انتاج شراب عالي الفركتوز باستعمال أنزيم الانفرتيز المقيد بطين البنتونايت العراقي

محمد عبد الرزاق الصوفي

مركز بحوث السوق وحماية المستهلك/ جامعة بغداد

alsoufim@mracpc.uobaghdad.edu.iq

الخلاصة

ادى استعمال تقنية التقييد بين انزيم الانفرتيز وطين البنتونايت بوساطة glutaraldehyde الى ربط 93% من كمية الانزيم الحر الكلية، وبلغ الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الانزيم الحر والمرتبط 5، وكان الأنزيم الحر ثابتا في اس هيدروجيني تراوح بين 3 إلى 7 بنسبة فعالية متبقية أعلى من 70% عند اس هيدروجيني مقداره 3، إلا انه فقد ما يقرب من 50% من فعاليته الأصلية عند اس هيدروجيني 8، بينما اظهر الانزيم المرتبط ثباتية اعلى، حيث كان ثابتا في اس هيدروجيني تراوح بين 3 إلى 8 بنسبة فعالية متبقية أعلى من 80% عند اس هيدروجيني 3، إلا انه فقد ما يقرب من 30% من فعاليته الأصلية عند اس هيدروجيني 8، وبينت النتائج أن درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم الحر والمقيد كانت 45 و 55م على التوالي، بينما لوحظ ان الأنزيم الحر كان ثابتا بدرجة حرارة 50م لمدة 30 دقيقة بعدها بدأت الفعالية بالتناقص ليفقد الأنزيم أكثر من 90% من فعاليته عند درجة حرارة 70م، الا ان الانزيم المقيد اظهر ثباتا حراريا اعلى، اذ كان ثابتا بدرجة حرارة 60م لمدة 30 دقيقة بعدها بدأت الفعالية بالتناقص ليفقد الأنزيم ما يقرب اكثر من 80% من فعاليته عند درجة حرارة 70م، كما حافظ الانزيم المرتبط على كامل فعاليته لمدة 21 يوم، الا انه فقد 90% من فعاليته الابتدائية بعد مرور 30 يوم من الخزن بدرجة حرارة 4م، في حين حافظ الانزيم الحر على كامل فعاليته لمدة 5 ايام، الا ان الفعالية بدأت بالتناقص بشكل ملاحظ ليفقد كامل فعاليته بعد مرور 19 يوم من الخزن بدرجة حرارة 4م، وعند تحديد وقت التفاعل اللازم لانتاج شراب عالي الفركتوز بالاعتماد على تقدير نسبة الكلوكوز المتحرر من تحلل السكروز بفعل الانزيم المقيد، اظهرت النتائج ان نسبة السكروز المتحلل بلغت 32% بعد مرور 10 دقائق على بدء التفاعل، ثم ارتفعت لتكون 71% بعد مرور 20 دقيقة ولتصل الى 93% بعد مرور 30 دقيقة وتستقر على هذه الحالة لغاية وقت تفاعل مقداره 30 دقيقة، كما اظهرت نتائج تأثير عدد مرات الاستعمال في فعالية الانزيم المقيد (عدد الدورات) ان الانزيم المقيد حافظ على كامل فعاليته بعد 26 استعمال متتالي بواقع 30 دقيقة للاستعمال الواحد، وبعد 50 استعمال متتالي احتفظ الانزيم المقيد بحوالي 76% من فعاليته الابتدائية.

كلمات مفتاحية : تقييد الانزيمات ، سكر الفركتوز ، انزيم الانفرتيز

المقدمة

تستعمل الانزيمات المقيدة في العديد من التطبيقات منها صناعة الاغذية والصناعات الصيدلانية والكنس الحيوي وصناعة المنظفات والانسجة فضلا عن التطبيقات الاخرى، ويساهم تقييد الانزيمات في تحسين ثباتيتها فضلا عن امكانية استعمالها لمرات عدة دون حصول فقدان في فعاليتها والتي تعتمد على الطريقة المستعملة في التقييد والمادة الرابطة وقوة الارتباط بين الانزيم والمادة الساندة (Nisha واخرون، 2012)، وغالبا ما تستعمل طرائق عدة لتقييد الانزيمات والتي تختلف فيما بينها اعتماد على الاساس العلمي الذي يحدد عملها، ويعد الارتباط التساهي بين الانزيم والمادة الساندة احد الطرائق المستعملة في تقييد الانزيمات والتي تعتمد في الاساس على السلسلة الجانبية في بعض الاحماض الامينية مثل الارجنين والاسبارتك ودرجة التفاعل المعتمدة على مختلف المجاميع الوظيفية مثل مجموعة imidazoleو indolyl و phenolic hydroxyl (Singh، 2009)، وتقوم المادة الرابطة في هذا النوع من انواع التقييد باضفاء بعض المميزات الايجابية على فعالية الانزيمات المرتبطة بها نتيجة احداث بعض التغيرات غير المؤثرة على فعالية وتخصص الانزيم المرتبط (Fu واخرون، 2011)، اذ توفر الكربوهيدرات الموجودة في Cyanogen bromide (CNBr)–agarose و CNBr activated–Sepharose نوع من الحماية للانزيم تجاه المتغيرات الحرارية، كذلك يضفي الذراع الفاصل لل glutaraldehyde ثبات حراري للاصرة التساهيمة المتشكلة مع الانزيم (Cunha واخرون، 2008).

