تنقية وتوصيف انزيم Polygalacturonases المنتج من العفن *Aspergillus niger TP4* المتحمل للحرارة

محمد عمر محي الدين
جامعة بغداد/كلية الزراعة / قسم علوم الأغذية

رقيباء علي جيجان
جامعة بغداد/كلية الزراعة / قسم علوم الأغذية

*بحث مستل من اطروحة الدكتوراة الباحث الثانى

المستخلص:

استخلص انزيم Polygalacturonases المنتج من العفن Aspergillus niger TP4 وفق الظروف المثلى للانتاج.أمكن تنقية الأنزيم الخام المُنتج بخطوات عدة تمثلت بالتركيز بكبريتات الامونيوم أو الترسيب بالكحول الأثيلي ومن ثم كروماتوكرافيا التبادل الآيونى بعمود DEAE-Sepharose والترشيح الهلامي في عمود Sephacryl S-300 خطوةً أخيرة، بلغ عدد مرات التنقية وبأتباع هذه الخطوات 11.80مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها 30% .كما جرت محاولة تنقية الأنزيم بطريقة الألفة او الإرتباط بالجينات الصوديوم (alginate affinity) فكانت حصيلة الأنزيم 86 % وبعدد مرات تنقية بلغت 14مرة. تم التأكد من نقاوة الأنزيم حد التجانس بكلتا الطريقتين المذكورتين بالترحيل الكهربائي. درست خواص الأنزيم ،فكان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليته 5 .تراوح الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم بين 4.5 إلى7.بلغت درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم 50 م° في حين كانت درجة الحرارة المثلى لثباته 20-50 م°. بلغ الوزن الجزيئي للأنزيم 41 كيلو دالتون مقدرة بطريقة الترحيل الكهربائي SDS/PAG باضافة 2-mercaptoethanol و39 كيلو دالتون بطريقة تحليل الحوامض الأمينية و81 كيلو دالتون بطريقة الترشيح الهلامي مما يعني أن الأنزيم قد يكون مؤلفاً من وحدتين ثانويتين متماثلتين أظهرت دراسة الثوابت الحركية أن معدلات قيم ثابت ميكالس *Km* لتفاعل الأنزيم تجاه Polygalacturoic acid هي 2.8 ملغم/مليلتر وإن قيمة السرعة القصوى *Vmax* 4.159 مايكرو مول/دقيقة .وبناء على تحليل النواتج المتكونة من معاملة حامض الكالاكتيورونيك المتعدد بالأنزيم وبطريقة كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC ثبت أن الأنزيم من نوعEndopolygalacturonase .

Abstract

extracted enzyme Polygalacturonases product from Aspergillus niger TP4 according optimal conditions for production. The enzyme was purified by several steps included concentration by ammonium sulfate or ethanol followed ion exchange chromatography on DEAE-Sepharose column and gel filtration on Sephacryl S-300 column. The purification numbers and the yield of the enzyme at the end of these steps were 11.80 and 30% respectively. Alginate affinity as alternative procedure was also used for purification of the enzyme produced on synthetic support material. The purification number by this method was 14 with a yield estimated about 86% .The molecular weight was 41 kD as determined by gel electrophoresis on SDS/PAGE using 2- mercaptoethanol, and 39 kD as estimated by amino acid analysis. But it was approximately two folds of this value and about 81kD according to gel filtration which means that the enzyme may be consist of two identical subunits.The optimum pH of the enzyme was 5,The enzyme was most stable at pH 4.5 to7 ,The optimum temperature of enzyme activity was 50 at optimum pH.The kinetic studies revealed that Michael's constant (*Km*) and Maximum Velocity (*Vmax*) values of the enzyme using polygalacturoic acid as substrate were 2.8 and 4.159 while they were 9.8 and 8.93when the pectin was used as substrate for the enzyme.The enzyme was found to be from Endopolygalacturonase type according to the results of Thin Layer Chromatography analysis for detection of the products obtained from treatment of polygalacturonic acid with the enzyme.

المقدمة:

تُعد الأنزيمات العوامل المساعدة الأساسية في تحفيز التفاعلات جميعها التي تجرى داخل الأنظمة الحيوية. وهي على درجة عالية من التنوع من حيث آلية عملها والتركيب والخواص وغيرها من الخصائص التي تميزها. ومنها الأنزيمات المحللة للبكتين التي تنتجها العديد من الكائنات الحية في الطبيعة ، كالنباتات مثلاً بغية تحليل البكتينات الداخلة في تركيب جدار خلاياها، وتحويرها جزئياً بطريقة تمنح أجزاء من النباتات في أثناء الإنضاج نسجه طرية. أما الأحياء المجهرية فتنتجها بهدف توفير مصادر الكاربون والطاقة لها من النباتات ومخلفاتها(3.23). وتعود درجة تنوع الأنزيمات المحللة للبكتين إلى درجة التعقيد العالية التي تتسم بها البكتينات نفسها وللأنزيمات المحللة للبكتين إستعمالات عديدة تتقدمها أستعمالها في تصفية العصائر وتنقيتها

من الشوائب، وفى إستخلاص الزيوت من النباتات وتخمير الشاي والقهوة وغيرها. وفى الوقت الحاضر ثمة عددٍ من الشركات المنتجة لها على نطاق تجاري، وبمواصفات تخدم الغرض من استخدامها أو تطبيقها، مستعينةً بالأحياء المجهرية كالبكتريا والاعفان(4,25).

ورغم أن إنتاج الأنزيمات المحللة للبكتين من الأحياء المجهرية وعلى نطاق تجاري قد قطع شوطاً واسعاً إلا أن التحري عن عزلات جديدة منتجة لها ، وبمواصفات خاصة، وعلى نحو أكثر وفرةً، يبقى مجالاً مفتوحا لجميع الذين يرمون الخوض فيه . وهذا ما يلاحظ من خلال مراجعة المصادر العلمية التي تكتظ بالأبحاث والدراسات عن الأنزيمات المحللة للبكتين(16,36)، والتي تركز في جانب مهم منها، على إنتاج أنزيمات بعينها من الأنزيمات المحللة للبكتين وتنقيتها وتوصيفها ودراسة الجينات المشفرة لها، بغية فهم أكثر عمقا للعوامل الوراثية والظروف البيئية التي تتحكم في التعبير عنها، للاستفادة منها في إنتاجها على نطاق تجاري بتكاليف رخيصة. قبل الشروع بدراسة صفات الانزيمات وخواصها الحركية لابد من تنقيتها حد التجانس،اى التخلص من المواد الموجودة مع الانزيم جميعها،تحاشيا للوقوع فى استنتاجات خاطئة.ولا تتحقق التنقية الاعبر مجموعة من خطوات متدرجة ومدروسة يُفترض أن تزداد خلالها فعالية الأنزيم النوعية فى كل خطوة(11) وهناك تقنيات متعددة لتنقية الانزيمات وعلى درجة عالية من التنوع إعتماداً على تخصص الانزيم للارتباط بمجموعة معينة .على ان تركيز الانزيم فى مستخلصه الخام بالتخلص من اكبر كمية من الماء يعد خطوة لابد منها لتقليص الحجوم وزيادة كفاءة التنقية.وهناك وسائل عدة لتحقيق ذلك منها للترسيب بالاملاح اللاعضوية والمذيبات والتجفيد والترشيح الفائق(6).ونظراً للتنوع الكبير في الأنزيمات المحللة للبكتين وتنوع الأساليب المتبعة في تنقيتها من هنا جرى التفكير في إنتاج أحد الأنزيمات المحللة للبكتين.وقد جاءت هذه الدراسة استكمالا لتلك الدراسات من خلال دراسة تنقية الانزيم وتوصيفه والمنتجة بطريقة تخمرات الحالة الصلبة باستخدام الفطر *TP4* *Aspergillus niger*المتحملة للحرارة

المواد وطرائق العمل:

1- انتاج واستخلاص الانزيم:

تم انتاج الانزيم Polygalacturonases من العفن *Aspergillu niger* TP4 وفقا للظروف المثلى وكما اشرنا لذلك فى دراستى(2,1) سابقة أستخلص الأنزيم من الوسط بإضافة 15 مليلتر ماء مقطر مع التحريك لمدة 30 دقيقة. رشح المستخلص خلال قطعة قماش من الململ النظيف، ثم نبذ مركزياً على سرعة 1000 دورة لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 5 مº. عد الجزء الرائق مستخلصاً خاما للأنزيم، قدرحجمه وفعالية الأنزيم فيه. وعبرت عن إنتاجية الوسط من الأنزيم كالاتي:

إنتاجية الأنزيم(وحدة/غم) = فعالية الأنزيم (وحدة/مليلتر)×حجم المستخلص(مليلتر) ÷ وزن الوسط (غم)

2- تركيز المستخلص الأنزيمى الخام:جرت عملية التركيز باسلوبين ،تمثل الاسلوب الاول باستخدام كبريتات الامونيوم بأضافة أوزان معينة منه تدريجياً إلى المستخلص الخام بدرجة 4 مº مع التحريك المستمر لبلوغ نسبة إشباع تراوحت بين 0-80 % . نبذ المحلول بعد كل مرحلة من مراحل الإضافة على سرعة 8000 دورة لمدة 15 دقيقة بدرجة 4 مº. فصل الرائق وذوب الراسب في أقل كمية من محلول خلات الصوديوم الدارئ وبتركيز0.1 مولار ورقم هيدروجيني 5 .ثم قدرت فعالية الأنزيم وتركيز البروتين في المحلول.أما الاسلوب الثانى فقد تمثل بالتركيز بالكحول الاثيلى .أضيفت حجوم معينة من الكحول الاثيلى المبرد الى المستخلص الخام للأنزيم تدريجياً مع التحريك المستمر للحصول على نسبة مئوية من الكحول تراوحت بين 30-80 % . وفصل الرائق بالطرد المركزي وذوب الراسب المتكون في كل مرحلة من مراحل أضافة الكحول في كمية من محلول خلات الصوديوم ثم قدرت فعالية الأنزيم وتركيز بروتين في المحلول.

