مجلة العلوم الحديثة والتراثية ، 2016 ، 4 (3) : 501 – 512 .
http://www.jmsh.eu

تنقية وتوصيف أنزيم Nattokinase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis*

أحمد سعدون عبيد و أسوان حمدالله البيار*
قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة بغداد / العراق.
***Corresponding author: aswanbayar@yahoo.com**

الخلاصة

اجريت عملية تنقية لأنزيم Nattokinase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* مرتان الأولى بإستخدام الكازين مادة خاضعة والثانية بإستخدام الفايبرين مادة خاضعة، تضمنت خطوات التنقية الترسيب بكبريتات الأمونيوم والديلزة والترشيح الهلامي سيفادكس G-75 والمبادل الأيوني DEAE- Cellulose. أظهرت النتائج وجود ست قمم من البروتين في الترشيح الهلامي وعند إستخدام الكازين مادة خاضعة ظهرت ثلاثة قمم الأولى قمة عريضة أظهرت فعالية تحللية عند إستخدام الفايبرين مادة خاضعة في حين لم تُظهر القمتين الأخريين أي فعالية تجاه الفايبرين لذا تم إهمالهما. وعند إجراء التبادل الأيوني ظهرت قمة واحدة متجانسة عند إستخدام الكازين والفايبرين مواد خاضعة كل على حدا، وتم الحصول على فعالية نوعية بلغت 2494.87 وحدة/ملغم وبلغت عدد مرات التنقية 15.39 وبحصيلة انزيمية 21.31% عند استخدام الكازين مادة خاضعة، في حين بلغت الفعالية النوعية 729.10 وحدة/ملغم وعدد مرات التنقية 6.07 وبحصيلة انزيمية 24.43% عند استخدام الفايبرين مادة خاضعة . جرى توصيف الأنزيم المنقى بمعرفة الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية ودرجة الحرارة المثلى للفعالية والرقم الهيدروجيني الأمثل للثبات ودرجة حرارة المثلى للثبات إذ بلغت 8، 40 مْ، 8-9 و 30- 50 مْ على التوالي ، ويهدف هذا البحث الى تنقية وتوصيف أنزيم Nattokinase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* للوقوف على أفضل درجة حرارة و pH أمثل.

Purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis*

Ahmed S. Obaid and Aswan H. Al-Bayyar*
Food Science Department/College of Agriculture, University of Baghdad, Iraq.
***Corresponding author: aswanbayar@yahoo.com**

Abstract

The nattokinase of *Bacillus subtilis* was purified twice first by using casein as a substrate, second by using fibrin as a substrate. Purification steps include ammonium sulfate precipitation, dialysis, gel filtration (Sephadex G-75) and Ion Exchange (DEAE-Cellulose). Results showed that there were six peaks of protein in gel filtration; it was clear that there were 3 peaks when casein used as a substrate, first one was a wide peak gave analytical activity with fibrin, while other two peaks show no activity towards fibrin so they were denied. There was only one straight peak in ion exchange by using casein and fibrin as substrates separately; specific activity was 2494.87U/mg with 15.39 fold and yield 21.31% when casein was used as a substrate, while specific activity was 729.10U/mg with 6.07 fold and yield 24.43% by using fibrin as a substrate. The purified enzyme was characterized for optimum pH, optimum temperature, pH stability and heat stability, which were 8, 40^{o}C, 8-9 and 30-50^{o}C, respectively. The aim of this research is to purify and characterize nattokinase produced by *Bacillus subtilis* to definition optimum pH and temperature.

المقدمة

التنقية هي سلسلة متتابعة من طرائق الفصل والتي يمكن من خلالها فصل بروتين ما عن بقية البروتينات والمكونات الأخرى الموجودة في المستخلص الأنزيمي الخام . وتبرز أهمية خطوات التنقية للأنزيم وذلك لمعرفة

صفاته الكيميوحيوية وكيفية قيامه بتحفيز تفاعل معين من دون حدوث تداخل مع المواد الأخرى التي قد توجد مع الأنزيم وتعطي نتائج مختلفة (1). وهناك عدة طرائق لفصل وتنقية الأنزيمات وتشمل طرائق الترسيب مثل الترسيب بالأملاح (كبريتات الأمونيوم) والترسيب بالكحول والأسيتون (2). إن بعض طرائق الفصل يعتمد على الوزن الجزيئي مثل طريقة الترشيح الفائق (Ultrafiltration) والنضح الغشائي (Dialysis) والكروموتوكرافي بأنواعها منها ما يعتمد على الوزن الجزيئي فقط مثل الترشيح الهلامي (Gel filtration) ومنها ما يعتمد على الوزن الجزيئي والشحنة الكهربائية مثل التبادل الأيوني(Ion-Exchange chromatography) وطرائق الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) .

في إحدى الدراسات تمكن (3) من الحصول على فعالية نوعية 466.4 وحدة/ملغم بروتين وبحصيلة 43.2% وحدة /ملغم بروتين وعدد مرات تنقية 56.1 مرة من الأنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis natto B-12* وذلك من خلال خطوات التنقية لأنزيم Nattokinase والتي تضمنت الترسيب بكبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع تراوحت بين 40-80% ومن ثم إجراء عملية ديلزة بعدها مرر المستخلص الانزيمي على عمود تبادل أيوني Ion – Exchange من نوع CM- sepharose وبعدها مرر المستخلص الأنزيمي على عمود ترشيح هلامي (gel filtration) ذو حجم Sephadex G-75. كما ذكر (4) أنه تم الحصول على أنزيم Nattokinase وبفعالية نوعية 12.7 وحدة / ملغم بروتين وبحصيلة 54.1% وعدد مرات تنقية 3.25 مرة والذي تم إنتاجه عن طريق كلونة الجين المنتج له Pan من بكتريا *B. subtilis* الى *B. subtilis* WB 800. كما إستطاع (5) من تنقية أنزيم Nattokinase والحصول على فعالية نوعية 57.245 وحدة /ملغم بروتين وبحصيلة 61.36 % وعدد مرات تنقية 20 مرة والذي تم إنتاجه من بكتريا *B. subtilis* وبطريقة الوجبة شبه المتقطعة fed –batch.