استعملت طرائق ومواد عدة في تقييد الانفرتيز β–D–fructofuranoside fructohydrolase (E.C. 3.2.1.26) الذي ينتمي الى مجموعة التحلل المائي، منها المعدن المخلبي من نوع Triazole–Functionalized Eupergit® C (Uzun واخرون، 2011)، والجيلاتين متعدد الاكريل امايد (Emregul واخرون، 2006) وهلام الالجينات (Vu و Le، 2008)، ونشارة الخشب (Mahmoud، 2007)، والجيلاتين (Olcer واخرون، 2013) فضلا عن العديد من المواد الاخرى (Kotwal و Shankar، 2009)، وقد نال الانفرتيز هذا الاهتمام نظرا لأهميته الاقتصادية، إذ يعد احد أهم الأنزيمات المستعملة في مجال صناعة الأغذية والمشروبات والعصائر والخبز والمعجنات فضلا عن المستحضرات الصيدلانية من خلال استعماله في تحضير السكر المحول وشراب عالي الفركتوز من السكروز من خلال قيامه بتحليل السكروز عن طريق مهاجمته للآصرة الكلايكوسيدية بين وحدتي الكلوكوز والفركتوز الرابطة بين ذرة الكربون الثانية للفركتوز وذرة الكربون الأولى للكلوكوز مما يؤدي إلى إنتاج سكري الكلوكوز والفركتوز(Aranda واخرون، 2006)، لذا فقد جرت تنقيته من عدة مصادر كالنباتات والأحياء المجهرية لاستعماله في مجالات صناعية عدة (Amin واخرون، 2010).

يعد البنتونايت احد الصخور الطينية المعدنية الأكثر شيوعا التي تمتلك خصائص امتصاص عالية، ويستعمل في مجالات عدة كحفر آبار البترول وكمادة رابطة لرمال القوالب السباكة وفي تعدين خامات الحديد وكمزيل للشوائب والملوثات المعدنية وقصر ألوان الزيوت النباتية والصناعية وتحسين نوعيتها فضلا عن استعماله في صناعة العقاقير الطبية ومواد التجميل (Schutz واخرون، 2013)، وتشكل بلورة Montmorillonite التي تنتمي الى المجموعة المعدنية Smectite التركيب الرئيس لطين البنتونايت، وتمتاز هذه البلورات المعدنية بتركيبها الطبقي الذي يتكون من

طبقتين من السيلكا تتراهيدرال بينهما طبقة الالومينا اوكتاهيدرال، ونظرا لطبيعتها الحامضية فأن ذلك يوفر حيزا هاما للارتباط بمجاميع الامين NH_2 الموجودة في الانزيم فضلا عن قدرة المجاميع المجاميع الفعالة R في الاحماض الامينية المشكلة لتركيب الانزيم من الارتباط بها وتكوين روابط مستعرضة من الاواصر التساهمية (Sanjay و Sugunan، 2006)، ونظرا لامتلاك العراق كميات هائلة من طين البنتونايت في الصحراء الغربية فقد هدف البحث الى استعمال هذه المادة في تقييد انزيم الانفرتيز ودراسة بعض خصائصه.

المواد وطرائق العمل

الانزيم:

استعمل انزيم الانفرتيز المنقى من الطماطم والمستحصل عليه من دراسة سابقة (الصوفي، 2013) بفعالية نوعية مقدارها 21.58 وحدة/ ملغم.

طين البنتونايت:

استعمل طين البنتونايت المستحصل عليه من الاسواق المحلية لمدينة بغداد.

تقدير تركيز البروتين:

قدر تركيز البروتين كميا وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Bradford (1976) باستعمال ألبومين المصل البقري Bovine Serum Albumin (BSA) كبروتين قياسي على طول موجي مقداره 595 نانومتر.

تقدير الفعالية الانزيمية:

قدرت فعالية الأنزيم الحر والمرتبط وفقا للطريقة التي قام بوصفها Sanjay و Sugunan (2006) وذلك بمزج 1 مللتر من محلول الانزيم الحر او 0.1 غم من الانزيم المرتبط مع 1 مللتر من محلول السكروز (المادة الاساس) ذي تركيز 10% (وزن:حجم) وجرى وضع المزيج في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 25 م لمدة 30 دقيقة لاتمام التفاعل، بعدها مزج 1 مللتر من الناتج مع 5 مللتر من كاشف 3,5–dinitrosalicylic acid وسخن لدرجة حرارة الغليان لمدة 5 دقائق، ثم برد المزيج لدرجة حرارة الغرفة، وجرى قياس كمية السكريات المختزلة باستعمال جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي مقداره 500 نانومتر، واستخرجت الفعالية الأنزيمية (وحدة/ مللتر) من خلال المنحنى القياسي للكلوكوز المحضر مسبقا، وعرفت وحدة الفعالية الأنزيمية بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتحليل 1 ملغم من السكروز الى كل من الكلوكوز والفركتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة، وتم اعتماد النسبة المئوية (%) في الاشارة الى فعالية الانزيم الحر والمرتبط في جميع خطوات البحث.

تنشيط طين البنتونايت:

لاجل تحقيق الارتباط التساهمي بين الانزيم وطين البنتونايت استعملت الطريقة التي قام بوصفها Sanjay و Sugunan (2006) وذلك بإضافة محلول (3–APTES) 3–aminopropyltriethoxy المذاب في الاسيتون بنسبة 10% (حجم:حجم) الى الطين وجرى تحريكه لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 25 م ، بعدها رشح المزيج

تحت التفريغ وجرى غسله بالاسيتون المبرد لمرات عدة ثم جفف تحت التبريد وجرت معاملته باضافة محلول glutaraldehyde بنسبة 10% (حجم:حجم) وترك لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة الغرفة، ثم رشح المزيج وغسل بالماء المقطر مرات عدة وجرى تجفيفه بدرجة حرارة الغرفة.

تقييد الانزيم:

استعملت الطريقة التي قام بوصفها Sanjay و Sugunan (2006) وذلك بمزج تراب البنتونايت المنشط مع محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 المذاب فيه انزيم الانفرتيز المنقى بتركيز 10 ملغم/ مللتر بنسبة (1:1) (وزن:حجم)، بعدها جرى تحريك المزيج لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 4م، ثم اجري النبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4م للمزيج بسرعة مقدارها 5000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة، وجرى التخلص من الرائق بعد ان تم تقدير تركيز البروتين (وحدة/ ملغم)، وعبئ الانزيم المقيد بطين البنتونايت في عمود زجاجي وجرى حفظه بدرجة حرارة 4م باستعمال محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6.

