Purification of Fungul Glucoamylase and Study the Effect of Concentration And Thermal Processing on Enzymatic Activity of Starch Hydrolysis

M. K. M. Jwaid
Department of Chemistry, College of Education, Ibn Al-Haitham, University of Baghdad

Abstract

Glucoamylase from black Aspergillus niger isolate was purified by ammonium sulfate precipitation and sephadex G 200 filtration. A trial for the purification of glucoamylase resulted in an enzyme with a specific activity of 6472 unit/mg protein with 10 times fold. The main goal of the present work was to test this enzyme in hydrolyzing the raw starch. Two substrates were used: corn starch and potato starch 2% (w/v). The effect of enzyme dosage and thermal processing of substrate on kinetics and efficiency of hydrolysis were studied. The results suggested that the glucoamylase activity is increased as the increase of enzyme concentration and the enzyme was sufficiently effective in hydrolyzing tested raw starch, and thermal modification of substrates was not necessary.

تنقية الكلوكواميليز الفطري ودراسة تأثير الجرعات المختلفة من الانزيم والمعاملات الحرارية التصنيعية في فعالية الانزيم في تحلل النشا الخام

مثلى كاظم محمد جواد
قسم الكيمياء، كلية التربية ابن الهيثم، جامعة بغداد

الخلاصة

نُقيَّ الكلوكواميليز المنتج من عزلة *Asp.niger* الاسود بوساطة الترسيب بكبريتات الامونيوم، والترشيح بالـ Sephadex G 200، ونتج من التنقية أنزيم ذي فعالية نوعية 6472 وحدة/ملغم بروتين، وبدرجة عشر مرات تنقية.
ان الهدف الرئيس للعمل الحالي هو اختبار قدرة هذا الانزيم على تحلل النشا الخام، فاستعمل لهذا الغرض مادتي اساس هما نشا الذرة، ونشا البطاطا 2% (v/w) ثم درست تأثير الجرعات المختلفة للانزيم والمعاملات الحرارية التصنيعية في حركيات وكفاية الانزيم في تحلل النشا. ودلت النتائج ان فعالية الانزيم تزداد بزيادة تركيزه، وان الانزيم كان كفوءاً في تحلل النشا الخام، وان المعاملات الحرارية للمادة الاساس ليست ضرورية.

المقدمة

يوجد أنزيم الكلوكواميلير Glucoamylase بشكل واسع في الطبيعة، فهو موجود في الانسجة الحيوانية والنباتية وتنتجه اعداد واسعة من الاحياء المجهرية(1)ويعد فطر *Aspergillus niger* الاسود منتجاً جيداً لهذا الانزيم(2)، استعمل مدة طويلة في انتاج الكحول من تخمر المواد النشوية(3).

تمكن الباحث(4) من فصل وتنقية نوعين من أنزيمات الاميليز المنتجة من فطر *Asp-niger* هما ألفا أميليز α-amylase والكلوكواميليز Glucoamylase ، اذ يعمل الاخير على تحطيم جزيئة النشا من خلال كسر الاصرة الكلايكوسيدية الخارجية نوع (α-1,6 and 1,3-glucosidic linkage) فضلا عن (α-1,4-glucosidic linkage) منتجاً الكلوكوز نتائجا نهائية(5) وتمكن الباحث(6) من فصل نواتج تحلل النشا بوساطة الكلوكواميليز الفطري باستخدام كروموتوكرافي الرقائق (TLC) وبكروموتوكرافي ذي الاداء الفائق (HPLC) فلم يجد أثرا للسكريات المتعددة المتضمنة السكريات الثنائية، وانما وجد فقط الكلوكوز. والكلوكواميليز من نوع الانزيمات المحبة للحرارة العالية (Thermophillic) فهو ذو ثباتية عالية في الدرجات الحرارية الواقعة بين 50– 60 °م(7).

اما أنزيم الالفا أميليز الذي ينتجه فطر *Asp.niger* الى جانب الكلوكوأميليز فهو يعمل على الاصرة الداخلية نوع (α-1,4-glucose-4-glucanohydrolase) من انزيمات التسييل نوع endo-cleavage ، اذ يعمل على الاصرة α-(1,6-glucosidic linkage) من الداخل ويعمل بشكل عشوائي منتجاً الدكسترينات والمالتوز والكلوكوز(8). الرقم الامثل لثباتيته (6.2) وللكلوكواميليز (4–5) بدرجة 35°م(9).

ان لانزيم الكلوكواميليز أهمية صناعية كبيرة في انتاج الكلوكوز والكحول الناتج من تخمر النشا فضلا عن الصناعات الصيدلانية(10) لاسيما انه يتميز بخلوهِ من السموم الفطرية(11).

لقد جرت العادة في صناعة منتجات النشا اجراء عملية الطبخ لغرض جلتنته بعدها يضاف أنزيم الالفا أميليز لتسييل النشا (خفض اللزوجة) ثم يضاف أنزيم الكلوكوأميليز لانتاج الكلوكوز(12) ان المعاملة الحرارية المستخدمة في

جلتنة النشا تكلف الصناعة مبالغ طائلة، لذلك أنصبت جهود الباحثين باتجاه أنتاج انزيم كلوكواميليز له القدرة على تحليل النشا الخام (غير المجلتن)(1) ، اذ بين العديد من الباحثين(13) ان هناك ثلاثة أنواع من أنزيمات الكلوكواميليز احدها يدعى Glm له القابلية على تحطيم جزيئة النشا الخام والانزيمين الاخرين هما Glu و Gla لايمتلكان مثل تلك الصفة.