3- أزالة الأملاح desalting:

أ- تهيئة عمود السيفادكس Sephadex G-25:حضر هلام السيفادكس Sephadex G-25 حسب تعليمات الشركة المجهزة (Pharmacia Fine Chemicals) بتعليق 20 غم من الهلام في 2.5 لتر من الماء وسخن العالق في حمام مائى بدرجة 90- 85مº لمدة ساعة واحدة مع التحريك المستمرة وبهدوء ثم ترك بدرجة 7مº لليوم التالى. رشح الهلام وغسل في محلول خلات الصوديوم الدارئ برقم هيدروجيني 5 بتركيز0.1 مولار مرتين بالتعليق و بالترشيح وأخيراً علق بكمية مناسبة من المحلول نفسه وفرغ من الغازات (Degassing) وعبأ في عمود ليعطى هلاما بأبعاد (1.5×4) سم. ثم تمت موازنته بمحلول خلات الصوديوم الدارئ المذكور.

ب-إضافة الأنموذج الأنزيمى الخام:

مرر المحلول الأنزيمى الخام المركز من خطوة الترسب بالكحول على سطح العمود بهدوء مع محلول خلات الصوديوم الدارئ وبرقم هيدروجيني 5 وبتركيز 0.05 مولار جمعت الأجزاء بمعدل 3 مليلتر لكل أنبوبة وجمعت الأنابيب الحاوية على الفعالية الأنزيمية و قدر الحجم الكلى للأجزاء الحاوية على الفعالية قدرت فعالية الأنزيم مع تركيز البروتين فيه.

4- تنقية الانزيم

أ- الطريقة الاولى :واشتملت على خطوتين هما:

اولاً :<u>كروماتوكرافيا التبادل الايونى</u>:بعد موازنة عمود التبادل الأيونى مرر المحلول الأنزيمى المركز بطريقة الكحول على سطح العمود بهدوء، غسل العمود بمحلول دارئ Tris-Acetat بتركيز25 ملى مولار ورقم هيدروجينى 7 لإنزال البروتينات غير المرتبطة وجمعت الأجزاء بمعدل 3 مليلتر لكل أنبوبة حتى إنخفاض الامتصاصية الى الخط الصفرى Base line .جرت عملية الإسترداد للبروتينات المرتبطة بالمبادل بإستعمال المحلول نفسه والحاوى على تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم تراوحت بين(0-1) مولار ،وتمت متابعة البروتين في الأجزاء المستردة بقياس الإمتصاصة على طول موجى 280 نانومتر وتقديرالفعالية الأنزيمية فيها . وبناء على النتائج المستحصل عليها تم جمع الأجزاء التي ظهرت فيها الفعالية الأنزيمية وقدرت

تركيز بروتين وركـــزت بـمرشحات الطرد المركزي centrifugal filterk Devices (Amicon) ،التي تسمح بعبور المركبات ذات الأوزان الجزئية أقل من 10 آلاف دالتون.

ثانياً- كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي:

مرر المحلول الأنزيمى المركز بعد خطوة التبادل الأيوني من هلام Sephacryl S-300 المجهز من شركة سكما حسب تعليماتها. وأجريت عملية الموازنة والإسترداد بمحلول الدارئ Tris– Acetat بتركيز10 ملى مولار وبرقم هيدروجيني 7 وبسرعة جريان 20 مليلتر /ساعة بواقع 3مليلتر للجزء الواحد .تمت متابعة البروتين فى الأجزاء المفصولة بقياس الإمتصاصية عـلى طول موجى 280 نانومتر فضلا عن تقديرالفعالية. جمعت الأجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها ثم ركـــز في أنبوبة الـــتركيز بمرشحات الطرد المركزي Amicon .

ب - الطريقة الثانية طريقة ألجينات الصوديوم:

أجريت عملية التنقية هذه بالإعتماد على الطريقة المذكورة في (29) من خلال الخطوات المذكورة أدناه ،علما بان هذه الطريقة قد أستخدمت لتنقية الانزيم المنتج على الوسط الساند الصناعى الممثل بقطعة الاسفنجة بابعاد معينه(بحث قيد النشر)

5- توصيف الانزيم:تم اجراء الترحيل الكهربائى لغرض تحديد نقاوة الانزيم وتقدير الوزن الجزئيى بطريقة الترحيل الكهربائى فضلا عن طريقة الترشيح الهلامى وطريقة تحليل الحوامض الامينية وبعدها تم تحديد درجة الحرارة المثلى للفعالية ودراسة الثبات الحرارى ودراسة الرقم الهيدروجينى الامثل للفعالية ودراسة الرقم الهيدروجينى للثبات وتمت دراسة الثوابت الحركية،وشملت Vmax وKm بعدها تم دراسة تاثير الأيونات الفلزية في فعالية الأنزيم والكشف عـــن عـمل الأنزيم.

النتائج والمناقشة

أجريت مجموعة من التجارب الأولية لتجزئة بروتينات المستخلص الخام لتركيز أنزيم البكتنيز بإستخدام كل من كبريتات الأمونيوم والكحول الأثيلى بغية تعيين حدود الكميات الواجب إضافتها من هذه المواد إلى المستخلص لترسيب أكبر كمية من الأنزيم وبأعلى فعالية كخطوة أولـية في عملية التنقية. ويوضح الجدول(١)

جدول (١): كفاءة كبريتات الأمونيوم والكحول الأثيلي فى تركيز أنزيمات polygalacturonase المنتج من TP4 *niger* *Aspergillus* بإستخدام تخمرات الحالة الصلبة

الخطوة	الحجم مل	الفعالية الأنزيمية وحدة/مل	تركيز البروتين ملغم/مل	الفعالية النوعية وحدة/ملغم	الفعالية الكلية (وحدات)	الحصيلة %	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام كبريتات الامونيوم بين نسبتى الاشباع 50 – 80 %	150 40	120 104	4.19 3.44	28.64 30.23	18000 4160	100.0 23.11	1.00 1.06
المستخلص الخام الكـــحول الاثيلى بين نسبتى الاضافة 50-70%	80 24	120 240	4.19 3.18	28.64 75.47	9600 5760	100 60	1.00 2.64

حصيلة هذه التجارب، إذ تبين أن أعلى فعالية نوعية أمـكن الـــحصول عليها بـــكبريتات الأمونيوم للأنزيم الخام المستحصل عليه بإسلوب تخمرات الـــحالة الصلبة على وسط نخالة الـــحنطة كـــانت 30.23 وحـــدة /ملغم مابين نسبتي الإشباع 50 % إلى 80 % وهي أعلى بقليل من الفعالية النوعية للمستخلص الخام والبالغ 28.64 وحدة /ملغم .وهذا يعنى أن عدد مرات التنقية للأنزيم المركز بكبريتات الامونيوم وبنسب الإشباع المذكورة كانت 1.06 وبحصيلة مقدارها 23.11 % .في حين كانت الفعالية النوعية 75.47 وحدة /ملغم للأنزيم المركز بالكحول الأثيلى عـــند رفـــع نسبته في رائـــق المستخلص الـــخام مـــن 50 % إلى 70 % مـــقابل 28.64 وحدة / ملغم في المستخلص الخام .عليه فان عدد مرات التنقية الذي تحقق ما بين النسبتين المذكورتين من الكحول الأثيلى بلغ 2.64 وبحصيلة مـــقدارها 60%. لذا اعتمد ترسيب الأنزيم وتركيزه بالكحول الأثيلى من مستخلصه الخام كخطوة أولى من خطوة التنقية وعلى مرحلتين، في الأولى أضيف الكحول الأثيلي إلى المستخلص الخام بتركيز 50% ،أهمل الراسب المتكون بعد النبذ المركزي، ثم رفع تركيز الكحول في الرائق إلى 75% بدلا من 70% إمعانا في ترسيب الأنزيم ، وجمع الراسب بإذابته في أقل كمية من دارئ الخلات بتركيز0.1 مولار وبرقم 5 لإستعماله فـــى الـــمراحل اللاحـــقة مـــن الـــتنقية بـــالـــطريقة الأولـــى. وعلى الرغـــم من أن العديد مـــن الـــباحـــثين (15,6) استخدموا كبريتات الأمونيوم بنجاح في تركيز أنزيمات البكتنيز المنتج من الأحياء المجهرية سواء بأسلوب تخمرات الحالة الصلبة اوأسلوب المزارع المغمورة، ألا أن البعض منهم أكد كفاءة التركيز بالمذيبات العضوية مثل الكحول مقارنة مع كبريتات الامونيوم.

