تنقية وتوصيف انزيم اللايبيز المستخلص من بذور فول الصويا المنبتة

م.م. بتول محمود الانصاري . ا.د. علي احمد ساهي . ا.م.د. ضياء فالح الفكيكي

قسم علوم الاغذية / كلية الزراعة

الخلاصة:

تضمنت الدراسة تنقية وتوصيف انزيم اللايبيز المستخلص من بذور فول الصويا المنبتة وذلك باتباع عدة خطوات متعاقبة لتنقية الإنزيم وذلك للتوصل إلى أفضل مرحلة في تنقية الإنزيم والتخلص من اكبر كمية ممكنة من المواد البروتينية وغير البروتينية الموجودة في المستخلص الإنزيمي واجريت خطوة الترسيب التدريجي للإنزيم باستعمال نسب إشباع متدرجة من كبريتات الامونيوم ٢٠ – ٩٠ %، إذ لوحظ حدوث ارتفاع واضح بشكل تدريجي للفعالية النوعية للإنزيم في الراسب الناتج لغاية نسبة إشباع ٨٠% وقد أعطت هذه الخطوة فعالية نوعية مقدارها ٣٢٤,٤٠ وحدة / ملغم بروتين وحصيلة إنزيمية بلغت ٢٩,٢٠ % بعدد مرات تنقية مقدارها ١٠,٧٩ مرة. وبينت نتائج تحديد نقاوة اللايبيز ظهور قمة واحدة عند الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلامايد بغياب العوامل الماسخة، وبلغ الوزن الجزيئي ٤١,٦٨٦ كيلو دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلامايد بوجود العوامل الماسخة. وجد ان الدالة الحامضية المثلى لفعالية الانزيم كانت ٨ ، في حين تراوحت الدالة الحامضية المثلى لثبات الإنزيم بين ٧- ٩ إذ احتفظ الإنزيم بـ ٩٠ % من فعاليته. بينما لوحظ ان درجة الحرارة المثلى للفعالية الانزيمية للانزيم المنقى هي ٤٠ م و ان الإنزيم يفقد ٦٧ % من فعاليته على ٩٠ م .

الكلمات المفتاحية: لايبيز، كبريتات الامونيوم، تنقية ، الوزن الجزيئي

*جزء من رسالة دكتوراه الباحث الاول

المقدمة :

تلعب اللايبيزات دورا رئيسيا في التطبيقات الصناعية كانزيمات محفزة للعمليات البيولوجية وهي اكثر امانا وصديقة للبيئة. وقد استعملت في تصنيع الاغذية نتيجة لوظائفها المفيدة في تجهيز وتحسين نوعية المنتجات (٥، ٢٥) على الرغم من المدى الواسع من اللايبيزت الميكروبية الا ان استخدام هذة الانزيمات

على النطاق الصناعي لا يزال محدود بسبب ارتفاع تكاليف الانتاج ، مما ادى الى البحث عن مصادر اخرى للانزيم (٢١) . يوجد انزيم اللايبيز على نطاق واسع في الطبيعة ولكن تم العثور على تراكيز عالية نسبيا في البذور و بالخصوص البذور الزيتية الغنية بنسبة الكليسيريدات الثلاثية والتي تكون مصدر طاقة كامنة في النباتات التي تنمو حديثا وبشكل عام تكون البذور غنية بالكليسيريدات الثلاثية وخلال مرحلة الانبات لايمكن للبذور ان تستفاد منها الابوجود اللايبيزات التي تنشط خلال مرحلة الانبات (١٠). حظيت لايبيزات البذور اهتماما كبيرا في الاونة الاخيرة باعتبارها محفزات بايولوجية واظهرت مزايا عديدة تفوقت بها على اللايبيزات الميكروبية والحيوانية كالخصوصية وانخفاض التكلفة وتوافرها وسهولة عزلها وتنقيتها وامكانية استخدامها كبديل للانزيمات التجارية واستعمالها في الصناعات الغذائية وصناعة المنظفات ودباغة الجلود وصناعة المستحضرات الصيدلانية والدوائية وانتاج مواد التشحيم (٢٥). ونظراً لعدم وجود دراسة كافية عن اللايبيزات المستخلصة من البذور المنبتة فإن هذه الدراسة تهدف الى تنقية وتوصيف انزيم اللايبيز المستخلص من بذور فول الصويا المنبتة .

المواد وطرائق العمل :

استخدم في هذه الدراسة المستخلص الانزيمي الخام لبذور فول الصويا المنبتة حسب طريقة (١١) والذي تم استخلاصه بمحلول الدارىء Tris-HCl ٠,١ مولاري وبدالة حامضية ٨ المتكون من ٠,٠١ مولاري كلوريد الكالسيوم KCl، ٠,٠٠١ مولاري EDTA، ٠,٠٠١ مولاري كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$.

تنقية الإنزيم

التركيز بكبريتات الامونيوم

اضيفت بلورات كبريتات الامونيوم الصلبة تدريجيا الى المستخلص الانزيمي الخام لغرض ترسيب الانزيم مع التحريك المستمر على محرك مغناطيسي لحين الاذابة بدرجة حرارة ٤ م لمدة ثلاث ساعات للوصول الى درجة تشبع ٢٠-٩٠ % ثم أجريت عملية النبذ المركزي لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة ٤ مْ. قدرت الفعالية بعد كل مرحلة من مراحل الترسيب ، جمعت الرواسب وذوبت في حجم قليل من دارئ٠,١ مولاري Tris-HCl بدالة حامضية ٨ المتكون من٠,٠٠١ مولاري EDTA، ٠,٠٠١ مولاري كلوريد المغنيسيوم، ٠,٠١ مولاري كلوريد الكالسيوم ،أجريت له عملية ديلزة ضد الماء المقطر باستعمال أكياس التنافذ الغشائي على درجة حرارة ٤ م لمدة ٢٤ ساعة مع استبدال الماء كل ٦ ساعات ، ثم قدر حجم المحلول الناتج والفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين. اجريت عملية الترشيح الهلامي بإمرار المستخلص الإنزيمي المركز المستحصل عليه من الخطوة السابقة ببطء على الجوانب الداخلية للعمود ذو الابعاد (٢,٥ × ٧٢) سم وباستعمال Sephdex G-١٠٠، أجريت موازنة للعمود باستعمال المحلول الدارئ بما يعادل ٣ أمثال حجم الهلام في العمود ونظمت سرعة الجريان بمعدل ٣٠ مل/ساعة. أجريت عملية الاسترداد بالمحلول الدارئ نفسه وجمعت الأجزاء الناتجة من العمود في أنابيب اختبار بمعدل ٣ مل/ أنبوب وبمعدل جريان ٣٠ مل/ ساعة. قرأت الامتصاصية الضوئية لكل جزء من الأجزاء المفصولة عند طول موجي ٢٨٠ نانومتر ، وتم قياس فعالية الإنزيم في القمم المفصولة وذلك بعد رسم العلاقة بين عدد الأجزاء المفصولة والامتصاصية عند ٢٨٠ نانومتر، جمعت الأجزاء التي احتوت على الإنزيم وحسب الحجم وقدرت الفعالية وتركيز البروتين.