تحديد درجة كفاءة التقييد:

اعتمد في تحديد درجة كفاءة التقييد على النسبة المئوية لارتباط الانزيم الحر بالمادة الساندة وذلك عن طريق حساب الفرق الناتج بين كمية البروتين في كل من محلول الانزيم الحر المضاف الى المادة الساندة ومحلول غسل المادة الساندة والذي يبين كمية الانزيم غير المرتبطة، وجرى استخراج النتائج وفقا للمعادلة الاتية:

$$\text{درجة كفاءة التقييد (\%)} = \frac{\text{كمية البروتين (وحدة/ ملغم) في محلول الانزيم} - \text{كمية البروتين (وحدة/ ملغم) في محلول}}{\text{كمية البروتين (وحدة/ ملغم) في محلول الانزيم}} \times 100$$

تحديد الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية والثبات:

استعملت الطريقة الموصوفة من قبل Uzun واخرون (2011) لتحديد الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم الحر والمرتبط بمدى تراوح بين 3.0 الى 9.0، اذ استعمل محلول خلات الصوديوم الدارئ ذي تركيز 0.1 مولار لتحضير مديات من الاس الهيدروجيني تراوحت بين 3.0–6.5، في حين استعمل محلول فوسفات الصوديوم الدارئ ذي تركيز 0.1 مولار لتحضير مديات من الاس الهيدروجيني تراوحت بين 7.0–9.0، في حين جرى تحديد الاس الهيدروجيني الامثل للثبات وذلك بحضن الانزيم الحر والمرتبط حضن ابتدائي لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في محاليل الاس الهيدروجيني المحضرة بمديات تراوحت بين 3.0 الى 9.0 ومن ثم قياس الفعالية الانزيمية.

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الإنزيم:

عينت درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم الحر والمرتبط وفقا لما وصفه Uzun واخرون (2011) باضافة الانزيم الى محلول التفاعل ذي اس هيدروجيني مقداره 5 المحضن بدرجات حرارية عدة تراوحت بين 20 الى 80م، في

حين حددت درجة الثبات الحراري بحضن المحلول الانزيمي في حمام مائي لمدة 15 دقيقة بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين 20 الى 80م ومن ثم تبريده لدرجة حرارة الغرفة وتقدير الفعالية الإنزيمية (وحدة/ مللتر).

خزن الانزيم:

جرت متابعة فعالية الانزيم المقيد المخزون بمحلول خلات الصوديوم الدارئ ذي تركيز 0.1 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 5 بدرجة حرارة 4 و 25م لمدة 30 يوم وفقا لما وصفه Uzun واخرون (2011).

تحديد قابلية الانزيم في انتاج شراب عالي الفركتوز:

حددت قابلية الانزيم المرتبط في انتاج شراب عالي الفركتوز وذلك باضافة 1غم من الانزيم المقيد ذي فعالية نوعية مقدارها 21.58 وحدة/ ملغم الى 10 مللتر من محلول خلات الصوديوم الدارئ ذي تركيز 0.1 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 5 والحاوي على السكروز بتركيز 10%، ثم حضن المزيج تحت التحريك بدرجة حرارة 40م لمدد زمنية مختلفة تراوحت بين 10 الى 60 دقيقة، وتم متابعة عمل الانزيم بالاعتماد على نسبة الكلكوز المتحرر وفا للطريقة الموصوفة من قبل Sanjay و Sugunan (2006) باستعمال كاشف 3,5–dinitrosalicylic acid لقياس كمية السكريات المختزلة باستعمال جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي مقداره 500 نانومتر.

تأثير عدد مرات استعمال الانزيم المقيد في الفعالية:

جرت متابعة الفعالية الانزيمية (وحدة/ مللتر) الانزيم المقيد بعد كل استعمال تحت ظروف التجربة لغاية 50 مرة استعمال لغرض قياس نشاط الانزيم المقيد، وفقا لما جاء به Emregul واخرون (2006).

النتائج والمناقشة

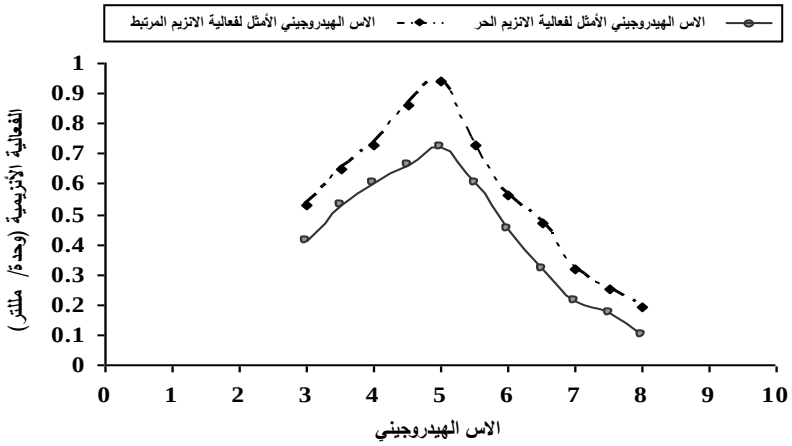
تحديد درجة كفاءة التقييد:

بينت النتائج المستحصلة عليها ان هذه التقنية ادت الى ربط 93% من كمية الانزيم الحر الكلية، وهي نسبة ربط عالية، مقارنة بالنتائج التي ادرجها عدد من الباحثون، اذ اشار Vu و Le (2008) الى ان نسبة ارتباط الانزيم بهلام الالجينات بلغت 79.34%، في حين بين Le واخرون (2004) ان نسبة الارتباط الانزيم بهلام الالجينات تتراوح بين 50 الى 85%.