العوامل المؤثرة في فعالية وثبات الأنزيم النقي:

1.الرقم الهيدروجيني: يؤثر الرقم الهيدروجيني تأثيراً كبيراً في فعالية الأنزيم ونتيجة لذلك تتأثر سرعة التفاعلات الأنزيمية ويؤثر الرقم الهيدروجيني في التفاعل الأنزيمي عن طريق تأثيره في تأين المجاميع الأيونية للموقع الفعال (المجاميع الأمينية والكاربوكسيلية) فضلاً عن تأين مادة التفاعل وتأين معقد الأنزيم ومادة التفاعل و تأثيره في ثبات الأنزيم . إن نشاط الأنزيم عادة يتحدد بمدى معين من قيم الأرقام الهيدروجينية يطلق عليه(الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية) والذي يتأثر بعدة عوامل مثل درجة الحرارة و تركيز مادة التفاعل والقوة الأيونية للوسط وقت التفاعل وتركيز المحلول المنظم (6). أما (الرقم الهيدروجيني الأمثل للثبات) فيعتمد على درجة الحرارة والقوة الأيونية وتركيز الأنزيم وطبيعة المحلول الدارئ وتركيز كل من المثبطات والمنشطات (7). وقد ذكر (8) إن تأثير الرقم الهيدروجيني في سرعة التفاعل الأنزيمي تكون أقصى ما يمكن عند الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية وعند الابتعاد سواء بالارتفاع أو الإنخفاض عن هذا الرقم سوف تنخفض سرعة التفاعل نتيجة هبوط فعالية الأنزيم بسبب حدوث مسخ للأنزيم (Denaturation).

2. درجة الحرارة: تعرف درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيمات بأنها الدرجة القصوى التي يبدي فيها الانزيم فعالية ثابتة خلال مدة زمنية تكون في أقل تقدير بطول المدة الزمنية المحددة لقياس الفعالية. وبشكل عام تزداد فعالية الأنزيمات بزيادة درجة الحرارة لأنها تمنح الجزيئات المتفاعلة طاقة حركية تتيح لها التصادم لحين الوصول الى الدرجة المثلى بعدها تنخفض ،ولكن باستمرار الإرتفاع في درجات الحرارة تؤدي الى حصول تغير

في التركيب الفراغي للموقع الفعال للأنزيم وهذا ما يعرف بالمسخ(Denaturation)(6). أما درجة الثبات فتعرف بأنها درجة الحرارة التي يبقى فيها الأنزيم محتفظاً بكامل فعاليته في مدة زمنية تقدر بطول مدة قياس الفعالية أو أكثر وتتاثر درجة حرارة الثبات للأنزيم بعدة عوامل منها الرقم الهيدروجيني والقوة ألايونية وطبيعة المحلول المنظم ووجود أو غياب مواد التفاعل والمثبطات والمنشطات ومدة الحضن وتركيز الأنزيم .إن الأنزيمات غير النقية تقاوم الإرتفاع في درجات الحرارة أكثر من الأنزيمات النقية .إن وجود مواد أخرى مع الأنزيم مثل الكاربوهيدرات والبروتينات تعطي حماية للأنزيم وتزيد من مقاومة الأنزيم للظروف الخارجية مع إستمرار خطوات التنقية تنفصل هذه المواد ويصبح الأنزيم أكثر حساسية للظروف الخارجية (7).

المواد وطرق العمل

تنقية الأنزيم: تم ترسيب الأنزيم بإستخدام كبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع تراوحت بين 40-80 % ثم أجريت عملية نبذ مركزي بسرعة 10000 RPM/مدة 15 دقيقة بعدها يفصل الراسب ، وأُذيب الراسب في كمية قليلة من الفوسفات الدارئ ذو تركيز 0.1 مولاري ورقم هيدروجيني 7.5 ،تم تقدير حجم المستخلص الأنزيمي وتركيز البروتين والفعالية الانزيمية، ثم اجريت عملية ديلزة للأنزيم لتخليصه من أملاح كبريتات الأمونيوم العالقة بعدها تم البدء بعملية الترشيح الهلامي باستخدام سيفادكس G-75 في عمود زجاجي بابعاد(60×1.5 سم)، أجريت موازنة للعمود بأستعمال محلول الفوسفات الدارئ لمدة 18 ساعة وبسرعة جريان 30مل/ساعة بعدها أُضيف الأنزيم الى سطح الهلام وأسترد الأنزيم بواقع 5مل لكل انبوبة، تمت متابعة تركيز البروتين في الأجزاء التي تم جمعها وذلك بقياس الإمتصاص الضوئي لكل منها عند طول موجي 280 نانومتر. جمعت بعدها الأجزاء التي أعطت فعالية أنزيمية ضمن القمة الواحدة ثم ركزت بأستعمال polyethylene glycol وأُعيد إمرارها في العمود نفسه وفي الظروف نفسها المذكورة أنفاً، وجُمعت الأجزاء التي أعطت فعالية أنزيمية ضمن القمة الواحدة وقدرت الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين. اجريت عملية تبادل أيوني للمستخلص الأنزيمي بإستخدام مبادل أيوني من نوع DEAE-Cellulose وتم تنشيطه على وفق ما ذكره (9) وبأبعاد (30 × 2.5 سم)، بسرعة جريان 30 مل/ ساعة بواقع 5 مل للجزء الواحد ، جرت عملية الإسترداد للبروتينات المرتبطة بالمبادل بإستعمال المحاليل المتدرجة التركيز بالتعاقب وقد صاحب ذلك متابعة تركيزالبروتين في الأجزاء المتجمعة بقراءة الإمتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانومتر، تم تقدير الفعالية الأنزيمية للأجزاء وعلى ضوء النتائج المستحصلة جُمعت القمم وقُدرت الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين والحجم لكل قمة.

صفات الأنزيم:

1. الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية: حُضرت محاليل المادة الأساس الكازين بإذابة 50 ملغم من الكازين في 10 مل من المحاليل الدارئة المختلفة وبمدى من الأرقام الهيدروجينية (4-10). وقدرت فعالية أنزيم Nattokinase في كل محلول ورُسمت العلاقة بين قيم الأرقام الهيدروجينية مقابل الفعالية الأنزيمية لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم .

2.تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم: أضيف 0.1 مل من محلول المستخلص الانزيمي الى 1 مل لكل محلول من المحاليل الدارئة المذكورة اعلاه في أنابيب إختبار حُضنت الأنابيب في درجة حرارة 37 مْ لمدة ساعة واحدة ثم بعدها قُدرت الفعالية الأنزيمية المتبقية ثم رُسمت العلاقة بين النسبة المئوية للفعالية الأنزيمية المتبقية والرقم الهيدروجيني لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل للثبات .

3. تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم: قُدرت فعالية الأنزيم بمدى من درجات الحرارة تراوحت بين (20-70) مْ وبفارق عشر درجات ثم رُسمت العلاقة بين الفعالية الأنزيمية مقابل درجات الحرارة المستعملة بالتفاعل لتحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم .

4. تحديد درجة الحرارة المثلى لثبات الأنزيم: تم حضن 1 مل من محلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.1 مولاري في أنابيب إختبار مضاف إليه 0.1 مل من المستخلص الأنزيمي بدرجات حرارة تراوحت بين (20-70) مْ وبفارق عشر درجات ولمدة ساعة واحدة ثم بعدها قُدرت الفعالية الأنزيمية المتبقية وحُسبت كنسبة مئوية %.

النتائج والمناقشة

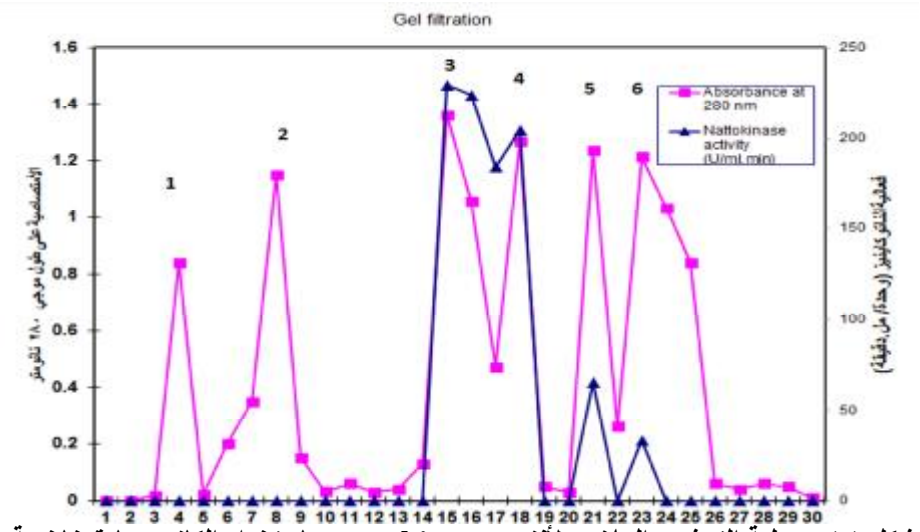
تنقية وتوصيف أنزيم Nattokinase: يوضح الجدول (1) خطوات تنقية أنزيم Nattokinase من بكتريا *Bacillus subtilis* بإستخدام الكازين مادة تفاعل للأنزيم إذ تم إنتاج أنزيم Nattokinase من العزلة *Bacillus subtilis* وتضمنت خطوات التنقية إجراء ترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 80% أعقبها خطوة ديلزة بإستعمال غشاء تنافذي ذي M.W.CO 14000 إذ يلاحظ من جدول التنقية أن فعالية الأنزيم بعد الترسيب بكبريتات الأمونيوم إرتفعت الى 356.24 وحدة / مل بعد إن كانت 164.37 وإرتفاع الفعالية النوعية الى 473.72 وحدة / ملغم بعد إن كانت 162.100 و بلغت عدد مرات التنقية 2.92 وبحصيلة أنزيمية 65.01% ، أما عند إجراء الديلزة فقد إنخفضت الفعالية في حين إزدادت الفعالية النوعية الى 576.77 وحدة / ملغم وبحصيلة أنزيمية 63.44%. وكذلك نلاحظ من خلال جدول التنقية إن تركيز البروتين قد إنخفض الى أقل من النصف قليلاً والسبب في ذلك هو نضوح بروتينات ذات أوزان جزيئية أقل من 14000 كيلودالتون الى خارج إنبوبة الديلزة ، كما إن عملية الديلزة تؤدي الى دخول كميات من محلول الدارئ الى داخل كيس الديلزة الأمر الذي أدى الى تخفيف التركيز ورفع عدد مرات التنقية .

جدول (1): خطوات تنقية أنزيم Nattokinase من بكتريا *Bacillus subtilis* بإستخدام الكازين مادة خاضعة

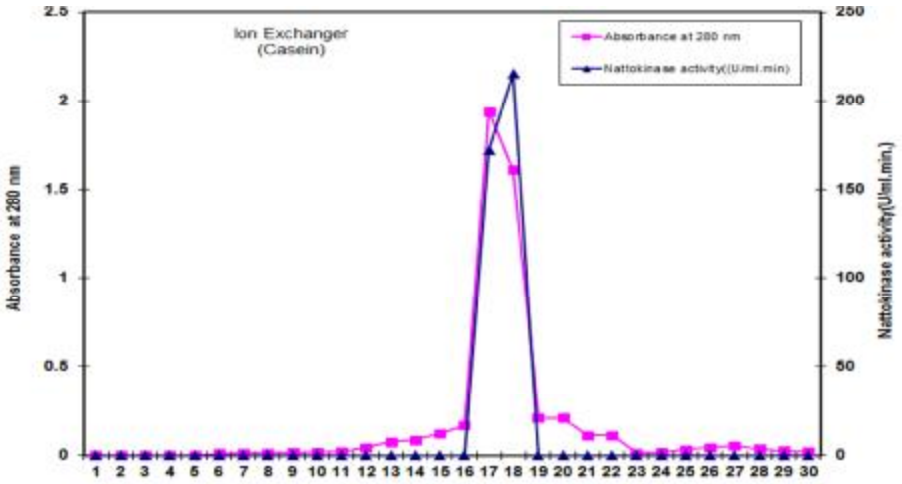
خطوة التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل	البروتين (ملغم/مل)	الفعالية الكلية (وحدة)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الأنزيمية (%)
الأنزيم الخام	50	164.37	1.014	8218.5	162.100	1	100
كبريتات الأمونيوم	15	356.24	0.752	5343.6	473.72	2.92	65.01
الديلزة	20	260.7	0.452	5214	576.77	3.56	63.44
الترشيح الهلامي	12	205.6	0.213	2467.2	965.26	5.95	30.02
التبادل الأيوني	6	291.9	0.117	1751.4	2494.87	15.39	21.31