تحديد نقاوة الإنزيم

اتبعت تقنية الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلامايد بغياب العوامل الماسخة لتحديد نقاوة الإنزيم Slab polyacrylamide gel electrophoresis تبعا لطريقة (١٤) Laemmli والموصوفة من قبل Garfin (١٢)في اختبار نقاوة الإنزيم مع بعض التحويرات، وقد اجريت التجربة في مختبر الهندسة الوراثية في كلية الزراعة /جامعة البصرة .

تقدير فعالية اللايبيز

قدرت الفعالية للانزيم حسب الطريقة التسحيحية الموصوفة من قبل (١٦) بمتابعة تحرير الاحماض الدهنية من خلال التحلل المائي لمستحلب زيت الزيتون بفعل انزيم اللايبيز.

تقدير تركيز البروتين

اتبعت طريقة (٨) لتقدير تركيز البروتين بعد تحضير المنحنى القياسي لألبومين المصل البقري Bovine. Serum Albumin (BSA)

توصيف الإنزيم

تعيين الوزن الجزيئي

تم تقدير الوزن الجزيئي بأتباع طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلامايد بوجود العوامل الماسخة Sodium dodecyl sulphate Slab Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) تبعا لطريقة (١٤) والموصوفة من قبل (١٢).

تعيين الدالة الحامضية المثلى لفعالية الإنزيم

قدرت الفعالية الإنزيمية مع استعمال ٠,١ مولاري من المحاليل الدارئة الآتية بدوال حامضية مختلفة تراوحت بين٣-١٢.

المحاليل المستعملة:

١- دارئ خلات الصوديوم بتركيز ٠,١ مولاري بمدى دالة حامضية ٣-٤-٥.

٢ - دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز ٠,١ مولاري بمدى دالة حامضية ٦-٧.

٣- دارئTris-HCl بتركيز ٠,١ مولاري بمدى دالة حامضية ٨-٩.

٤- دارئ Tris-NaOH بتركيز ٠,١ مولاري بمدى دالة ا حامضية ١٠-١١-١٢ .

ثم رسمت العلاقة بين فعالية الإنزيم المنقى (وحدة / مل) تجاه الدوال الحامضية المختلفة.

تعيين الدالة الحامضية المثلى لثباتية الإنزيم

مزجت حجوم متساوية من الإنزيم المنقى مع المحاليل الدارئة المحضرة في أنابيب اختبار وحضنت في الحمام المائي عند درجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٦٠ دقيقة ثم نقلت الأنابيب مباشرة إلى حمام ثلجي، وقدرت الفعاليةالانزيمية عند الدالة الحامضية المثلى لفعالية الانزيم ، وعبر عن الفعالية الانزيمية المتبقية كنسبة مئوية (%) ، ورسمت العلاقة بين النسبة المئوية للفعالية الإنزيمية المتبقية والدالة الحامضية المثلى لثبات الانزيم .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

قدرت فعالية الإنزيم وعلى مدى من درجات الحرارة تراوحت بين ٢٠- ٩٠ م و بفارق ١٠ درجات ورسمت العلاقة بين الفعالية ودرجات الحرارة المختلفة .

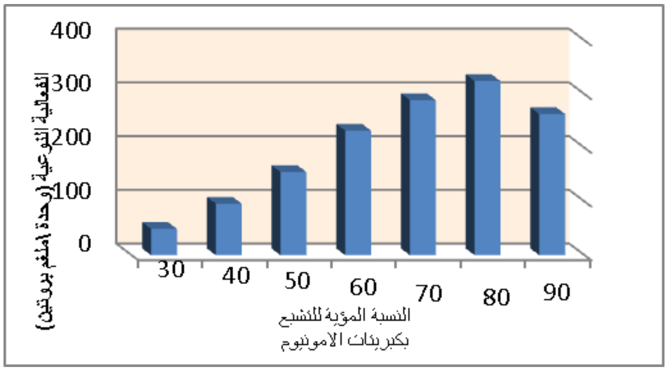
تعيين درجة الحرارة المثلى لثباتية الإنزيم

حضن ١ مل من الإنزيم المنقى بدرجات حرارية تراوحت بين ٢٠-٩٠ م لمدة ٦٠ دقيقة ، بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي ثم قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية (%) ورسمت العلاقة بين النسبة المئوية للفعالية المتبقية تجاه درجات الحرارة المختلفة.

النتائج والمناقشة :

تركيز الانزيم

يظهر الشكل (١) خطوة الترسيب التدريجي للإنزيم باستعمال نسب إشباع متدرجة من كبريتات الامونيوم ٣٠ – ٩٠% ، إذ لوحظ حدوث ارتفاع واضح بشكل تدريجي للفعالية النوعية للإنزيم في الراسب الناتج لغاية نسبة إشباع ٨٠% وقد أعطت هذه الخطوة فعالية نوعية مقدارها ٣٢٤,٤٠ وحدة / ملغم بروتين وحصيلة إنزيمية بلغت ٢٩,٢٠ % بعدد مرات تنقية مقدارها ١٠,٧٩ مرة جدول (١). إن ارتفاع الفعالية والحصيلة الإنزيمية (%) في هذه الخطوة قد يعزى إلى دور أملاح كبريتات الامونيوم التنشيطي على فعالية اللايبيز، اذ تعد هذه الخطوة احد الخطوات المهمة في عمليات التنقية نظرا لما تمتاز به من صفات ايجابية من ناحية تقليص الحجم وزيادة كفاءة التنقية والتخلص من اكبر كمية من البروتينات (٤، ٢).