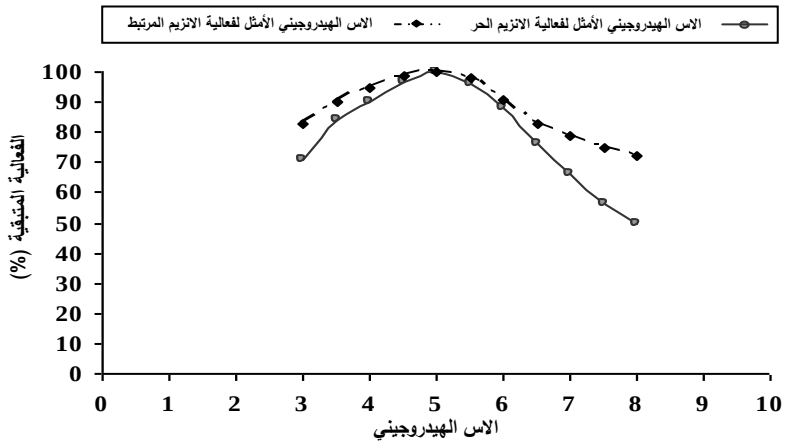
تحتاج عملية التقييد الى استعمال مواد رابطة والتي غالبا ما تكون عبارة عن بوليمرات خاملة ومواد لاعضوية فضلا عن كونها متوافرة باسعار مناسبة، كما يجب ان تتميز بخصائص هامة منها قوتها العالية وثباتيتها تجاه مواد التفاعل وقدرتها في زيادة او المحافظة على فعالية الانزيمات المرتبطة بها من خلال عدم تاثيرها في مواقع التمييز والربط والتحليل الموجودة في الموقع الفعال للانزيم او عدم اضرارها في الهيئة الفراغية التي يتخذها الانزيم عند ارتباطه بالمادة الاساس لاتمام التفاعل وانتاج المادة المطلوبة فضلا عن قدرتها في ربط اعلى كمية من الانزيم (Singh، 2009 ؛ Datta واخرون، 2013).

تحديد الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم الحر والمرتبط:

يلاحظ من (الشكل، 1) أن الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الانزيم الحر والمرتبط كانت 5، في حين يبين (الشكل، 2) ان الأنزيم الحر كان ثابتا في مدى من الاس الهيدروجيني تراوح بين 3 إلى 7 بنسبة فعالية متبقية أعلى من 70% عند اس هيدروجيني مقداره 3، إلا انه فقد ما يقرب من 50% من فعاليته الأصلية عند اس هيدروجيني مقداره 8، بينما اظهر الانزيم المرتبط ثباتية اعلى، اذ كان ثابتا في مدى من الاس الهيدروجيني تراوح بين 3 إلى 8 بنسبة فعالية متبقية أعلى من 80% عند اس هيدروجيني مقداره 3، إلا انه فقد ما يقرب من 30% من فعاليته الأصلية عند اس هيدروجيني مقداره 8.



شكل (1): الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم الانفرتيز الحر والمرتبط.



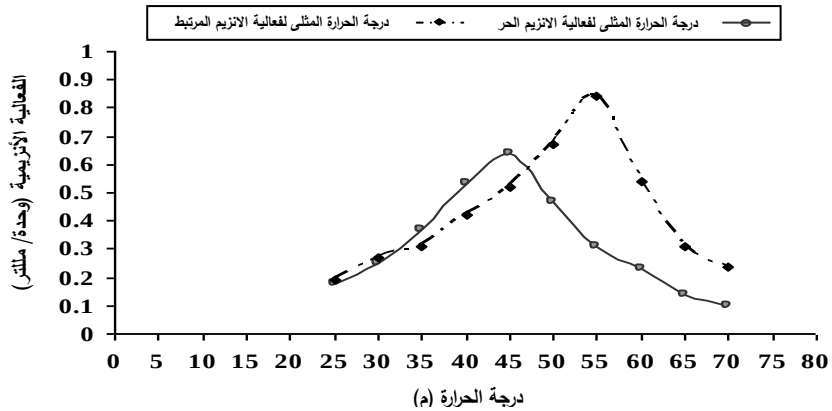
شكل (2): الاس الهيدروجيني الامثل لثبات أنزيم الانفرتيز الحر والمرتبط.

يمثل الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية والثبات أحد المؤشرات الهامة التي تحدد نجاح عملية التقييد، اذ قد يؤدي انحراف قيمة الاس الهيدروجيني للانزيم المرتبط الى عدم القدرة على استعماله في مجالات محددة وبالتالي تنتفي الجدوى من ربط الانزيم ويصبح الاعتماد على استعمال الانزيم الحر ذي اهمية اقتصادية اكبر، لذا فأن الارتباط التساهمي الحاصل بين الانزيم والمادة الرابطة لم يؤدي الى احداث اي تغيير في الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية، ويعود السبب في ذلك الى ان هذا الارتباط لم يحصل في الاماكن الهامة التي تحدد فعالية الانزيم وتؤثر في عمله والتي تتمثل في مواقع التمييز والربط والتحليل المتواجدة في الموقع الفعال، فضلا عن ان الارتباط الحاصل لم يؤثر في الهيئة الفراغية التي يتخذها الانزيم عند

