ب - توصيف أنزيم الليبوكسيجينيز Lipoxygenase المستخلص والمنقى من بذور الفول السوداني

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

تاريـــخ الإيداع 2008/04/02

قبل للنشـــر في 2008/11/03

الملخص

وُصف أنزيم الليبوكسيجينيز المستخلص من الفول السوداني بعد تنقيتــه فــي الدراســة الــسابقة، وأشارت النتائج إلى أن الوزن الجزيئي للأنزيم هو 97 كيلو دالتن مقدراً بطريقة الترشيح الهلامي، وبلغت نقطة التعادل الكهربائي(PI) للأنزيم 6.2، كما أظهرت الدراسة أن الأنزيم من البروتينات الــسكرية وأن نسبة الجزء الكربوهيدراتي تشكل 13% عند تقديرها بطريقة الفينول – حمض الكبريتيك. وقــد وجــد أن الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية 7 وأظهر الأنزيم ثباتاً واسعاً في مدى مــن قــيم الأس الهيــدروجيني (الدالة الحمضية pH) تراوحت بين 6.5 و8.5. وكانت درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنــزيم 40 مْ عنــد الأس الهيدروجيني الأمثل ودرجة حرارة الثبات لهذا الأنزيمين 40 - 60 مْ، وبلغت طاقة التنشيط لتحويل المادة الأساس إلى ناتج 9.48 كيلو سعره/ مول في حين بلغت قيمة طاقة التنشيط لمــسخ الإنــزيم 24.3 كيلو سعره/ مول. أظهرت دراسة الثوابت الحركية أن معدلات قيم ثابت ميكالس (km) لتفاعــل الأنــزيم تجاه حمض اللينولييك وحمض واللينولينيك هي 0.280 ، 0.326 لكل منها على التوالي إذ إن أقل قيمــة لــ km تدل على الملائمة النسبية لمادة التفاعل، في حين بلغت قيمة Vmax 1.29 وحدة امتــصاص / دقيقة لحمض اللينولييك، و0.68 وحدة امتصاص/ دقيقة لحمض اللينولينيك، حيث تدل القيمة الكبرى على الألفة العالية بين الأنزيم ومادة الأساس. كما وجد أن جميع المثبطات المعدنيــة المــستخدمة فــي هــذه الدراسة هي: EDTA, 8. Hydroxy quinoline, α - α dipyridyl, 1 : 10 phenan throline

سببت تثبيطاً بدرجة واضحة مما يعطي دليلاً على اشتراك المعادن في تفاعل الأنزيم. وقــد أظهــرت الايونات الموجبة للكالسيوم، النيكل، المغنسيوم المنغنيز تأثيراً منشطاً، في حين أظهرت إيونات النحــاس، والحديد، والزنك تأثيراً مثبطاً. ووجد أن المستخلص الخام والأنزيم المنقى يقصر لون الطحين الأسمر إلى اللون الأبيض بشكل واضح، مؤدياً إلى تحسين خواص الرغيف المنتج .

الكلمات المفتاحية: الليبوكسيجينيز، توصيف الأنزيم، الفول السوداني.

B : Characterization of Lipoxygenase which extraction and Purification From Peanut Seed

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 enzyme was characterized by the following: Its molecular weight was 97 KD as estimated by gel filtration, iso electric point was at 6.2. The result showed that it was a glycoprotein with a carbohydrate content of 13 % as determined by phenol – sulfuric acid method. Its optimum activity pH was 7. The enzyme was stable at pH range between (6.5–8.5). The optimum temperature for enzyme activity was 40 C at the optimum pH. The enzyme stability temperature ranged between (40–60) C. The activation energy to convert the substrate to product was 9.48 kilo calorie/ mole. The inactivation energy for the denatured enzyme was 24.3 kilo calorie/ mole . The average Michael's constant (Km) for the enzyme reactions towards Linoleic, Linolenic acid, were 0.280, 0.326 respectively. The lowest value for Km was for linoleic acid which showed a relative suitability of the substrate, V max was 1.29 absorption unite / minutes and 0.68 1-0 Linolenic acid. Metal inhibitors such as: EDTA, 8-hydroxy quinolinc, & – & dipridyl, 1:10 phenan throlinc, in habited lipoxygenase clearly meaning that it is ametallo protein enzyme. Ions such as Ca, Ni, Mg and Mn, had and activating effect for Lipoxygenase, other such Cu, Fe and Zn had an inhibitory effect on the enzyme. Extract of both row and purified enzymes bleached clearly the flour color Leading to the improvement of quality properties of the loaf produced.