شكل (١) الفعالية النوعية لانزيم اللايبيز المركز بواسطة كبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت (٣٠ -٩٠ %)

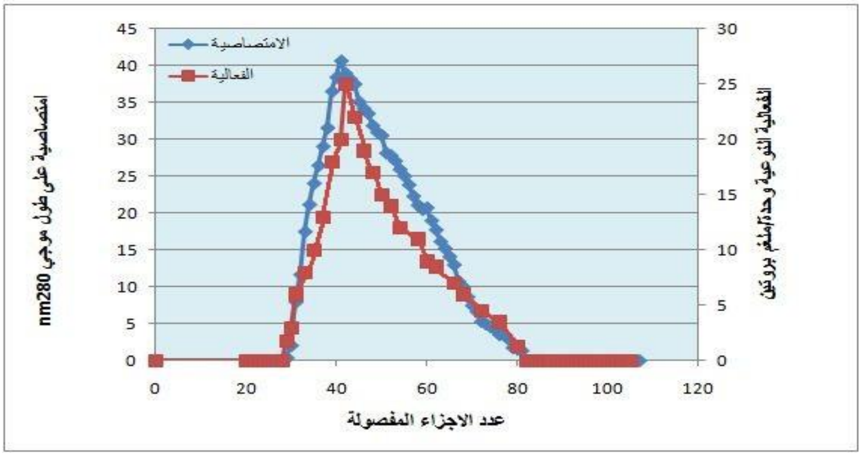
استعملت كبريتات الامونيوم بنسب إشباع مختلفة في معظم الدراسات المتعلقة بتركيز وتنقية اللايبيزات من المصادر النباتية وكانت الحصيلة الإنزيمية ونسب الإشباع تختلف من دراسة إلى اخرى اذ كانت النتائج المتحصل عليها من استعمال كبريتات الامونيوم في خطوة ترسيب إنزيم اللايبيز من بذور فول الصويا المنبتة بنسبة إشباع ٨٠ % اعلى مما حصل عليه (١١) اذ اعطت خطوة تنقية بذور فول الصويا المنبتة باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٨٠ % فعـــــــالية انزيمية مقدارها $^{-٣}$ ١٠× ١٠,٣٧ وحدة / مل. اما(٢٣) فقد وجد ان خطوة تنقية اللايبيز من بذور الســــــــلجم المنبتــــــــــــــة *napus L. Brassica* باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة تشبع ٨٠% اعطت فعالية نوعية ٢٧,٨٠ وحدة / ملغم وحصيلة انزيمية ٧١,٠٣ % وبعدد مرات تنقية ١,٩٨. في حين وجد (١٧) ان فعالية اللايبيز القاعدي المنقى من بذور الكاكاو المنبتة *Theobroma cacao*)

L.) باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٢٠ – ٤٠ % بلغت ٠,٢١ وحدة / ملغم والحصيلة الانزيمية ٣٧,٩١ % وعدد مرات التنقية ٤,٣٨.

وحصل (٢٦) على فعالية نوعية بلغت ٠,٩١ وحدة /ملغم بروتين وحصيلة انزيمية ٨٥,١٦ % عندما استعمل كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٥٠- ٧٥ % في تنقية بذور نبات المطاط *Hevea brasiliensis*. وبلغت الفعالية النوعية ١,٤٢ وحدة / ملغم والحصيلة الانزيمية ٩,٥٥ % وعدد مرات التنقية ١,٠٣ مرة عند تركيز اللايبيز المستخلص من ثمار نخلة Raphia بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٨٠ % (٢٠).

يعد الإنزيم الناتج من خطوة الترسيب باستعمال كبريتات الامونيوم منقى جزئيا ، بسبب تداخل مديات ذوبان بروتينات مختلفة (٤) ، ولغرض تنقية الإنزيم اجري الترشيح الهلامي وذلك نظرا" لما تمتاز به مادة الـ sephadex من صفات مرغوبة وهي سهولة تحضيره واستيعابه الواسع ومديات فصله العالية للمواد وإمكانية استعماله لعدة مرات .

بينت النتائج الموضحة في الشكل (٢) ظهور قمة واحدة عند قياس الامتصاصية على طول موجي مقداره ٢٨٠ نانومتر للأجزاء المستردة ، تركزت الفعالية الانزيمية في نفس القمة ايضا في الاجزاء (٣١- ٨٠) وبلغ حجم الاجزاء ١٥٠ مل. يعد تطابق قمة البروتين مع قمة الفعالية الانزيمية احد الادلة على وصول الانزيم الى مرحلة متعددة من التنقية (٢٧).



شكل (٢) كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي لانزيم اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة باستعمال عمود السيفادكس G ١٠٠ بابعاد (٢,٥ × ٧٢) سم بمعدل جريان (٣٠ مل/ ساعة) بواقع ٣ مل /جزء