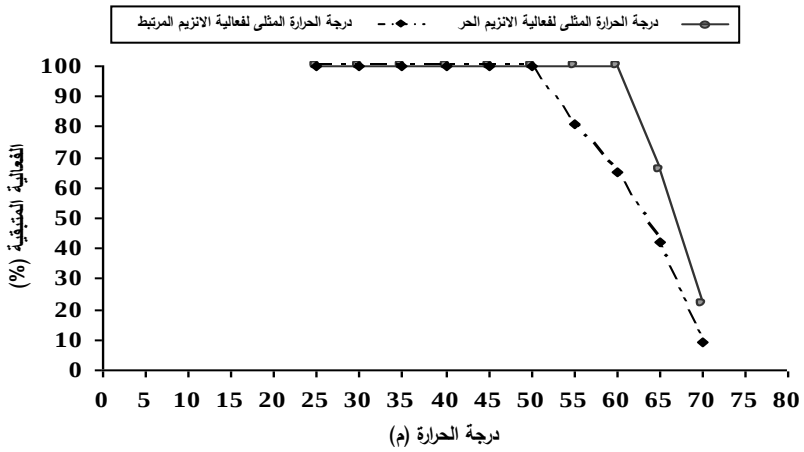
ارتباطه بالمادة الاساس لاتمام عمله بالشكل الصحيح، بينما يلاحظ في الجانب الاخر حصول زيادة في الاس الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم المقيد مقارنة بالانزيم الحر ويعود ذلك الى ان الارتباط القوي بين الانزيم والمادة الساندة اثر بشكل كبير في القوى الجزيئية البينية في الجزيئة الانزيمية التي تكون مسؤولة في المحافظة على التركيب الفراغي للانزيم والذي يؤدي تغيره الى تغير في فعالية الانزيم (Sanjay و Sugunan، 2006) . لاحظ Emregul واخرون (2006) ان الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم الحر والمقيد بالجيلاتين متعدد الاكريل امايد كان 6 و 7.2 على التوالي، وبين Sanjay و Sugunan (2006) ان الانزيم المقيد بوساطة montmorillonite K−10 احتفظ بـ 90% من فعاليته الاصلية، بينما فقد الانزيم الحر 35% من فعاليته الاصلية بعد مرور 300 دقيقة على الحضن في الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية، واشار Mahmoud (2007) الى ان الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم الحر والمقيد بنشارة الخشب كانت 5.6، وان الانزيم المقيد اظهر ثباتية اعلى من الانزيم الحر عند الاس الهيدروجيني 7.6 و 8 واحتفظ بحوالي 20% من فعاليته الاصلية، بينما ثبطت فعالية الانزيم الحر في هذا الاس الهيدروجيني بالكامل، واوضح Uzun واخرون (2011) ان الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم الحر والمقيد بـ Metal Chelated Triazole−Functionalized Eupergit® C بلغ 5، وفسر ذلك بان المحافظة على هذا الاس الهيدروجيني في كل من الانزيم الحر والمقيد يمكن ان يعزى الى ان تركيز الشحنات في نطاق الانزيمات المقيدة مشابه للوسط السائل الموجود فيه، واشار انه مع ذلك فان الفعالية في الانزيمات المقيدة كانت اعلى من الانزيم الحر في مديات الاس الهيدروجيني التي تراوحت بين 3 الى 9 وهذا يمكن ان يعزى الى التفاعلات المخلبية الحاصلة والتي تحمي الانزيمات المقيدة تجاه الدنترة السريعة بالمقارنة مع الانزيم الحر، و اكد Olcer واخرون (2013) ان الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم الحر والمقيد بالجيلاتين كانت 4.5 و 5 على التوالي، وان الانزيم المقيد كان اكثر ثباتا من الانزيم الحر في مدى من الاس الهيدروجيني تراوح بين 5 الى 7 ، اذ بلغت الفعالية المتبقية للانزيم الحر والمرتبط 50 الى 80% على التوالي من الفعالية الابتدائية عند اس هيدروجيني مقداره 7.

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الانزيم الحر والمرتبط:

يبين (الشكل، 3) أن درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم الحر والمقيد كانت 45 و 55م على التوالي، بينما يلاحظ من (الشكل، 4) ان الأنزيم الحر كان ثابتا بدرجة حرارة 50م لمدة 30 دقيقة بعدها بدأت الفعالية بالتناقص ليفقد الأنزيم أكثر من 90% من فعاليته عند درجة حرارة 70م، الا ان الانزيم المقيد اظهر ثباتا حراريا اعلى، اذ كان ثابتا بدرجة حرارة 60م لمدة 30 دقيقة بعدها بدأت الفعالية بالتناقص ليفقد الأنزيم ما يقرب اكثر من 80% من فعاليته عند درجة حرارة 70م.



شكل (3): درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم الانفرتيز الحر والمرتبط.



شكل (4): درجة الحرارة المثلى لثبات أنزيم الانفرتيز الحر والمرتبط.

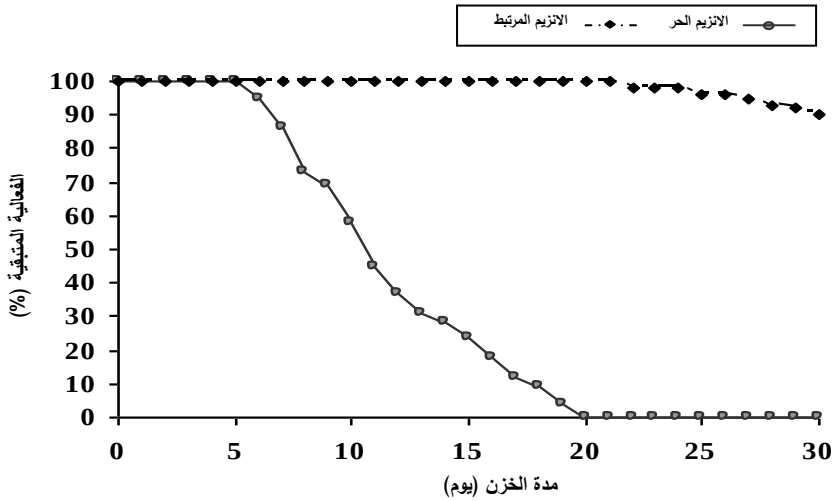
تؤدي زيادة درجة الحرارة الى انخفاض الفعالية الانزيمية نتيجة للتثبيط الحراراي للانزيم، اذ يحدث في درجات الحرارة العالية تفتح طيات الجزيئة الانزيمية وتعرض محتواها من الاحماض الامينية للوسط وبالتالي تأثرها بالحرارة وحدوث الدنترة (Sanjay و Sugunan، 2006)، فقد اشار Emregul (2006) الى حصول زيادة في فعالية كل من الانزيم الحر والمقيد بالجيلاتين متعدد الاكريل امايد لحين الوصول الى درجة حرارة 55م ثم بدأت الفعالية بعدها بالانخفاض، الا ان الثبات الحراري اختلف لكل منهما، ففي درجة حرارة 10م كانت فعالية الانزيم المقيد 43% بينما كانت فعالية الانزيم الحر 4%، بينما اصبحت الفعالية عند الوصول الى درجة حرارة 70م 30 و 7% لكل من الانزيم المقيد والحر على التوالي، وبين Sanjay و Sugunan (2006) ان درجة الحرارة المثلى للانزيم المقيد بوساطة montmorillonite K-10 اصبحت 60م بعد ان كانت 50م للانزيم الحر، واكد ان التقييد زاد من درجة الثبات الحراري للانزيم المقيد، اذ احتفظ الانزيم الحر بـ10% فقط من فعاليته الابتدائية بعد مرور 90 دقيقة من الحضن الابتدائي بدرجة حرارة 60م بينما احتفظ الانزيم المقيد بـ75% من فعاليته الابتدائية عند نفس ظروف التجربة، ولاحظ Mahmoud (2007) ان درجة الحرارة المثلى لفعالية كل من الانزيم الحر والمقيد بنشارة الخشب كانت 60م، واحتفظ الانزيم المقيد بفعاليته الكاملة بعد مرور ساعة من الحضن بدرجة حرارة 60م، بينما فقد الانزيم الحر 50% من فعاليته الاصلية وثبطت الفعالية بشكل كامل بدرجة حرارة 80 و90م، بينما احتفظ الانزيم المقيد بـ 63 و15% من فعاليته الاصلية بعد مرور 15 دقيقة من الحضن عند تلك الدرجات الحرارية على التوالي، واوضح Vu و Le (2008) ان حضن الانزيم الحر والمقيد بهلام الالجينات بثلاث درجات حرارة بلغت 50 و55 و 60م ادى الى احتفاظ الانزيم المقيد والحر بـ 90 و 75% من فعاليته الاصلية على التوالي بعد مرور 160 دقيقة على التوالي في درجة حرارة 50م، بينما ادى الحضن بدرجة حرارة 55م الى احتفاظ الانزيم المقيد والحر بـ 93 و 45% من فعاليتهما الاصلية بعد مرور 160 دقيقة على التوالي، في حين فقد الانزيم الحر فعاليته بالكامل بعد مرور 120 دقيقة عند الحضن بدرجة حرارة 60م، بينما احتفظ الانزيم المقيد بحوالي 25% من فعاليته الاصلية عند تلك الدرجة الحرارية، واشار Uzun واخرون (2011)

