استخلاص الأنزيم وقياس فعاليته

Extract the enzyme and measure its effectiveness

أولًا : استخلاص الأنزيم :

تجري عملية الاستخلاص للانزيم بعد انتهاء مدة التخمر احسب نوع الانزيم باستخدام 50 سم^3 من محلول الفوسفات الدارئ ذي تركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 7 لكل دورق، إذ تمزج المحتويات جيدًا بوساطة الخلاط المغناطيسي لمدة 15 دقيقة ثم يتم الترشيح من خلال منظومة ترشيح معقمة باستخدام القطن تتبعها خطواة ترشيح ثانية باستخدام ورق الترشيح NO.1 Whatman وتحت التفريغ ، ثم يؤخذ الرائق الذي يمثل المستخلص الأنزيمي ويحدد حجمه .

ثانيًا : قياس فعالية الأنزيم :

1- إنزيم الأميليز :

أ- يوزع محلول النشأ المنظم (لاحظ الملحق) في أنابيب اختبار وبواقع 20 سم^3 لكل انبوبة ثم توضع الانابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 45م وتترك لبضع دقائق .

ب- يضاف 10 سم^3 من المستخلص الأنزيمي الخام المراد قياس فعالية انزيم الأميليز فيه ثم تمزج المحتويات جيدا مع تسجيل وقت الإضافة مباشرة .

ج- يتم نقل 1 سم^3 من مزيج التفاعل عند مدد زمنية محددة (كل 5 دقائق) بوساطة ماصة معقمة إلى انبوبة اختبار تحتوي على 5 سم^3 من محلول اليود المخفف (لاحظ الملحق) وتمزج المحتويات جيدًا .

يقارن اللون المتكون مع لون قياسي ناتج من تفاعل اليود المخفف مع الدكسترين (لاحظ الملحق) عند الوصول إلى نقطة النهاية في وقت يقل عن 10 دقائق يفضل تخفيف المستخلص الانزيمي الخام بالماء المقطر مع مراعاة ذلك في الحساب .

حسبه المعادلة التالية :

$$N = \frac{1430 \times V}{t \times a \times Vo}$$

حيث أن :

A = فعالية انزيم الفا اميليز معبرًا عنها بوحدات NOVO لكل مل (وتعرف وحدات NOVO بانها كمية الإنزيم التي تحول 1غم من النشا الذائب الى دكسترينات في ساعة تحت ظروف التقدير).

t = الوقت اللازم للوصول إلى نقطة النهاية محسوبًا بالدقائق.

a = حجم النموذج المراد تقدير فعالية الأنزيم فيه معبرًا عنه بالملليلتر (سم^3) او وزن النمودج معبرًا عنه بالغرام.

V = الحجم الذي خفف اليه النموذج.

V_0 = حجم المستخلص الانزيمي المستخدم (حجم محلول الانزيم المستخدم) بالملليلتر .

2- انزيم البروتييز :

1- يتم استرجاع 12غم من حليب فرز مجفف لكل 100 سم^3 من محلول كلوريد الكالسيوم (تركيز 0.01 مولاري) ثم يعدل الرقم الهيدروجيني الى 6.5 ويحضن في حمام مائي

بدرجة حرارة 45م لمدة نصف ساعة، ثم يوزع الحليب في انابيب اختبار كبيرة الحجم وبواقع 10 سم^3 لكل أنبوبة.

2- يضاف 1 سم^3 من المستخلص الأنزيمي لكل أنبوبة من الأنابيب المحتوية على الحليب السابق وتحضن في حمام مائي بدرجة حرارة 46م لمدة نصف ساعة مع التحريك الشديد.

3- حساب زمن التخثر للحليب بالثواني.

4- تقدر الفعالية التخثرية معبرًا عنها بالوحدات التخثرية milk clotting units حسب المعادلة :

$$\text{الفعالية التخثرية}(\mathbf{M.C.U}) = \frac{\mathbf{2400}}{\text{الوقت اللازم}} \times \text{عدد مرات تخفيف المستخلص الأنزيمي}$$

3- انزيم السليوليز :

1- يضاف السليلوز الى احد الاوساط Mebth medium او Dubos medium (لاحظ الملحق الخاص بالأوساط) ويكون السليلوز بشكل أوراق ترشيح ويعبأ في دوارق او انابيب ويعقم.

2- يحضن بدرجة حرارة 25-28 م مدة من الزمن قد تمتد عدة أسابيع .

3- تفحص أوراق الترشيح كل اسبوع حتى ظهور التأكل disintegration وكذلك ظهور بقع صفراء على أوراق الترشيح الذي يدل على تحلل السليلوز .

4- بعد ظهور البقع الصفراء على أوراق الترشيح ، يقطع هذا الجزء من اوراق الترشيح ويفت في صحن زجاجي معقم ونظيف مع كمية من الماء المقطر المعقم.

5- تعمل مسحة من العالق على شريحة زجاجية نظيفة وتترك لتجف ثم تصبغ بصيغة الكاربول فوكسين ثم تغسل بالماء وتترك لتجف وتفحص تحت المجهر.