أ - استخلاص وتنقية أنزيم الليبوكسيجينيز Lipoxygenase من بذور الفول السوداني *Arachis hypogaea L.*

ابتسام كريم محيسن[1] و إياد نافع يحيى[1] و سند باقر الاعرجي[2]

(1) قسم العلوم– كلية التربية الأساسية - الجامعة المستنصرية

(2) كلية التقنيات الطبية والصحية - هيئة التعليم التقني

تاريــخ الإيداع 2008/04/02

قبل للنشــر في 2008/11/03

الملخص

تضمنت الدراسة اختيار أفضل طريقة لاستخلاص الأنزيم من بين تسع طرائق، ركز المحتوى البروتيني باستخدام الترسيب بالأسيتون البارد من بين خمس طرائق للتركيز (التنقية الجزئية). وأكملت مراحل التنقية باستخدام التبادل الأيوني الهلامي بعمود (DEAE – Sephadex A-50)، ومن ثم استخدام الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل S-300 إذ بلغت الفعالية النوعية 1162.9وحدة/ ملغم بروتين والحصيلة الأنزيمية مقدارها 43.18% وعدد مرات التنقية 8.61 مرة. ثم التأكد من نقاوة الأنزيم بإجراء عملية الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة لبروتين إذ ظهرت حزمة بروتينية واحدة في هلام متعدد اكريل أمايد.

الكلمات المفتاحية: أنزيمات، ليبوكسيجينز، ترسيب الأنزيمات، تنقية الأنزيمات، الفول السوداني.

A - Extraction and Purification of Lipoxygenase From Peanut Seed *Arachis hypogaea*. L

Ibtisam Karim[1]; Ayad Nafi Yehea[1] and Sand AL-Arji[2]

[1] Science Department, College of Basic Education, University of Al-Mustansiriyah.

[2] College of medical technology and healthy, The Technical Education.

Received 02/04/2008

Accepted 03/11/2008

ABSTRACT

The study included the selection of the best methods to extract the enzyme among nine methods. The protein content was concentrated and precipitated by cold acetone among other five methods of concentration (partial purification). The purification stages were achieved by using ion exchange column chromatography (DEAE – Sephadex A 50 column). Followed by gel filtration chromatography using sephacryl S-300. The active parts were lyophlizated (free drying) to obtain Lipoxygenase with 43.18% yield and 8.16 folds of purification and specific activity of 1162.9 unit / mg.

The purity of enzyme was confirmed by poly acryl amide gel electrophoresis under non denaturing conditions, with the appearance a single band .

Key words: Enzyme, Enzyme extraction, Enzyme purification, Lipoxygenase, Peanut Seed

المقدمة

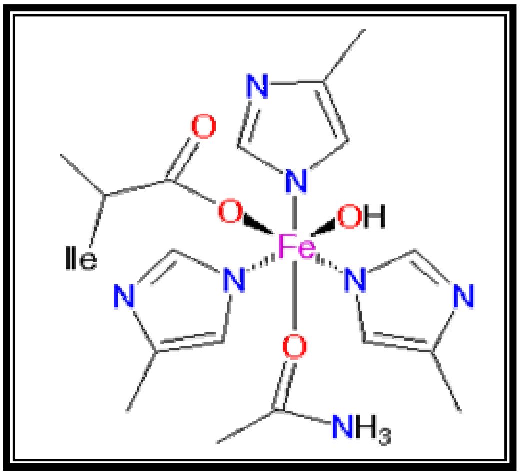
الأنزيمات هي الصنف الأكبر والأكثر تخصصاً من البروتينات وظيفتها في الجسم كعوامل بيولوجية مساعدة للتفاعلات المشمولة في الأيض، وقد تكون الأنزيمات بروتينات بسيطة متكونة كلياً من حوامض أمينية أو بروتينات متبادلة تحتاج إلى مجموعة غير بروتينية لفعاليتها البيولوجية. ولا تقتصر أهمية الأنزيمات في كونها عوامل بيولوجية مساعدة، بل تم استخدامها في مجال الصناعات الكيمياوية والصناعات الغذائية مثل استخدامها في صناعة الأجبان، وفي تحسين خواص الدقيق، وتطرية اللحوم، وتصنيع أغذية الأطفال، وصناعة المشروبات الكحولية، وفي إزالة الأوكسجين الجوي في عملية التعليب، وفي ترويق العصائر، وفي صناعة أغذية خاصة للأشخاص المصابين بالحساسية وفي أغذية الرضع (جاسم، 2004). يتصف أنزيم الليبوكسيجينيز Lipoxygenase بانتشاره الواسع في الطبيعة وبتنوع صوره. يوجد أيضاً في المملكة الحيوانية، وحديثاً تمكن الباحثون من فصله وتنقيته من أنواع جديدة من الأحياء المجهرية (Kermasha وآخرون، 1997) كذلك فإن صوره متنوعة في المملكة النباتية وفي ضمن النوع الواحد، ولاسيما العائلة البقولية إذ يعد بروتين البقوليات أحد أهم مصادر الأنزيمات ولاسيما أنزيم الليبوكسيجينيز، كذلك يوجد في القمح والشعير وفي بعض الفواكه كالتفاح (Kim و Grosch، 1979) ، كذلك يوجد في الفول السوداني الذي يعد من المحاصيل الصناعية المهمة، إن وجود هذا الأنزيم في الفول السوداني قد يؤدي إلى تفاعلات الأكسدة ومن ثم التزنخ التي تؤدي بدورها إلى إعطاء طعم ونكهة غير مرغوب فيهما (off - flavor) فضلاً عن تلف المحصول وعدم إطالة خزنه (Petterson وMackintosh، 1994؛ السلطان وآخرون، 2004).

يقوم أنزيم الليبوكسيجينيز بقصر اللون الأسمر للطحين إلى اللون الأبيض المرغوب فيه، إذ إن هذا الأنزيم مسؤول عن أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة والمحتوية على كثير من الروابط المزدوجة Poly un saturated fatty acid والمحتوية على مجاميع cis, cis, 1, 4 - pentadine والتي تكون مقرونة بانخفاض في القيمة الغذائية نتيجة لأكسدة مركبات أخرى مثل الكاروتين وبعض الفيتامينات والحوامض الأمينية ولا تقتصر هذه التأثيرات على القيم الغذائية فقط بل إنها تتعدى ذلك إلى الصفات الحسية، ومن ثم مدى تقبل المستهلك للمنتجات الغذائية (الأعرجي، 2000؛ الدلالي، 1982).

إن بذور الفول السوداني (Peanut seed) لها قيمة اقتصادية عالية لأنها محصول زيتي ومصدر بروتيني غذائي في الوقت نفسه، فالحاجة المتزايدة إلى البروتينات في غذاء الإنسان يجعل البحث متواصلاً عن مصادر جديدة للبروتين لذلك أدخلت زراعة الفول السوداني إلى النطاق التجاري في العراق حديثا بعدما كان يزرع على نطاق محدود

(الدليمي، 2000). الاسم الانكليزي للفول السوداني Peanuts واسمه العلمي (*Arachis hypogaea*. L.) وهو نبات عشبي حولي، يعود إلى العائلة البقولية.

أشار الباحث Whitaker (1972) إلى أن أنزيم الليبوكسيجينيز قد تم اكتشافه في عام (1928) من قبل الباحثين Boun وHass، وذلك في أثناء ملاحظتهم فقدان اللون الأصفر في عجين القمح بعد إضافة كميات قليلة من طحين فول الصويا. على الرغم من اعتقادهم في ذلك الوقت أن سبب فقدان اللون في عجين القمح هو تحطم صبغة الكاروتين فقد وجد بعدها أن الصبغة المحطمة بشكل رئيسي هي الزانثوفيلات، وبعد ذلك وجد الباحثان Andre وHou في عام (1932) أن فول الصويا تحوي أنزيما يؤكسد الدهون غير المشبعة سمياه أنزيم الليبوكسيديز (Lipoxidase)، وهو الأنزيم الذي أعطته لجنة تسمية الأنزيمات التابعة لاتحاد الكيميائيين الحيويين اسم الليبوكسيجينيز (Lipoxygenase) والذي يقع تحت رقم (EC 1.13.11.12) (Liu, 1998) (Linoleate : Oxidoreductase). كما في الشكل (1).



الشكل (1) جزء من تركيب الليبوكسيجينيز الحاوي على الحديد في النباتات (Skrzypczak وآخرون1997)

تتميز أنزيمات الليبوكسيجينيز المستخلصة من فول الصويا والفول الأردي (Urd beans) والماش والفاصوليا الخضراء بفعاليتها العالية، (Siddiqi وTappel، 1956) ويليها الفول (AL-Obaidy، 1975). وذلك من خلال أكسدتها للمواد الدهنية، ثم البزاليا (Reynolds وKlein، 1982). كان يعتقد سابقاً أن أنزيم الليبوكسيجينيز لا يوجد في الأحياء المجهرية ولكنّ الباحث Kermasha وآخرين (1997) وجدوه في

الأحياء المجهرية حيث استخلصه من بكتريا *Mycobacterium phlei* و*Pseudomons fluorscens*.