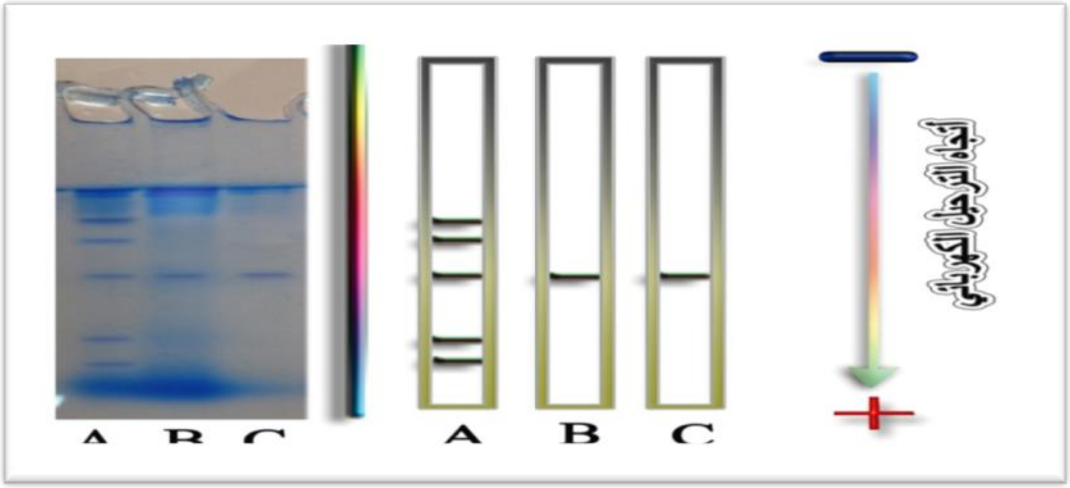
اشار الجدول (١) الى ان خطوة الترشيح الهلامي حققت عدد مرات تنقية مقدارها ٨,١٣ مرة وحصيلة انزيمية ١٧,٨٢ % اما الفعالية النوعية فكانت ٢٤٤,٤٠ وحدة / ملغم بروتين. وقد استعمل هلام السيفادكس Sephadex G-١٠٠ في العديد من الدراسات المتعلقة بتنقية انزيم اللايبيز من الحيوانات والنباتات والاحياء المجهرية، واستعمل هذا الهلام في تنقية انزيم اللايبيز من بذور القطن، اذ وجد ان الفعالية النوعية ٤٤ وحدة / ملغم بروتين بحصيلة انزيمية ٢ % وعدد مرات التنقية ٢٨,٦ مرة (١٣).

واستعمل (٢٨) الترشيح الهلامي كخطوة اخيرة للايبيز المستخلص من بذور الجوز Walnut وقد وجد ان الحصيلة الانزيمية ٣١ % وعدد مرات التنقية ٢٨,٨ مرة. وقد استعمل (٢٠) طريقة الترشيح الهلامي لتنقية اللايبيز المستخلص من ثمرة نخلة Raphia وكانت الفعالية النوعية ١٧,٤٠ وحدة / ملغم بروتين وحصيلة انزيمية ٥,٧٩ % وعدد مرات التنقية ١٢,٦٨ مرة.

جدول(١) خطوات تنقية انزيم اللايبيز المستخلص من فول الصويا المنبتة

خطوات التنقية	الحجم (مل)	البروتين (ملغم /مل)	البروتين الكلي(ملغم)	الفعالية (وحدة/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية(وحدة)	الحصيلة %	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام	٥٠٠	١,٢٣	٦١٥	٣٧	٣٠,٠٨	١٨٥٠٠	١٠٠	١
الترسيب بكبريتات الامونيوم (٣٠-٨٠%)	١٨,٥	٠,٩	١٦,٦٥	٢٩٢	٣٢٤,٤٠	٥٤٠٢	٢٩,٢٠	١٠,٧٩
الترشيح الهلامي سيفادكس G١٠٠	١٥٠	٠,٠٩	١٣,٥	٢٢	٢٤٤,٤	٣٣٠٠	١٧,٨٣	٨,١٣

بينت النتائج في الشكل (٣) الترحيل الكهربائي للمستخلص الإنزيمي في هلام الاكريل امايد ، احتوى الجزء A الذي يمثل المستخلص الانزيمي الخام على مجموعة من الحزم لاحتواءه مجموعة من البروتينات ، أما الجزء (B) فيظهر وجود حزمة واحدة في هلام الاكريل امايد خلال الترحيل الكهربائي لمستخلص الإنزيم الناتج من الخطوة الثانية من خطوات التنقية وهي الترسيب بكبريتات الامونيوم ، ويوضح الشكل (C) احتواء هلام الاكريل امايد على حزمة بروتينية واحدة للمحلول الإنزيمي الخارج من خطوة الترشيح الهلامي . وهذا يعطي صورة واضحة على مدى كفاءة عمليات التنقية للتخلص من كل البروتينات المرافقة للإنزيم والحصول عليه بشكل منفرد و بنقاوة عالية (٧).



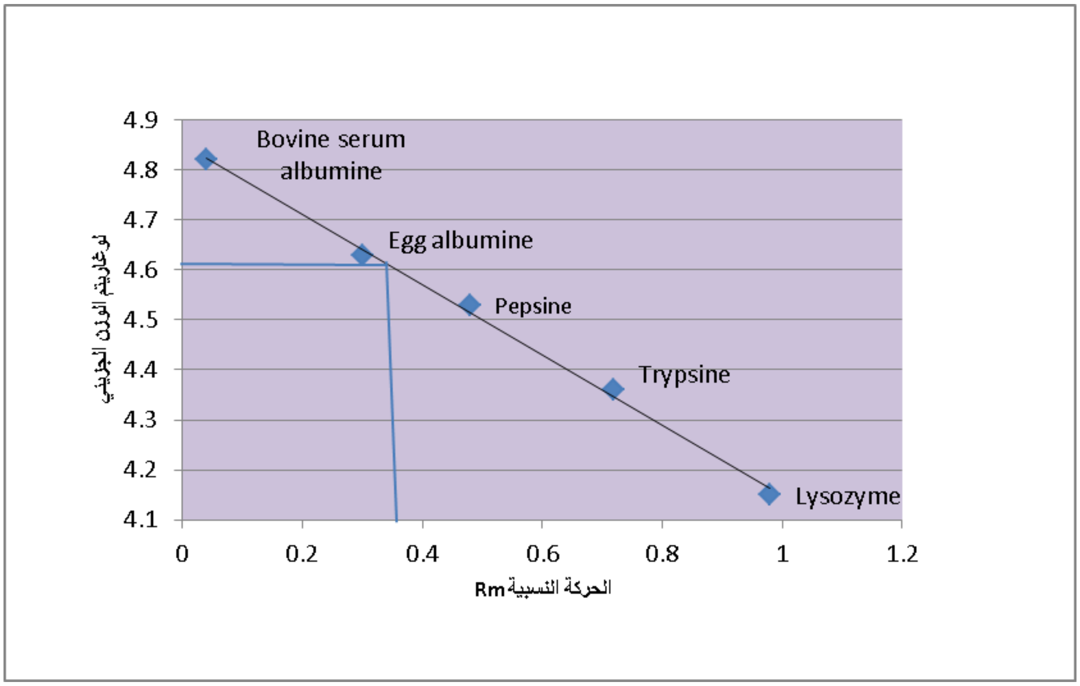
شكل (٣) الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة SDS في هلام متعدد الاكريل امايد لانزيم اللايبيز المنقى من فول الصويا المنبتة