لذا فان من أهم اهداف هذا البحث هو تنقية أنزيم الكلوكواميليز المنتج من عزلة *Asp.niger* المحلية ودراسة تأثير تركيز الكلوكواميليز في تحلل نوعين من النشا هما نشا الذرة ونشا البطاطا، ودراسة تأثير المعاملات الحرارية التصنيعية في فعاليته التحللية بدرجة 45 ْم للنشا الخام ودرجة 50 ْم للنشا المجلتن.

المواد وطرائق العمل

تنقية الانزيم

الانزيم الخام: تم الحصول عليه بشكل مزارع سائلة للعزلة المحلية *Asp.niger* الاسود(7) تمت تنقية الانزيم بموجب الخطوات الاتية:-

الخطوة الاولى

اجراء عملية الطرد المركزي على المزارع السائلة المذكورة آنفاً وبمعدل 4000 دورة مدة 15 دقيقة وبدرجة 4 ْم، وتم جمع حوالي 200 مللتر من أنزيم الكلوكوأميليز الخالي من خلايا الفطر ثم أجريت عليه فحوصات الفعالية وكمية البروتين.

الخطوة الثانية

ترسيب الانزيم بوساطة كبريتات الامونيوم(14) وذلك بأضافة مادة كبريتات الامونيوم الى الانزيم على اربعة مراحل هي 40%، 60%، 80% و 100% وفي كل مرة تجرى عملية الطرد المركزي بمعدل 5000 دورة مدة 15 دقيقة مع اذابة البروتين المترسب في محلول 0.2 µ منظم الفوسفات ذو الرقم الهيدروجيني 4.2 في كل مرحلة مع تعيين فعالية الانزيم وكمية البروتين.

الخطوة الثالثة

النضج الغشائي

اجراء عملية الديلزة مقابل الماء المقطر والمحلول المنظم ثم في بلورات سكر المائدة، اذ يؤخذ الراسب المذاب في محلول 0.2µ منظم الفوسفات ذو الرقم الهيدروجيني 4.2 المستحصل عليه من الخطوة الثانية ويوضع في انابيب الديلزة مع غلق الانابيب بأحكام ووضعها مدة 3 ساعات في منظم الفوسفات المذكور آنفاً ثم تنقل الى الماء المقطر للمدة نفسها، بعدها توضع في بلورات السكروز مدة 3 ساعات اخرى ثم تحفظ بالثلاجة بدرجة 5 ْم لاجراء عملية التنقية اللاحقة بعد قياس الفعالية وكمية البروتين.

الخطوة الرابعة

الترشيح الفائق Ultra filtration of crude enzyme(15) باستخدام مرشحات Diafloultra fitera من نوع PM 10 واستناداً الى تعليمات الشركة المنتجة فان هذا النوع من المرشحات يسمح للجزيئات ذي الاوزان الجزيئية 10.000 او أقل بالمرور من خلالها ولايسمح للجزيئات ذي الاوزان الاعلى وباستخدام ضغط 1.5-2 بار وبدرجة 4 ْم. تم تركيز الانزيم بمقدار 3 مرات بعدها قيس الحجم وفعالية الانزيم وكمية البروتين.

الخطوة الخامسة

استخدمت طريقة الترشيح الهلامي Gel filtration ، تم تحضيره، اذ استخدم العمود (7.0 × 2.6) معبا بمادة (Sephadex G200) و استعمل المحلول منظم الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 4.2 ، واضيفت المادة

Sodium azide بتركيز (0.02)% لمنع نمو الفطريات داخل حشوة العمود وأضيف 1 مل من عينة الانزيم التي حصلنا عليها من الخطوة الرابعة بعناية الى قمة العمود فوق سطح الجل وبموجب جريان البفر بسرعة 40 مل/ساعة جمع خلالها 50 جزء بواقع 5 مل لكل جزء. وتم تعيين فعالية الاجزاء وكمية البروتين وتمت قراءة الامتصاص الضوئي لكل جزء على طول موجي 280 نانوميتر، وكررت العملية مع انزيم الكلوكوأميليز القياسي للتثبت من نوع الانزيم الفطري المستعمل قيد البحث .

التحليلات الكيميائية

تقدير البروتين: (17)

و قياس فعالية الانزيم: (18)

و تقدير كمية الكلوكوز: (19)

و تعيين كمية الدكستروز المكافيء: (19)

و تقدير الفعالية النوعية Specific activity

وتحسب بموجب المعادلة:

$$\text{الفعالية النوعية} = \frac{\text{فعالية الانزيم وحدة/مل}}{\text{كمية البروتين ملغم/مل}} = \text{وحدة/ ملغم بروتين}$$

تعيين تركيز حامض الاوكزاليك

اتبعت الطريقة المذكورة في (16) وهي طريقة كيميائية للتثبت من وجود حامض الاوكزاليك الذي قد ينتج من بعض الفطريات.

فحص السمية

استخدمت الطريقة المذكورة في (11) لقياس نسبة السموم الفطرية التي قد تتوافر في الانزيم الخام وأهمها سموم الافلاتوكسين، اذ قسيت السمية بوساطة جهاز (HPLC) وتم تحضير محاليل قياسية من سموم الافلاتوكسين وهي B1، B2، G1، G2 من شركة (Sigma, st.louis- Mo, U.S.A) بتركيز 0.001، 0.01، 0.1، 10 مايكروغرام/مل على التوالي في محلول مكون من البنزين و نتريل الخليك Acetonitrile بنسبة 9: 1 ثم حقنت المحاليل القياسية في الجهاز بكمية 40 مايكروليتر مع كاشف فلورسيني.