أما في خطوة الترشيح الهلامي فيلاحظ في الشكل (1) ظهور ست قمم من البروتين وعند تقدير فعالية Nattokinase بإستخدام الكازين مادة خاضعة ظهرت ثلاث قمم القمة الاولى عريضة نوعاً ما، أما القمة الثانية والثالثة فكانت صغيرة جداً وعند تقدير فعالية Nattokinase بإستخدام الفايبرين مادة خاضعة ظهرت القمة رقم (3) و(4) من البروتين فعالية للأنزيم ولذا تم تحديد القمة (3) و (4) القمة الممثلة للأنزيم وقد بلغت فعاليتها 205.6حدة / مل وعدد مرات التنقية 5.95 وبحصيلة أنزيمية 30.02 % وأُهملت القمتين الصغيرتين لأنها لم تُظهر أي فعالية محللة للفايبرين . عند إجراء خطوة التنقية الرابعة باستخدام التبادل الأيوني شكل (2) ظهرت قمة واحدة في طور الغسل في الأنابيب (17 ،18)وقد بلغت فعاليتها 291.9 وحدة / مل وبلغت عدد مرات التنقية

15.39 وبحصيلة أنزيمية 21.31% . تشير النتائج الى إن عملية الترسيب أسهمت وبشكل فعال في إنخفاض ذائبية البروتين وترسيبه عن طريق معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين وإحداث إخلال في طبقة الماء المحيطة بالبروتين وخفض درجة ذوبانها (10) . والذي بدوره أثر على الفعالية النوعية للأنزيم وأدى الى رفعها وكذلك زيادة عدد مرات التنقية، إن من الدلائل المهمة لنقاوة الأنزيم والتي تحدد كفاءة كل مرحلة من مراحل خطوات تنقية الأنزيمات هي زيادة عدد مرات التنقية وإنخفاض الحصيلة الانزيمية (7).



شكل (1): عملية الترشيح الهلامي لأنزيم Nattokinase بإستخدام الكازين مادة خاضعة.

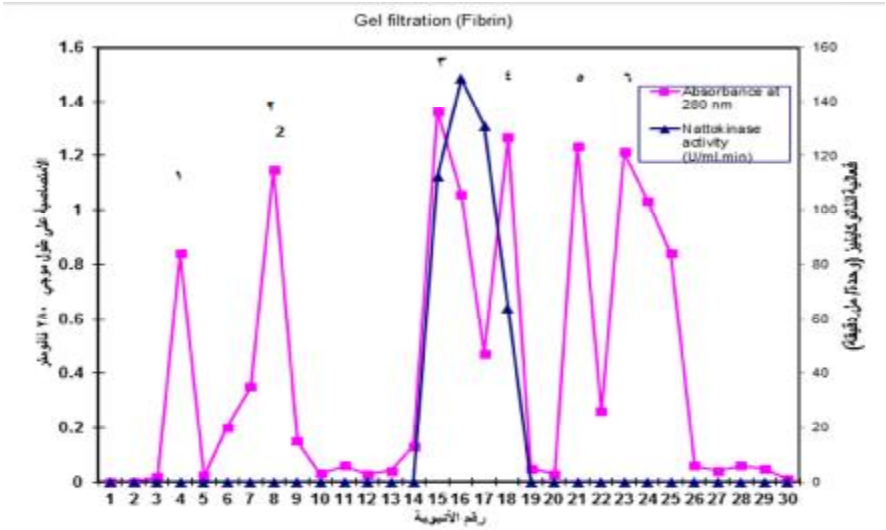


شكل (2) عملية التبادل الأيوني لأنزيم Nattokinase باستخدام الكازين مادة خاضعة.

أما الجدول (2) فيوضح خطوات تنقية أنزيم Nattokinas باستخدام الفايبرين مادة خاضعة و يُلاحظ إرتفاع في الفعالية عند الترسيب بكبريتات الأمونيوم من 84.15 وحدة / مل الى 199.46 وحدة / مل وزيادة في كمية البروتين من 0.7016 – 1.1651 ملغم / مل ، وبلغ عدد مرات التنقية 1.42 وبحصيلة أنزيمية 71.1 % . أما عند خطوة الديلزة فقد بلغت الفعالية 142.57 وحدة / مل وبحصيلة أنزيمية 67.76%.

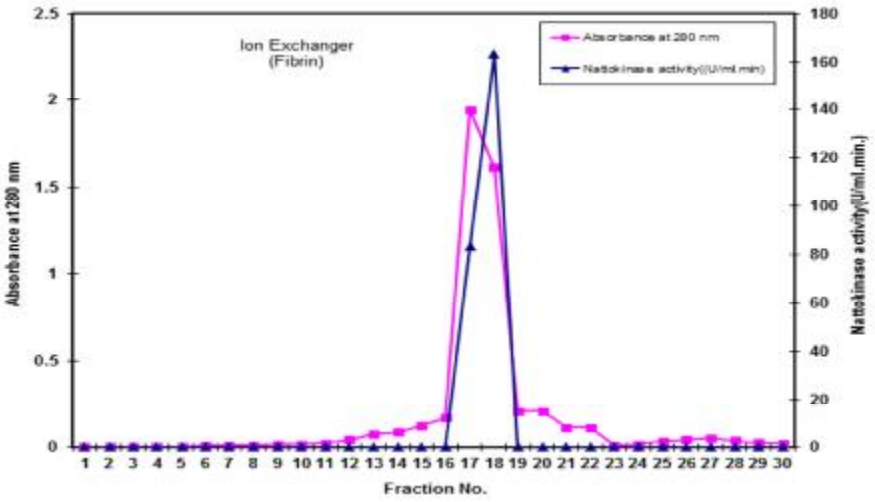
الجدول (2): خطوات تنقية أنزيم Nattokinase من بكتريا *Bacillus subtilis* باستخدام الفايبرين

خطوة التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	البروتين (ملغم/مل)	الفعالية الكلية (وحدة)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الأنزيمية (%)
الأنزيم الخام	50	84.15	0.7016	4207.5	119.94	1	100
كبريتات الأمونيوم	15	199.46	1.1651	2991.9	171.21	1.42	71.1
الديلزة	20	142.57	0.5871	2851.4	242.83	2.02	67.76
الترشيح الهلامي	12	161.96	0.324	1943.52	499.87	4.17	46.2
التبادل الأيوني	6	171.34	0.235	1028.04	729.10	6.07	24.43



شكل (3): عملية الترشيح الهلامي باستخدام الفايبرين مادة خاضعة.