تعني تنقية الأنزيم التخلص من الشوائب والمواد الموجودة مع الأنزيم لتفادي الاستنتاجات الخاطئة. ولغرض دراسة صفات الأنزيم وخواصه الحركية لابد من تنقيته، ويمكن تنقية الأنزيم بخطوات متدرجة ومدروسة يفترض أن تزداد من خلالها فعالية الأنزيم النوعية في كل خطوة (Kornberg، 1990). وقد أشار الدلالي (1983) إلى وجود طرائق متعددة لتنقية الأنزيمات وهي على درجة عالية من التنوع يعتمد اختيارها على صفات الأنزيم كالوزن الجزيئي، نقطة التعادل الكهربائي، تخصص الأنزيم للارتباط بمجموعة معينة والحالة الأيونية. وقد استخدم الباحثون طرائق مختلفة في تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من مصادر مختلفة منها لحم الخنزير، والترمس، وفول الصويا (Whitaker، 2004 ; Gada وآخرون، 1999؛ Kermasha وآخرون Suurmeijen 1997 ; وآخرون، 1998;السلطان وآخرون، 2004).

وقد ذكر محي الدين (1998) أن القاسم المشترك في تلك الطرائق هو كروموتوغرافيا التبادل الأيوني فضلاً عن الترشيح الهلامي. وأوضح الباحث Segel (1976) أن اختيار المبادل الأيوني يتم حسب المعادلة الآتية:

$$\triangle p = pI - pH$$

حيث إن:

$\triangle P$: محصلة الشحنة المحمولة على الأنزيم.

pH: الأس الهيدروجيني الأمثل للأنزيم ويحسب متوسطا من المراجع.

pI: نقطة التعادل الكهربائي التقريبية وتحسب متوسطا من المراجع.

وعند تطبيق هذه المعادلة لاختيار نوع المبادل الأيوني لأنزيم الليبوكسيجينيز في بذور الفول السوداني فإن:

$$\triangle P = 6.2 - 7.5$$

$$\triangle P = -1.3$$

وعليه نختار المبادل الأيوني السالب وهو DEAE ذو الشحنة الموجبة لكي يرتبط بشحنة الأنزيم السالبة. ويسمى بالعمود السالب اعتمادا على ما يمسك من شحنة الأنزيم وليس على ما بداخله من شحنة.

استخدمت تقنية الترشيح الهلامي (Gel-Filtration) التي يتم الفصل فيها على أساس الحجم والوزن الجزيئي للأنزيمات، وفي بعض الأحيان تستخدم مادة Sephadex A- 50, 100, 150, 200، وحديثاً تم استخدام هلام السيفاكريل Sephacryl (S - 300) لما يمتاز به من ميزات مهمة مقارنة مع الأنواع الأخرى التي يعتمد أساس عملها على الوزن الجزيئي فهو يحتوي في تركيبه على الأكريل أمايد والدكستران مما يكسبه صلابة جيدة ومقاومة عالية للانضغاط، فضلاً عن تميزه بالفصل الجيد والسريع وسهولة تحضيره وبقائه ثابتاً مدة طويلة. وتتراوح حدود فصله من (Pharmacia fine chemical) (5-600 kDa). وقد استخدم هذه الطريقة الباحثان Molias وValle (1988) في أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الترمس. وقد استخدمها الباحث Kermasha وآخرون (1997) لفصل الأنزيم من الفطر *Fusarium proliferum*، كما استخدمها أيضاً الباحث Kuo وآخرون (1997) لفصل الأنزيم من فول الصويا والترمس. واستخدم هذه الطريقة أيضاً السلطان وآخرون (2004) في فصل وتنقية الليبوكسيجينيز من الفول السوداني. ونظراً لعدم وجود دراسة كافية عن أنزيم الليبوكسيجينيز في بذور الفول السوداني، فإن هذه الدراسة تهدف إلى فصل وتنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني صنف إباء وهو من الأصناف المنتجة محلياً في العراق.

مــواد البحث وطرائقه

تحضير طحين الفول السوداني

طُحنت بذور الفول السوداني بطاحونة مختبرية من خلال مصفي 1 ملم بحيث حصلنا على طحين حفظ في عبوات زجاجية محكمة وخزن في البراد إلى حين إجراء التحاليل اللازمة عليها.

الكاشف والمواد الكيميائية

الكواشف والمواد الكيميائية المستعملة في التحاليل كانت من النوع التحليلي (Analar)، كما استخدم الماء منزوع الشوارد والماء المقطر في جميع مراحل العمل وخطواته.

التحاليل الكيميائية

أجريت التحاليل الكيميائية بمكررين اثنين على عينات طحين بذور الفول السوداني، حسب الطريقة المذكورة في .A.O.A.C (1999)، فقد قدرت الرطوبة، والرماد، والألياف الخام، وجرى تقدير نسبة البروتين باستخدام جهاز Micro – kjeldahl واستعمل العامل 6.25 لتحويل نسبة النتروجين الكلي إلى النسبة المئوية للبروتين، واستخدم مذيب أيثر البترول Petroleum ether في عملية تقدير نسبة الدهن حسب

طريقة Soxhlet التي وصفها Osborn وVooght (1987). وقدرت نسبة الكربوهيدرات كما في (Pearson، 1976) على أساس أن الكربوهيدرات هي المواد المتبقية بعد طرح نسبة الرماد والألياف والبروتين والدهن من 100. وقد قيس الأس الهيدروجيني حسب طريقة Egan وآخرين (1985) باستعمال جهاز قياس الـ pH من نوع Phillips–9409. وقدرت الحموضة الكلية على أساس حمض اللينوليكLinolic acid.

حساب القيمة الحرارية

القيمة الحرارية (كيلو سعره / 100 غم) = $(4 \times P) + (9 \times F) + (3.75 \times c)$

حيث إن:

P: النسبة المئوية للبروتين، F: النسبة المئوية للدهن، C:النسبة المئوية للكربوهيدرات

وان 1غم من المواد البروتينية والدهنية والكربوهيدراتية ينتج 4، 9 و3.75 كيلو سعره على التوالي في الجسم عند احتراقها. (Osborn وVooght، 1987).

استخلاص الليبوكسيجينيز من الفول السوداني

لغرض تحديد الطريقة الفضلى لاستخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الفول السوداني فقد استخدمت طرائق مختلفة منها:

الاستخلاص بالماء المقطر

أضيف 10 غرامات من طحين بذور الفول السوداني إلى 100 مل ماء مقطر منزوع الشوارد مع المزج مدة 20 دقيقة على خلاط مغناطيسي، ثم رشح المحلول بقطعة قماش ململ وأجريت عملية الطرد المركزي للراشح بسرعة (4000 xg) مدة 15 دقيقة في 0 مْ، ثم حفظ الراشح في أنابيب محكمة السد وحفظت في المجمدة - 20 مْ إلى حين استخدامها في تقدير الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين لحساب الفعالية النوعية (حمادي، 2001).

الاستخلاص بمحلول 10 % كلوريد الصوديوم، pH 5

أذيب 10 غرامات من طحين الفول السوداني في 100 مل من محلول 10 % كلوريد الصوديوم بنسبة 1 : 5 (وزن / حجم) ومزج المحلول مدة 20 دقيقة باستخدام خلاط مغناطيسي، ومن ثم رشح المحلول بقطعة قماش ململ وأجري الطرد المركزي للراشح بسرعة (4000 xg) وفي درجة 0 مْ مدة 15 دقيقة، واستخدم المحلول لتقدير الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين لحساب الفعالية النوعية (التميمي، 1996).

الاستخلاص بمحلول 10 % كلوريد الصوديوم pH 8

اتبعت في هذه الطريقة الخطوات نفسها المتبعة في الفقرة السابقة ماعدا تغيير قيمة الأس الهيدروجيني إلى 8 وذلك بإضافة القاعدة NaOH إلى محلول 10 % NaCl .

الاستخلاص بمحلول 0.2 % كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$

أضيف 10غرامات من طحين بذور الفول السوداني إلى 100 مل من محلول 0.2% كلوريد الكالسيوم ومزج المحلول بخلاط مغناطيسي مدة 20 دقيقة، ثم رشح المحلول بقطعة قماش ململ وأجري الطرد المركزي للراشح بسرعة (4000 xg) مدة 15 دقيقة، وأخذ الرائق لقياس الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين.

الاستخلاص بمحلول (0.2 %) كلوريد البوتاسيوم KCl

خلط (10 gm) من طحين الفول السوداني في 100 مل من محلول 0.2 % كلوريد البوتاسيوم ومزج المحلول بخلاط مغناطيسي مدة 20 دقيقة، ثم رشح المحلول بقطعة قماش ململ وأجري الطرد المركزي بسرعة (4000 xg) مدة 15 دقيقة، ثم حفظ الراشح لقياس الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين.

الاستخلاص بمحلول 0.2 مول دارئ الخلاتpH 5

استخدمت الطريقة التي اتبعها Krctoich والتي وصفها التميمي (1996) وذلك بخلط 10 غرامات من طحين بذور الفول السوداني مع 100 مل من محلول دارئ الخلات 0.2 مول 5 pH (0.2 مول CH3COOH Na + 0.2 مول CH3COOH) وأجريت عليها الخطوات السابقة نفسها.