دراسة تأثير تركيز الكلوكواميليز في تحلل نشا الذرة والبطاطا 2% (v/w) غير المعاملة حرارياً (خام).

A- وسط نشا الذرة بتركيز 2% (v/w) المذاب في منظم الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 4.2 وبدرجة حرارة 40° م اضيفت التراكيز (0.0075، 0.0150، 0.0300، 0.0600 و 0.120 ملغم بروتين/مل) وحضنت مدة 90 دقيقة في حمام مائي بدرجة 40° م(19) تقاس كمية الكلوكوز المتحررة وكفاية الكلوكواميليز كل 10 دقائق.

B- وسط نشا البطاطا بتركيز 2% (v/w) المذاب في منظم الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 4.2 وبدرجة 40° م اضيفت المقادير المذكورة نفسها في A من الانزيم وحضنت في حمام مائي بدرجة 40° م مدة 90 دقيقة تقاس كمية الكلوكوز المتحررة وكفاية الانزيم كل 10 دقائق.

تشخيص الكلوكواميليز بوساطة TLC

فصل نواتج التفاعل بطريقة (TLC) استخدمت الطريقة المذكورة في (20) اذ فصلت نواتج التفاعل الانزيمي بطريقة كروموتوكرافي الرقائق (TLC) وتمت المقارنة مع الكلوكواميليز القياسي.

تأثير المعاملة الحرارية التصنيعية في الفعل التحللي للانزيم

A- اضيف الكلوكواميليز بتركيز 0.0600 ملغم بروتين/مل الى وسط نشا الذرة 2% (v/w) ووسط نشا البطاطا 2% (v/w) بعد رفع حرارتها الى 45 ْم مدة 90 دقيقة قبل الوصول الى حالة الجلتنة. تقاس كمية الكلوكوز المتحررة وكفاية الانزيم كل 10 دقائق .

B- يضاف الكلوكواميليز الى وسطي نشا الذرة ونشا البطاطا بتركيز 0.006 ملغم بروتين/مل وهي بدرجة 50 ْم وبحالة جلتنة وتترك في حمام مائي على حرارة 50 ْم مدة 90 دقيقة. تقاس كمية الكلوكوز المتحررة وكفاية الانزيم كل 10 دقائق.

النتائج والمناقشة

تنقية الانزيم الخام

استعمل أنزيم الكلوكواميليز الخام المنتج من عزلة *Asp.nigel* الاسود المحلية بشكل مزارع سائلة للفطر (7) Jabor et al, (2004).

اجريت عملية الترشيح للحصول على الانزيم الخام الخالي من خلايا الفطر ثم رسب بكبريتات الامونيوم واجريت بعدها عملية الديلزة وتنقية الانزيم بوساطة الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G 200.

دلت النتيجة المبينة بالجدول رقم (1) على ان الفعالية النوعية للانزيم تزداد بعد كل خطوة تنقية، اذ ارتفعت الفعالية النوعية بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم الى 3670.5 وحدة/ملغم بروتين بمعدل تنقية 5.7 مرة اكثر من الخطوة التي تسبقها.

وعند اجراء عملية الديلزة للانزيم مقابل بلورات السكروز ادت الى رفع الفعالية النوعية الى 4023.6 وحدة/ملغم بروتين بما يعادل 6.2 مرة تنقية كما ادت خطوة الترشيح الهلامي بوساطة Sephadex G 200 الى زيادة الفعالية النوعية للانزيم الى 6471.6 وحدة/ملغم بروتين بما يعادل 10 مرات تنقية عن الخطوة الاولى لقد دلت هذه النتائج على ان الزيادة في تنقية الانزيم تؤدي الى زيادة في تركيزه ورفع فعاليته النوعية (6، 15)، تعتمد وسائل التنقية على عوامل عديدة منها، حجم جزيئات البروتين، وصافي شحنة البروتين، ونقطة التعادل الكهربائي، والرقم الهيدروجيني الامثل لثباتيته، وميل الانزيم للارتباط ببعض المواد فقد توصل الباحث(21) الى تنقية انزيم الالفا اميليز المنتج من بكتريا *Lactobacillus fermentum* الى تنقية تعادل 28 مرة اكثر من الخطوة الاولى عندما استخدم طريقة الترسيب بالكلايكوجين واستخدم كروماتوكرافي التبادل الايوني.

دلت نتيجة الترشيح الهلامي المبينة في الشكل 1 (a) وجود اكثر من بروتين ظهر مع الاجزاء الخارجة من العمود وعند قياس فعالية الكلوكواميليز وجد انها واقعة بين الانابيب 18-24 .

وعند مقارنة الشكل رقم 1 (a) بالشكل رقم 1 (b) الذي يمثل الانموذج القياسي للكلوكواميليز بعد امراره على الهلام Sephadex G 200 وجد ان الانزيم يقع في الانابيب نفسها عند ضبط وقت الاضافة، وهذا دليل على ان عزلة *Asp.niger* المحلية هي منتجة للكلوكواميليز، وان جزء البروتين الاخر المنفصل اختبر باضافة اليود فكون معقدا ذا لون ازرق دلالة على ان الانزيم يعمل على الاواصر الكلايكوسيدية الفرعية للاميلوبكتين منتجاً سلاسل الاميلوز القصيرة التي تعطي اللون الازرق مع اليود (15،22) ، أي ان عزلة *Asp.niger* الاسود المحلية تنتج انزيم الايزواميليز الى جانب الكلوكواميليز .