تنقية الأنزيم:

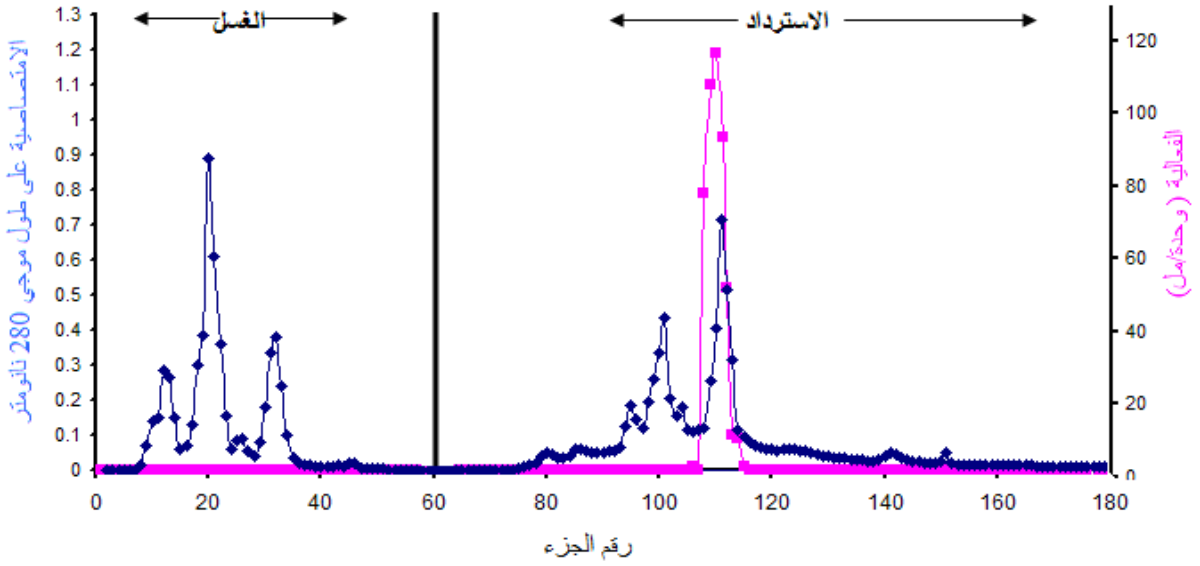
1: طريقة التنقية الأولى:

تضمنت هذه الطريقة ترسيب الأنزيم وتركيزه بالكحول الأثيلي، مع إجراء عملية إزالة الأملاح بإستعمال عمود السيفادكس Sephadex G-25 ثم إمراره في عمود المبادل الأيوني DEAE- Sepharose الموازن بمحلول Tris-Acetat الدارئ بتركيز25 ملى مولار ورقم هيدروجيني7 وإسترداد الأجزاء المرتبطة بالمبادل بتراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم تراوحت بين 0-1 مولار (شكل١). ومن ثم تركيز الأجزاء المحتوية على فعالية عالية وترشيحها في عمود هلامي من Sephacryl S-300 (شكل ٢).ويوضح الجدول (٢) أن عدد مرات التنقية وحصيلة الأنزيم التي أمكن الحصول عليها بعد خطوة ترسيب الأنزيم بالكحول الأثيلي بين نسبتي الإضافة (50-75%) كانت 3.26 و60 % على التوالى. أرتفع عدد مرات التنقية إلى 6.03 وإنخفضت الحصيلة إلى 45 % بعد خطوة كروماتوكرافيا التبادل الايونى. ولوحظ خلو الأجزاء غير المرتبطة بالمبادل (أجزاء الغسيل) من الفعالية تماما، مما يؤكد إرتباط الأنزيم بالمبادل الايونى السالب وإن محصلة الشحنات المحمولة على الأنزيم في الظروف المستخدمة هي شحنات سالبة .

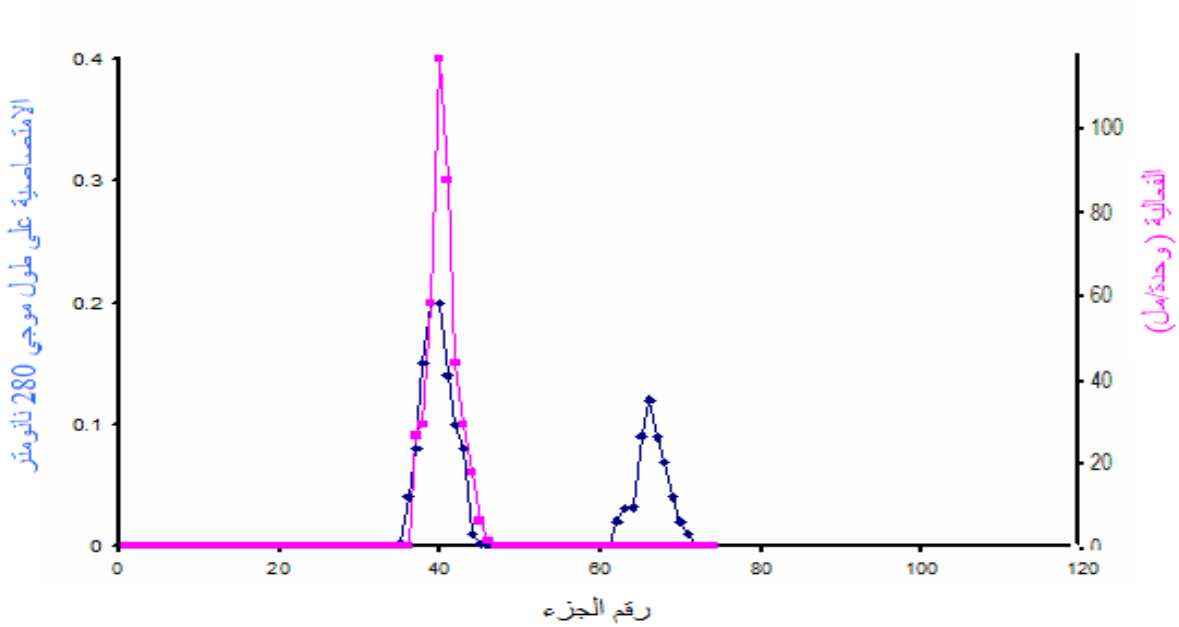
جدول(٢): خطوات تنقية أنزيم (polygalacturonase (PGase المنتج من العزلة *Aspergillus niger* TP4 بإستخدام تخمرات الحالة الصلبة (نخالة الحنطة)

الخطوة	الحجم مل	الفعالية الأنزيمية وحدة/مل	تركيز البروتين ملغم/مل	الفعالية النوعية وحدة/ملغم	الفعالية الكلية (وحدات)	الحصيلة %	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام	150	120	4.25	28.2 4	9600	100	1.00
الكحول الاثيلى 50 - 75%)	24	240	2.61	91.95	5760	60	3.26
التبادل الايونى بمبادل DEAE- Sepharose	54	80	0.47	170.21	4320	45	6.03
الترشيح الهلامى بعمود Sephacryl S-300	48	60	0.18	333.33	2880	30	11.80

وجاءت خطوة الترشيح الهلامي بعد خطوة التبادل الأيوني لإستكمال تنقية الأنزيم، فإرتفع عدد مرات التنقية إلى 11.80مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها 30 %. ولوحظ ظهور قمتين للبروتين في الأجزاء المستردة من الهلام (شكل 1) حيث كانت الفعالية متركزة في القمة الأولى. أما القمة الثانية فكانت خالية تماماً من الفعالية، وكانت منفصلة بصورة جيدة عن القمة الأولى التي جمعت أجزاءها وركزت بطريقة الطرد المركزي. واستخدمت في التأكيد من نقاوة الأنزيم بالترحيل الكهربائي ودراسة خواصه المختلفة.