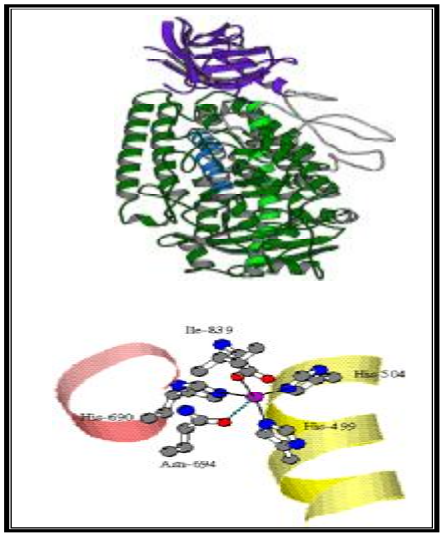
Key word: Characterization, Lipoxygenase, Peanut Seed**.**

المقـــدمـــة

اكتُشف أنزيم الليبوكسيجينيز من قبل Boun و Hass في عام 1928 (حسب ما ذكره Whitaker (1972))، وذلك في أثناء ملاحظتهما 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 و Hou في عام (1932) أن فول الصويا يحوي أنزيماً يؤكسد الدهون غير المشبعة وسمياه أنزيم الليبوكسيديز (Lipoxidase)، وهو الأنزيم الذي أعطته لجنة تسمية الأنزيمات التابعة لاتحاد الكيميائيين الحيويين اسم الليبوكسيجينيز (Lipoxygenase) والذي يقع تحت رقم (Linoleate : Oxidoreductase) (EC1.13.11.12) (1998, Liu). كما في الشكل (1). إن أنزيم الليبوكسيجينيز واسع الانتشار في المملكة النباتية وبصورة رئيسية في البقوليات، فهو يوجد في فول الصويا، الفول الأردي (Urd beans)، الماش، البزاليا، الفول السوداني، وفي الحمص والفول (AL-Obaidy، 1975). كما يوجد هذا الأنزيم في القمح وبقية الحبوب الأخرى وفي بذور النباتات الزيتية وفي بذور الجت، كذلك في بذور عباد الشمس (Leoni وآخرون، 1985). وفي بذور الترمس (Molias و Valle، 1988).

تتميز أنزيمات الليبوكسيجينيز المستخلصة من فول الصويا والفول الأردي والماش والفاصوليا الخضراء بفعاليتها العالية، (Siddiqi و Tapple، 1956) ويليها الفول (AL-Obaidy، 1975). وذلك من خلال أكسدتها للمواد الدهنية، ويوجد في التفاح أيضا (Kim و Grosch، 1979)، وفي البزاليا (Reynolds و Klein، 1982). كان يعتقد سابقاً أن أنزيم الليبوكسيجينيز لا يوجد في الأحياء المجهرية ولكن الباحث Kermasha وآخرون (1997) وجده في الأحياء المجهرية حيث استخلصه من بكتريا *Mycobacterium phlei* و *Pseudomons fluorscens*. وقد أثبت Gada وآخرون (1999) وجود الأنزيم في الأنسجة الحيوانية حيث وجده في عضلات الخنزير.

إن أنزيم الليبوكسيجينيز من الأنزيمات التي تحفز إضافة جزيئة أوكسجين إلى الحموض الدهنية غير المشبعة والتي تحتوي على الجزء الفعال 1,4-cis,cis - pentadiene لتعطي الهيدروبيروكسيدات ناتجاً لذا فإن الحموض الدهنية الأساسية الموجودة طبيعياً مثل حض اللينولييك (18:2) وحمض اللينولينيك (18:3) تعمل بوصفها مادة أساس لأنزيم الليبوكسيجينيز (Silva وآخرون، Richard ; 2001 وآخرون ، 2001).