أما في خطوة الترشيح الهلامي فيمكن ملاحظة الشكل (3) الذي يوضح الترشيح الهلامي لأنزيم Nattokinase بإستخدام الفايبرين مادة خاضعة لقياس الفعالية فظهرت قمة واحدة في الأنابيب (15،16،17،18) وبفعالية 161.96وحدة/مل وكان عدد مرات التنقية 4.17 وبحصيلة 46.2 % .



شكل (4): عملية التبادل الأيوني باستخدام الفايبرين مادة خاضعة.

أما في خطوة التبادل الأيوني باستخدام الفايبرين مادة خاضعة فيمكن ملاحظة الشكل (4) إذ ظهرت قمة واحدة في الأنابيب (17،18) والتي تمثل فعالية البروتيز في تحليل الفايبرين و بلغت الفعالية 171.34 وحدة/مل وبلغت عدد مرات التنقية 6.07 وبحصيلة أنزيمية 24.43%. وتتفق هذه النتائج مع ما وجده (11) والذي أشار الى إرتفاع في الفعالية النوعية لأنزيم fibrinolytic enzyme الخام المنتجه من خميرة *candida guilliermondii* من 1.16 الى 4.14 وحدة / ملغم وتضاعفت عدد مرات التنقية من 1 الى 3.57 فيما إنخفضت الحصيلة الأنزيمية الى 53.31 % بعد خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع تراوحت من 60-80 % لكن عند خطوة التبادل الأيوني بوساطة مبادل أيوني من نوع DEAE-sepharose فقد وصلت الفعالية النوعية الى 8.65 وحدة / ملغم وإزداد عدد مرات التنقية الى 7.46 أما الحصيلة الأنزيمية فقد أخذت بالإنخفاض الى أن وصلت الى 52.60%. كما أشار (12) الى زيادة عدد مرات التنقية من 1 الى 4.29 وإنخفاض الحصيلة الأنزيمية الى 57.7 % بعد خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم لكن الفعالية النوعية أخذت بالإرتفاع الى 4.64 وحدة/ملغم لكن بعد خطوة التبادل الأيوني بمبادل من نوع DEAE-cellulose فقد وصلت الفعالية النوعية الى 13.11 وحدة / ملغم وزادت عدد مرات التنقية الى أن وصلت 12.14أما الحصيلة الأنزيمية فقد إنخفضت الى 45.72% لكن عند خطوة الترشيح الهلامي وصلت الفعالية النوعية الى 32.52 وحدة / ملغم والحصيلة الأنزيمية إنخفضت الى 44.86% أما عدد مرات التنقية فقد زاد الى 30.11.

تمكن (13) من تنقية انزيم fibrinolytic enzyme (Nattokinase) من بكتريا *Bacillus species* بعدة خطوات من التنقية شملت على الترسيب بكبريتات الامونيوم أعقبها خطوة ديلزة وترشيح هُلامي وتبادل أيوني، و إرتفعت عدد مرات التنقية الى 10.70 كما إرتفعت الفعالية النوعية من 78.26 الى 867 وحدة / ملغم فيما إنخفضت الحصيلة الأنزيمية الى 76%. ووجد (14) أن الفعالية النوعية لأنزيم fibrinolytic enzyme attokinase الخام المنتج من عفن *Schizophyllum commune BL23* قد إرتفعت من 4.59×10^{3} الى 39.31×10^{4} وحدة / ملغم وإزداد عدد مرات التنقية من 1 الى 86 بينما إنخفضت الحصيلة الأنزيمية الى 36.47%بعد خطوات تنقية شملت على الترسيب بكبريتات الامونيوم والديلزة والترشيح الهلامي والتبادل الأيوني ،وقد يعود هذا التباين في ارتفاع الفعالية النوعية وعدد مرات التنقية لأنزيم (Nattokinase) المنقى من مصادر مختلفة الى إختلاف مصدر الأنزيم فضلا عن الإختلاف في التقانات المُستخدمة في تنقية الأنزيم ونوع الُهلام والمبادل الأيوني المستخدم.

توصيف الأنزيم:

1. الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية: بينت نتائج الدراسة إن أنزيم Nattokinasالمنتج من بكتريا *Bacillus subtiis* والمُنقى جُزئياً يمتلك فعالية عند قيم أرقام هيدروجينية تراوحت بين (7- 9).يتبين من خلال الشكل(5) والذي يمثل منحنى الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم إن أعلى فعالية للأنزيم ظهرت في مدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين (7 - 9) وكان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم هو(8) إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 190.803 وحدة /مل ويُلاحظ الإنخفاض التدريجي للفعالية على جانبي الرقم الهيدروجيني الأمثل إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 119.645 وحدة/مل عند رقم هيدروجيني 4، أما عند رقم هيدروجيني 9 فقد بلغت الفعالية الأنزيمية 173.482وحدة / مل ويعزى سبب ذلك الإنخفاض في الفعالية الى تأثروتغير تركيب واحدة أو أكثر من المجاميع الأيونية الموجودة في الموقع الفعال للأنزيم أو الموجودة في المادة الأساس أو كليهما ، وعليه

تغيرت الحالة الأيونية لهذه المجاميع وإنعكس سلباً على قابلية إرتباط الأنزيم بالمادة الأساس (7). وأتفقت هذه النتيجة مع ما ذكره (15) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus subtilus* هو8، في حين ذكر (16) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج أنزيم Nattokinase من بكتريا *Bacillus subtilus RAJS19* هو PH=11 . وأشار (17 و 18) الى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيمات fibrinolytic enzyme (Nattokinase) المنتج من بكتريا *Bacillus lichiniformis B4* هو 7 إذ بلغت الفعالية عنده 815.13 وحدة / مل.

