة أخرى، أبدى الإنزيم المدروس فاعلية مثلى عند كل من درجة الحرارة 50 °م و pH 6.5. بيّنت الدراسة أيضاً أن وجود نسبة محددة للماء ضمن الوسط التفاعلي ضروري لعمل الإنزيم في تحفيز تفاعل اصطناع الإستر الإيثيلي لحمض الفيروليك، إذ جرى الحصول على أعلى مردود لهذا التفاعل (95.7%) من أجل نسبة الماء في المزيج التفاعلي 2%. يمكن بالاعتماد على هذه النتائج دراسة إمكانية استخدام إنزيم HCAE لتحفيز تفاعل أسترة حموض هيدروكسي السيناميك مع بعض السكريات مثل الأرابينوز بهدف إنتاج مركبات تتمتع بذوبانية جيدة في الأوساط المائية، حتى يمكن الاستفادة منها في بعض الصناعات الغذائية كمضادات تأكسد.

## المراجع REFERENCES

1. Ralet M. C., Thibault J. F., Faulds C. B., Williamson G. (1994). *Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell-walls of sugar-beet pulp*. Carbohydrate Research, V. 263, pp. 227-241.
2. Ishii T. (1997). *Structure and functions of feruloylated polysaccharides*. Plant Science, V. 127, pp. 111-127.
3. Thibault J. F., Asther M., Ceccaldi B. C., Couteau D., Delattre M., Duarte J.C., Faulds C., Heldt-Hansen H., Kroon P., Lesage-Meessen L., Micard V., Renard C., Tuohy M., Hulle S. V., Williamson G. (1998). *Fungal Bioconversion of Agricultural By-Products to Vanillin*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, V. 31, pp. 530-536.
4. Kroon P. A., Williamson G., Fish N. M., Archer D. B., Belshaw N. J. (2000). *A modular esterase from Penicillium funiculosum which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module*. European Journal of Biochemistry, V. 267, pp. 6740-6752.
5. Mastihubova M., Szemesova J., Biely P. (2003). *Two efficient ways to 2-O- and 5-O-feruloylated 4-nitrophenyl  $\alpha$ -L-arabinofuranosides as substrates for differentiation of feruloyl esterases*. Tetrahedron Letters, V. 44, pp. 1671-1673.
6. Lam T. B. T., Iiyama K., Stone B. A. (1994). *An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractionated cell walls of wheat internodes*. Phetochemistry, 37, 327-333.
7. Graf E. (1992). *Antioxidant potential of ferulic acid*. Free radical biology and medicine, V. 13, pp. 435-448.
8. Walton N., Narbad A., Faulds C. B., Williamson G. (2000). *Novel approaches to the biosynthesis of vanillin*. Current Opinion in Biotechnology, V. 11, pp. 490-496.
9. Sultana R., Ravagna A., Mohmma-Abdul H., Calabrese V., Butterfield D. A. (2005). *Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid bpeptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity*. Journal of Neurochemistry, V. 92, pp. 749-758.
10. Guyot B., Bosquette1 B., Pina M., Graille J. (1997). *Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from Candida antarctica in solvent free medium*. Biotechnology Letters, V. 19, pp. 529-532.
11. Stamatis H., Sereti V., Kolisis F. N. (1999). *Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants*. Journal of the American Oil Chemists' Society, V. 76, pp. 1505-1510.
12. Enaud E. (2004). *Fonctionnalisation enzymatique de composés phénoliques: synthèse d'esters aromatiques de flavonoïdes glycosylés catalysées par la lipase B de Candida antarctica*. Ph. D.Thesis, Univ.of ENSAIA-INPL, Nancy, France, 177p.