فصل نواتج تفاعل الانزيم بوساطة TLC

لزيادة التثبت من تشخيص الانزيم فصلت نواتج التفاعل الانزيمي بطريقة TLC (20). دلت النتائج المبينة في الشكل رقم (2) تكون سكر الكلوكوز وتحركه مع محلول الكلوكوز القياسي وهذا دليل على وجود انزيم الكلوكوأميليز الذي يحطم النشا بشكل كامل الى كلوكوز كناتج نهائي (15، 20، 22) ونلاحظ بقاء بعض السكريات على خط البداية وهذا يعود الى ارتفاع الوزن الجزئي لهذه السكريات مما سبب عدم تحركها مع محلول الفصل.

قياس السمية

تم التحري عن سموم الافلاتوكسين وحامض الاوكزاليك في المستخلص الانزيمي قيد الدراسة بطريقة HPLC بالمقارنة مع السموم القياسية، اذ أظهرت النتائج خلوه من السموم الفطرية وحامض الاوكزاليك.

تأثير تركيز الكلوكواميليز النقي في تحلل النشا في وسطين مختلفين للنشا هما نشا الذرة A ونشا البطاطا B

أضيف الكلوكواميليز النقي بتخافيف عديدة مختلفة هي:

(0.0075، 0.0150، 0.0300، 0.0600، 0.120 ملغم بروتين/مل) في وسطين للنشا هما نشا الذرة A ونشا البطاطا B بتركيز 2% (v/w) لكلا الوسطين، وحضنت الاوساط في حمام مائي بدرجة 40°م مدة 90 دقيقة. تقاس كمية الكلوكوز المتحرر وكفاية الانزيم كل 10 دقائق، دلت النتائج المبينة في الشكل رقم 3 (a) والشكل رقم 3 (b) بأن سرعة تحلل النشا المعبر عنها بكمية الكلوكوز المتحررة وكفاية الانزيم المعبر عنها بالنسبة المئوية للدكستروز DE% تزداد بزيادة تركيز الانزيم وان اقصى سرعة تحلل له كانت عند الدقيقة 50 من فترة الحقن لكافة التراكيز المستخدمة، وان انزيم الكلوكواميليز يؤدي الى تفاعل بلمرة للكلوكوز أي يحول الكلوكوز الى سكريات متعددة بتفاعل عكسي عند استعماله بتراكيز عالية (19، 23، 24) لذا فان افضل كفاية للكلوكواميليز كانت عند التركيز 0.0600 ملغم/مل في الوسطين A و B.

كما دلت النتائج المبينة بالشكل رقم 3 (a) و (b) ان سلوك الانزيم في الوسط A كان سلوكاً منتظماً وواضحاً، فيما كان سلوكه عشوائياً في تحلل الوسط B وهذا يعتمد على شكل ونوع وحجم جزيئة النشا الخاصة بالمادة الاساس التي لها تأثيراً واضحاً في سلوك وتفاعل الانزيم(19، 21–23).

تأثير المعاملات الحرارية في قابلية الكلوكواميليز المنتج من عزلة *Asp.niger* الاسود المحلية في تحلل النشا الخام والمجلتن.

في هذه التجربة أضيف الانزيم بتركيز 0.0600 ملغم بروتين/مل الى الوسط A و B بدرجة45°م للنشا الخام ودرجة 50°م للنشا المجلتن وهي الدرجات الحرارية المستخدمة في العمليات التصنيعية لمنتجات النشا(2،3، 19،20، 22، 24) التي يتطلب فيها استخدام انزيم ذي ثباتية حرارية عالية.

دلت النتائج المبينة في الشكل رقم 4 (a) و (b) ان المعاملة الحرارية لم تؤثر في فاعلية وكفاية الكلوكواميليز المنتج من العزلة المحلية *Asp.niger* تحت ظروف هذه التجربة لان الانزيم ذو ثباتية حرارية عالية تصل الى 70°م و ان الفطر المستعمل من نوع المحب لدرجات الحرارة العالية(25).

اظهرت النتائج في الشكل رقم 4 (a) تشابهاً وتطابقاً في النشاط التحللي للانزيم ودرجة كفايته في تحلل النشا. اما النتائج المبينة في الشكل رقم 4 (b) فكانت ليست ذي فارق معنوي عند مستوى 0.05 لتوزيع t في الحالتين النشا الخام و المجلتن لوسط نشا البطاطا ومن الممكن ان الاستغناء عن عملية طبخ النشا في العمليات التصنيعية لان الانزيم ذو قدرة تحليلية جيدة للنشا الخام وهذا يدل على ان انزيم الكلوكواميليز المنتج من العزلة *Asp.niger* الاسود يتكون من أنواع عديدة مختلفة من الكلوكواميليز تختلف في شكل الموقع الفعال والوزن الجزيئي ولها القدرة على التغلغل الى داخل