2. الرقم الهيدروجيني الأمثل للثبات: بينت نتائج الدراسة أن أنزيم Nattokinase المنقى جزئياً من العزلة *Bacillus subtilis* يمتلك ثباتاً عند قيم أرقام هيدروجينية تتراوح بين 8.0-9.0 . كما موضح في الشكل (6) إذ إحتفظ الأنزيم بكامل فعالتيه بشكل تقريبي، إلا إنه فقد بحدود 51 % من فعاليته عند رقم هيدروجيني 4.0 بينما إحتفظ الأنزيم 98% من فعاليته عند رقم هيدروجيني 10 . كما نلاحظ إن ثباتية الأنزيم بدت واضحة عند أرقام هيدروجينية 8 و9 إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 128.928 وحدة / مل عند رقم هيدروجيني 8 إذ احتفظ الأنزيم 99% وفقد 1% لكن عند رقم هيدروجيني 9 فقد بلغت الفعالية الأنزيمية 129.107 وحدة / مل و احتفظ الأنزيم بكامل فعاليته 100 % لكن عند الرقم الهيدروجيني 10 بدأت تنخفض الفعالية بشكل بسيط إذ بلغت 126.785 وحدة / مل وعليه فإن الثباتية تحققت بشكل تام عند أرقام هيدروجينية 8 و 9 واتفقت هذه النتائج مع ما ذكره (16) فقد اشار الى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات فعالية أنزيم Nattokinase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis IMRK* المطفرة وراثياً هو8 و9 وبلغت الفعالية الانزيمية 107,129 وحدة / مل على التوالي واحتفظ الأنزيم بكامل فعاليته ولم يكن هناك فقد في الفعالية المتبقية وعلية فان ثبات الأنزيم تحقق عند هذين الرقمين.

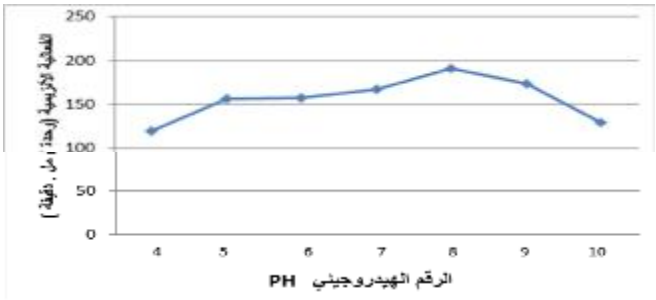
من الصفات المهمة جداً في تحديد ظروف التنقية والخزن للأنزيم هو الرقم الهيدروجيني إن سبب الإرتفاع والإنخفاض في الفعالية الأنزيمية عند قيم أرقام هيدروجينية حامضية وقاعدية هو حدوث تغيرات في التركيب الثانوي والثالثي لجزيئة الانزيم فضلاً عن تغير الحالة الأيونية للموقع الفعال للأنزيم وكذلك تغير الطبيعة الكيميائية للمحلول الدارئ تعد من العوامل المهمة المؤثرة في الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم (7). ذكر (19) إن الأنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* يمتلك ثباتاً عند قيم أرقام هيدروجينية بين 6.0-8.0، بينما أشار (20) الى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات فعالية أنزيم Nattokinase المنتج من بكتريا *Bacillus firmus* هو 9.0-11.0. واشار (21) الى أن أفضل رقم هيدروجيني لثبات فعالية الأنزيم المنتج من بكتريا *B. amyloliquefaciens* هو 9.0 ، ووجد (22) أن أنزيمات fibrinolytic enzyme المنتجة من بكتريا *Bacillus lichiniformis B4* تمتلك ثباتية عند رقم هيدروجيني 7 إذ إحتفظ الأنزيم بكامل فعاليته بينما عند رقم هيدروجيني 10 إحتفظ الأنزيم 13.9% من الفعالية المتبقية وعند رقم هيدروجيني 5 إحتفظ 26% من الفعالية المتبقية .

3. درجة الحرارة المثلى للفعالية: تبدي الأنزيمات حساسية معينة تجاه التغيرات في درجات الحرارة وذلك من خلال تأثير الحرارة في زيادة ارتفاع او انخفاض الفعالية الأنزيمية وعلى هذا الاساس فقد اجريت هذه الدراسة لتحديد تأثير درجة الحرارة على فعالية أنزيم Nattokinase المنقى جزئياً ضمن مدى من درجات الحرارة التي تتراوح بين (20-70) مْ عند الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم . إذ يُلاحظ من خلال الشكل (7) والذي يمثل منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم Nattokinase إزدياد فعالية الأنزيم ما بعد درجة حرارة 20 مْ

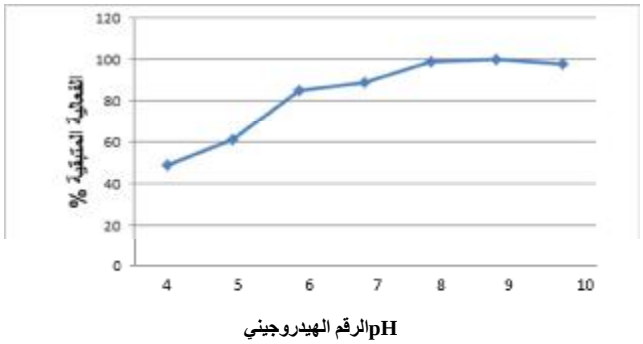
وبشكل حاد وملحُوظ إذ بلغت الفعالية الانزيمية 50.089 وحدة / مل وبلغت أقصاها عند درجة حرارة 40 مْ إذ وصلت الفعالية الى 123.75 وحدة / مل ويُعزى ذلك الأرتفاع الى زيادة سرعة التفاعلات الأنزيمية مع إرتفاع درجات الحرارة بسبب زيادة الطاقة الحركية لجزيئات المواد المتفاعلة ومن ثم زيادة فرص تصادم ما بين جزيئات المادة الأساس والموقع الفعال للأنزيم (7). وإنخفضت بعد ذلك الفعالية الأنزيمية إذ بلغت أدناها 19.73 وحدة/مل عند درجة حرارة 70 مْ وسبب ذلك الإنخفاض المفاجيء هو حصول مسخ أو دنترة (denturation) للموقع الفعال للأنزيم والذي أدى الى عدم تطابق الانزيم والمادة الأساس بشكل صحيح فضلاً عن حدوث تغيير في التركيب الثالثي للأنزيم وفقدانه الفعالية (7) . وأتفقت هذه النتيجة مع ما ذكره (23) أن درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم fibrinolytic enzyme المنتج من بكتريا *Bacillus lichiniformis B4* هي 37 مْ، إذ بلغت الفعالية الأنزيمية عند هذه الدرجة 1168.15وحدة / مل فعند إنخفاض الدرجة الى أقل من هذه الدرجة تؤثر في نشاط الأنزيم أما عند إرتفاعها الى أكثر من ذلك فتؤدي الى تحطم تركيب الأنزيم بسبب عملية الدنترة (Denturation). كما أشار (5) الى أن أنزيم fibrinolytic enzyme (Nattokinase) المنتج من خميرة *Candida guilliermondii* يُظهر أعلى فعالية عند درجة حرارة 45 مْ لكن يفقد 30% من فعاليته عند خفض درجة الحرارة الى 30 مْ، ويفقد 50% من الفعالية عند وصول درجة الحرارة الى 70مْ. ووجد (24) أن درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم fibrinolytic enzymeالمنتج من *Mucor subtillissimusucp1262* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة Solid state fermentation هي 30 مْ ،إذ بلغت الفعالية الأنزيمية عندها 144.58 وحدة / مل ويحتفظ بكامل فعاليته لكن عند إرتفاع درجة الحرارة الى 40 مْ، يفقد الانزيم 75.52% من الفعالية المتبقية وعند درجة حرارة 60 مْ يفقد 95% من فعاليته .