- A : المستخلص الأنزيمي الخام
- B : المستخلص الأنزيمي المركز بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع (٨٠) %
- C : الإنزيم المنقى بواسطة الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-١٠٠

توصيف الإنزيم

تعيين الوزن الجزيئي للإنزيم

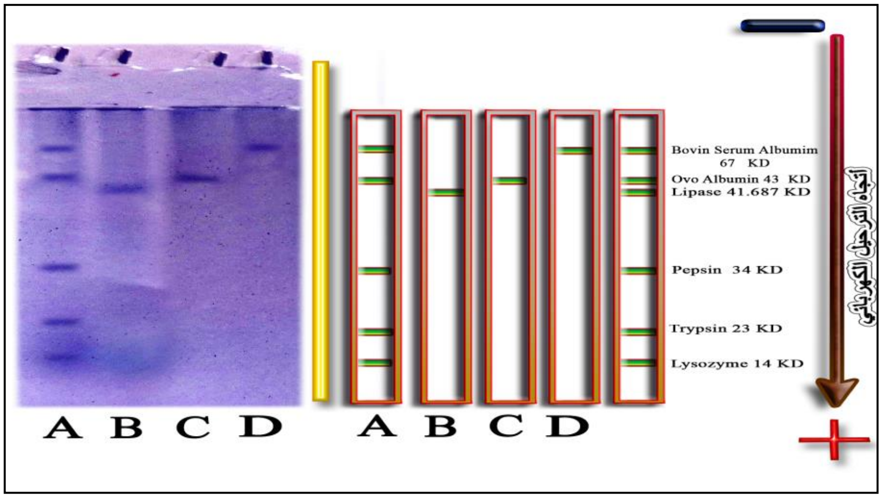
وضح الشكل (٤) العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية (Relative mobility) للبروتينات القياسية في هلام الاكريل امايد بوجود (SDS) لحساب الوزن الجزيئي بطريقة الترحيل الكهربائي.



شكل (٤) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد في وجود المواد الماسخة

إن استعمال SDS يساهم في تحطيم التركيب الثالثي للبروتين عن طريق ارتباطه بشدة بالوحدات المكونة للإنزيم ومن ثم إلغاء تأثير الشحنة أثناء عملية الفصل(٢٤).

بين الشكل (٥) الترحيل الكهربائي للبروتينات القياسية وإنزيم اللايبيز قيد الدراسة باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل أمايد بوجود SDS ، اذ تم قياس الحركة النسبية (Rm) للايبيز ومن خلال هذه القيمة أمكن تحديد الوزن الجزيئي من لوغاريتم الوزن الجزيئي تحت الظروف نفسها ووجد أنها تساوي ٤١,٦٨٦ كيلو دالتون .



(شكل –٥) تقدير الوزن الجزيئي لإنزيم اللايبيز المنقى من فول الصويا المنبتة بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS

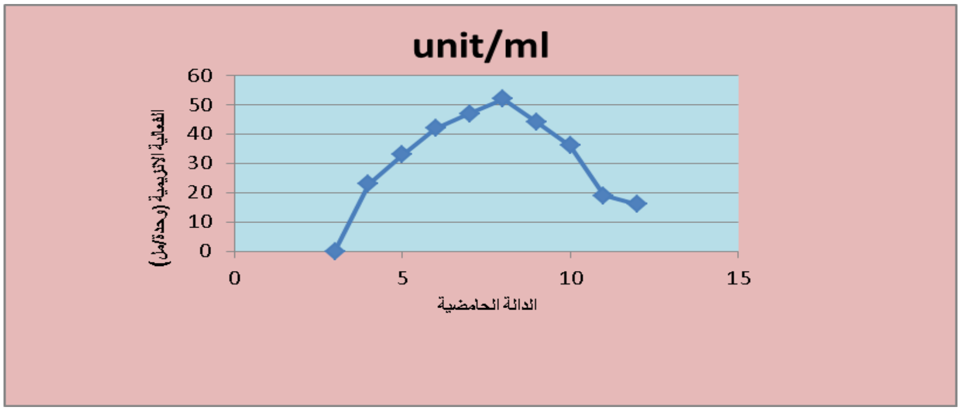
- A : البروتينات القياسية
- B : اللايبيز قيد الراسة
- Ovo albumin : C
- Bovin serum albumin : D

كانت هذه النتيجة مقاربة لما بين (٢٢) بان الوزن الجزيئي للايبيز المنقى من بذور الكتان المنبتة ٤٢ كيلو دالتون باستعمال طريقة الترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة وتقاربت النتائج المتحصل عليها من دراسات اخرى فقد وجد (١٧) أن الوزن الجزيئي للايبيز المنقى من بذور الكاكاو المنبتة بلغ ٣٦ كيلو

دالتون.ووجد (٦) ان الوزن الجزيئي للايبيز المستخلص من بذور السلجم *Brassica napus* L. والمنقى بتنقية الترشيح الفائق بلغ ٣٨ كيلو دالتون بأستعمال طريقه الترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة SDS. بينما وجد (١٩) ان الوزن الجزيئي للايبيز المنقى من بذور ثمرة نخلة Raphia كان ٣٥ كيلو دالتون .

تعيين الدالة الحامضية المثلى لفعالية اللايبيز

تم دراسة الدالة الحامضية المثلى لفعالية اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة بمدى من الدوال الحامضية تراوحت بين ٣-١٢ ، واوضحت النتائج في الشكل (٦) ان الدالة الحامضية المثلى لفعالية الانزيم كانت ٨ ، اذ اظهرت اعلى فعالية للانزيم ٥٢ وحدة / مل . وانخفضت الفعالية عند الدوال التي تراوحت بين ٤-٧ وكذلك انخفضت عند الدوال الحامضية التي تراوحت بين ٩-١٢ ، في حين لم تظهر أي فعالية عند الدالة الحامضية ٣ .