الاستخلاص بمحلول 0.2 مول دارئ الفوسفات 7 pH

كررت خطوات الطريقة السابقة ولكن باستخدام محلول 0.2 مول دارئ الفوسفات 7 pH (1972,Whitaker) (0.2 مول NaH2PO4 + 0.2 مولa2HPO4 . H2O)

الاستخلاص بمحلول الغليسرول 20 %

استخدمت طريقة (Wang وGrant) التي وصفها التميمي (1996) وذلك بخلط 10 غرامات من طحين بذور الفول السوداني مع 20 % محلول الغليسرول بنسبة 1 : 10 (وزن/ حجم) مدة 30 دقيقة وبعدها رشح بقطعة قماش ململ، ثم يجرى له الطرد المركزي بسرعة (4000xg) مدة 15 دقيقة، ويستخدم الرائق لقياس الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين.

الاستخلاص بمحلول 0.5 % كربونات الصوديوم Na_2CO_3

استخدمت الطريقة التي اتبعها Kretoich والتي وصفها التميمي (1996) وذلك بعمل محلول من الطحين 10 غرامات ومحلول كاربونات الصوديوم 0.5 % بنسبة 1 : 5 (وزن/ حجم) وترك مدة 16 ساعة بدرجة 30 مْ، ثم رشح المحلول بقماش ململ وعدل الأس الهيدروجيني إلى 7.2 pH باستخدام 0.5 عياري من حمض HCl، وأجريت عملية الطرد المركزي بسرعة (4000 x g) مدة 15 دقيقة وأخذ الرائق لقياس الفعالية الأنزيمية.

تنقية الليبوكسيجينيز

استخدمت عدة طرائق لتنقية الأنزيم بعد أن تم استخلاصه من بذور الفول السوداني حسب الطريقة التي أعطت أعلى فعالية (10 % NaCl pH 5) وهي كالآتي:

الطريقة المثلى لتركيز المستخلص الأنزيمي

تم تركيز المستخلص الأنزيمي باستخدام خمس طرائق مختلفة وذلك لتحديد الطريقة المثلى لتركيز الأنزيم (التنقية الجزئية) للحصول على أعلى فعالية نوعية (Specific activity) وأعلى نسبة مئوية من الحصيلة الأنزيمية (Yield) والطرائق الخمس هي:

الترسيب بالأسيتون البارد: خلط الأسيتون المبرد مع المستخلص الأنزيمي بنسبة 1:0.5، 1:1، 1:2، 1:3 و1:4 (حجم/ حجم) وأُضيف الأسيتون تدريجياً مع التحريك المستمر داخل حمام ثلجي، فصل الراسب بالطرد المركزي وبسرعة (4000 x g) مدة15 دقيقة، أهمل الراشح وأذيب الراسب في محلول دارئ الفوسفات 0.2 مول pH 7، ثم قيست الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين فيه. (التميمي، 1996).

الترسيب بكبريتات الأمونيوم: تم تركيز الأنزيم باستخدام كبريتات الأمونيوم بموجب الطريقة الموضحة من قبل (Segel، 1976) بدرجة 4 م°مع التحريك المستمر حتى بلوغ نسب إشباع تراوحت بين 30-60%، ثم فصلت الرواسب المتكونة بعد كل إضافة بالطرد المركزي وبسرعة (5000 x g) مدة 15 دقيقة، أهمل الرائق، وأُذيب الراسب في أقل كمية ممكنة من دارئ الفوسفات بتركيز 0.2 مول وpH 7 ثم أجريت عملية النضح الغشائي (Dialysis) للمحلول نفسه وقدرت الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين فيه.

الترسيب بالكحول الاثيلي: تم تركيز المستخلص الأنزيمي بإضافة حجوم معينة من الكحول الاثيلي تدريجياً مع التحريك المستمر للحصول علي نسب مئوية متدرجة من الكحول تراوحت من 30 – 50 %، طرد المحلول مركزياً بسرعة (5000 x g) مدة 15 دقيقة وأهمل الراشح وأذيب الراسب المتكون في كل مرحلة من مراحل إضافة الكحول في أقل كمية من دارئ الفوسفات بتركيز 0.2 مول و pH 7، وقدرت الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين فيه (محي الدين، 1998).

التركيز بحبيبات السفادكس G.25 الجافة: يضاف المستخلص الأنزيمي إلى أنبوب الديلزة (النضح الغشائي) ويحاط بطبقة من حبيبات السفادكس G. 25 يوضع في طبق داخل البراد حتى اليوم التالي، ثم يتم قياس الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين (التميمي، 1996).

التركيز بالترشيح الفائق: أجريت عملية الترشيح الفائق للمستخلص الأنزيمي الخام في خلية الترشيح الفائقة السرعة سعة 50 مل من نوع (Amicon -Model K-52-

(PS,MAX) الهولندية الصنع، واستخدم المرشح (Diaflo Ultra filter) من نوع -XM 100 بعد نقعه بالماء المقطر مدة ساعة واحدة، ثم تثبت في الخلية ويضاف المستخلص الأنزيمي في مستودع الخلية وتغلق. واستخدم النتروجين لدفع المستخلص خلال المرشح بضغط 3.5 كغم/ سم ووضعت الخلية على خلاط مغناطيسي إلى حين انتهاء الترشيح الفائق، عندها يكون المستخلص قد ركز ثم يقاس الحجم وتركيز البروتين وفعالية الأنزيم.

خطوات تنقية الأنزيم

تمت تنقية الأنزيم المستخلص بخطوات وهي كروموتوغرافيا التبادل الأيوني Ion Exchange chromatography، وأعد عمود المبادل الأيوني، حيث حضر المبادل الأيوني Sephadex A 50-DEAE Cellulose بالطريقة التي وصفها (Whitaker,1972) وقد أضيف المحلول الأنزيمي المركز بالأسيتون البارد إلى عمود المبادل DEAE Cellulose – Sephadex A 50 ثم جمعت الأجزاء التي لم ترتبط بالمبادل الأيوني والمتدفقة من العمود في أنابيب اختبار بمعدل 5 مل، وبسرعة جريان 4 / 5 (مل/ دقيقة)، غسل العمود بمحلول الموازنة نفسه إلى حين انخفاض الامتصاص على 280 نانومتراً إلى صفر. ثم أجريت عملية الاسترداد باستخدام التدرج الملحي الخطي (Linear Salt Gradient)، ثم قراءة الامتصاصية على 280 نانومتراً لتحديد القمم المفصولة، ولغرض إجراء هذه العملية تم استخدام جامع الأجزاء المتدفقة (Fraction collecter) من نوع (Ultroac 2070). وتم الترشيح باستخدام كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel-Filtration وباستخدام مادة السيفاكريل (Sephacryl S-300) المجهزة من شركة Pharmacia السويدية. حضر الهلام حسب تعليمات الشركة المنتجة إذ علقت حبيبات السيفاكريل بالماء المقطر بنسبة 10:1 (وزن/ حجم)، وبعد ركود الهلام سكب السائل العلوي بهدوء وبعدها غسل الهلام بمحلول الموازنة (فوسفات الصوديوم الدارئ) 0.01 مول وpH 7، بعد ذلك جرى تعبئة المزيج في عمود زجاجي بأبعاد 1.6 × 58 سم وأجريت موازنة العمود بالمحلول السابق نفسه حتى اليوم التالي وبسرعة جريان 3 مل/ دقيقة. مرر المحلول الأنزيمي المركز الذي حصل عليه من خطوة التنقية السابقة (التبادل الأيوني) إلى سطح هلا السيفاكريل (S-) 300، واستردت الأجزاء بمحلول الموازنة نفسه وبسرعة جريان 5/9 (مل/ دقيقة)، ثم قيس امتصاص الضوء على طول موجي مقداره 280 نانومتراً لتحديد القمم المفصولة وتحديد الفعالية في القمم المفصولة.

تعيين نقاوة الأنزيم

اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد أكريل أمايد بغياب العوامل الماسخة (Poly acryl amid electrophoresis under non denaturted condition) والتي ذكرها (Gaffney، 1996) في تعيين نقاوة الأنزيم، وكانت المواد المستعملة:

- **محلول اكريل الخزين Acryl amid stock solution**: حضر بتركيز 28 % بإذابة 27 غراماً من اكريل امايد مع 1 غرام من Bis acryl amide في 100 مل من الماء المقطر،رشح المحلول وحفظ في درجة حرارة 7 مْ.

- **محلول دارئ هلام الفصل Resolving gel buffer**: حضر من (Tris hydroxy methyl methyl amine) بتركيز1.5 مول وضبط الـ pH عند 8.3 بإضافة حمض HCl بتركيز 1 مول.

- **محلول دارئ هلام الرص Stacking gel buffer**: حضر بتركيز 0.5 مول بمزج حجم واحد من محلول دارئ هلام الفصل مع حجمين من الماء المقطر وضبط الـ pH عند 6.8 .

- **محلول الأقطاب Electrode buffer solution** : حضر من Tris – HCl بتركيز 0.025 مول والكلايسين بتركيز0.192 مول وضبط الـ pH عند 8.3 .

- **محلول 1.5 % فوق كبريتات الأمونيوم Ammonium per sulfate**

- **محلول(N,N,N,N.Tetra methylene ethylene diamine) (TEMED)**.