4. درجة الحرارة المثلى للثبات: يعد الثبات الحراري من العوامل المهمة التي يمكن عن طريقها تحديد درجات الحرارة التي يحتفظ فيها الأنزيم بفعاليته ونشاطه وتلك التي تؤثر سلباً ويتم على ضوئها إختياردرجة الحرارة الملائمة لأستعمال الأنزيم في التطبيقات العملية . وقد أظهرت نتائج حضن أنزيم Nattokinase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilus* في درجات حرارية مختلفة وفي الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الانزيم ولمدة ساعة واحدة، نلاحظ في الشكل (8) الذي يمثل منحنى الثبات الحراري لأنزيم Nattokinase إن الأنزيم يظهر ثباتاً بدرجات حرارة تراوحت بين (30-50) مْ. فعند درجة حرارة 30 مْ يحتفظ الأنزيم بكامل فعاليته والتي بلغت 193.75 وحدة / مل ،وكذلك درجة حرارة 40 مْ و 50 مْ كما إحتفظ الأنزيم بمعظم فعاليته إذ بلغت 193.30و 192.85 وحدة/مل على التوالي، ففي درجة حرارة 40 مْ إحتفظ الأنزيم 99.76% من فعاليته وفقد 0.24% وفي درجة 50 مْ إحتفظ 99.53% وفقد 0.47% لكن نُلاحظ في درجة حرارة 20مْ كانت الفعالية منخفضة جداً إذ بلغت الفعالية 79.017 وحدة/مل وكذلك في الدرجات العالية 60 مْ و70 مْ بدأت الفعالية بالانخفاض بشكل سريع وبلغت 72.50 و36.78 وحدة / مل على التوالي. إن سبب فقدان الأنزيم جزء من فعاليته خلال مدة الحضن وذلك لتعرض الأنزيم الى المسخ أو ما يسمى بالدنترة (Denturation) والذي يؤدي الى تغيير تركيبهُ الثالثي وينعكس ذلك سلباً على تفاعل الأنزيم مع المادة الأساس. وإتفقت هذه النتيجة مع ما ذكره (25) إن أعلى ثباتية لأنزيم Nattokinase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilus natto B-12* كانت على درجة حرارة 30-50 مْ لمدة 60 دقيقة لكن فقد الأنزيم 80 % من فعاليته بعد 10 دقائق من تعرضه لدرجة حرارة 60 مْ . في حين أشار (26) الى أن أنزيم Nattokinase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilus*

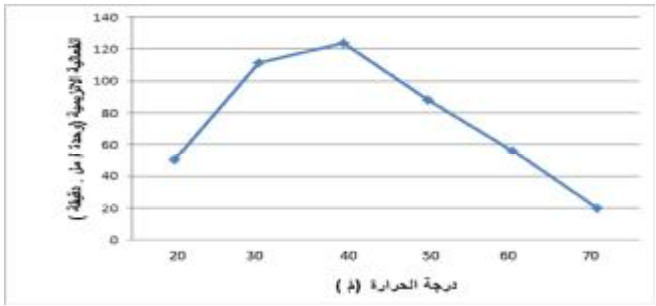
RAJS19 يمتلك أعلى ثباتية في مدى حراري يتراوح بين 65-85 مْ وهذه الثباتية تشابة ثباتية أنزيم Nattokinase المنتج من عدة سلالات مثل *Bacillus subtilus*(21)، وكذلك بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* وبكتريا *Bacillus sp kck-7* (27)، وأشار(28) الى أن أنزيم fibrinolytic enzyme المنتج من بكتريا *Bacillus lichiniformis B4* يمتلك ثباتية عند درجات حرارة تتراوح بين(20-40) مْ وإحتفظ الأنزيم بكامل فعاليته لكن عن إرتفاع درجات الحرارة أعلى من ذلك يحصل انخفاض سريع في فعالية الأنزيم المتبقية الى 28% بسبب دنترة الأنزيم. بينما أشار (29) الى أن افضل ثباتية تحققت لأنزيم fibrinolytic enzyme المنتج من *Candida guilliermondii* عند درجات حرارة تراوحت بين 30-50مْ لمدة 30 دقيقة لكن يفقد الأنزيم 22% من فعاليته عند درجة حرارة 60 مْ بينما يفقد 70% عند درجة حرارة 70 مْ . ويعود هذا التباين في تحديد درجة الحرارة المثلى للفعالية والثبات لأنزيم Nattokinase الى إختلاف نوع الكائن المستخلص منه الأنزيم أو إختلاف ظروف التنمية وظروف إنتاج الأنزيم(30).