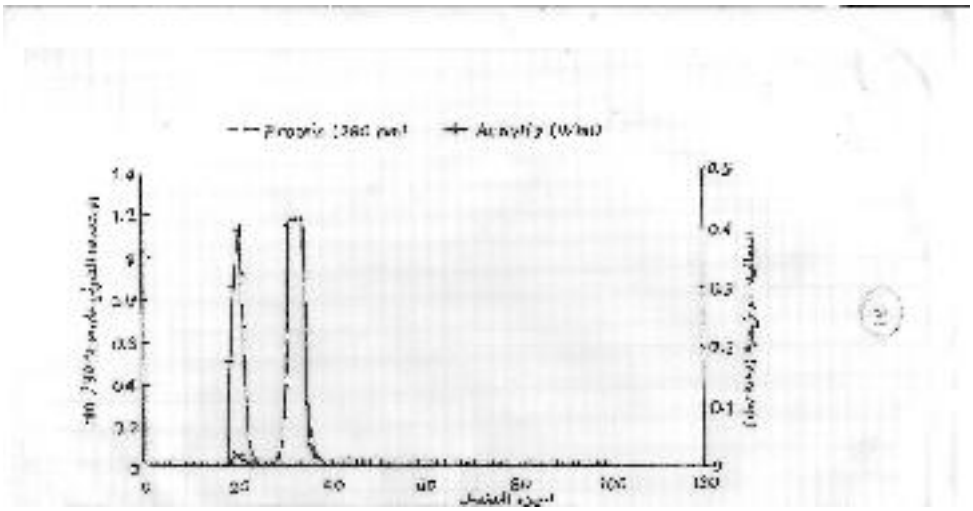
كتلة البوليمر في جزيئة النشا لتحطيم الاواصر الداخلية التي اقتصر تحطيمها على انزيم الالفا أميليز (9، 20، 25)، اذ اعتمدت الصناعات على الالفا اميليز في تحطيم بوليمرات النشا لانه يعمل على الاواصر الداخلية لتمهيد العمل لانزيم الكلوكواميليز الذي يحطم الاواصر الخارجية للسكريات المتعددة ويحولها الى الكلوكوز ناتجا نهائيا (15، 20، 22).

المصادر

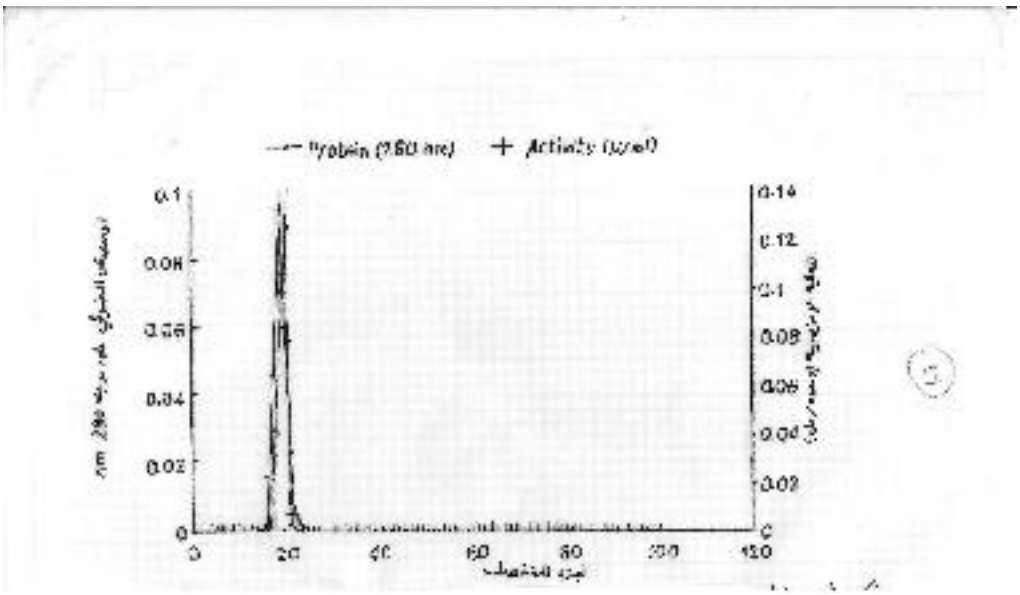
1. Horvathova, V.; Janecek, S. and Sturdik, E., (2000).Amylolytic enzmes :theirspecificties,origins and roperties,Biologia, Bratislava. 55: 603-613.
2. Ueda, S. and Koba, Y., (1981). Amylolytic system of blak-koji mold, Biotech.Bioeng,. 23: 291.
3. Park, Y.K., (1982). J of Biotech. Bioeng., 24: 495.
4. Abouzeid, A.M., (1997). 89 (358): 55-66..
5. Chessa, J. P.; Feller G. and Gerday, C., (1999). TAC 240B- can. J. Microbiol., 45: 452-457.
6. Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol C.; Singh D. and Mohan, R., (2000). Biotechnol. Appli. Biochem., (31): 135-152.
7. Jabor, S.; Jawad, M. and Mahammad, J. S., (2004). J. of P. Applied sciences, 17(2): 10-18.
8. Dlaly, B.K. and Mahmood, W.A., (1985). zanco.. 3(2): 47-58. .
9. El-Safey, E.M. and Ammar, M.S., (2004). Univ. Bull. Environ.. 7(1): 93-99.
10. Octavio, L.F.; Daniel, J. R. and Francislete, R.M., (2000). Eur. J. Biochem. 267: 2166-2173.
11. Alani, H.H.; Soyood, R.; Zainab, M. and Abdl-Kharim, A., (1994). unpublished j. of applied sciences 6(1): 22-32.
12. Gasperik, J.; Hostinova, E.; Minarikova,O.; Soldaneva, I. and Zelinka, J., (1988). Biologia, Bratislava, 43: 673-679.
13. Hostinova, E.; Solovicova A.; Dvorsky, R. and Gasperik, J., (2003). Arch. Biochem. Biophys. 411: 189-195.
14. Dixon, M. and Webb, E.G., (1964). Enzymes, 2nd Edit. Academic press. Inc. New York.
15. Simone, C.; Peixoto. Joao, A. and Jorge. Hecto, F., (2003). Int. Microbiol, 6: 269-273.
16. Hadwan, H. A., (1987). Ph.D. thesis Division Mycology and plant pathology. India Agri. Research Institute, New Delhi.
17. Chykin, S., (1966). Biochemistry laboratory. Techniques John wiley and Sons. New York, London, Sydney.
18. Somogy, M. Noles, (1952). J. Biol. Chem. 195: 19-22.
19. Horvathova, V.; Slajsova, K. and Ernest, S., (2004). Biologia, Bratislava, 59(3): 361-365.
20. Chaplin, M.F., (1986). Monosaccharides in carbohydrate analysis, Ed. By M.F. Vhaplin and J.F. Kennedy. IR1. Press Limited. England.
21. Tanlamond, P.; Desseaus, V.; Morean, Y.; Santimone M. and Marseille G., (2002). Comp Biochem physiol. B Biochem Mol. Biol. 133(3): 351-360.
22. James,J.A. and Lee, B.H, (1997). J. food. Biochem 21: 1-52.
23. Abdel-Rahman, E. M., (1990). Ph.D. thesis, Al-Azhar Univ., Fac. Of Sci., Bot. and Microbial. Dept., Cairo, Egypt.
24. El-Safey, E.M, (1994). Sci. A thesis, Bot. and Microbial. Dept., Fac. Sci., Al-Azhar Univ., Cairo, Egypt.
25. Odibo, F.J.C. and Ulbrich- Hofmann, R., (2001). Acta Biotechnological, 21(2):141-153.