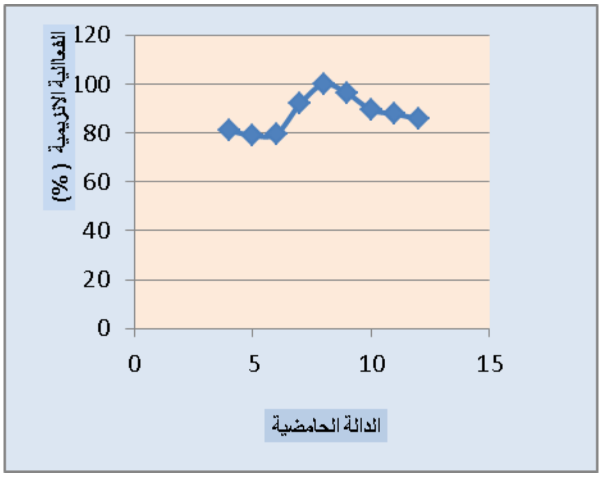
شكل (٦) منحنى الدالة الحامضية المثلى لفعالية اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة

جاءت نتيجة هذه الدراسة مطابقة لما وجده (١١) من إن الدالة الحامضية المثلى لفعالية اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة باستعمال زيت الزيتون كمادة أساس قد بلغت ٨. وجاءت النتائج مطابقة للدالة الحامضية للايبيز المستخلص من مصادر اخرى حيث ان الدالة الحامضية المثلى لفعالية اللايبيز القاعدي المستخلص

من بذور *Hura Crepirans* المنبتة لمدة ١٦ يوم بلغت ٨ (١٠). بينما وجد (٩) ان الدالة الحامضية المثلى لانزيم اللايبيز المعزول من بذور جوز الهند *Cocosmucifera linn* كانت بحدود ٨,٥-٧,٥ . في حين وجد (١٧) ان فعالية اللايبيز القاعدي والمنقى من بذور الكاكاو المنبتة بلغت اقصاها عند دالة حامضية ٩.

تعيين الدالة الحامضية المثلى لثبات اللايبيز

درس تأثير الدالة الحامضية المثلى في ثبات اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة إذ تعد هذه من الصفات المهمة في تحديد ظروف التنقية وخزن الإنزيم . أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٧) إن الدالة الحامضية المثلى لثبات الإنزيم تراوحت بين ٧- ٩ إذ احتفظ الإنزيم بـ ٩٠ % من فعاليته . يعود سبب الانخفاض في الفعالية للدوال الحامضية القاعدية أو الحامضية إلى حدوث تغير في التركيب الثانوي والثالثي لجزيئة الإنزيم إضافـــــــــــــة إلى تغير الحالة الأيونية للموقع الفعال للإنزيم (٢٤ ، ١٥,١) .



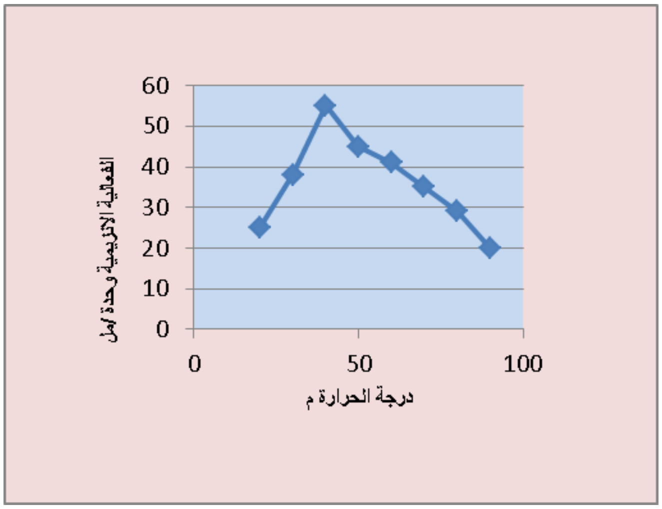
شكل (٧) منحنى الدالة الحامضية المثلى لثباتية اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة

كانت النتائج مقاربة لما لاحظ (١٧) بإن اللايبيز المستخلص من بذور الكاكاو المنبتةCacoa bean اظهر ثباتية عالية تجاه الدالة الحامضية تراوحت من ٧-١٠ حيث فقد الانزيم ١٥% من فعاليته عند دالة حامضية ٧. وكذلك وجدت نفس النتائج في انواع مختلفة من لايبيزات الفول مثل لايبيز البطيخ الابيض White melon الذي يكون ثابتا عند دالة حامضية تراوحت بين ٨-٩ (١٠) .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية اللايبيز

يوضح الشكل (٨) حصول زيادة واضحة في الفعالية الإنزيمية بازدياد درجة حرارة التفاعل حتى بلغت الفعالية أقصاها عند درجة حرارة ٤٠ م ومقدارها ٥٥ وحدة / مل. يعود سبب ازدياد سرعة التفاعل الإنزيمي بزيادة درجة

الحرارة إلى زيادة الطاقة الحركية للجزيئات، إلا إن ارتفاع درجات الحرارة عن حدود معينة يؤدي إلى مسخ الإنزيم وتلف التركيب الثالثي له وبالتالي انخفاض فعاليته (٢٤) .