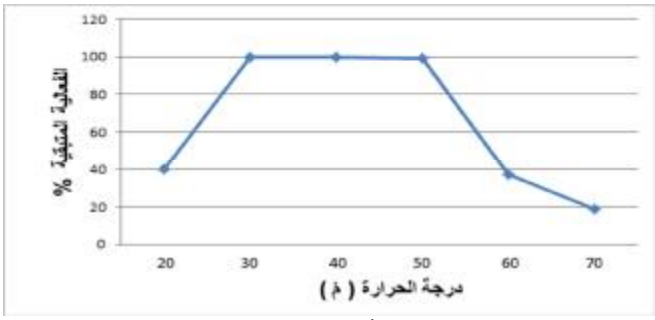
شكل (5)الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية



شكل (6)الرقم الهيدروجيني الأمثل للثبات



شكل (7) درجة الحرارة المثلى للفعالية



شكل (8) درجة الحرارة المثلى للثبات

المصادر

1. Kornberg, A. 1990. Why purify enzymes. In methods in enzymology. Vol.182 (edited by Deutscher, M.P)1-5, Academic Press New York.
2. ألعاني، أسوان حمدالله عبود بيار ، 2005. إنتاج السليوليزات من *Aspergillus* sp. المعزولة محلياً ودراسة بعض خصائصها وإستعمالاتها التطبيقية.
3. Ueda, M.; Kubo, T.; Miyatake, K. 2007. Purification and Characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB. Appl. Microbiol. Biotechnol., 74: 331-338.
4. Wang, C., Du M, Zheng D., Kong F., Zu G., Y. F. 2009a. Purification and characterization of nattokinase from Bcillus subtilis natto B-12. J. Agric. food Chem., 57(20): 9722-9729.
5. Liu, X.L., L.X.DU, FP.Lu, X.Q. Zheng and J.Xiao, 2005b .Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12. Appl.Microbiol. Biotechnol., 67:209-214.
6. Whitaker, J. R., 1972. Principle of Enzymology for food Science.Mareel Dekker, Inc. New York.
7. Segel, I.H., 1976. Biochemical Calculation. 2rd Edition, John Wiley and Sons, Inc. New York.
8. Purich, D.L., 1996.Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanisms. New York. Academic Press.
9. Karlsson, E., Ryden, L.and Brewer , J.1998.Ion-Exchangechromatography In; protein purification . principles High Resolution , method and Application .Second Edited by Jan . christer Janson and Lars Ryden .Wiley- Liss .A John Wiley and sons,INC. Publication .
10. Englard,E.M. and S. Seifter, 1990. Precipitation Techniques in:method in enzymology (edited by murray E.D. and Dentsher,P)182:425-441.
11. Cha, W.S., S.S. Park, SJ. Kim and D. Choi, 2010. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid state conditions using corn cob. Bioresour. Technol.,101:6475-6481.
12. Ellaiah, P. and Srinivasulu, B. 1996. Production of extracellular protease by *Streptomyces fradiae* . Hindustan Antibiot Bull., 38(1-4): 41-47.
13. Mahajan, P.M.; Nayak, S. and Lele, S.S. 2012. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis 1CTF-1*: media optimization , purification and.J Biosci characterization Bioeng.113(3):307-314.
14. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis- π. Method and application to human serum proteins. Annals of The New York Academy of Sciences, 121: 404-427.

15. Urano, T..; Ihara, H.; Umemura, K.; Suzuki, Y.; Oike, M.; Akita, S.; Tskamoto, Y.; Suzuki, I. and Takada, A. 2001. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* cleaves and inactivates plasminogem activator inhibitor Type 1. J. Biol. Chem., 276: 24690-696.
16. Chang, C.T.; Fan, M.H.; Kuo, F.C. and Sung, H.Y. 2000. Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtils IMR-NK1*. J. Agric. food Chem., 48: 3210-3216.
17. El-Safey, E.M. and Abdul-Raouf, U.M. 2004. Production, purification, and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* .International Conferences For Development And The Environment In The Arab World .23:14.
18. Ali, U.F. and Ibrahim, Z.M. 2008. Production and some Properties of Fibrinolytic enzyme from *Rhizomucor miehei* (Cooney and Emerson) Schipper. J. Appl. Sci. Res., 4: 892-899.
19. Zhu, J.; Du, L.; Lu, F.; Liu, X. and Wang, P. 2006. purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme nattokinase. Microbiol., 33: 68-71.
20. Moon, S.H. and Parulekar, S.J. 1991. A parameteric study of protease production in batch and fed batch culture of *Bacillus firmus*. Biotechnol. Bioeng., 37: 467-483.
21. Peng, Y.; Huang, Q.; Zhang, R. and Zhang, Y. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens DC-4* screened from douche, a traditional Chinese soybean food. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 134: 45 -52.
22. Kim, J.S.; Sapkota, K.; Park, S.E.; Choi, B.S.; Kim, S.; Hiep, N.T.; Kim, C.S.; Choi, H.S.; Kim, M.K.; Chun, H.S.; Park, Y. and Kim, S.J. 2006. A fibrinolytic enzyme from the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. J. Microbiol., 44(6): 622-631.
23. Siraj, S.C. 2011. Comparative studies on production of nattokinase from *Bacillus subtilis* changing the nitrogen sources M.A Thesis, Rajiw Gandhi University of Health Sciences, Karnataka, Bangalore.
24. Sathya, R.; Pradeep, B.V.; Angayarkann, J. and Palaniswamy, M. 2009. production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro – industrial wastes. Biotechnol. Bioproc. Engin., 14: 788-794.
25. Hsieh, C.; Lu, W.; Hsieh, Y.; Lai, C.; Kow, N. 2009. Improvment of the stability of nattokinase using γ-polyglutamic acid as a coating material for microen capsulation. LWT-Technol., 42: 144-149.
26. Yin, L. J., H.H.Lin and S.T. Jisng, 2010. Bioproperties of potent nattokinase from *Bacillus subtilis* YJI. J. Agric . Food Chem., 58: 5737-5742.
27. Kim, W.; Choi, Y.; Kim, H.; Park, H. and Choi, J. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* Strain CK 11-4 secreened from Chungkook-Jang. Appl. Environ. Microbiol., 62: 2482-2488.
28. Wang, S.; Chen, H.; Liang, T.; Linm Y. 2009b. A novel nattokinase produced by *Pseudomonas sp.* TKU015 using shrimp shells as substrate. Process Biochem., 44: 70-76.
29. Mahmoud, M.G., I.A. Ghazy, G.S. Ibrahim, A.S. Fahmy, M.O. El-Badry and A.M. Abdel-Aty, 2011. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme of *Bacillus polymaxa* NRC-A. Int. J . Acad. Res., 3: 542-547.
30. Liu, J., Xing. J., Chang. T., Ma. Z., Liu, H. 2005a. Optimization of nutritional condition for Nattokinase production by *Bacillus natto NLSSE* using statistical experimental methods. Process. Biochem., 40,2757-2762.