- **محلول التصبيغ Staining Solution**: حضر بإذابة 0.25 غراماً من صبغة (Commassie brilliant blue - R-250) في حمض الخليك والميثانول والماء المقطر بالنسب 4 : 5 : 1 على التوالي.

- **محلول إزالة الصبغة Destining Solution**: حضر من 40 مل كحول مثيلي و10 مل حمض الخليك وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

- **محلول التثبيت Fixing Solution**: يتكون من 40 % كحول مثيلي و10 % حمض الخليك ثلاثي الكلور TCA.

- **محلول الحفظ Presserving Solution**: حضر بمزج 150 مل كحول اثيلي و50 مل حمض الخليك و50 مل غليسرول وأكمل الحجم إلى 500 مل بالماء المقطر.

-**محلول النموذج**: حضر النموذج بإذابة 2 غرام من الأنزيم مع 1 مل من محلول دارئ الفصل و50 مايكروليتراً من 0.25% صبغة برومو فينول الزرقاء ورفعت كثافة محلول النموذج بإضافة 7 قطرات من الغليسرول.

طريقة العمل

بعد تحضير المحاليل المذكورة حضر هلاما الفصل والرص وفق النسب المذكورة في الجدول (1)، لتحضير هلام الفصل خلطت النسب المذكورة بشكل جيد، ثم صب الخليط مباشرة في أنابيب زجاجية بطول 10 سم وبقطر 0.5 سم وترك الهلام داخل الأنابيب للتصلب، بعدها أزيلت طبقة الماء من سطح الهلام المتصلب ثم أخذت الحجوم المذكورة

بحسب الجدول لتحضير هلام الرص وخلطت بشكل جيد ونقلت مباشرة إلى سطح هــلام الفصل المتصلب بواقع 1 مل من هذا الهلام في كل أنبوبة، وتركت أعمدة الهــلام لكــي تتبلمر.

الجدول (1) مكونات هلام الفصل والرص

المـــادة	الفقرة	هلام الفصل 7.5 %	هلام الرص 3%
ماء مقطر	-	13.4 مل	19 مل
محلول أكريل امايد الخزين	1	9.6 مل	4 مل
محلول دارئ هلام الفصل	2	8 مل	-
محلول دارئ هلام الرص	3	-	8 مل
TEMED	6	40 مايكروليتر	40 مايكروليتر
برسلفات الأمونيوم	5	0.32 مل	0.32 مل

عملية الفصل

بعد تحضير الأنابيب الحاوية على الهلام توضع هذه الأنابيب في أماكنها المخصــصة في الجهاز، ثم يوضع محلول الأقطاب في المستودع وربطت الدائرة الكهربائية بفرق جهد مقداره 100 فولت وتيار 1.5ملي أمبير مدة 15 دقيقة، ثم أوقف التيار الكهربائي لوضـــع النماذج وتوصيلها كهربائيا. يوضع بعد ذلك 50 مايكروليتراً من نموذج الأنزيم المحــضر مسبقا على القمة العليا للأنبوبة الحاوية على الهلام. يمرر تيار كهربائي بفولتية مقــدارها 200 فولت وبتيار25-35 ملي أمبير بدرجة 4 م° مدة 6 – 8 ســاعات ثــم اســتخرج الهلام وغمر في محلول التثبيت مدة 30 دقيقة ثم في محلول التصبيغ مدة 18 ســاعة، وأخيراً في محلول إزالة الصبغة مع استبداله إلى حين إزالة الصبغة من الهــلام وزيــادة وضوح حزمة البروتين، ثم حفظ الهلام بأنابيب اختبار حاوية على محلول الحفظ.

النتائج والمناقشة

التحاليل الكيميائية لبذور الفول السوداني

يبين الجدول (2) نتائج التحاليل الكيميائية لبذور الفول السوداني صنف إباء العراقــي من حيث تحليل مكوناته من الرطوبة والبروتين والدهن والألياف والرماد والكربوهيدرات وبعض الصفات الأخرى. جاءت هذه النتائج مقاربة جداً لما وجده المــشكور (1985) إذ وجد أن نسبة البروتين 28.5% وأن نسبة الزيت 47.5% وأن نسبة الألياف الخام 2.8% وان نسبة الرماد 2.9% وأن نسبة الكربوهيدرات كانت 11.2% في الفول السوداني من أحد الأصناف المحلية. كانت هذه النسب متقاربة مع ما ذكره Hoffpauir (1979) مــن أن الفول السوداني يحتوي تقريباً على 40-50% زيتاً 20-30% بروتيناً وأن زيت الفول السوداني يتألف من كليسيريدات الحموض الدهنية طويلة السلــسلة، يتــضمن المحتــوى

الكربوهيدراتي النشأ والسكروز والمركبات البكتينية والسليلوز. كما جاءت النتائج مطابقة لما وجد السلطان وآخرون (2004) والذي ذكر بأن بروتينات الفول السوداني تتألف بصورة رئيسة من الكلوبيولينات Globulins والتي تم عزل اثنين منها وسميت Arachin وConarachin اللذين يشكلان نسبة 4 : 1.

الجدول (2) مكونات بذور الفول السوداني

المكونات	نسبتها المئوية %
الرطوبة	7.5
البروتين	24.8
الدهن	44.2
الألياف الخام	3.1
الرماد	2.7
السكريات	17.7
القيمة الحرارية (كيلو سعره/ 100 غم)	567.8
الحموضة الكلية (حمض اللينوليك)	0.81
الأس الهيدروجيني pH (الدالة الحمضية)	6.6

استخلاص الليبوكسيجينيز Lipoxygenase Extraction

تحديد الطريقة المثلى لاستخلاص الأنزيم

استخلص أنزيم الليبوكسيجينيز باستخدام محاليل مختلفة تم اختيارها اعتماداً على المراجع العلمية في مجال استخلاص الأنزيمات (Whitaker، 2004 ; Sawhney وSingh، 2005 ; الصوفي، 2005). درست كفاءة تسع طرائق لاستخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الفول السوداني، إذ أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3) اختلاف الفعالية النوعية للأنزيم باختلاف المحاليل الدارئة والأس الهيدروجيني المستخدم، وقد عد الاستخلاص بمحول كلوريد الصوديوم 10% وpH 5 أفضل المحاليل، من حيث يساعد على استخلاص الأنزيم بكفاءة عالية مقارنةً مع محاليل الاستخلاص الأخرى. إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 138.3 (وحدة/ ملغم بروتين) والفعالية الكلية 22410 وحدة وتلاه محلول الاستخلاص بدارئ الخلات 0.2 مول وpH 5 والفعالية النوعية 101.12 وحدة/ ملغم بروتين، وقد تراوحت الفعالية النوعية والفعالية الكلية بين 13.14 – 138.3 وحدة/ ملغم بروتين و912-22410 وحدة للأنزيم المستخلص باستخدام جميع المحاليل. تعزى قابلية محلول كلوريد الصوديوم 10 % العالية في استخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز إلى أن زيادة القوة الأيونية تؤدي إلى فك الترابطات بين الأنزيم والمواد الخلوية الأخرى وزيادة ذائبيته في محلول الاستخلاص مما أدى بدوره إلى زيادة الفعالية النوعية للأنزيم، فضلاً عن ذلك فإن جدار الخلية النباتية يحتوي على بعض الجزيئات الكبيرة المشحونة كالمواد البكتينية التي تعمل على تكوين المعقدات الأيونية مع الأنزيم

لذلك يحتاج إلى محاليل استخلاص ذات قوة أيونية عالية لتحرير الأنزيم. 1995, Whitaker; 1972, Borcelo Munoz ; الأعرجي، 2000 ;السلطان وآخرون، 2004 ; جاسم، 2004 ; كريم، 2004) وقد استخدم AL-Bakir وآخرون (1988) هذه الطريقة نفسها في استخلاص الأنزيمات من مصادر مختلفة. ومن الجدير بالذكر أن عملية الاستخلاص وارتفاع أو انخفاض الفعالية النوعية في المستخلصات الخام المتحصل عليها تعتمد على نوع الأنزيم ومصدر الأنزيم (نباتي أو حيواني أو من الأحياء المجهرية)، كذلك تعتمد على طبيعة تركيب الأنزيم والحالة الوراثية والبيئية لمصدر الأنزيم وإلى طبيعة الارتباطات الحاصلة بين الأنزيم والمكونات الأخرى للحيوان أو النبات مثل المواد البكتينية والألياف والمواد الكربوهيدراتية التي تحتاج إلى محاليل استخلاص ذات أس هيدروجيني منخفض وذات قوة أيونية عالية لتسهيل عملية الاستخلاص لأنزيم الليبوكسيجينيز جاسم، 2004 ; Javeri وUhlenbruck، 2004 ; الطويل، 2004 ; التميمي، 1996). وبعد الحصول على المستخلص الأنزيمي الخام والحاوي على أعلى فعالية نوعية وقبل الدخول في مراحل تنقية الأنزيم ينبغي معرفة بعض المؤشرات الأولية الخاصة بصفاته ومن أهمها الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية والثبات وكذلك درجة الحرارة المثلى للفعالية والثبات في المستخلص الأنزيمي الخام ولكون النتائج التي تم الحصول عليها متطابقة مع نتائج صفات الأنزيم المنقى نفسها، لذلك تم ذكرها في فقرات توصيف الأنزيم بغية الاختصار.