شكل(1):كروماتوكرافيا التبادل الأيوني لتنقية الأنزيم polygalacturonaseمن العفن *Aspergillus niger* TP4 بإستعمال المبادل ألايوني DEAE-Sepharose



شكل(2): الترشيح الهلامي لتنقية أنزيم Polygalacturonase من العفن *Aspergillus niger* TP4 بإستعمال عمود Sephyacryl S-300

طريقة التنقية الثانية:

أتبعت طريقة ثانية للتنقية بإستعمال آلجينات الصوديوم ويوضح الجدول (٣) أن عدد مرات التنقية وحصيلة الأنزيم التي أمكن الحصول علىها بعد خطوة إسترداد الأنزيم من المعقد كانت 14 مرة و 86 % على التوالي. ويعود سبب الحصول على حصيلة عالية من الأنزيم بهذه الطريقة إلى احتمالية أحتواء مستخلصه الخام على عدد محدود من البروتينات الغريبة لأن عملية إنتاج الأنزيم قد تم في وسط لا يحتوي من المركبات العضوية غير حامض الكالاكتيورونيك المتعدد كمادة أولية للإنتاج وكمادة حاثة . ويذكر أن (17) قد تمكن من تنقية أنزيم polygalacturonase من المستحضر التجاري لأنزيمات البكتنيز والذي يحمل تسمية Pectinex Ultra-SPLوبطريقة الآلجينات والحصول على حصيلة بلغت 83 % وبعدد مرات تنقية قدرت بـ 20 مـرة. أما(18) فقد نقى الانزيم من مستحضر تجاري آخر هو Pectinex Ultra-SPLأيضا و بأسلوب كروماتوكرافيا الألفة وبإستعمال آلجينات الكالسيوم فكانت الـحصيلة الأنزيمية 85 % . وأما(29) فقد أستطاع من تنقية الأنزيم من Pectinex Ultra-SPL بإستخدام آلجينات الصوديوم بحصيلة بلغت 96 % وبعدد مرات تنقية 16 مرة.

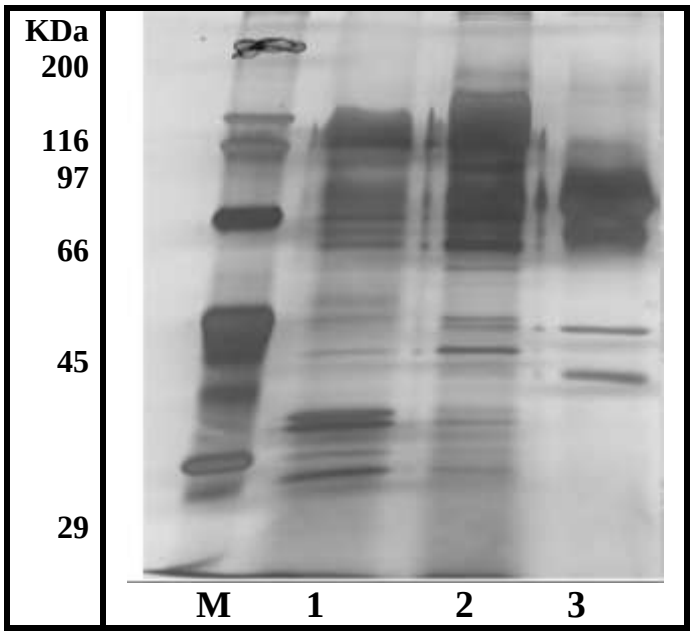
جـدول (3): تـنقية أنـزيم (Polygalacturonase (PGase الـمنتج مـن الـعزلة *Aspergillus niger TP4* بطريقة الوسط الساند الصناعي (قطعة أسفنج) بإستعمال آلجينات الصوديوم

الخطوة	الفعالية الأنزيمية وحدة /مل	تركيز البروتين ملغم /مل	الفعالية النوعية وحدة/ملغم	الحصيلة %	عدد مرات التنقية
المستخلص الأنزيمي	167	0.55	304	100	1
الجزء المسترد من معقد آلجينات الصوديوم	91	0.02	4550	86	14

التأكد من نقاوة الأنزيم:

أستعمل الترحيل الكهربائي بوجود العوامل الماسخة SDS لتعين نقاوة الأنزيم خلال المراحل المتعاقبة من خطوات التنقية للأنزيم المنتج بطريقة تخمرات الحالة الصلبة باستخدام نخالة الحنطة . ويوضح الشكل (شكل3) أن المستخلص الأنزيمي ما بعد المرحلتين الأولى والثانية من التنقية والمتمثلة بالترسيب بالكحول الأثيلي والتبادل الأيوني ما زالت تحتوي على بعض البروتينات ذات الأوزان الجزيئية العالية أو القريبة من الوزن الجزيئي للأنزيم. بينما يوضح الشكل(4) نتائج الترحيل الكهربائي

للأنزيم المنقى بطريقة آلجينات الصوديوم وكذلك من المرحلة الأخيرة المتمثلة بالترشيح الهلامي بطريقة التنقية الأولى فى هلام متعدد أكريل أمايد بوجود SDS بعد معاملته بـ Mercaptoethanol -2 ومقارنتها مع البروتينات القياسية . إذ يلاحظ ظهور حزمة واحدة للأنزيم في كلتا عملتي التنقية مما يؤكد نقاوته حد التجانس. علماً بأن عملية التنقية بإستعمال ألجينات الصوديوم قد نفذت على الأنزيم المنتج على الوسط الساند الصناعي المتمثل بقطعة الإسفنج بينما نفذت الطريقة الأولى على الأنزيم المنتج بطريقة تخمرات الحالة الصلبة بأستعمال نخالة الحنطة وسطاً للإنتاج. ويلاحظ من الشكل كذلك وضوح حزم الأنزيم المنقى بطريقة الآلجينات مقارنة بحزمة الأنزيم المنقى بالطريقة الأخرى وذلك بسبب الحصيلة العالية للأنزيم في الحالة الأولى (الجدول2).

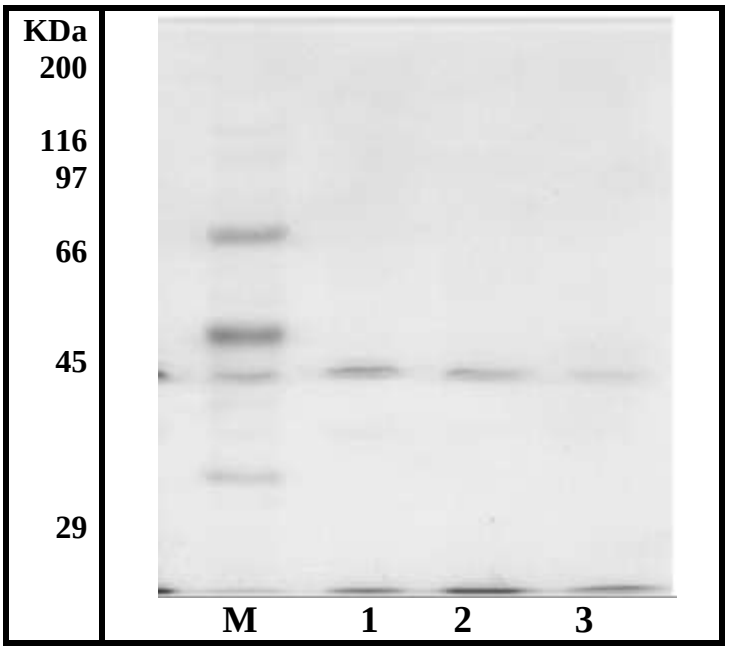


شكل (3):الترحيل الكهربائي لأنزيم Polygalacturonase في هلام متعدد أكريل أمايد بوجود SDS خلال المراحل المختلفة من التنقية:
1 –أنموذج المستخلص الخام 2 –أنموذج بعد عملية الترسب بالكحول الاثيلى 3 –أنموذج المسترد بعد التبادل الأيوني . أما M فيمثل البروتينات القياسية

توصيف الأنزيم:

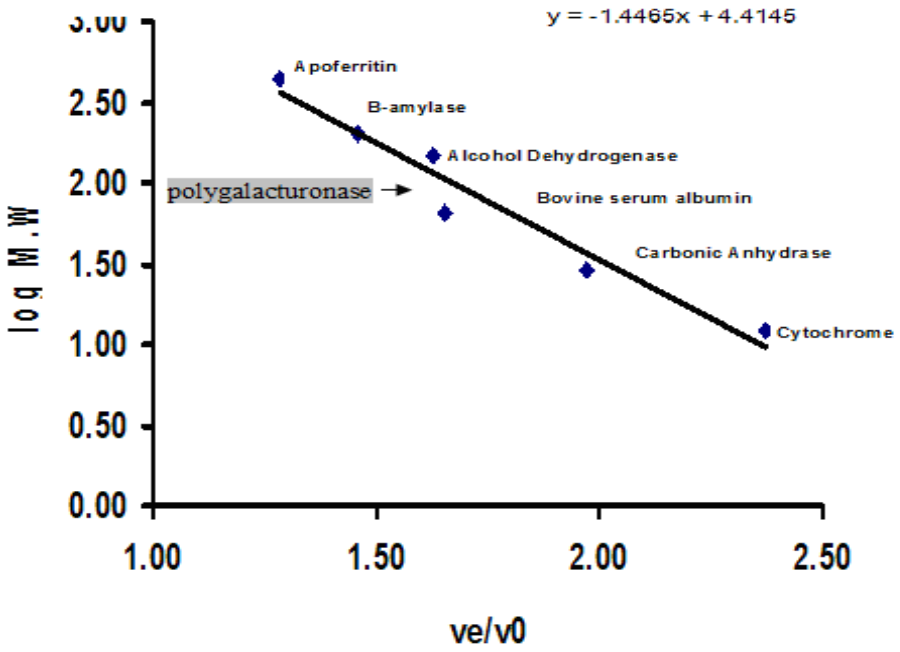
الوزن الجزيئي للأنزيم:

قدر الوزن الجزيئي للأنزيم بثلاث طرائق وهى طريقة الترشيح الهلامي وطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS (SDS-PAGE) وطريقة تحليل الحوامض الأمينية وقد تبين أن الوزن الجزيئي بالطريقة الأولى (الشكل٥) يبلغ 81 كيلو دالتون وبالطريقة الثانية (الشكل4 و الشكل6) يبلغ 41 كيلو دالتون. أما وزنه الجزيئي بتحليل مكوناته من الأحماض الأمينية بطريقة HPLC فكانت 39 كيلو دالتون. ولابد من الإشارة أن تحليل الأحماض الأمينية قد تم في ظروف حامضية مما حال دون تشخيص الأحماض الأمينية التي تتحلل في هذه الظروف. عليه فإن تقدير الوزن الجزيئي بهذه الطريقة تعد تقريبياً ومحسوباً على أساس 18 حامضاً فقط. من هنا يمكن إعتبار هذه النتيجة مقاربة للنتيجة التي تم الحصول عليها بطريقة الترحيل الكهربائي والبالغة 41 كيلودالتون. على أن تقدير الوزن الجزيئي بطريقة الترشيح الهلامي يعطي مؤشراً آخر عن الأنزيم، وهو أن الأنزيم قد يكون مؤلفاً من وحدتين ثانويتين متماثلتين بدلالة أن وزنهما الجزيئي بلغ معاً 81 كيلودالتون وهو ضعف الوزن الجزيئي المقدر بطريقة الترحيل الكهربائي و تحليل الأحماض الأمينية تقريباً، لا سيما أن ملاحظة التباين في الوزن الجزيئي لأنزيم ما عند تقديره بأكثر من طريقة واحدة تكاد تكون امراً مألوفاً فقد قدر كل من (25,20,18,16,7)

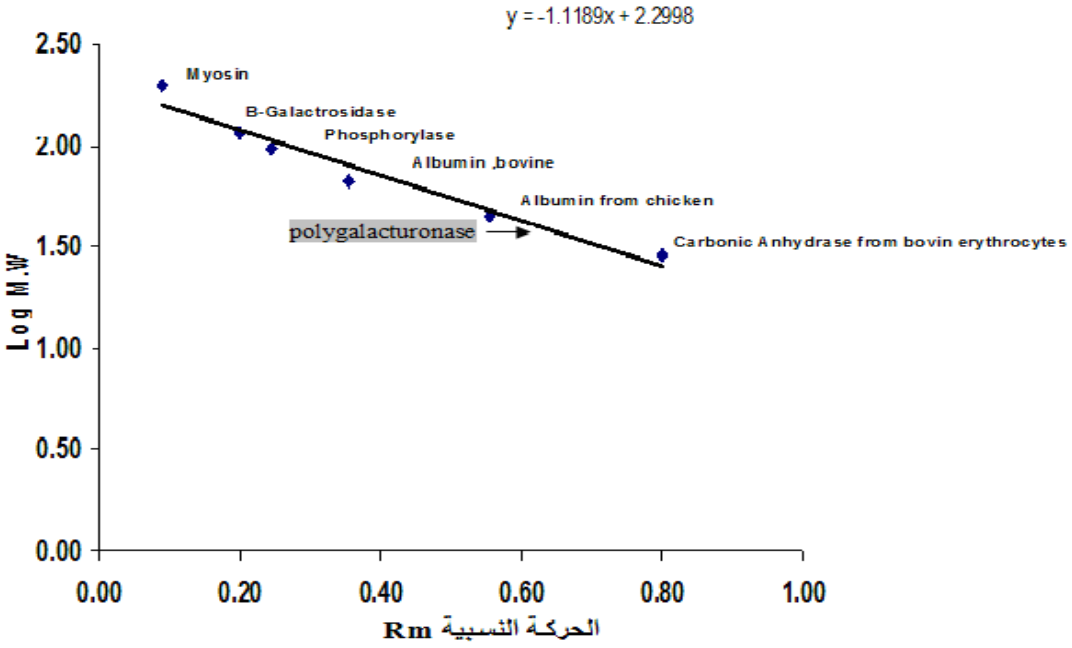


شكل(٤):الترحيل الكهربائي لأنزيم Polygalacturonase في هلام متعدد أكريل أمايد بوجود SDS مقارنة مع البروتينات القياسية لتقدير الوزن الجزيئي والتأكد من النقاوة :
2,1تمثل الاجزاء المستردة من طريقة التنقية بآلجينات الصوديوم، 3 الأجزاء المستردة من الترشيح الهلامي بطريقة التنقية الأولى

الوزن الجزئيي لانزيم PGase بحوالى 43 ،41 ،35،29 ،42 كيلو دالتون على التوالى بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS ووجد الباحث(6) أن الوزن الجزيئي للأنزيم Endopolygalacturonase المنقى من عفن *Aspergillus niger* هو 35 كيلو دالتون مقدراً بالطريقة نفسها.



شكل (5) :تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم polygalacturonase من العفن *Aspergillus niger* TP4 بطريقة الرشيح الهلامي



شكل (6) تقدير الوزن الجزيئي polygalacturonase من العفن *Aspergillus niger* TP4 بطريقة الترحيل الكهربائي بوجودSDS

الخواص الفيزيائية للانزيم :

يوضح الجدول (5) بعض الخواص للانزيم وهى الرقم الهيدروجينى للفعالية والثبات ودرجة الحرارة المثلى وثبات الانزيم

جدول (5)بعض الخواص الفيزيائية للانزيم

الخواص	القيمة
الرقم الهيدروجينى الامثل	5
الرقم الهيدروجينى لثبات الانزيم	7.5-3.5
درجة الحرارة المثلى	50Cº
الثبات الحرارى للانزيم	50-25 Cº

درس تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل بين 3-7 بفارق نصف درجة من وسط إلى آخر ولوحظ من أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم هو 5 وانخفضت الفعالية بالإبتعاد عن هذه القيمة زيادة أو نقصاناً.ويأتي هذا الانخفاض في فعالية الأنزيم من تأثيرالرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في مجاميع معينة قابلة للتأين والموجودة ضمن تركيب الأنزيم وفى المواد الأساس(37) فقد ذكر أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم من عدد مختلف من المصادر الفطرية يقع بين 3.8-6.5 بينما وجد(32) أن الرقم الهيدروجيني الامثل لأنزيم Polygalacturonase لعدد أخر من المصادر الفطرية يقع ما بين 2.5-6 . بينما لاحظ (19) أن الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الأنزيم نفسه من *Monilla sp* هو 4.5.اما الرقم الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الأنزيم فقد تم تعينها من بحضنه مدة 30 دقيقة في محاليل دارئة تراوحت أرقامها الـهيدروجينية ما بين3.5-7.5 ثم قياس فعاليته .وعبرت عن ثبات الأنزيم تجاه الارقام الهيدروجينية المختلفة بالنسبة المئوية للفعالية المتبقية وأظهرت النتائج المبينة في الجدول أن الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الأنزيم تتراوحت بين 4.5 -7 ولوحظ احتفاظ الأنزيم بـ 42.33 % من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني3.5 في حين أحتفظ بما يربوا من 39.43 % عند الرقم الهيدروجيني 7.5 ، وقد يعزى هذا الانخفاض إلى تأثير الرقم الهيدروجيني في تغير التركيب الثانوي والثلاثي لجزئية الأنزيم وتغير هيئة الموقع الفعال وإن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم والذي يعد معيار مهماً لتحديد ظروف تنقية الأنزيم وخزنه يتوقف على عدة عوامل منها نوع الأنزيم ومصدره (27).