الشكل(1) يمثل تركيب أنزيم الليبوكسيجينيز (Boyington وآخرون، 1993)

إن أنزيم الليبوكسيجينيز يعمل على الحموض الدهنية غير المشبعة من نوع Cis, Cis أما أنواع Trans - Trans, Trans - Cis فلا يتمكن الأنزيم من مهاجمتها إذ تقوم بدور مثبط تنافسي، وإن النواتج الأولية من تفاعل الليبوكسيجينيز هي مركبات الهيدروبيروكسيدات ذوات التركيب Cis-Trans والتي تكون فعالة ضوئيا (Optically active). وأوضح الباحث Robinson وآخرون (1995) بأن الأنزيم يبدأ بالتفاعل عند انتزاع ذرة هيدروجين من المادة الأساس فيبدأ تفاعل تسلسلي (chain reaction)، يسيطر عليه الأنزيم ويتكون معقد من المادة الأساس والأنزيم في أثناء تفاعله. ولغرض توصيف الأنزيم المستخلص والمنقى يجب تقدير الوزن الجزيئي له، ويتم اتباع تقنيات عديدة ومختلفة لهذا الغرض مثل تقنية تحليل الحموض الأمينية(Amino acid analysis)، تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (High Performance Liquid Chromatography) HPLC والطرد المركزي الفائق السرعة (Ultra Centrifugation)، ولكن أغلب الدراسات تشير إلى استخدام طريقة الترشيح الهلامي أو الترحيل الكهربائي (الدلالي، 1982؛ المظفر، 1983) باستخدام (Sodium Dodecyl Sulfate) (SDS)

تتراوح حدود الأوزان الجزيئية لأنزيم الليبوكسيجينيز من المصادر المختلفة بين 90 و110 كيلو دالتن، وقد يختلف الوزن الجزيئي للأنزيم باختلاف المصدر الذي تم استخلاص الأنزيم منه وباختلاف الطرائق المتعددة في تقديره (محي الدين، 1998). وقد وجد Reynolds و Klein (1982) أن الوزن الجزيئي للأنزيم من بذور البزاليا بلغ 65 كيلو

دالتن، في حين وجد Molais وValle (1988) أن الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز المستخلص من بذور الترمس هو 92 كيلو دالتن، وأشار إلى إن الوزن الجزيئي للأنزيم يختلف من مصدر إلى آخر. في حين وجد Vanden وMendoza (1982) في بذور اللوبيا نظيرين لأنزيم الليبوكسيجينيز وزنهما الجزيئي 68 و74 كيلو دالتن. وقد وجد الباحث Gada وآخرون (1999) أن الوزن الجزيئي للأنزيم في عضلات الخنزير كان 90 كيلو دالتن، في حين كان الوزن الجزيئي للأنزيم والذي قدره Ding وآخرون (1996) من الفول السوداني 105 كيلو دالتن، أما Allen وآخرون (1997) فقد وجد أن الوزن الجزيئي للأنزيم من الفول السوداني هو أيضاً 105 كيلو دالتن، فيما وجد السلطان وآخرون (2004) أن الوزن الجزيئي للأنزيم يساوي 104 كيلو دالتن المستخلص من الفول السوداني. وهذا الاختلاف يعود إلى استخدام طرائق مختلفة في تنقية الأنزيم.

مواد البحث وطرائقه

أنزيم الليبوكسيجينيز

استخدم في هذه الدراسة الأنزيم الذي استخلص من الفول السوداني بالدراسة السابقة والذي استخلص بمحلول كلوريد الصوديوم 10% وpH 5 وتم ترسيبه بالأسيتون البارد، وأكملت مراحل التنقية باستخدام التبادل الايوني الهلامي بعمود (DEAE- Sephadex A-50)، ومن ثم استخدم الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل S-300 حيث بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 1162.9 وحدة/ ملغم بروتين والحصيلة الأنزيمية مقدارها 43.13 % وعدد مرات التنقية 8.61 مرة، وتم التأكد من نقاوة الأنزيم بإجراء عملية الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة للبروتين إذ ظهرت حزمة بروتينية واحدة في هلام متعدد اكريل امايد.