الى ان اقصى فعالية لكل من الانزيم الحر والمقيد بوساطة Metal Chelated Triazole–Functionalized Eupergit® C كانت بدرجة حرارة تراوحت بين 45 الى 50م عند اس هيدروجيني مقداره 5، وقد وجد ان ان الفعالية المتبقية للانزيم الحر ازدادت بازدياد درجة الحرارة من 20 الى 45م ثم بدأت بالنقصان بعد ذلك، حيث في هذا المعدل من درجات الحرارة يكون التثبيط الحراري بطيئا وغير ممكن تقدير تاثيره في معدل التفاعل، لكن بعد ذلك يتم ملاحظة تأثير زيادة درجة الحرارة في معدل الفعالية المتبقية، كذلك فقد ازدادت فعالية الانزيم المرتبط بزيادة درجة الحرارة من 20 الى 50م ثم بعد ذلك بدأت بالنقصان، لذا كان واضحا ان تقييد الانزيم بهذه الطريقة ساهم في زيادة درجة الحرارة المثلى للانزيم، ومن ناحية اخرى يشير ذلك الى زيادة طاقة التنشيط للانزيم ليتمكن من اتخاذ الشكل الملائم للارتباط بالمادة الاساس، وهذا يشير ان التقييد سبب تحسين هام في ثباتية الانزيم، ولاحظ Olcer واخرون (2013) ان درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم الحر والمقيد بالجيلاتين كانت 60م، وحصلت زيادة في ثباتية الانزيم المقيد، اذ كانت الفعالية المتبقية له 58% من الفعالية الابتدائية في درجة حرارة 80م، بينما فقد الانزيم الحر فعاليته بالكتما في تلك الدرجة الحرارية.

خزن الانزيم:

تأثير درجة حرارة الخزن في فعالية الأنزيم الحر والمرتبط:

يشير (الشكل، 5) ان الانزيم المرتبط حافظ على كامل فعاليته لمدة 21 يوم من الخزن بدرجة حرارة 4م، الا انه فقد 10% من فعاليته الابتدائية بعد مرور 30 يوم من الخزن بدرجة حرارة 4م، في حين حافظ الانزيم الحر على كامل فعاليته لمدة 5 ايام من الخزن بدرجة حرارة 4م، الا ان الفعالية بدأت بالتناقص بشكل ملاحظ ليفقد كامل فعاليته بعد مرور 19 يوم من الخزن بدرجة حرارة 4م.

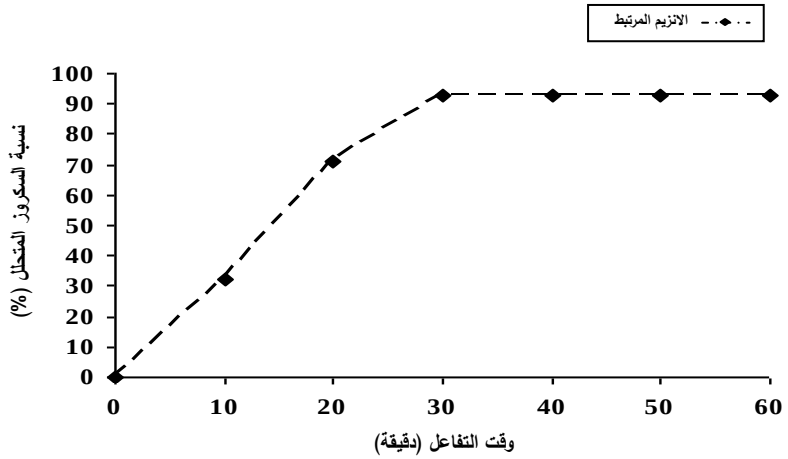


شكل (5): تأثير الخزن بدرجة حرارة 4م لمدة 30 يوم في فعالية انزيم الانفرتيز الحر والمرتبط.