الجدول (3) طرائق استخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز

المعـــــــاملة	الحجم (مل)	الفعالية وحدة /مل	البروتين ملغم	الفعالية الكلية(وحدة)	الفعالية النوعية وحدة/ملغم بروتين
الماء المقطر	33	46	3.5	1518	13.14
10% Nacl و pH 5	45	498	3.6	22410	138.3
محلول الغلسيرول 20%	52	108	1.6	5616	67.5
محلول KCl 0.2 %	34	204	5.5	6936	37.09
Na_2CO_3 0.5 %	33	119	1.6	3168	60.0
NaCl 10 % و pH 8	38	24	1.3	912	18.46
دارئ الخلات 0.2 مول pH 5	27	250	2.47	6750	101.12
$CaCl_2$ 0.2%	50	119	2.1	7250	69.04
دارئ الفوسفات 0.2 مول pH 7	48	170	4.6	8160	36.96

تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز
Purification of Lipoxygenase

استخدمت طرائق مختلفة لتنقية الليبوكسيجينيز من مصادر مختلفة كان الهدف منها إزالة احتمال تداخل المواد الأخرى الموجودة في المستخلص الخام في أثناء دراسة صفات الأنزيم. (الأعرجي، 2000). يقصد بتنقية الأنزيم القيام بمجموعة من الخطوات الكيميائية

والفيزيائية المتعاقبة بهدف الحصول على مستخلص أنزيمي نقي والتخلص من أكبر قدر ممكن من البروتينات والمواد الأخرى كالشوائب والصبغات مثلاً. وتقاس كفاءة كل خطوة من خطوات التنقية بما يعرف بالحصيلة الأنزيمية yield (وهي تعبر عن النسبة المئوية للفعالية الأنزيمية الموجودة أصلاً التي يتم الاحتفاظ بها) وعلى أساس عدد مرات التنقية Fold purification (وهي تعبر عن العامل الذي تزداد به الفعالية النوعية للمستخلص). (محي الدين، 1998).

الترسيب بالأسيتون البارد

يمكن توضيح فائدة الأسيتون البارد في الترسيب بأنه يحدث تكتلاً لجزيئات البروتين مع بعضها بارتباط المجاميع المشحونة ومن ثم زيادة قوة التجاذب Attraction Force بحسب العلاقة الآتية التي أوردها Whitaker (1972) .

$$F = \frac{Z^+ Z^-}{Dr^2}$$

حيث إن:

$Z^+ Z^-$: تمثل الشحنات الموجبة والسالبة على البروتين (الأنزيم).

D: ثابت الفصل الكهربائي (ثابت ثنائي القطب).

r: المسافة بين جريئتين بروتين (أنزيم). F : قوة التجاذب.

إذ يؤدي خفض قيمة D (ثابت الفصل الكهربائي) إلى زيادة قوة التجاذب، ونظراً لأن قيمة D للمذيبات العضوية (الأيثانول، الميثانول، الأسيتون) هي30 وهي أقل مما هي لقيمة D للماء 80 فسوف يؤدي ذلك إلى مضاعفة F (قوة التجاذب) ومن ثم إلى ترسيب البروتين. ولتفادي حدوث تمسخ للبروتينات (الأنزيمات) Denaturation عند استخدام المذيبات العضوية نتيجة كسر الروابط الكارهة للماء Hydrophobic bonds الموجودة في التركيب الجزيئي للبروتين يستخدم الأسيتون البارد. وقد استخدمت في هذا البحث خمس نسب خلط للأسيتون البارد مع المستخلص الأنزيمي هي 0.5 : 1، 1 : 1، 2 : 1، 3 : 1 و4 : 1 (حجم/ حجم) لترسيب الأنزيم من مستخلصاته، أظهرت النتائج أفضلية نسبة الخلط 2 : 1 على بقية النسب من حيث الفعالية النوعية المستحصل عليها لذلك اعتمدت في ترسيب الأنزيم من مستخلصاته كما موضح في الجدول (4). وقد أسهم في تحقيق تنقية جزئية للأنزيم بلغت 3.65 مرة وبحصيلة مقدارها (66.7%). وقد استخدم هذه الطريقة كثير من الباحثين في تنقية الأنزيم إذ استخدمها السلطان وآخرون (2004) في تنقية الأنزيم من الفول السوداني وحصلوا على فعالية نوعية 65.58 (وحدة/ملغم) وعدد مرات تنقية 2.35 مرة وحصيلة أنزيمية بلغت 45.64% وأكد السلطان وآخرون (2004) أن تركيز أنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني باستخدام الأسيتون البارد والكحول هي أفضل الطرائق.

واستخدمها أيضاً AL-ObaidyW (1975) في تركيز المستخلص الأنزيمي الليبوكسيجينيز في الفول، لذلك اعتمدت هذه الطريقة في تنقية الأنزيم.

التركيز بالكحول الأثيلي Concentration by Ethanol

يوضح الجدول (4) نتائج ترسيب الأنزيم باستخدام الكحول الأثيلي البارد إذ تراوحت الفعالية النوعية بين 10.5-459.2 وحدة/ ملغم بروتين للأنزيم المركز بالكحول الأثيلي عند رفع نسبته في المستخلص الخام من 30% - 50% مقابل 137.5 وحدة/ ملغم بروتين في المستخلص الخام، عليه فإن عدد مرات التنقية الذي حصلنا عليه ما بين النسبتين المذكورتين من الكحول الأثيلي بلغ (3 مرة) كخطوة أولى من خطوات التنقية وعلى مرحلتين، في الأولى أضيف الكحول الأثيلي إلى المستخلص الخام بتركيز 30% أهمل الراسب المتكون (قليل الفعالية النوعية) إذ بلغت الفعالية 76.6 وحدة، ثم رفع تركيز الكحول في الراشح إلى 50% إمعاناً في ترسيب الأنزيم وجمع الراسب وإذابته في أقل كمية من المحلول الدارئ إذ بلغت الفعالية في هذه النسبة من الكحول 753 وحدة.من الجدير بالذكر أن عملية الترسيب بفعل المذيبات العضوية (الميثانول، الأيثانول، الأسيتون.. الخ) القابلة للامتزاج بالماء (Water Miscible) تعتمد على ثابت الفصل الكهربائي Dielectric constant لهذه المذيبات العضوية التي هي أقل من الماء بكثير مما يؤدي إلى انخفاض كبير في قيمة هذا الثابت وارتفاع قيمة القوة التي تجذب الجزيئات بعضها إلى بعض وتكوين كتل تترسب في المحلول. على الرغم من أن كثيراً من الباحثين ومنهم (كريم، 2004 ; جاسم ، 2004 ; الشيخلي ،2004 ;الصوفي، 2005) استخدموا كبريتات الأمونيوم في تركيز الأنزيمات ومنها الليبوكسيجينيز، إلا أن بعضهم أكد كفاءة التركيز بالمذيبات العضوية مثل الكحول الأثيلي والأسيتون وفضل عدد كبير منهم ترسيب الأنزيمات من مستخلصاتها الخام بالمذيبات العضوية دون اللجوء إلى الترسيب بالأملاح. (محي الدين ،1998 ; حسن،1996 ; Al-Obaidy، 1975).

الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم oncentration by Ammonium Sulfate

تعدُّ عملية الترسيب بالأملاح المتعادلة من العمليات الضرورية في تنقية الأنزيمات للتخلصً من البروتينات غير المرغوب فيها والموجودة مع الأنزيم وتقليص حجم المستخلص الخام والحصول على الأنزيم بدرجة من النقاوة، وأملاح كبريتات الأمونيوم فعالة في ترسيب البروتينات بسبب ذائبيتها العالية فضلاً عن انعدام تأثيرها في البروتينات (السعيدي، 2004 ; Munoz و Borcelo، 1995)، فيحدث الترسيب بالأملاح بفعل معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والإخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما يؤدي ذلك إلى انخفاض ذائبيتها وترسبها وتسمى هذه العملية (Salting out) (التمليح الخارجي)، (1997,Schmander). يرفع التركيز الملحي على مراحل لغرض ترسيب الأنزيم في المستخلص الخام، إذ يعمل الملح على معادلة الشحنات

الموجودة على سطح البروتين وكذلك سحب طبقة الماء المحيطة به مما يؤدي إلى تقليل ذائبيته مما يعمل على ترسيب البروتين. وقد استخدم (جاسم، 2004) هذه الطريقة في تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الترمس وبنسب إشباع مختلفة وأيضاً استخدمها Al-Hassnawi (2006) في تنقية أنزيم البيتاكلاكتوسايديز وبنسب إشباع تتراوح بين 20-70%، وكذلك استخدمها الشيخلي (2004) في تنقية أنزيم ألفا أميليزمن بكتريا *Becillus lichenforimis* R_5 بنسبة إشباع 80%. ويلاحظ من الجدول (4) أن الفعالية النوعية للإنزيم كانت بين 7.7 – 146.8 وحدة /ملغم من البروتين ما بين نسبتي إشباع 30% إلى 60% وهذا يعني أن نسبة الإشباع 30% لم ترسب أنزيم الليبوكسيجينيز وإنما رسبت بروتينات أخرى بدليل أن فعالية الأنزيم كانت منخفضة جداً وهي 42.2 مقارنةً بالفعالية عند نسبة إشباع 60% والتي بلغت 433.1، وأخيراً إن الفعالية النوعية بنسبة إشباع 60% كانت 146.8 وحدة/ملغم من البروتين مقارنةً بـ 7.4 وحدة/ ملغم من البروتين بنسبة إشباع 30%. وأن عدد مرات تنقية الأنزيم المركز بكبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع 60% كانت 1.06 وبحصيلة أنزيمية مقدارها 23.19%، إن هذه النسبة من الحصيلة الأنزيمية وعدد مرات التنقية هي أقل من النسب الأخرى في طرائق التركيز المستخدمة لذلك لم تعتمد هذه الطريقة.