فعالية الأنزيم Determination enzyme activity

قيست فعالية الأنزيم بطريقة استخدام مستحلب اللينولييت كمادة أساس Linoleat Emulsion وقيست الامتصاصية في طول موجي 234 نانومتراً. (Liu، 1998).

تقدير البروتين

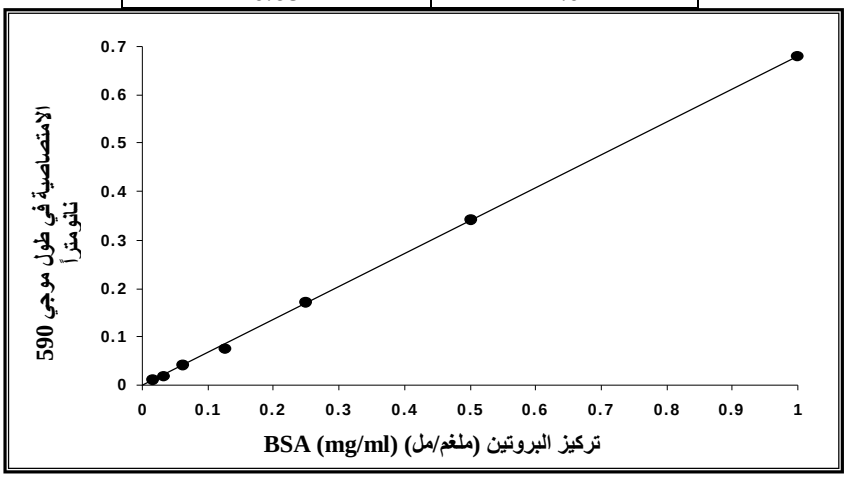
استخدمت طريقة Bradford (1976) في تقدير تركيز البروتين باعتماد منحنى ألبومين المصل البقري القياسي (B. S. A) (Bovine Serum Albumin).

والمجهز من شركة Fluka، حيث حضرت من هذا المحلول تراكيز ثنائية مكررة كما في الجدول (1)، ورسم المنحني القياسي لقيم امتصاص الضوء مقابل تراكيز البومين المصل البقري بعد قياس الامتصاص على طول موجي (590 نانومتراً) باستخدام جهاز المطياف الضوئي، كما موضح في الشكل (2) وقدر تركيز الأنزيم بالطريقة الآتية:

تركيز البروتين (ملغم/ مل)= امتصاص الضوء على طول موجي 590/ الميل slope

الجدول (1) تراكيز البروتين

تركيز البروتين(ملغم/ مل)	الامتصاصية على 590 نانومتراً
0.015	0.0093
0.031	0.0192
0.062	0.042
0.125	0.076
0.25	0.17
0.5	0.34
1.0	0.68



الشكل (2) المنحنى القياسي لتعيين تركيز البروتين بطريقة برادفورد

توصيف الأنزيم

الوزن الجزيئي

جرى تعيين الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز المنقى بطريقة الترشيح الهلامي وحسب طريقة Garfin (1990) والتي ذكرت من قبل الصوفي (2001). اتبعت طريقة الترشيح الهلامي Gel Filtration على عمود السيفاكريل (S-300) بأبعاد 58x1.6 سم في تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز، وعُيّن حجم الفراغ (VO) Void Volume للعمود باستخدام الدكستران الأزرق (الأعرجي، 2000)، كما عُيّنت حجوم الأسترداد للبروتينات القياسية (Ve) التي شملت اللايسوزايم Lysozyme، الأوفاالبومين Ovalbumin، ألبومين المصل البقري Bovin Serum Albumin (B.S.A)،

الكلوكوز أوكسيديز Glucose Oxidase، الكحول دي هايدروجينيز AL-Cohol dehydrogenase والكلوبيولين المناعي IGY، استخرجت منها قيم Ve /VO.