جدول (1): تنقية انزيم الكلوكواميليز المنتج من عزلة Aspergillus niger الاسود.

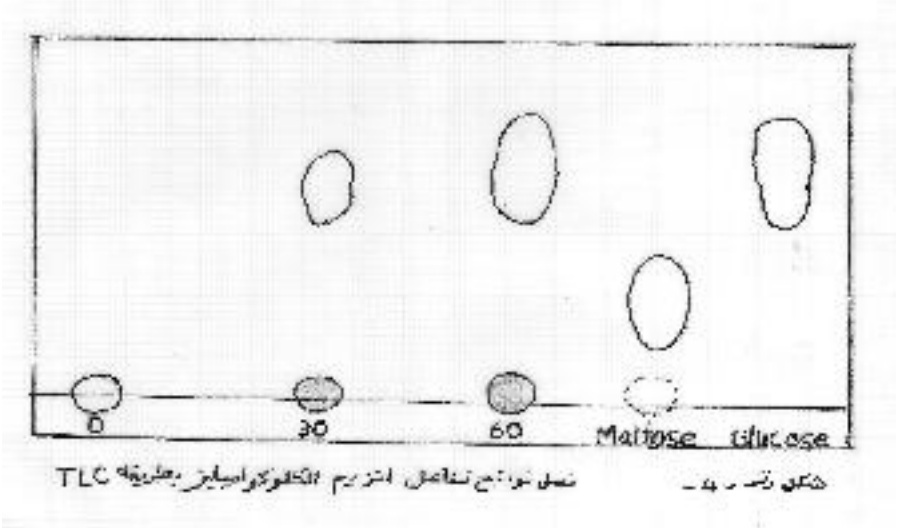
طريقة التنقية	حجم الانزيم ml	فعالية الانزيم u/ml	كمية البروتين mg/ml	الفعالية الكلية u/ml	البروتين الكلي u/ml	الفعالية النوعية u/mg prot	عدد مرات التنقية
الكلوكواميليز الخام (راشح المزرعة)	200	266.1	0.42	20532	84	633	1
كبريتات الامونيوم (درجة اشباع 60%)	200	660.7	0.18	132140	36	3670.5	5.7
الديلزة مقابل السكروز البلوري	15	2213.1	0.55	33196	8.25	4023.6	6.2
Sephadex G200 chromatography (الترشيح الهلامي)	5	3236	0.5	16180	2.5	6472	10