التركيز بحبيبات السفادكس الجافة
Concentration by dry granules of sephadex G-25

تظهر النتائج الموضحة من الجدول (4) أن هذه الخطوة قد حققت تنقية جزئية للأنزيم مقدارها 2.74 مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها 34.4%، وهي نتيجة جيدة في تركيز الأنزيم، لكن إن عملية التركيز بحبيبات السفادكس الجافة G-25 أعطت تنقية جزئية أقل من الترسيب بالأسيتون البارد والكحول الأثيلي ولكنها كانت أعلى من طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم والترشيح الفائق. (Al-Hassnawi، 2006 ; جاسم، 2004). لم تشر معظم الدراسات المتوافرة في مجال تنقية الليبوكسيجينيزات إلى استخدام حبيبات السفادكس كطريقة لتركيز المستخلصات الأنزيمية، فقد تم استخدامها حالياً بديلاً عن مادة متعدد الاثيلين كلايكول Poly ethylene Glycol غير المتوافرة حالياً والغالية الثمن.

التركيز بالترشيح الفائق Concentration by Ultra – Filtration

تعد من الطرائق المستخدمة على نطاق واسع على المستويات المخبرية والصناعية ولاسيما في تنقية الأنزيمات وذلك لكون هذه الطريقة لا تحتاج إلى مواد كيميائية كثيرة، ويتم العمل على درجات حرارية منخفضة ولا يحدث تغيير في طور البروتين أي لا يحدث تحول من ذائب إلى راسب. يوضح الجدول (4) النتائج المتحصل عليها من هذه الطريقة عند تركيز الأنزيم إذ كانت الفعالية النوعية 421.5 وحدة/ ملغم بروتين وبعدد مرات تنقية 2.95 مرة وبحصيلة أنزيمية 27.4%. وقد وجد البيار (1994) أن هذه

الطريقة مجدية في مجال تركيز أنزيمات الاميليز، وكذلك استخدمها سعيد (2004) في تركيز أنزيم البروتييز المنتج من خميرة *candida albicans*، وأيضاً استخدمها السلطان وآخرون (2004) في تركيز الليبوكسيجينيز من الفول السوداني إذ حصل على عدد مرات تنقية 2.28 مرة وبحصيلة أنزيمية 41.95%، وأيضاً استخدمها جاسم (2004) في التنقية من بذور الترمس.

الجدول (4) طرائق تركيز الأنزيم من المستخلص الخام "التنقية الجزئية"

ت	الطريقة	الحجم (مل)	الفعالية (مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
	المستخلص الخام	49	500	3.6	138.7	24500	1.0	100
1	الأسيتون المبرد 1:2	17	962.3	1.9	506.5	16359	3.65	66.7
	المستخلص الخام	49	465	3.6	137.5	22776	1.0	100
2	الايثانول %30 %50	16 16	76.6 753.0	7.3 1.64	10.5 459.2	1225.6 12048	0.067 3.33	2.38 52.9
	المستخلص الخام	45	498	3.6	138.3	22410	1.0	100
3	كبريتات الامونيوم %30 %60	12 12	42.20 433.1	5.5 2.95	7.7 146.8	506.4 5197.2	0.06 1.06	2.26 23.19
	المستخلص الخام	46	494	3.6	137.2	22724	1	100
4	السفادكس G-25	13	600.4	1.6	375.3	7805.2	2.74	34.4
	المستخلص الخام	45	500	3.5	142.8	22500	1	100
5	الترشيح الفائق	8	771.3	1.83	421.48	6170.4	2.95	27.42

تنقية الأنزيم (كروموتوغرافيا التبادل الأيوني)
Enzyme purification

تضمنت تنقية الأنزيم ثلاث خطوات رئيسة وهي الاستخلاص للحصول على الأنزيم الخام والترسيب بالأسيتون البارد ثم إمرار الأنزيم المنقى جزئياً على عمود المبادل الأيوني السالب DEAE Cellulose Sephadex-A50 الذي تمت موازنته بدارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.01 مول وpH 7، ثم قيست الامتصاصية على طول موجي 280 نانومتراً. يوضح الجدول (5) أن الحصيلة الأنزيمية بلغت 64% وبعدد مرات تنقية 3.55 مرة في خطوة التنقية الجزئية وهي خطوة الترسيب بالأسيتون البارد، وازداد عدد مرات التنقية إلى 6.06 مرة في خطوة التبادل الأيوني Ion Exchange ، ظهرت ثلاث قمم (Peaks) في مرحلة التنقية هذه كانت منها قمتان في ضمن مرحلة الغسل Washing وكانت خاليتان من الفعالية الأنزيمية تماماً مما يؤكد ارتباط الأنزيم بالمبادل الأيوني السالب، إن محصلة الشحنات المحمولة على الأنزيم في أحوال الاسترداد هي شحنات سالبة تتنافر مع شحنة الأنزيم لذلك تنزل بمرحلة الغسل. أما في مرحلة الاسترداد (Elution) فنلاحظ ظهور قمة واحدة، وكانت هذه القمة تحتوي على الفعالية التي تؤكد

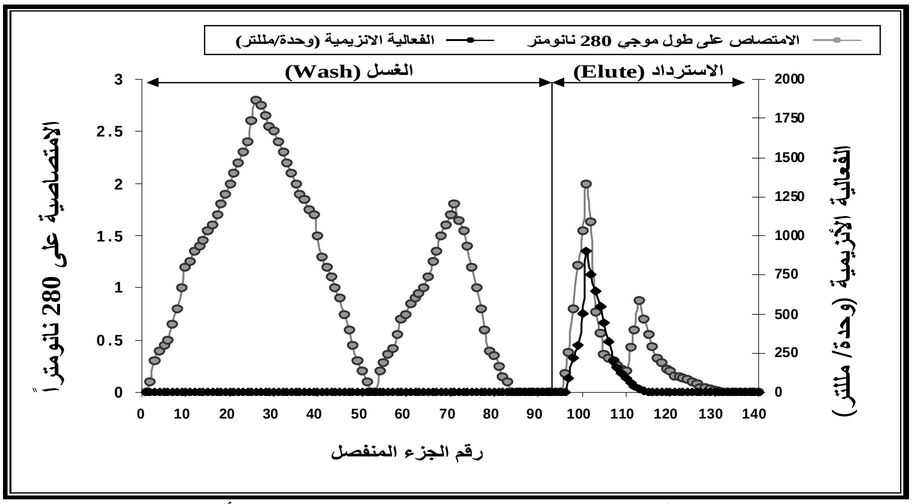
وجود الأنزيم في هذه المرحلة. ازدادت الفعالية النوعية للأنزيم من 135.14 وحدة/ملغم من البروتين في مرحلة الإنزيم الخام و480 وحدة/ ملغم من البروتين في مرحلة التنقية الجزئية بالأسيتون إلى 819.5 وحدة/ ملغم من البروتين في خطوة التبادل الأيوني. جمعت الأجزاء الحاوية على فعالية عالية وقيس حجمها والفعالية وتركيز البروتين فيها. كما في الأشكال (2، 3، 4).