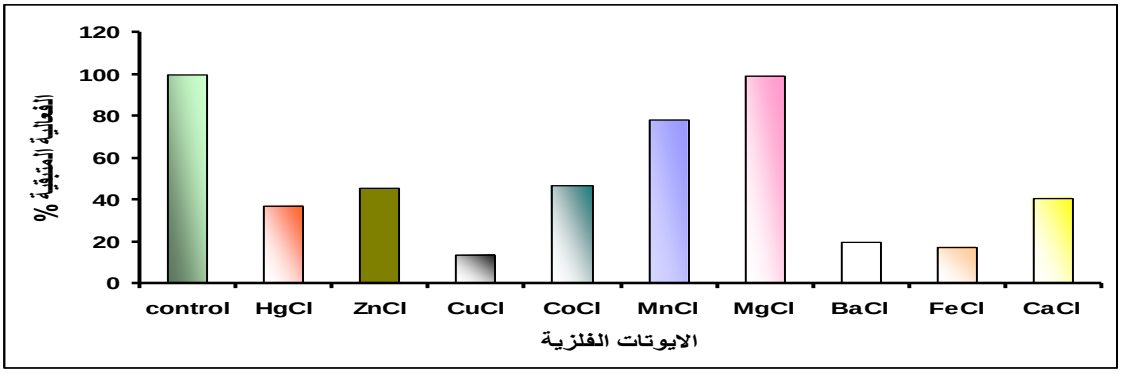
وقـد وجـد(31), أن أنزيم polygalacturonase مـن العـفن *Penicillium viridicatum* يحافظ على 90 % من فعاليته بعد حضن الأنزيم عند مدى من الأرقام الهيدروجينية تقـع بين5-8، بينما وجـد (14) أن الرقم الهيدروجيني لثبات polygalacturonase من *Thermoascus aurantiacus* يتراوح بين 5.0-5.5 وأن الأنزيم يحتفظ بحوالى 33 % من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 9 بعد مدة حضن بلغت 24 ساعة

كما يوضح الجدول (7) درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم التى درست بين 30-80 مº. إزدياد فعالية الأنزيم مع زيادة درجة الحرارة وبلغت أقصاها عند درجة حرارة 50مº ويعزى سبب زيادة سرعة التفاعلات الأنزيمية مع إرتفاع درجة الحرارة لحد معين إلى زيادة التصادمات بين جزئيات الأنزيم والمادة الأساس نتيجة لزيادة الطاقة الحركية للجزيئات (27) فيما تسبب درجات الحرارة العالية إنخفاضا في الفعالية بسبب إحداثها مسخاً في الأنزيم جزئياً أو كلياً جراء ما يطرأ من تغيير في تركيب الأنزيم وهيئته الفراغية وهيئة الموقع الفعال.

وتتباين درجات الحرارة المثلى لأنزيم polygalacturonase بتياين مصدر الأنزيم. فقد أشار (15,8) درجـة الـحرارة الـمثلى لأنـزيم polygalacturonase الـمستخلص مـن *A. sojae* و*T. reesei* و*A. niger* هي 40 مº .

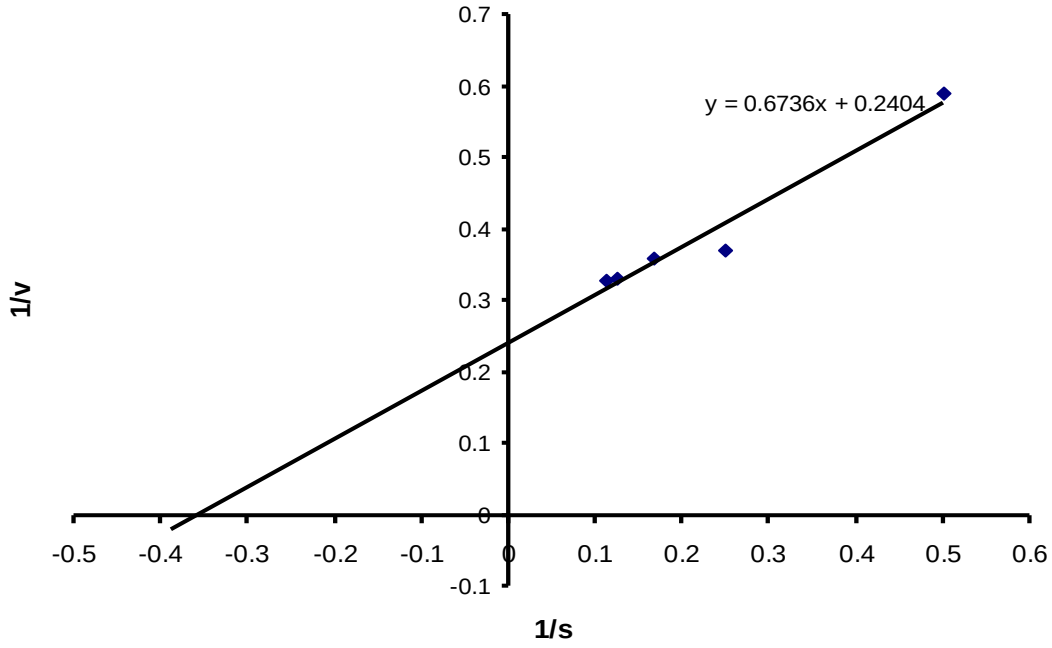
علما أن الثبات الحراري للأنزيم الذي درس بين 20- 80 مº مدة 15 دقيقة وعلى الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الأنزيم . فقط ثبت أنه يتراوح بين 20-50 مº ، أخذت بعدها الفعالية بالانخفاض تـدريجيا عـند رفـع درجة الحرارة إلى 60 مº. أذ إحـتفظ الأنـزيم بحوالى 59 % من فعاليته عـند الـدرجة هـذه ، وبـحوالى 10 % عـند 70 مº . ويذكر أن (34) قـد وجـد أن أنزيم polygalacturonase المنتج مـن الـعفن *Aspergillus niger* يـحتفظ بفعالـيته على درجـة حـرارة 35 مº ثم تبـدأ الـفـعالية بالتدهور مـع إرتفـاع درجـة الـحرارة عـن 40 مº حـيث يفـقد الأنزيم 45% من فعاليته ،بينـما وجـد (28)أن الأنزيم endopolygalacturonase مـن العفن *Aspergillus giganteus* يفقد 50% من فعاليته على درجة حرارة 50 مº .في حين تسببت تعريض الأنزيم لدرجة حرارة65 مº لـمدة 5 دقائق إلى دنترة سريعة للأنزيم مع احتفاظه بنسبة فعالية تصل إلى 9.5 % (21) كما تمت دراسة تأثير بعض الأيونات الفلزية في فعالية الأنزيم:أذ لوحظ (شكل 7) أنخفاض فعالية الأنزيم جراء حضنه مع كلوريد النحاس وكلوريد الحديد وكلوريد الباريوم وبتركيز 10 ملى مولار بيد أن اعلى مستوى للتثبيط ظـهر بتأثير كـلوريد النحاس فـقد ثبط الأنزيم بنسبة 87 % ، بينما لوحظ أن ايونات الكوبلت والخارصين والمنغنيز تسبب تثبيطا بدرجات متفاوتة بتركيز 10 مولار.أما كلويد المغنيسيوم فلم يلاحظ لها أي ثاثير تثبيطي بتركيز 10 ملي مولر.فقد ذكر (25) ,أن أيونات الفضة والمنغنيز تعمل على زيادة فعالية أنـزيمPolygalacturonase بدرجات متفاوتة بتركيز1 ملى مولار ولاحظ (12) أن أيـونات الكـالسيوم والمنغنيز تـعمل على تثبيط فعالية الأنـزيم المستحصل عليه مـن *S. sclerotiorum.* ووجد (22). أن أيونات المغنيسيوم والكالسيوم تسبب تثبيطاً في فعالية Polygalacturonase بدرجات متفاوته فقد كانت نسبة تثبيط لايون الكالسيوم 12 % بينما كانت نسبة التثبيط لايون المغنيسيوم 33 % ، كما وجد(16) أن لايونات ثنائية التكافؤ عند تركيز 1 ملى مولار تاثير مثبط وبدرجات متفاوتة على فعالية أنزيم Polygalacturonase من عفن *Trichoderma harzianum*ماعدا أيون الزئبق فقط ثبط كامل الفعالية ،كما تم تسجيل تأثير مشابه لعد من الأيونات في فعالية أنزيم Polygalacturonase من بكتريا *Bacillus* حيث وجد (10) أن أيـونات Cu^{+2}، Ni^{+2}، Zn^{+2} فـعلاً مثـبطاً تجاه الأنـزيم Polygalacturonase ، ولأحـظ (25) ان فـعالية أنـزيم Endopolygalacturonase مـن عـفن *Mucor*

rouxii تــزداد بـفعل Mn^{+2} مقارنة بالايونات ثنائية التكافؤ الآخرى مثل Co^{+2}، Mg^{+2} ، Cu^{+2}، Fe^{+2} فــي حين يــحفز كلــوريد الـــزئبق زيادة فــعالية الأنزيم مــن العــفن*Aspergillus niger* بــمقدار3.4 مـــرة(26). في حين لاحظ (35) أنخفاض في فعالية أنزيم Polygalacturonase بنسبة 5-15 % عند أضـافة أملاح Mn^{+2}، Co^{+2}، Mg^{+2} الى محلول التفاعل ،بينما تسببت الاملاح ثنائية التكافؤ Fe^{+2}، Zn^{+2} في أنـخفاض الفعالية بنسبة 27-31 % بتركيز 1ملى مولار