لاحظ Sanjay و Sugunan (2006) ان الانزيم المقيد بوساطة montmorillonite K-10 المخزون عند الاس الهيدروجيني الامثل بدرجة حرارة 5م بقي ثابتا لمدة 18 يوم وفقد 15% من فعاليته الاصلية بعد مرور 30 يوم من الخزن، بينما فقد الانزيم الحر كامل فعاليته بعد مرور 15 يوم على الخزن في نفس ظروف التجربة، واكد Mahmoud (2007) ان الانزيم المقيد بنشارة الخشب لم يفقد شي من فعاليته عند خزنه بدرجة حرارة الثلاجة لمدة 60 يوم، واشار Vu و Le (2008) الى ان الانزيم المقيد بوساطة هلام الالجينات حافظ على كامل نشاطه عند الخزن في محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 4.5 في درجة حرارة تراوحت بين 2 الى 4م لمدة 40 يوم، بينما حافظ الانزيم الحر على 69% من فعاليته الابتدائية تحت نفس الظروف، وعند استبدال محلول الحفظ بالماء المقطر وبقاء نفس الظروف لاحظ بأن كل من الانزيم المقيد والحر حافظ على فعالية مقدارها 90 و59% من فعاليتهما الاصلية على التوالي، واوضح Uzun واخرون (2011) ان خزن كل من الانزيم الحر والمقيد بوساطة Metal Chelated Triazole-Functionalized Eupergit® C عند اس هيدروجيني مقداره 5 وبدرجة حرارة 4 و 25م لمدة 35 يوم ادى الى ان يخسر الانزيم الحر 25% من فعاليته الاصلية، بينما خسر الانزيم المقيد 22% من الفعالية عند الخزن في درجة حرارة 25م، بينما عند درجة حرارة 4م خسر الانزيم الحر 19% من فعاليته الاصلية، بينما خسر الانزيم المقيد 10% من فعاليته خلال نفس الفترة، وعلل ذلك الى ان هذا النقصان في الفعالية يفسر كوقت معتمد طبيعيا لنقصان الفعالية الانزيمية، واضاف بأن التقييد يساهم في تحسين هام اخر وهو الثباتية اثناء الخزن والتي تكون ذات فائدة عند المقارنة بالانزيمات الحرة التي تميل الى فقدان فعاليتها بسرعة كبيرة خصوصا اذا كان الانزيم في محلول مائي، فأنه يكون غير ثابت خلال الخزن ويحدث نقصان في فعاليته بشكل متدرج، بينما بين Olcer واخرون (2013) ان الانزيم المقيد بالجيلاتين حافظ على اغلب فعاليته عند الخزن بدرجة حرارة 4م لمدة 30 يوم، بينما فقد الانزيم الحر حوالي 55% من فعاليته الاصلية خلال نفس الفترة الزمنية وظروف الخزن،

تحديد وقت التفاعل اللازم في انتاج شراب عالي الفركتوز:

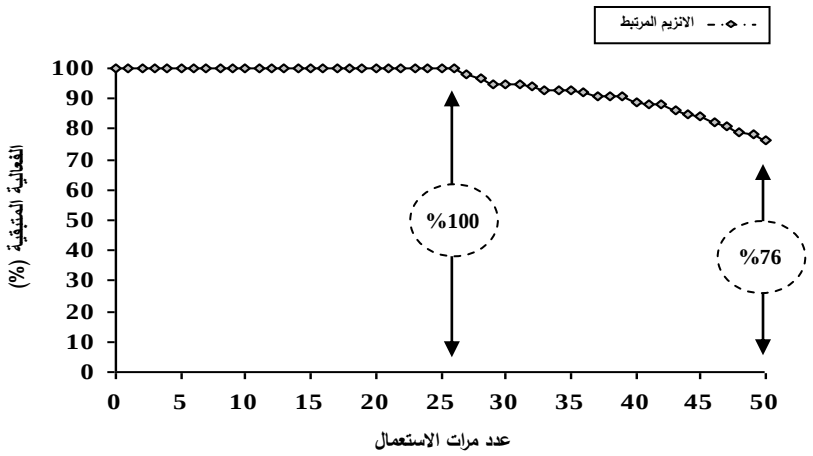
يلاحظ من (الشكل، 6) حصول زيادة في نسبة السكروز المتحلل بالاعتماد على تقدير نسبة الكلوكوز المتحرر بازدياد وقت التفاعل، اذ بلغت نسبة السكروز المتحلل 32% بعد مرور 10 دقائق على بدء التفاعل، ثم ارتفعت لتصل الى 71% بعد مرور 20 دقيقة لتصل الى 93% بعد مرور 30 دقيقة وتستقر على هذه الحالة لغاية وقت تفاعل مقداره 30 دقيقة، وهذا يشير الى امتلاك الانزيم المقيد كفاءة عالية في تحليل السكروز وانتاج الفركتوز بوقت مناسب، اذ يمثل تحديد وقت التفاعل احد الاختبارات الهامة لتحديد كفاءة الانزيم المقيد في انتاج شراب عالي الفركتوز عن طريق قيامه بتحليل السكروز الى كل من الكلوكوز والفركتوز، ويمثل زيادة تحرر الكلوكوز المؤشر الرئيس لعملية تحليل السكروز وانتاج الفركتوز (Aranda واخرون، 2006).



شكل (6): تحديد وقت التفاعل اللازم لانتاج شراب عالي الفركتوز باستعمال الانزيم المقيد.

تأثير عدد مرات استعمال في فعالية الانزيم المقيد (عدد الدورات)

يوضح (الشكل، 7) ان انزيم الانفرتيز المقيد بطين البنتونايت العراقي حافظ على كامل فعاليته بعد 26 استعمال متتالي بواقع 30 دقيقة للاستعمال الواحد، وبعد 50 استعمال متتالي احتفظ الانزيم المقيد بحوالي 76% من فعاليته الابتدائية.



شكل (7): تأثير عدد مرات الاستعمال في فعالية الانزيم المقيد.