الجدول (5) خطوات تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الفول السوداني

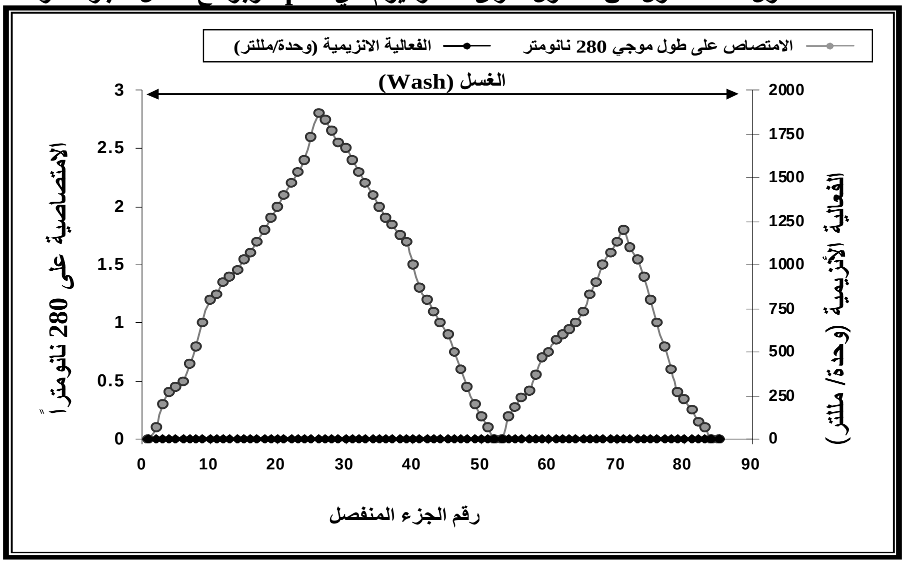
ت	خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/ مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية (%)
1	المستخلص الخام	48	500	3.7	135.14	24000	1	100
2	الأسيتون المبرد	16	960	2	480	15360	3.55	64
3	المبادل الأيوني DEAE-Sephadex A50	39	336	0.41	819.5	13104	6.06	54.6
4	الترشيح الهلامي Sephacryl S-300	33	314	0.4	1162.9	10362	8.61	43. 18

الترشيح الهلامي Gel Filtration

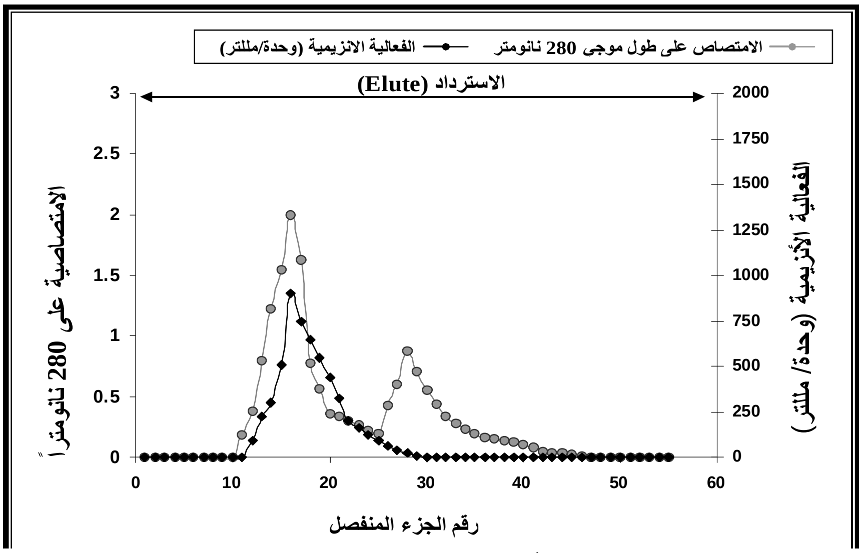
تلت خطوة التبادل الأيوني إمرار المحلول الأنزيمي الناتج عن الخطوة السابقة على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-300 الذي تمت موازنته باستعمال دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.01 مول و pH 7 ثم جمعت الأجزاء المستردة من العمود وقيست الامتصاصية الضوئية على طول موجي 280 نانومتراً. في هذه الخطوة أمكن الحصول على قمة بروتينية ذات فعالية عالية والشكل (5) يوضح أن قمة الفعالية تكاد تكون متطابقة تقريباً مع قمة البروتين، إن هذه الخطوة تعد دليلاً على نقاوة الأنزيم، إذ ارتفع عدد مرات التنقية في هذه الخطوة إلى 8.6 مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها 43.18% كما في الجدول (5) وتعبر النسبة المئوية عن كفاءة الفصل الجيد. اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (جاسم، 2004) إذ نقى أنزيم الليبوكسيجينيز بخطوتين متتاليتين بعمود السيفاكريل S-300، كما أن نتائج تنقية الأنزيم قيد الدراسة جاءت بمستوى أعلى قليلاً من النتائج التي حصل عليها (السلطان وآخرون، 2004) إذ حصل على حصيلة أنزيمية مقدارها 36% عند تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني وبخطوات التنقية نفسها، أي إن هذه الدراسة حققت تقدماً بمقدار 6% من ناحية الحصيلة الأنزيمية. ثم جمعت أجزاء الاسترداد الحاوية على الفعالية وحفظت بالمجمدة إلى حين الاستعمال. استخدم الترحيل الكهربائي بغياب العوامل الماسخة Denaturation Factors لتعيين نقاوة الأنزيم وخلوه من بروتينات أخرى، فلوحظ ظهور حزمة بروتينية واحدة (One band) في هلام متعدد أكريل أمايد Poly acryl amid Gel بعد أن كانت 4 حزم في المستخلص الأنزيمي المركز بالأسيتون البارد كما في الشكل (6)؛ مما يشير إلى وصول نقاوة الأنزيم حد التجانس (Singleton وآخرون، 2005) فضلاً عن السلوك الكروماتوغرافي للأنزيم المنقى خلال الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل S-300 كما في الشكل (5) إذ كانت قمة الفعالية متطابقة تطابقاً تاماً مع قمة الامتصاص على طول موجي 280 نانومترا.



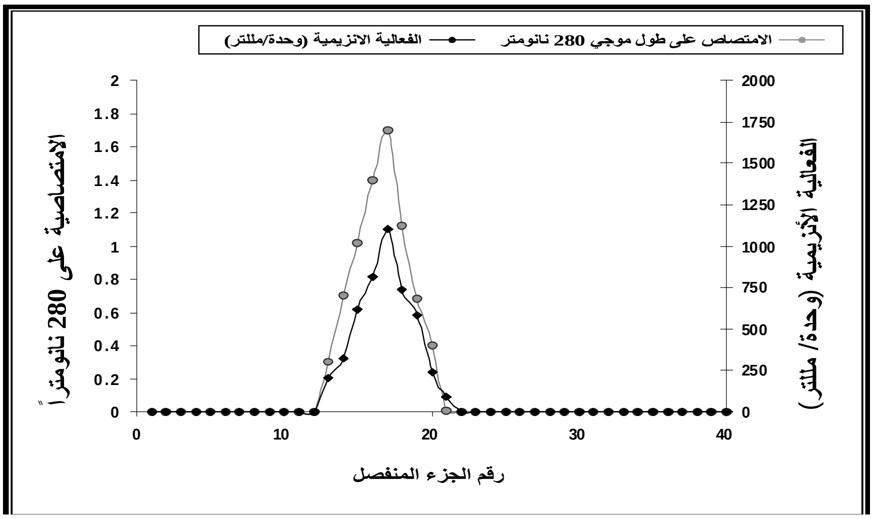
الشكل (2) كروماتوغرافيا التبادل الايوني الهلامي للمستخلص الخام لأنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني بعمود (DEAE-Sephadex A50) وتمت الموازنة باستخدام محلول 0.01 مول من محلول دارئ الصوديوم ذي pH 7وبواقع 5 مل للجزء الواحد.



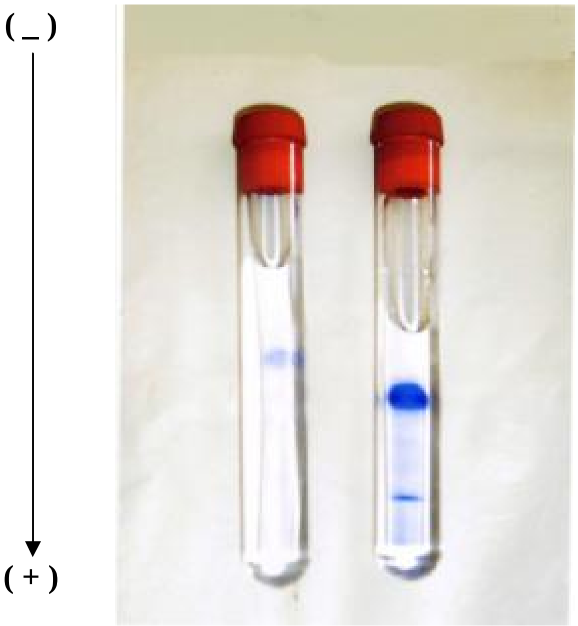
الشكل (3) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الهلامي (الغسل Wash) للمستخلص الخام لأنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني بعمود (DEAE-Sephadex A50) وتمت الموازنة باستخدام محلول 0.01 مول من محلول دارئ الفوسفات الصوديوم ذي pH 7 وبواقع 5 مل للجزء الواحد.



الشكل (4) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الهلامي (الاسترداد Elution) للمستخلص الخام لأنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني بعمود (DEAE - Sephadex A50) وتمت الموازنة باستخدام محلول 0.01 مول من محلول دارئ فوسفات الصوديوم ذي pH 7 وبواقع 5 مل للجزء الواحد.



الشكل (5) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل (S-300) بأبعاد 1.6 x 58 سم، تمت الموازنة باستخدام محلول فوسفات الصوديوم الدارئ وبواقع 3 مل للجزء الواحد.



الشكل (6) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) بهلام الاكريل امايد بغياب العوامل الماسخة لأنزيم الليبوكسيجينيز المنقى من الفول السوداني المحلي بتركيزين مختلفين، اذ تمثل الحزمة العليا (الأنزيم المنقى) في حين تشير الحزمة السفلى الى حزمة نهاية الفصل (حزمة الصبغة).

إن الاستنتاجات المتحققة من هذه الدراسة هي أن الفول السوداني صنف إيباء الذي خضع لدراسة استخلاص وتنقية أنزيم الليبوكسيجينيز يحتوي على أنزيم واحد خالٍ من المتناظرات الأنزيمية (Iso enzyme)، وإن استخلاص وتنقية الأنزيم ممكنة بطريقة بسيطة وسهلة من المصادر النباتية.