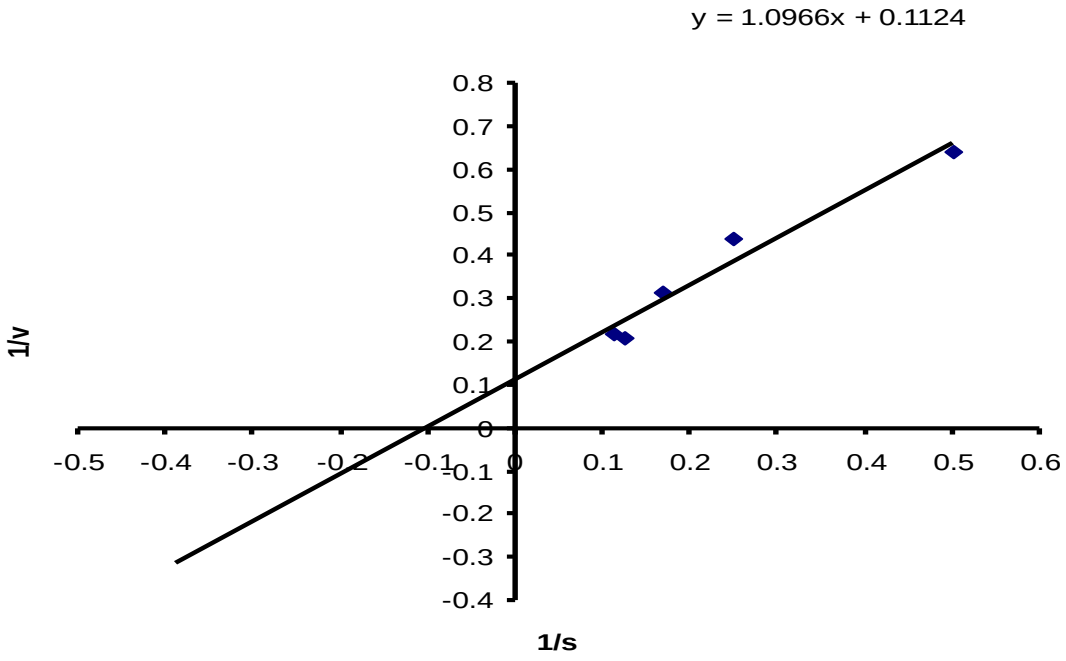


شكل(7) تأثير الأيونات الفلزية في أنزيم Polygalacturonase المنتج من العفن*Aspergillus niger* TP4

فى حين يوضح الشكل(8),(9) قيم الثوابت الحركية للأنزيم المنقى المنتج في هذه الدراسة وهى ثابت ميكالس *Km* والسرعة القصوى *Vmax* تجاه مادتين أساسيتين هما بكتين التفاح وحامض الكالاكتيورونيك المتعدد والتي استخرجت من رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتراكيز المواد الأساس المذكورة باستخدم طريقة Lineweaver-Buk plot .ويتبين من الشكل المذكور أن ثابت ميكالس تجاه حامض الكالاكتيورونيك المتعدد يبلغ 2.8 ملغم /مليلتر وهو أوطأ من ثابت ميكالس تجاه بكتين التفاح البالغ 9.8 ملغم/مليلتر، مما يدل على الآلفة العالية للأنزيم للارتباط بحامض الكالاكتيورونيك المتعدد أما قيمة *Vmax* للأنزيم باستخدام المادة الاساس حامض الكالاكتيورونيك المتعدد وبكتين التفاح فكانت 4,89 و9.27 مايكرومول/ دقيقة وعلى التوالي،وقد ذكرت المصادر ثابت ميكالس لأنزيم Polygalacturonase بقيم مختلفة ولعل ذلك يعود إلى مصدر الأنزيم وظروف التجربة فقد وجد (6) إن قــيمة Km و Vmax لأنزيم Polygalacturonase الــمستخلص مـن عـفن (SA6) *Aspergillus niger* كـانت 2.74 ملغم /مليلتر، في حـين وجد (8) أن قيمة ثابت ميكالس لنفس الأنزيم كانت 0.8 ملغم/مليلتر ووجـــد (32)أن قيـــمة *Km* و*Vmax* للأنزيم Polygalacturonase من عفن *Fusarium moniliforme* كـانت 0.12 ملغم/مليلتر و111.1 مايكرومولار/دقيقة.وذكر(16),Mohamed *et al*. أن ثابت ميكالس والسرعة القصوى لأنزيم polygalacturonase من العزلة *Trichoderma harzianum* بلغت1.42 ملغم/مليلتر و0.66مايكرومول/دقيقة.أن تباين قيم الثوابت الحركية لايعود إلى نوع الأنزيم ومصدره فحسب وإنما إلى ظروف تقدير الفعالية أيضا عند استخدام الأنزيم من المصدر ذاته كالرقم الهيدروجيني ودرجة حرارة التفاعل فضلاً على نوع الدارئ وقوته الأيونية مع اختلاف في الطرائق المستخدمة عند رسم المنحنيات للحصول على قيم هذا الثابت.



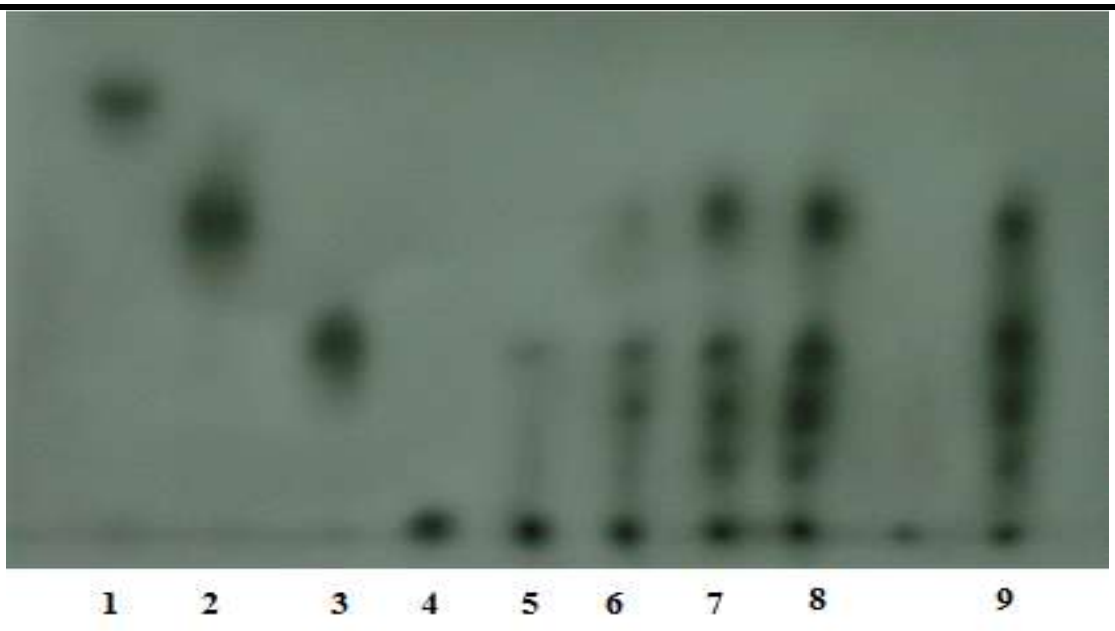
شكل(9) منحنى Lineweaver-Burk لتقدير ثابت ميكالس(*Km*) والسرعة القصوى (*Vmax*)لأنزيمpolygalacturonase اتجاه مادة التفاعل حامض الكالاكتيورونيك المتعدد



شكل (10): منحنى Lineweaver-Burk لتقدير ثابت ميكالس(Km) والسرعة القصوى(Vmax) لأنزيم polygalacturonase تجاه مادة التفاعل بكتين التفاح

كما أعتمدت طريقة كروماتوكرافيا الــطبقة الرقيــقة TLC للتعرف على أسلوب تحليل أنزيم Polygalacturonase لمادته الأساس المتمثلة بحامض الكالاكتيورونيك المتعدد فيما إذا كان التحليل طرفياً بمعنى أنه يحلل الحامض المذكور من الأطراف مع تكوين حامض الكالاكتيورونيك الأحادي أو الثنائي ومثل هذه الأنزيمات تسمى Exopolygalacturonase أوانه يقوم بكسر الأواصر بين وحدات المادة الأساسية بطريقة عشوائية ومن داخل الجزيئة، وهذا النوع من الأنزيمات تسمى Endopolygalacturonase

ويلاحظ من الشكل(11) أن الأنزيم يحلل المادة الأساس بطريقة عشوائية.إذ يلاحظ أن كمية نواتج التحلل تتوضح بعد مرورساعة تزداد مع إطالة زمن التفاعل الأنزيمي و تشتمل على حامض الكالاكتيورونيك المتعدد وبأطوال مختلفة مع ظهور كميات محدودة من حامض الكالاكتيورونيك الثنائي بعد مرور ساعة واحدة على التفاعل . بينما يخلو محلول التفاعل من الوحدات الأساسية المتمثلة بحامض الكالاكتيورونيك الأحادية.وتدل النتائج هذه ، أن الأنزيم من النوع Endopolygalacturonase . ويذكر أن هذه الطريقة قد أعتمدت من قبل عدد من الباحثين للغرض نفسه (38).