تعيين نقطة التعادل الكهربائي (pI) Iso electric point

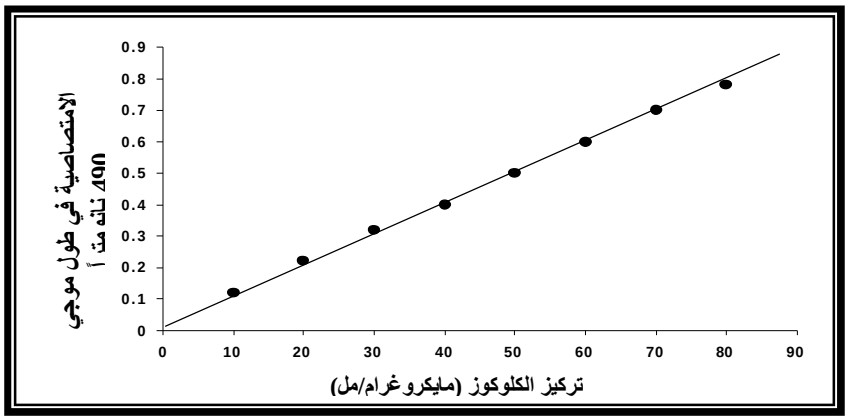
استخدمت الطريقة التي وصفها Wrigley (1971) والتي ذكرها محي الدين (1998) في تحضير المحاليل وإجراء عملية تبئير تعادل الشحنة Iso electric Focusing.

تقدير الكاربوهيدرات

استُخدمت الطريقة التي وصفها Dubois وآخرون (1956) وذكرها محي الدين (1998) وهي طريقة الفينول–حمض الكبريتيك، والجدول (2) يوضح تراكيز الكلوكوز، وقد قدر تركيز الكلوكوز في ملليتر واحد من محلول الأنزيم بالاستعانة بالمنحنى القياسي للكلوكوز (شكل 3)، ثم استخرجت النسبة المئوية للكربوهيدرات في الأنزيم .

الجدول (2) تراكيز الكلوكوز

تركيز الكلوكوز (مايكرو غرام/مل)	الامتصاصية على 490 نانومتراً
10	0.12
20	0.22
30	0.32
40	0.4
50	0.5
60	0.6
70	0.7
80	0.78



الشكل (3) المنحنى القياسي للكلوكوز باستخدام (0 - 80) مايكرو غرام/ مل

الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم

حضرت ثلاثة أنواع من المحاليل الدارئة بتركيز 0.2 مول وعلى مدى من الأس الهيدروجيني 4-10 لتعيين الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات الأنزيم. **أ**- محلول دارئ الخلات 0.2 مول بمدى أس هيدروجيني من 4-5.5. **ب**- محلول دارئ الفوسفات 0.2 مول بمدى أس هيدروجيني 6–8، حضرت كما ذكرها (Conbridge، 1985). **جـ**- محلول 0.2 مول من Tris-HCl بمدى أس هيدروجيني 8.5-10. خلط 1 مل من المستخلص الأنزيمي المنقى بتركيز 25 ملغم/ مل مع 1 مل من كل من المحاليل الدارئة سابقة الذكر في أنابيب اختبار، حضنت في حمام مائي بدرجة حرارة 30 مْ مدة 15 دقيقة. قدرت الفعالية الأنزيمية في كل نموذج لتحديد الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية الأنزيمية.

الأس الهيدروجيني الأمثل للثبات

حضن محلول الأنزيم مع كل من المحاليل الدارئة المذكورة آنفاً في أنابيب اختبار في حمام مائي بدرجة حرارة 37 مْ مدة 30 دقيقة، ثم نقل إلى حمام ثلجي. بعدها قُدّرت الفعالية المتبقية للأنزيم ورسمت العلاقة بين الأس الهيدروجيني والنسب المئوية للفعالية المتبقية للأنزيم لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل للثباتية.

درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم

استخدم مدى من درجات الحرارة تراوح بين 10-90 مْ لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم (Segel، 1976). حضن محلول الأنزيم ضمن المدى الحراري 10-90 مْ مدة 15 دقيقة، ثم قُدّرت فعالية الأنزيم لتعيين درجة الحرارة المثلى للأنزيم.