13. Vafiadi C., Topakas E., Nahmias V. R., Faulds C. B., Christakopoulos P., (2009). *Feruloyl esterase-catalysed synthesis of glycerol sinapate using ionic liquids mixtures*. Journal of Biotechnology, V. 139, pp. 124-129.
14. Vafiadi C., Topakas E., Alissandratos A., Faulds CB., Christakopoulos P. (2008). *Enzymatic synthesis of butyl hydroxycinnamates and their inhibitory effects on LDL-oxidation*. J Biotechnol, V. 133, pp. 497-504.
15. Vafiadi C., Topakas E., Christakopoulos P. (2008). *Preparation of multipurpose cross-linked enzyme aggregates and their application to production of alkyl ferulates*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, V. 54, pp. 35-41.
16. Vafiadi C., Topakas E., Alderwick LJ., Bersa GS., Christakopoulos P. (2007). *Chemoenzymatic synthesis of feruloyl-D-arabinose as a potential antimycobacterial agent*. Biotechnol Lett, V. 29, pp. 1771-1774.
17. Vafiadi C., Topakas E., Bakx EJ., Schold HA., Christakopoulos P. (2007). *Structural characterization by ESI-MS of feruloylated arabinooligosaccharides synthesized by chemoenzymatic esterification*. Molecules, V. 12, pp. 1367-1375.
18. MacKenzie C. R., Bilous D., Schneider H., Johnson K. G. (1987). *Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in Streptomyces spp*. Applied and Environmental Microbiology, V. 53, pp. 2835-2839.
19. Faulds C.B., Williamson G. (1991). *The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from Streptomyces olivochromogenes*. Journal of General Microbiology, V. 137, pp. 2339-2345.
20. McCrae S. I., Leith K. M., Gordon A. H., Wood T. M. (1994). *Xylan-degrading enzyme system produced by the fungus Aspergillus awamori: isolation and characterization of a feruloyl esterase and a p-coumaroyl esterase*. Enzyme Microb. Technol, V. 16, pp. 826-834.
21. Faulds C. B., Williamson G. (1993). *Ferulic acid esterase from Aspergillus niger: purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase*. Biotechnology and applied Biochemistry, V. 17, pp. 349-359.
22. Kroon P. A., Faulds C. B., Williamson G. (1996). *Purification and characterization of a novel esterase induced by growth of Aspergillus niger on sugar-beet pulp*. Biotechnology and applied Biochemistry, V. 23, pp. 255-262.
23. Tsuchiyama M., Sakamoto T., Fujita T., Murata S., Kawasaki H. (2006). *Esterification of ferulic acid with polyols using a ferulic acid esterase from Aspergillus niger*. Biochimica et Biophysica Acta, V. 1760, pp. 1071-1079.
24. Bornscheuer U. T. (2002). *Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis*. FEMS Microbiology Reviews, V. 26, pp. 73-81.
25. Topakas E., Vafiadi C., Christakopoulos P. (2007). *Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases*. Process Biochemistry, V. 42, pp. 497-509.



26. Kheder, F., Delaunay, S., Abo-Chameh, G., Paris, C.D., Muniglia, L. & Girardin, M. (2009). *Production and biochemical characterization of a type B ferulic acid esterase from Streptomyces ambofaciens*. Canadian journal of microbiology, V. 55, pp. 729-738.
27. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C., (1985). *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, V. 150, pp.76-85.
28. Faulds C. B., Williamson G. (1994). *Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from Aspergillus niger: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose*. Microbiology, V. 140, pp. 779-787.
29. Wang X., Geng X., Egashira Y., Sanada H. (2004). *Purification and Characterization of a Feruloyl Esterase from the Intestinal Bacterium Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, V. 70, pp. 2367-2372.
30. Farag A. M., Hassan M. A. (2004). *Purification, characterization and immobilization of a keratinase from Aspergillus oryzae*. Enzyme and Microbial Technology, V. 34, pp. 85-93.
31. Castanares A., McCrae S. I., Wood T. M. (1992). *Purification and properties of a feruloyl / p-coumaroyl esterase from the fungus Penicillium pinophilum*. Enzyme and Microbial Technology, V. 14, pp. 875-884.
32. Kroon P. A., Williamson G. (1996). *Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinase, arabinofuranosidase and an esterase from Aspergillus niger*. Biotechnology and applied Biochemistry, V. 23, pp. 263-267.
33. Shin H. D., Chen R. R. (2006). *Production and characterization of a type B feruloyl esterase from Fusarium proliferatum NRRL 26517*. Enzyme and Microbial Technology, V. 38, pp. 478-485.
34. Topakas E., Vafiadi C., Stamatis H., Christakopoulos P. (2005). *Sporotrichum thermophile type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis*. Enzyme and Microbial Technology, V. 36, pp. 729-736.
35. Faulds C. B., Pérez-Boada M., Martínez A. T. (2011). *Influence of organic co-solvents on the activity and substrate specificity of feruloyl esterases*. Bioresource Technology, V. 102, pp. 4962-4967.
36. Griebenow, K., Klibanov, A. M., (1995). *Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins*. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), V. 92, pp. 10969-10976.
37. Castillo, B., Bansal, V., Ganesan, A., Halling, P., Secundo, F., Ferrer, A., Griebenow, K., Barletta, G. (2006). *On the activity loss of hydrolases in organic solvents: II. A mechanistic study of subtilisin Carlsberg*. BMC Biotechnol, V. 6, pp. 51-63.

38. Topakas E., Stamatis H., Biely P., Kekos D., Macris B. J., Christakopoulos P. (2003). *Purification and characterization of a feruloyl esterase from Fusarium oxysporum catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures*. Journal of Biotechnology, V. 102, pp. 33-44.
39. Dipak P., Sikha N., Ahindra N., Amit B. (2008). *Comparison of Catalytic Activities between Esterase and Lipase in the synthesis of Drug, Flavor and Amide Compounds*. International Journal of Chemical Sciences, V. 6, pp.11-16.