المراجع REFERENCES

الاعرجي، سند باقر محمد. (2000). فصل أنزيم الليبوكسيجينيز ومثبط التربسين من فول الصويا صنف إباء وتنقيتهما وتوصيفهما. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

البيار، أسوان حمد الله عبود. (1994). دراسة أنزيمات الاميليز المنتجة من بعض عزلات الأعفان واستخدامها في صناعة الخبز. رسالة ماجستير. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

التميمي، سالم صالح حسين. (1996). الأنزيمات المحللة للبروتين في حنطة صنف أبي غريب السليمة والمتضررة بحشرة السونة وأثرها في بعض الصفات النوعية. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

الدلالي، باسل كامل. (1982). الأنزيمات في التصنيع الغذائي. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. (ترجمة).

الدلالي، باسل كامل. (1983). فهم الأنزيمات. مطابع جامعة الموصل. جامعة الموصل.(ترجمة).

الدليمي، حمادة مصلح مطر. (2000). تطبيقات زراعية في فستق الحقل (*Arachis hypogaea L.*). أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

السعيدي، جاسم محمد عودة. (2004). تنقية وتوصيف أنزيم الأنفرتيز من عزلة محلية من الخميرة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

السلطان، أحلام مكي عبدا لجبار ، الجميلي، طالب خماس حسن ، الأعرجي، سند باقر محمد. (2004). فصل وتنقية وتوصيف أنزيم الليبوكسيجينيز من فستق الحقل، مجلة العلوم الزراعية العراقية. 35 (5): 103 - 112.

الشيخلي، رنا عبد الله حسين. (2004). إنتاج أنزيم ألفا أميليز من البكتريا *Bacillus licheniformis* R_5 المعزولة محليا وتنقيته ودراسة صفاته. رسالة ماجستير. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

المشكور، سامي كاظم حسن. (1985). تأثير حرارة المايكرو ويف على الصفات الكيموحيوية لمركبات فستق الحقل مقارنة بالمعاملات الحرارية التقليدية. رسالة ماجستير. كلية الزراعة - جامعة بغداد

الصوفي، محمد عبدالرزاق. (2005). تنقية وتوصيف أنزيم G6pD من الخميرة المعزولة محليا. ودراسة إمكانية استخداماته في المجالات التطبيقية. أطروحة دكتوراه. قسم علوم الأغذية والتقانات الإحيائية. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

الطويل، سعد ضياء وديع. (2004). فصل وتنقية أنزيم البروتييز من أوراق نبات الديباج. رسالة ماجستير. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

جاسم، صنوبر محمد احمد. (2004). استخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز وتنقيته وتوصيفه من بذور الترمس *Lupinus termis L.* رسالة ماجستير. كلية التربية (ابن الهيثم) - جامعة بغداد.

حسن، شذى سلمان. (1996). إنتاج وتنقية وتوصيف الأنزيمات المحللة للبروتينات من العفن *Aspergillus. sp* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم - جامعة بغداد.

حمادي، دنيا سعاد علي. (2001). فصل وتنقية وتوصيف أنزيم الببسين من معدة أسماك الجري. رسالة ماجستير. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

سعيد، أسراء فريد. (2004). دراسة ،أنزيم البيروتييز الاسـبارتيلي المنـتج مـن خميـرة *Candida albicans* المعزولة محليا. رسالة ماجستير. كلية العلوم - جامعة بغداد.

كريم، سهاد خالد. (2004). استخلاص وتنقية أنزيم البيروكسيديز من جذور الشلغم *Brassica rapa L.* رسالة ماجستير. كلية العلوم - جامعة بغداد.

محي الدين، محمد عمر. (1998). تنقية وتوصيف أنزيم البروتييز الحامض بديل المنفحـة المنـتج مـن العفن *Rhizomulor miehei*. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة - جامعة بغداد.

Al-Bakir, A. ; Al-Tai, W. and Ali. M. (1988). B, galacto sides: Anew enzyme associated with maturation of Zahti dates. J. Agric water Res. V. 7: 25-47.

AL-Hassnawi, A. N. A. (2006) Isolation, purification and characterization of B-galactosidase From local chicken Liver and its medical pplication. A thesis to the college of education University of Baghdad. ph.D.m. Biochemistry.

AL-Obaidy , H. M. (1975). Broad bean Lipoxygenase, M. Sc. Thesis, Food Sci. Dept. Agricultural college, Baghdad University.

AL-Obaidy, H. M and Siddiqi A. M. (1981). Properties of Braod bean Lipoxygenase, Journal of Food Science. V. 46 : 622-629.

Ander, E. and Hou, K. (1932). The presence of a Lipoxdase in soybean campt. Rend., 194:645 In "principles of enzymology For the Food science" (Whitaker , J. R., ed.) p. 607 Marcel Dekker, Nc. New York. 1972.

Association of official Analytical chemists (A.O.A.C.) (1999). Official methods of analysis 15th ed. Washington Pc.

Egan, H. ; Kirk, R. and swyer, R. (1985). Chemical Analysis of Food. 8th Churchill living Stan. London.

Gada , J. ; Pinto, M. and Macid, P. (1999). Lipoxygenase activity in pig muscle : purification and partial characterization J. of Agric and Food chemistry (U.S.A) V. 44 (4) : 257 - 265.

Gaffney, B. J. (1996). Lipoxygenase : Structural principles and spectro scopy. Annu. Rev. Bio phys. Biomol. Struct. V. 25 : 431 - 459.

Hoffpauir, U. L. (1979). Peanut composition relation to processing and vitalization. J. Agric. Food chem. V. 1 : 668-681 ((http*:// www hort purdue edu- ext senior – fruits-im…)) .**

Javeri, S. and Uhlenbruck, G. (2004). Isolation of B-galactosidese. J. Clin. chem. clin Biochem. V. 22: 735 – 739

Kermasha, S.; Lavorel, V. and Bisakowshi, B. (1997). partial characterization of Lipoxygenase from Fusariun Proliferum. Food Biotechnology (New York) (USA) V. 9 (3) : 189-201.

Kim, S. and Grosch W. (1979). Partial purification of Lipoxygenase from Apples, J. Agric. Food chem.. V. 27 (2) : 243 : 246 .

Kornberg, A. (1990). Why purify Enzyme . In : Methods in Enzymology. (eds, M. P. Deustcher). V. 182 : 1 – 5 Academic Press . New York .

Kuo , J. ; Hwang, M. and Yeh, D. (1997) Purification Substrate Specificity and products Ca^+ Stimulating Lipoxygenase, J. of Agric. And Food Chem. (USA). V. 45(6) :205 -219.

Liu, K. (1998). Soybean chemistry Technology and Utilization, ITP International Thomson publishing, Chapman & Hall book , Tokyo.

Molias, J. and Valle, M. (1988). Lipoxygenase from lupin seed purification and characterization. J. Sci Food Agric V . 45: 165 – 174 .

Munoz, R. and Barcelo, R. A. (1995). Enzymes in: Hand Book of Food Analysis (eds : Nollet, L. M. L.) 2 : 317 – 319. Marcel Dekker New York.

Osborn, D. R. and Vooght, P. (1987). The Analysis of Nutrients in Food. Food science and technology Academic press, London, New York. San Francisco.

Pearson, D. (1976). The chemical Analysis of Food seventh edition, chrchill, Livingstone, Edinturg hard N. Y.

Petterson , D. S. and Mackintosh, I. B. (1994). The chemical composition and Nutritive

Reynolds, P. and Klein., B. (1982). purification and characterization of a type-1 Lipoxygenase from pea seeds, J. Agric. Food chem. V. 30(6): 1157 – 1163 .

Sawheney, S. K. and Singh R. (2005). Introductory practical Bio chemistry. Narosa publishing House. London.

Schmander , H. P. (1997). Peroxidase. Methods in Biotechnology. Taylor and Francis. London.

Segel, I. P. (1976). Biochemical calculation. Jon Willey and Sons, Inc. New York

Siddiqi, A. and Tappel, A. (1956). Catalysis of linoleate oxidation by pea Lipoxidase, Arch. Biochem. Biophys. V. 60 : 91-110.

Singleton, H. ; pattee, H. and Nelson, M. (2005). Factors Affecting product specificity of peanut Lipoxygenase. Agri cultural Research service. North Caroline state university. Raleigh. North Carolina. 27650.

Skrzypczak Jankun, E.; Amzel, L. ; kroa, B. and Fun, K. (1997). Structure of soybean Lipoxygenase and comparisons with its Lipoxygenase iso enzyme. Proteins V. 29 : 15 – 31 .

Suurmeijen, C.; Perez. G. and Vander Hijde, H. (1998). Purification , product characterization and kinetic properties of soluble tomato Lipoxygenase plant physiology and Biochemistry. (France). V. 36 (9) : 657- 672.

Whitaker, J. R. (1972). Principle of Enzymology for the Food Science page 607 , Marcel Dekker , INC , New York.

Whitaker, J. R. (2004). Lipoxygenase. In Oxidative Enzyme in foods, D. S., Robinson and N. A. Eskin (Ed) P. 175 Elserier Applied Sci. London.