شكل(11) : عمل أنزيم polygalacturonase الــمنتج مــن الــعفن *Aspergillus niger* TP4

1 - محلول mono-galacturonic acid
2 - محلول di- galacturonic acid
3 - محلول tri- galacturonic acid
4 - نواتج التحلل الأنزيمي عند وقت الصفر
5 - نواتج التحلل بعد مرور 30 دقيقة
6 - نواتج التحلل بعد مرور 60 دقيقة
7- نواتج التحلل بعد مرور 10 ساعات
8- نواتج التحلل بعد مرور 20 ساعة
9 - نواتج التحلل بعد مرور 48 ساعة

المصادر

1- محى الدين ،محمد عمر وجيجان،رقيباء علي(2013) إنتاج أنزيم polygalactyronase من العفن *Aspergillus niger* المتحمل للحرارة/١-عزل وغربلة الأعفان المتحملة للحرارة والمنتجة للأنزيم وتشخيص العزلة الأكثر إنتاجاً.مجلة العلوم الزراعيةالعراقية.44 (1):106-113 .

2 -محى الدين ،محمد عمر وجيجان،رقيباء علي(2013) إنتاج أنزيمpolygalactyronase من العفن *Aspergillus niger*المتحمل للحرارة/2- تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم بطريقة تخمرات الحالة الصلبة .مجلة العلوم الزراعيةالعراقية.44(1):97-105 .

3- **الشيباني ، علي عبد اللطيف (١٩٨٥)**. فعالية الانزيمات البكتينية في التمور وتنقية ودارسة صفات انزيم بولي جالاكتيوروتيز من صنف التمر الحلاوي.اطروحة ماجستير.كلية الزراعة . جامعة البصرة

4-Benkova,L.and Slezarik,A. 1966 Isolation of extracellular pectolytic enzymes produced by *Aspergillus niger*. Coolection Chechoslov Commun.,31:122-129.

5-Biggs,A.;El-Kholi,M.; El-Neshawy,S. and Nikerson,R. 1997plant Dis,81:399- 404.

6-Buga, M.; Ibrahim,S. and Nok,U 2010 Partially purified polygalacturonase from *Aspergillus niger*(SA6)African Journal of Biotechnology. 9(52):8944-8954.

7-Chun-hui, Z.; Zu-ming, L.;Xia,P.;Yue,J.; Hong, Z.and Zhi, B. 2009 Separation ,Purification and characterization of three Endo-Polygalacturonases from a Newly isolated *Penicillum oxalicum*. The Chinese Journal of process Engineering, 9(2):243-249.

8-Fahmy,A.; El-beih,F. ; Mohamed,S. Abdel-Gany,S. and Abd-Elbaky 2008. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger*. Appl. Biochem. Biotechnol., 149:205-217.

9-Kaur,G.;Kumar S.,and Satyanarayana,T.2004 Production characterizationand application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis, Bioresour. Technol. 94 239–243.

10-Koboyashi ,T.; Higaki ,N.; Yajima, N.; Suzumatsu ,A.; Haghihara, H. and Kawai S. 2001 Purification and properties of a, galacturonic acid releasing exopolygalacturonase from a strain of Bacillus. Biosci Biotechnol Biochem 2001;65:842–7.

11-Kornberg, A. 1990. Why purify enzymes. In .Methods in Enzymology. Academic press. New York.1-5.

12-Mohamed, S.A., Christensin T. and Mikkelsen, J.2003.New polygalactourinases from *Trichodermareesi*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. Carbohydr. Res.,338: 515-524.

13-Manachini,P.;Fortina,M.and Parini,C. 1987 Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. Biotechnol. Lett.,9:219-224.

14-Martins, E;Silva, D.; Leite, R. and Gomes ,E. 2007 Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. Antonie VanLeeuwenhoek, 91:921-299.

15-Mohsen S.M; Bazaraa W.A. and Doukani K.2009.Putification and characterization of Aspergillus niger U-86 polygalacturonase and its use in Clarification of pomegranate and grape juices.,805-817.

16-Mohamed ,S.; Abdulrahman ,L.;Al-Malki and Kumosani,T.2009 Characterization of a Polygalacturonase from *Trichoderma harzianum* Grown on Citrus Peel with Application for Apple Juice. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(3): 2770-2777

17-Mondal ,k.;Mehta ,R. and Gupta, M.N.2004. Affinity precipitation of *Aspergillus niger* pectinase by microwave-treated alginate. Protein expression and purification, 33:104-109.

18-Nakkeeran E; Subramanian R. and Kumar S.2010.Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of Aspergillus carbonarius, 109(2):101-106.

19-Natalla M,Simone RDS, Roberto DS, Eleni G. 2004.Pectinase Production by Fungal Strains in Solid State Fermentation Using Agroindustrial Bio-product. Braz. Arch. Biol. Technol.47(5): p. 5.

20-Patil ,N.P. and chaudhari ,B.L. 2010 Production and purification of pectinase by by soil isolate penicillium sp and search for better agro-residue for its SSf. Recent Research in science and technology,2(7):36-42.

21-pedrolli ,D.B.; Monteiro, A.C.,and Gomes ,E.2009 Pectin and pectinases: Production, Characterization and industrial application of Microbial pectinolytic Enzymes. The open Biotechnology Journal.3:9-18.

22-Rasheedha Banu,A; Kalpana Devi,M; Gnanaprabhal,G.; Pradeep,B. and Palaniswamy ,M. 2010 Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. Indian Journal of Science and Technology.3(4) 0974- 684

23-Reymond, D. and Phaff , H. 1965. Purification and certain properties of avocado polygalacturonase.J. Food Sci., 30:266-273.

24-Roy ,I;Jain ,S.; Teotia, S. and Gupta ,M. 2004. Evaluation of Microbeads of calcium Alginate as a Fluidized bed Medium for Affinity chromatography of *Aspergillus niger* pectinase. Biotechnol. Prog., 20:1490-1495.

25-Saad ,N.; Briand ,M.; Gardarin, C. ;Briand, Y. and Michaud, P. 2003 Production, purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Mucor rouxii* NRRL1894. Elsevier Inc.:1-6

26-Sakamoto,T;Bonnin,E;Quemener,J and Thibault,F.2002 Purification and characterization of two exopolygalacturonase from *Aspegillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan Biochim.Biophs.Acta.1572:10-18

27-Segel H. 1976. Biochemical calculations. John wiley and sons.canada.

28-Semenova ,M.; Grishutin ,S.; Gusakov, A.,Okunev, O. and Sinitsyn, A. 2003.Isolation and properties of pectin-ases from the fungus *Aspergillus japonicus*. Biochem. 68(5):559-569.

29-Sharma, A.; Mondal ,K. and Gupta ,M.N2003. Separation of enzymes by sequential macroaffinity ligand –facilitated three phase partitioning. ,J.Chromatogr. 995:127-134.

30-Sharma ,N.R.; Sasankan, A.; Singh, A. and Soni, Giridhar 2011. Production of polygalacturonase and pection Methyl Esterase from Agrowaste by using various isolates of *Aspergillus nige*r. Insight Microbiology.1(1):1-7

31-Silva ,D., Martins, E. S., Da Silva, R. and Gomes, E. 2002 Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentationusing agricultural wastes and agro-industrial byproducts. Braz. J. Microbiol., 33:318-324.

32-Suryakant, K.;P. Aditi; and Kunar ,A. 2001 Active site characterization of the single Endo-polygalacturonase produced by *Fusarium monihorme* NCIM1276.Eur.J. Biochem.258:832-840.

33-Tari, C., N.; Dogan, N. and Gogus,k 2008 Biochemical and thermal characterization of crude exopolygalacturonae produced by *Aspergillus sojae*. Food Chem., 111: 824-829.

34-Teng-Guo, C.; Ming Xue ,W.; Bao Chen, T.; Han Deing ,W. and Fan Rao, P. 2002. Purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Aspergillus niger*. J. Food Biochem., 26(3):253-265

35-Thakur, A.; Pahwa,R.; Singh,S., and Gupta,R.2010.Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025

36-Wayne, M.; Ivana, V.; Verneta, L.; Wesley, M.; Bruce, D.; Wojciech, J. and William,S.2010 Purification and Biochemical Characterization of Polygalacturonase Produced by *Penicillium expansum* During Postharvest Decay of'Anjou'Pear.Biochemistry and Cell Biology iochemistry,100:42-48.

37-Whitaker,J.1970 Protease of endothia parasitica. Methods in enzymology.(19). Academic press. New York.

38-Zhang, J.; Bruton, B. and Biles,C. 1999 *Fusarium solan*i endo Polygalacturonase from decayed muskmelon fruit:Purification and characterization. Physiological and Molecular plant pathology, 54:171-186.