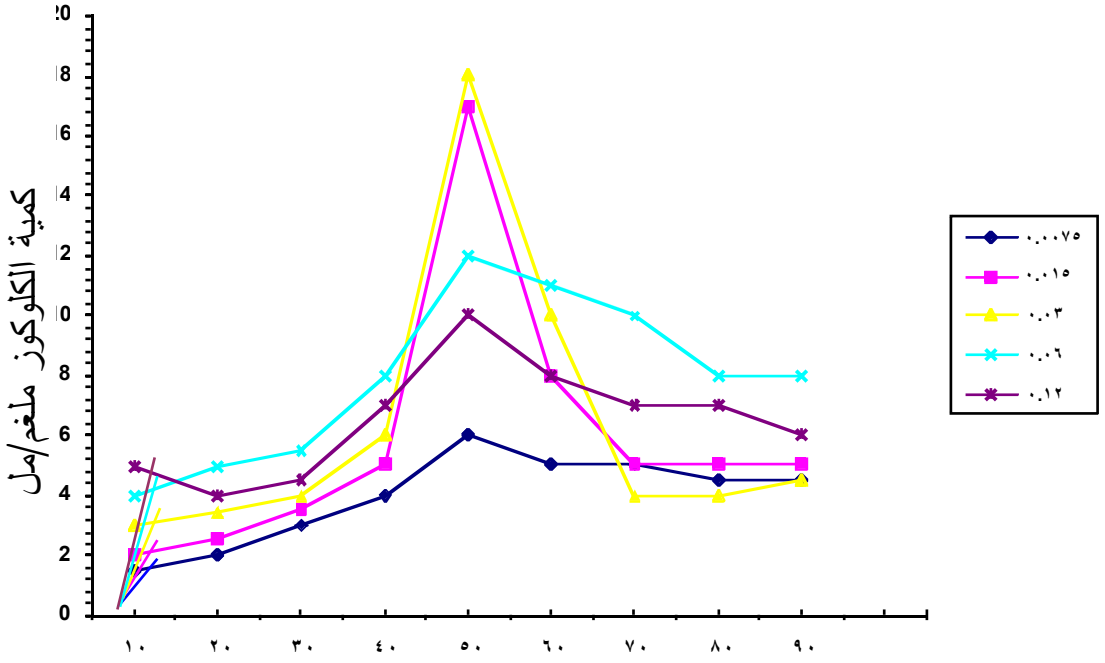
شكل رقم (1 a) تنقية انزيم الكوكواميليزالمنتج من A. niger بالترشيح الهلامي باستعمال scphadex G 200 ومحلول منظم الفوسفات M 0.1 ذي الرقم الهيدروجيني 4.2 وبواقع 5 مل للجزء المنفصل وبسرعة جريان 40 مل/ساعة



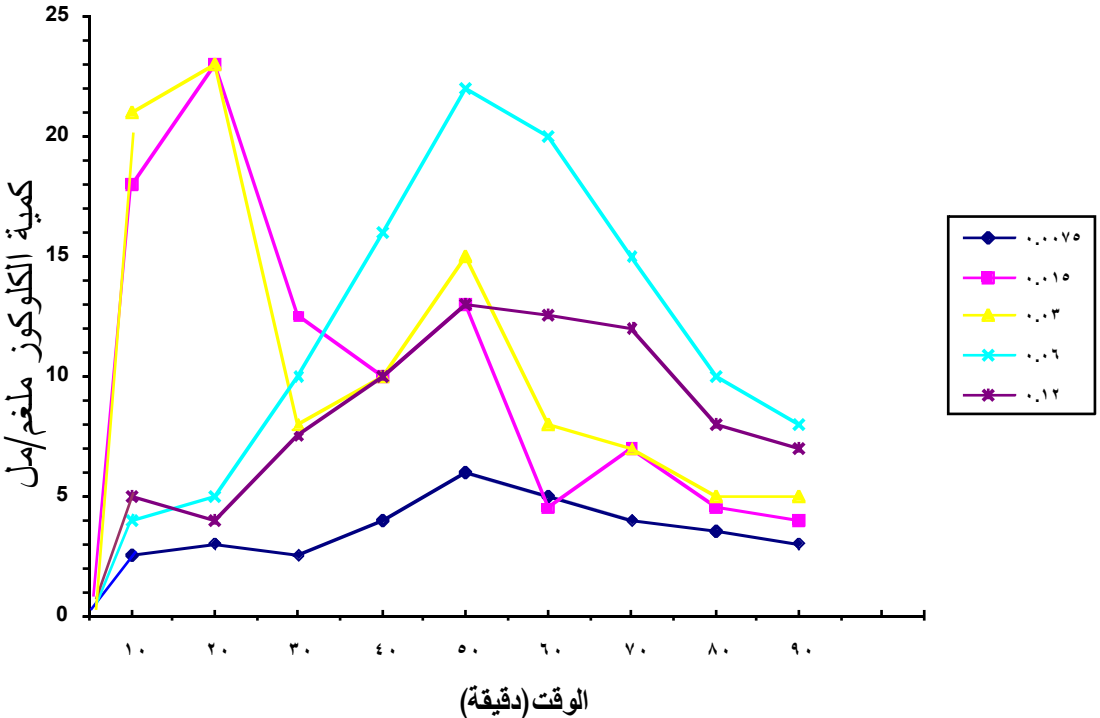
شكل (b1): الترشيح الهلامي لانزيم الكلوكواميليز القياسي باستعمال Sephadex G 200 ومحلول منظم الفوسفات 0.1 M ذي الرقم الهيدروجيني 4.2 وبواقع 5 مل للجزء المنفصل وبسرعة جريان 40 مل/ساعة.