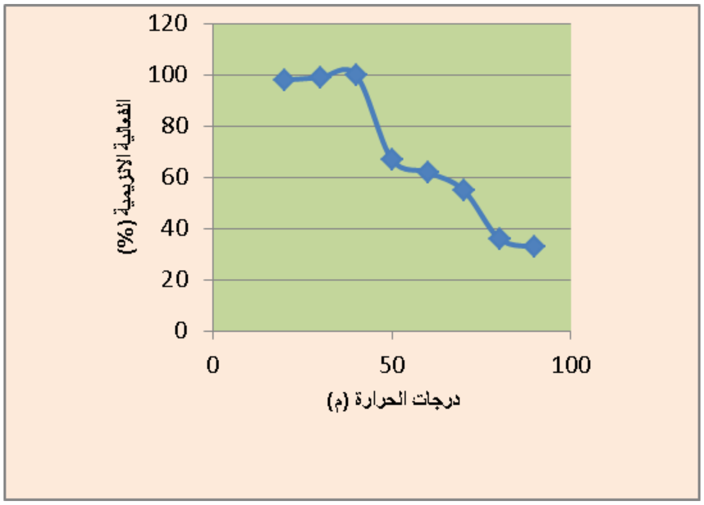


شكل (٨) منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة

اتفقت النتائج مع ما توصل إليه (٣) بان الدرجة الحرارية المثلى للايبيز المستخلص من بذور الخروع الساكنة بلغت ٤٠ م . بينما وجد (٢٠) ان درجة الحرارة المثلى لفعالية اللايبيز المستخلص من بذور الدخن اللؤلؤي المنبته كانت ٣٠ م واتفقت النتائج مع ما وجده (١٩) بان درجة الحرارة المثلى للايبيز المستخلص من ثمرة نخلة raphia كانت ٤٠ م .

تعيين درجة الحرارة المثلى لثبات اللايبيز

يبين الشكل (٩) أن إنزيم اللايبيز احتفظ بكامل فعاليته الانزيمية عند حضـــــنه بدرجات حرارة ٢٠- ٤٠ م لمدة ٦٠ دقيقة بعدها انخفضت الفعالية الإنزيمية تدريجيا إذ فقد الإنزيم ٦٧ % من فعاليته على ٩٠ م. اذ تتأثر حساسية الإنزيمات تجاه الحرارة بعدة عوامل تؤثر على الثبات الحراري للإنزيم كالوزن الجزيئي فغالبا ما تكون الإنزيمات ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة المتكونة من سلسلة ببتيدية واحدة والمحتوية على أواصر ثنائية الكبريت (S-S bond) أكثر ثباتا بدرجات الحرارة العالية من الإنزيمات المعــــــــــــــقدة ذات الأوزان الجزيئية العالية (١،٢٤) .



شكل (٩) منحنى الثبات الحراري لفعالية اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة

تباينت الدراسات في تحديد الثبات الحراري للايبيز المنقى وذلك حسب مصدر الانزيم فقد وجد (٢٩) ان اللايبيز المعزول من بكتريا *Burkholderia sp.* احتفظ ب ٨٠,٧ % من فعاليته عند حضنه في درجة حرارة ٤٠ م لمدة ٦٠ دقيقه، بينما احتفظ الانزيم ب٤٢ % من فعاليته عند درجة حراره ٦٠ م لمدة ٦٠ دقيقه. بينما وجد (١٧) ان الدرجة الحرارية المثلى لثبات اللايبيز المنقى والمستخلص من بذور الكاكاو

المنبتة كانت بين (٣٠- ٤٠) م اذ فقد الانزيم ٦٦ % من فعاليته عند درجة حرارة ٥٠ م.

ولاحظ(٢٦) ان درجه الحراره المثلى للايبيز القاعدي المنقى من بذور نبات المطاط ، كانت ٥٠ م وان الانزيم احتفظ ٩٠ % من فعاليته، بينما وجد (٢٠) ان درجة الحرارة المثلى لثبات انزيم اللايبيز المستخلص بذور الدخن اللؤلؤي ٦٠ م اذ احتفظ الانزيم بمقدار ٨٧ % من فعاليته كما وجد ان الانزيم يحتفظ ب ٢٨ % من فعاليتة عند درجة حرارة ١٠٠ م.

المصادر:

١-**الظويهري، ناجح هاشم كاظم .(٢٠١١)**. انتاج وتوصيف انزيم الانيولينيز من الفطر *Aspergillus niger* المعزول محليا. اطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة.

٢-**المظفر، سامي عبد المهدي (١٩٨٣)**. حركيات الانزيمات (الجزء الأول)، مطبعة الخلود- بغداد.

٣-**دارقلي، مريم ومالو، احمد(٢٠١١)**.العوامل المؤثره في فعالية لايبيز بذور الخروع الساكنه المزروعه في غواصة دمشق.مجلة جامعة دمشق للعلوم الاساسيه.المجلد ٢٧ (٢): ٢٤١-,٢٥٦

٤-**دلالي، باسل كامل (١٩٨٣)**. فهم الإنزيمات.مطابع جامعة الموصل – جامعة الموصل.

٥-**Balan, A. (٢٠١٣)**. Orgnic- Solvent surfactant thermostable lipase ,isolated from athermophlic bacterium , Geobacillus thermodenilrificans IBRL-nra**. *Advanced Studies in Biologe,*** ٥ (٩): ٣٨٩- ٤٠١.

٦-**Belguith, H.; Fattouch, S.; Jridi, T. andHamida,B.**(٢٠٠٩).Immunopurification of a rape (*Brassica napus* L.) seedling lipase**. *African Journal of Biotechnology*,** : ٣٥٦_٣٦٥.

٧-**Blakshear ,L. J. (١٩٨٤).** Systems to polyacrylamidegelelectrophoresis **in:** W.B.(Ed),Academic Press, Inc. Harcourt Brace ,Javonovich Publishers,PP, ٢٣٧-٢٥.

٨-**Bradford, M. M. (١٩٧٦).** A rapid and sensitive method for the quantitation formicrogram quantities of principle ofprotein-dye binding. ***Journal of Biochemistry ,*** ٧٢ : ٢٤٨-٢٥٤.

٩-**Ejedegba, B.O.; Onyeneke, E.C. and Oviasogie,P.O.**(٢٠٠٧).Characteristics of lipase isolated from coconut (*Cocos nucifera* linn) seed under different nutrient treatments. ***African Journal of Biotechnology,*** ٦: ٧٢٣–٧٢٧.

١٠-**Eze, S.O.O.(٢٠٠٧ a).**Studies on lipase [EC٣,١,١,٣] from germination *Hura cerpitans* seeds. ***Animal Research International***,٤(٣):٧٢١-٧٢٣.

١١-**Gadge, P.P.; Madhikar,S.D. ; Yewle,J.N.;Jadhav,U.U.; Zambare,A. P. and Padul. M.V. (٢٠١١).** Biochemical studies of lipase from germinating oil seeds (*Glycine max* **). *American journal Biochemsitry and Biotechnologye*,** ٧ (٣): ١٤١-١٤٥.