تعيين الثبات الحراري للأنزيم

أذيب الأنزيم النقي في محلول الفوسفات الدارئ بأس هيدروجيني 8.5 وبتركيز 0.2 مول. وحضنت كمية من الأنزيم بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين 10-90 مْ مدة 15 دقيقة، ثم نقل إلى حمام ثلجي وقدرت فعالية الأنزيم المتبقية بعد تلك المعاملات الحرارية.

تعيين طاقة التنشيط

قدرت طاقة التنشيط للأنزيم Activation energy لتحويل مادة التفاعل (Substrate) إلى ناتج (Product). فقد قدرت طاقة التنشيط بدلالة لوغارتيم ثابت سرعة التفاعل الملاحظ (K_o). ورسمت العلاقة بينه وبين مقلوب درجة الحرارة المطلقة (I / T) وفق معادلة ارهينيوس وميل المنحنى المرسوم .

$$\mathbf{Log\ k_o = \frac{Ea}{2.303\ R\ T} + Log\ A}$$

K_o = ثابت السرعة الملاحظ Ea = طاقة التنشيط A = ثابت التفاعل الخاص
R = ثابت الغازات (1.987 cal/mol.k^o) T = درجة الحرارة المطلقة (K^o) كلفن

تعيين الثوابت الحركية للأنزيم

حضر محلول مادة الأساس حمض اللينولييك واللينولينيك في محلول دارئ الفوسفات بتراكيز متدرجة من 0.1–1 %، ثم حُسبت قيمة ثابت ميكالس - منتن (K_m) والسرعة القصوى (V max) من رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتراكيز المواد الأساس بخمس طرائق وهي:

1- طريقة لاينويفر – بيرك Lineweaver - Burk plot
2- طريقة وولف – اغستنسون – هافستي Woolf-Augustinsson- Hafstee plot
3- طريقة هانس – وولف Hanes - Woolf plot
4- طريقة أيدي – سكاتيجارد Edaie - Scatchard plot
5- طريقة أستيسثال – كورنيش – بودون Estesthal - Cornish - Bowden plot

كما ورد عن Segel (1976).

دراسة تأثير المثبطات المعدنية

حضر خزين للمحاليل (Stock solutions) من المثبطات المعدنية المختلفة المستعملة في الدراسة. أخذ 0.1 مل من محلول الخزين وأضيف إلى 3 مل من محلول المادة الأساس (حمض اللينولييك) في خلية المطياف الضوئي Spectrophotometer للحصول على التراكيز المطلوبة من المثبط في خلية التفاعل، ثم0.1 مل من المستحضر الأنزيمي المراد دراسته والمخفف بشكل مناسب (الأعرجي ، 2000).

دراسة تأثير الايونات الموجبة في فعالية الأنزيم

حضرت محاليل كلوريدات النحاس والمغنيسيوم والزنك والنيكل والبوتاسيوم وبتركيز 10 ملي مول. حضن الأنزيم مع محاليل هذه الكلوريدات بدرجة 37 مْ مدة 30 دقيقة، ثم قدرت الفعالية المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الأنزيم غير المعامل.

النتائج والمناقشة

توصيف الأنزيم

الوزن الجزيئي للأنزيم

كانت قيم Ve /VO المستخرجة مساوية إلى1.30, 1.37, 1.41, 1.48, 1.63, 2.04 على التوالي. وعند إمرار أنزيم الليبوكسيجينيز وضمن الأحوال نفسها كانت نسبة حجم استرداد الأنزيم إلى حجم الفراغ Ve /Vo مساوية إلى 1.44 كما في جدول (3). وعند إسقاط هذه القيمة على منحنى العلاقة الخطية بين نسبة حجم الاسترداد إلى حجم الفراغ