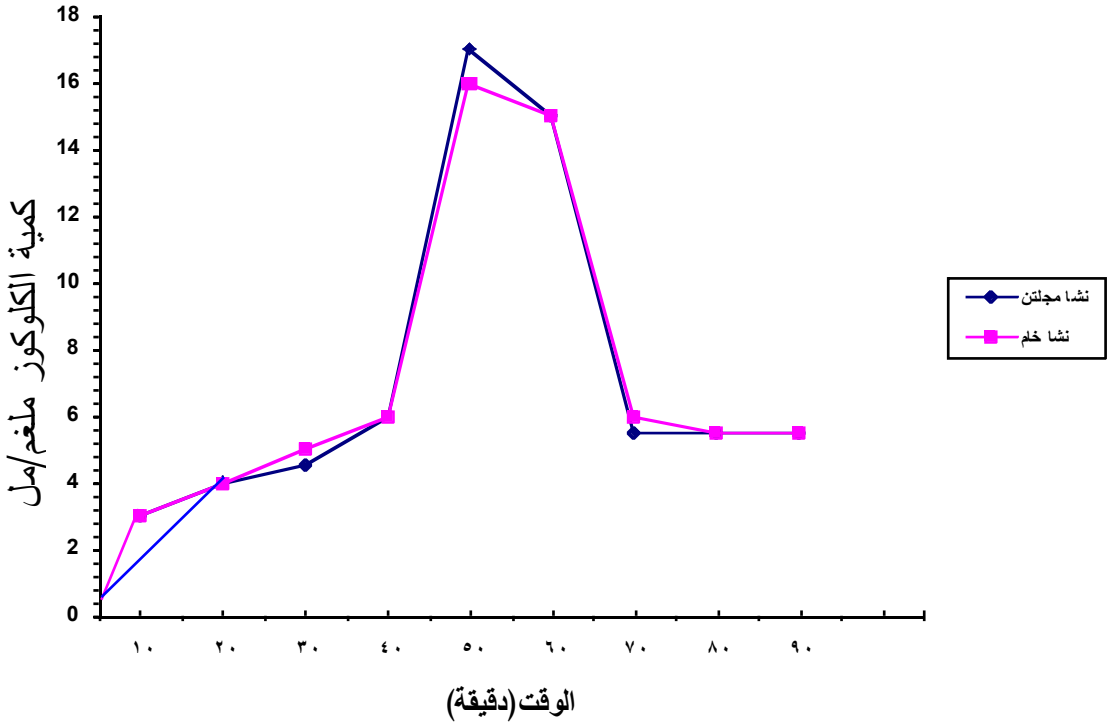
شكل(2) فصل نواتج تفاعل انزيم الكلوكواميليز بطريقة TLC



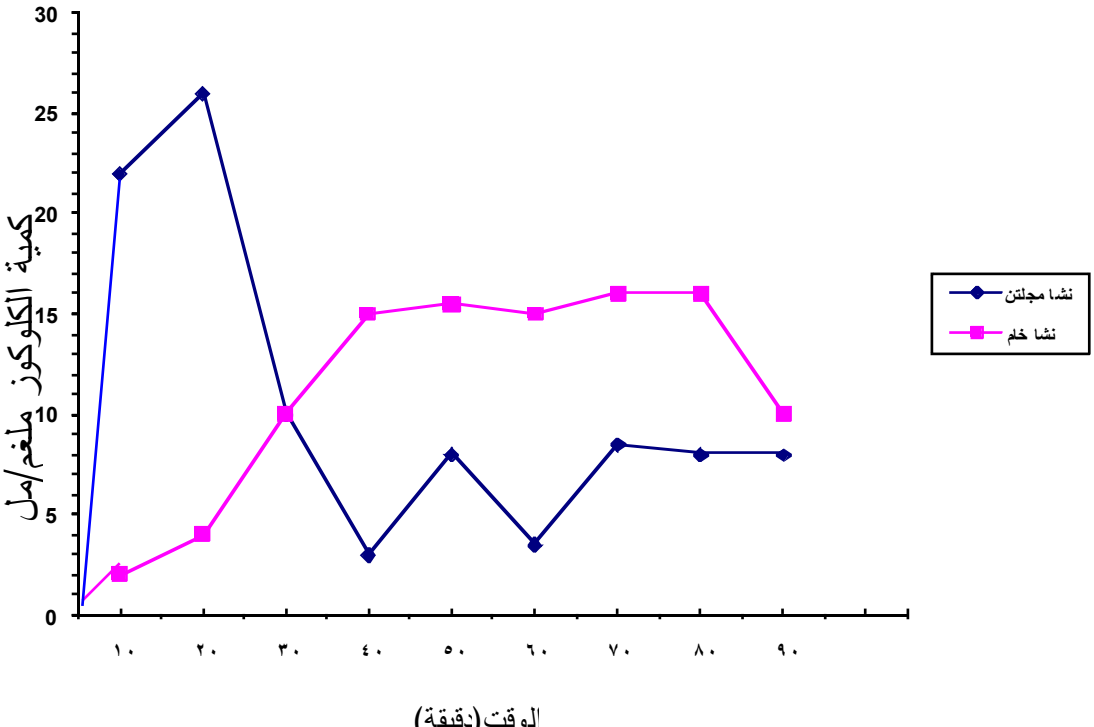
شكل (a3): تأثير تركيز الكلوكواميليز في تحلل نشا الذرة الخام 2A% (v/w) في pH (4.2) ودرجة 40 م.



شكل(3 b): تأثير تركيز الكلوكواميليز في تحلل نشا البطاطا الخام 2B% (v/w) في pH (4.2) ودرجة 40 م



شكل (a4): تأثير المعاملة الحرارية في عمل الكلوكواميليز في نشا الذرة 2% (v/w) و 4.2 pH وبدرجة حرارة 45 ْم للنشا الخام ودرجة 50 ْم للنشا المجلتن



شكل (b4): تأثير المعاملة الحرارية في عمل الكلوكواميليز في نشا البطاطا2% (v/w) و 4.2 pH وبدرجة حرارة 45 ْم للنشا الخام ودرجة 50 ْم للنشا المجلتن