يمثل حساب عدد مرات اعادة الاستعمال للانزيمات المقيدة احد اهم العوامل الاقتصادية عند التفكير في تقييد الانزيمات لانها تعطي تصورا واضحا حول كفاءة المادة المستعلمة في عملية التقييد، اذ اوضح Emregul واخرون (2006) انه لم يلاحظ اي اختلاف معنوي في الفعالية المتبقية للانزيم المقيد بالجيلاتين متعدد الاكريل امايد خلال 20 استعمال متتالي، وبين Mahmoud (2007) ان الانزيم المقيد بنشارة الخشب حافظ على 90% من فعاليته بعد 20

دورة (استعمل لمدة 5 ساعات متواصلة بواقع 15 دقيقة لكل دورة)، في حين احتفظ بـ 65% م فعاليته الاصلية بعد استعماله لمدة 10 ساعات متتالية، اشار Uzun واخرون (2011) انزيم الانفرتيز المقيد بوساطة Metal Chelated Triazole-Functionalized Eupergit® C حافظ على 82% من فعاليته بعد استعماله لمدة 10 مرات متتالية.

المصادر

1. الصوفي، محمد عبد الرزاق. (2013). تنقية وتوصيف أنزيم الانفرتيز من الطماطم (*Solanum lycopersicum* L.) واستعماله في تحسين بعض الصفات الحسية للخبز القياسي (اللوف). المجلة العربية للغذاء والتغذية. (مقبول للنشر).

2. Amin, F.; Bhatti. H. N. and Asgher, M. (2010). Partial purification and characterization of an acid invertase from *Saccharum officinarum* L. Pak. J. Bot. 42(4): 2531-2540.

3. Aranda, C.; Robledo, A.; Loera, O.; Contreras-Esquivel, J. C.; Rodriguez, R. and Aguilar, C. N. (2006). Fungal invertase expression in solid-state fermentation. Food Technol. Biotechnol. 44(2): 229-233.

4. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

5. Cunha, A. G.; Fernandez-Lorente, G.; Bevilaqua, J. V.; Destain, J.; Paiva, L. M.; Freire, D. M.; Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. M. (2008). Immobilization of Yarrowia lipolytica lipase-a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. Appl Biochem Biotechnol. 146:49-56.

6. Datta, S.; Christena, L. R. and Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. Biotech. 3:1-9.

7. Emregul, E.; Sungur, S. and Akbulut, U. (2006). Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. Food Chemistry. 97: 591-597.

8. Fu, J.; Reinhold, J. and Woodbury, N. W. (2011). Peptide-modified surfaces for enzyme immobilization. PLoS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0018692.

9. Kotwal, S. M. and Shankar, V. (2009). Immobilized invertase, Research review paper. Biotechnology Advances. 27: 311-322.

10. Le, C.T.; Mathieu, M.; Monique, L. and Mircea, A. M. (2004). Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents. Biotechnology and Applied Biochemistry. 39: 189-198.

11. Mahmoud, D. A. R. (2007). Immobilization of invertase by a new economical method using wood saawdust waste. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 1(4): 364-372.

12. Nisha, S.; Arun, K. S. and Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. Chemical Science Review and Letters. 1(3): 148-155.

13. Olcer, Z.; Ozmen, M. M.; Sahin, Z. M.; Yilmaz, F. and Tanriseven, A. (2013). Highly efficient method towards in situ immobilization of invertase using cryogelation. Appl. Biochem. Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-013-0507-5. Springer.

14. Sanjay, G. and Sugunan. S. (2006). Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. Food Chemistry. 94: 573-579.

15. Schutz, T.; Dolinska, S. and Mockovciakova, A. (2013). Characterization of bentonite modified by manganese oxides. Universal Journal of Geoscience 1(2): 114-119.

16. Singh, B. D. (2009). Biotechnology Expanding Horizons. Kalyani, India.

17. Uzun, K.; Cevik, E. and Senel, M. (2011). Invertase immobilization on a metal chelated triazole-functionalized eupergit® C. American Journal of Chemistry. 1(1): 16-21.

18. Vu, T. K. H. and Le, V. V. M. (2008). Biochemical studies on the immobilization of the enzyme invertase (EC.3.2.1.26) in alginate gel and its kinetics. Asean Food Journal. 15(1): 73-78.

Production of high fructose syrup by using invertase that immobilization on Iraqi bentonite

Mohammed A. Al-Soufi

Market Research and Consumer Protection Center, University of Baghdad

alsoufim@mracpc.uobaghdad.edu.iq

Abstract

The using of immobilization between invertase and bentonite by glutaraldehyde resulted to immobilized 93% of the amount of total free enzyme, the pH optimum of free and immobilized enzyme was 5, the free enzyme was stable in the pH range from 3 to 7 by relative activity of the highest from 70% at pH 3, but it lost about 50% of the original ativity at pH 8, the immobilized enzyme showed higher stability in pH range from 3 to 8 by relative activity of the highest from 80% at pH 3, but it lost about 30% of the original ativity at pH 8, The results was showed that the optimum temperature for free and immobilized enzyme activity were 45 and 55 °C respectively, while it was observed that the free enzyme was stable at 50 °C for 30 minutes, after that, enzyme activity beginning decrease to lose more than 90% of its original activity at 70 °C, but immobilized enzyme was showed higher heat stable, it was stabile at 60 °C for 30 minutes, after that, enzyme activity beginning decrease to lose more than 80% of its original activity at 70 °C, the activity of immobilized enzyme was stabile for 21 days, but it lost 90% of its original activity after 30 days of storage at 4 °C, while free enzyme was stabile for 5 days, but the enzyme activity beginning decrease to lose all activity after 19 days of storage at 4 °C, and when determining the reaction time for production of high fructose syrup depending of release glucose percentage estimated from sucrose by immobilized enzyme activity, the results showed that the percentage of sucrose hydrolyzed was 32% after 10 minutes of reaction started, then it increase to be 71% after 20 minutes and up to 93% after 30 minutes and settled on this range up to the time of reaction (30 minutes), the results also showed the effect number of times used in immobilized enzyme activity (cycle number) that the immobilized enzyme was Keep all its activity after 26 consecutive used by 30 minute of on used, and after 50 consecutive used, immobilized enzyme was keep about 76% of its primary activity.