١٢-**Garfin, D. E. (١٩٩٠).** Purification procedures electrophoretic methods. **In:** Methods in enzymology (Murray, E.D. and Dentscher, P.J.), Eds., ***Academic Press***, New York,١٨٢: ٤٢٥-٤٤١.

١٣-**Kundu, m.; joyoti basu, j.; guchhait,m. and chakrabarti, p.(١٩٨٧).** Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase from the Conidia of *Neurospora crassa*. ***Journal of General Microbiology***, ١٣٣**:** ١٤٩-١ ٥٣.

١٤-**Laemmli, U .K. (I ٩٧٠).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T٤. Nature (London) ٢٢٧: ٦٨٠-٦٨٥.

١٥-**Lehmacher, A. and Bisswanger, H. (١٩٩٠) .**Isolation and characterization of an extremely thermostable D-glucose xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB٨**. *Journal of Gen Microbiol.*** ١٣٦: ٦٧٩-٦٨٦.

١٦-**Maliks , S .V.; Kalia, V. and Pundir ,C. S. (٢٠٠٠)**. Immobilization of porcine pancreas lipase on zirconia coated alkylamine glass using glutaraldehyde. ***Indian Journal of Chemistry Technology ,*** ٧:٦٤-٦٧.

١٧-**Mayanpermana,l. D. G. Lndrati, R., Hastutip and suparm , O.(٢٠١١).**Characteristics of purified indingenous lipase from geriminated cocoa been using phenyl sepharose. **AS. *Journal of Food Agriculture Lnd***, ٤(٥): ٢٧٤-٢٨٥.

١٨-**Nath ,M. and Hidumathy, c. k.(**٢٠١٢).IsoLation,optimization and purification of lipase from myroides odoratimimus ***International Journal of Latest Research in Science and Technology***.١ (٣) :٢٣٩-٢٦.

١٩-**Okunwaye,T.; Obibuzory,U. and Okogbe_nin, E. A.(**٢٠١٥). purification and biochemical properties of lipase from raphia palm fruit mesocarp**. *African Journal***, ٩ (٥) ٧٣-٨٠ .

٢٠-**Pahoja, V. M. (**٢٠١٢) .Properties of lipase from Pearl millet seedling. Pak. ***Journal.Biochem. Mol.Biol.***, ٤٥(١) : ٢٦-٣٠.

٢١-**Paques, F. W.; Macedo, G. A.(٢٠٠٦).**Plant lipases from latex: Properties and industrial applications.***Quim. Nova***, ٢٩: ٩٣–٩٩.

٢٢-**Sammour, R.H., (٢٠٠٥)**. Purification and partial characterisation of an acid lipase in germinating lipid body lin seedlings. ***Turkish Journal of Botany,*** ٢٩: ١٧٧-١٨٤.

٢٣-**Sana, N. K.; Hossin, I.; Haque, E. M. and Shaha, R. K. (٢٠٠٤).** Identification, purification and characterization of lipase from germinating oil seeds (*Brassica napus* L.) .***Pakistan Journal of Biological Sciences,*** ٧, (٢): ٢٤٦ -٢٥٢.

٢٤-**Segel, I.H. (١٩٧٦).** Biochemical calculations. ٢nd Edn, John and sons. Inc. New York.

٢٥-**Seth, S. ; Chakravorty, D. ; Dubey,V. K. and Patra, S. (٢٠١٤).**An insight into plant lipase research – challenges encountered. ***Protein Expression and Purification,*** ٩٥: ١٣–٢١.

٢٦-**Weerasooriya M.K.B. and KumarasingheA.A.N.(٢٠١٢).** Isolation of alkaline lipase from rubber seed- partial purification, characterization and its potential applications as a detergent additive, ***Indian Journal of Chemistry and Technology,*** ١٩: ٢٤٤-٢٤٩ .

٢٧-**Whitaker, J. R. (١٩٧٢).** Principles of enzymology for the food scinces. Marcel Dekker, Inc., New York : ٥٧١ – ٥٧٩ .

٢٨-**Yesiloglu,Y. and Baskurt, L.,(٢٠٠٨).**Partial purification and characterization of almond seed lipase .**Preparative *Biochemistry and Biotechnology,*** ٣٨ (٤): ٣٩٧-٤١٠.

٢٩-**Yuan,B.; Cai, Y.; Liao, X.; Yun, L. ; Zhang, F. and Zhang**, D.(**٢٠١٠**). Isolation and identification of a cold-adapted lipase producing strain from decayed seeds of *Ginkgo biloba* L. and characterization of the lipase**.** ***African Journal of Biotechnology,*** Vol. ٩(١٨) : ٢٦٦١-٢٦٦٧.

Purification and Characterization of Lipase enzyme from germinating soy bean seed

*Batool M. Alansari Ali A. Sahi Dhia F. Alfekaik

Department of Food Science. Agriculture college . University of Basrah

Abstract

The study included purification and characterization of lipase enzyme from germinating soy bean seed, by following the gradually precipitated by addition of ammonium sulphate to final saturation of ٢٠ -٩٠٪. Agradual obvious higher specific activity of the enzyme in the precipitate resulted ,till saturation level ٨٠٪ , this step gave aspecific activity of ٣٢٤,٤٠ unit/ mg protein and an enzyme yield of ٢٩,٢٠٪ ,purification folds ١٠,٧٩ time . Results for determination of lipase purity showed an appearance of a single protein band by poly acrylamide gel electrophoresis with out of denaturizing agent . The molecular weight of enzyme was ٤١,٦٨٦ kilo dalton by poly acrylamide gel electrophoresis with denaturizing agent .

The optimum pH for enzymtic activity of the purified enzyme were ٨ while the optimum pH stability profile of the enzyme was between ٧ – ٩, and the enzyme kept ٩٠٪ of its activity, while notes that the optimum temperature for the enzymatic activity of the purified enzyme was ٤٠ C ᵒ, and that enzyme loses ٦٧٪ of its activity at ٩٠ Cᵒ.

Key words : Lipase, ammonium sulphate, purification, molecular weight

---

[٣]*Part of Thesis for third author