Ve /Vo للبروتينات القياسية المعلومة الوزن الجزيئي ضمن الأحوال المتقدمة الذكر ظهر أن الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني هو 97 كيلو دالتن كما في الشكل (4). كانت هذه النتيجة قريبة مما توصل إليه Kermasha وآخرون (1997) من العفن *Fusarlam proliferum* فكان الوزن الجزيئي للأنزيم يساوي 102 كيلو دالتن، أما Allen وآخرون (1997) فوجده في فول الصويا مساوياً 105 كيلو دالتن، أما السلطان وآخرون (2004) الذي اعتمد طريقة الترشيح الهلامي فوجدوا أن الوزن الجزيئي للأنزيم في الفول السوداني يساوي 104 كيلو دالتن، في حين وجده جاسم (2004) في بذور الترمس يساوي 93 كيلو دالتن. ومن الجدير بالذكر أن Boyington وآخرون (1993) وجدوا أن الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز في الفول السوداني 100.68 كيلو دالتن والذي تم تقديره بطريقة حساب الوزن الجزيئي لمجموع الحموض الأمينية المكونة للأنزيم بجهاز تحليل الحموض الأمينية (Amino Acid Analyzer) وحسب القانون الآتي:

الوزن الجزيئي للأنزيم = عدد الحموض الأمينية × 120

100.68 = 120 × 839 =

ويمثل الرقم 120 متوسط مجموع الأوزان الجزيئية للحموض الأمينية والبالغ عددها عشرون حمضاً أمينياً. يلاحظ أن الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني يختلف من صنف إلى آخر، وقد يعود هذا الاختلاف إلى عوامل وراثية وبيئية مختلفة (المشكور، 1985).

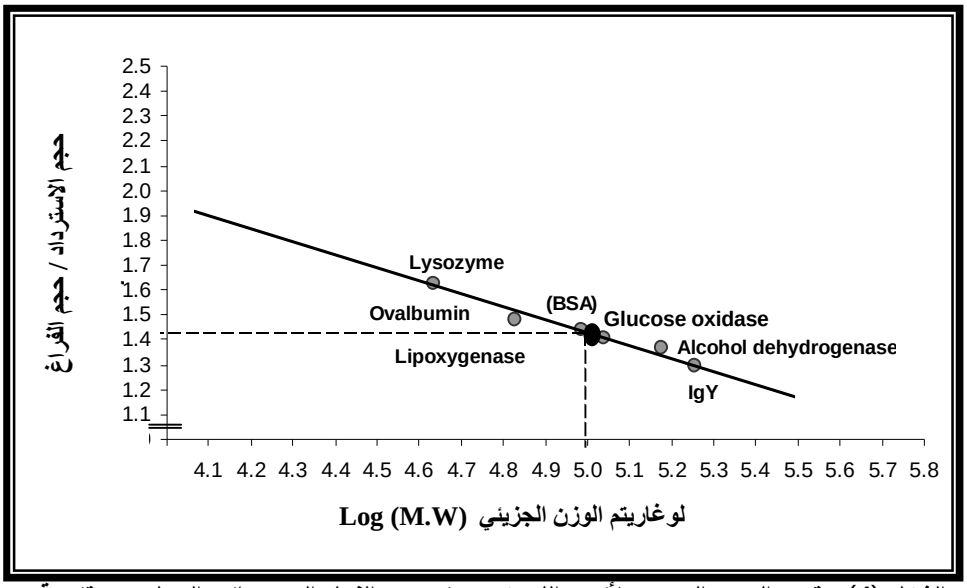
الجدول (3) يوضح العلاقة بين حجم الاسترداد وحجم الفراغ وبين الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية لاستخراج الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز.

البروتين القياسي	حجم الاسترداد Ve مل	حجم الاسترداد/ جم الفراغ	الوزن الجزيئى دالتون	لوغارتيم الوزن الجزيئى
IGY	70	1.29	180.000	5.255
AL-Cohol dehydrogenase	74	1.37	150.000	5.176
Glucose Oxidase	76	1.41	110.000	5.040
Bovin Serum Albumin (B.S.A)	80	1.48	67.000	4.826
Ovalbumin	88	1.63	43.000	4.633
Lysozyme	110	2.04	14.000	4.146
Lipoxygenase	78	1.44	97.000	4.985

نقطة التعادل الكهربائي

جرى تعيين نقطة التعادل الكهربائي لأنزيم الليبوكسيجينيز المنقى من الفول السوداني بطريقة تبئير تعادل الشحنة (Iso electric Focusing) التي تعتمد على وجود تدرج للأس الهيدروجيني في الهلام الذي يتصف بالثبات والاستمرارية باستخدام جزيئات

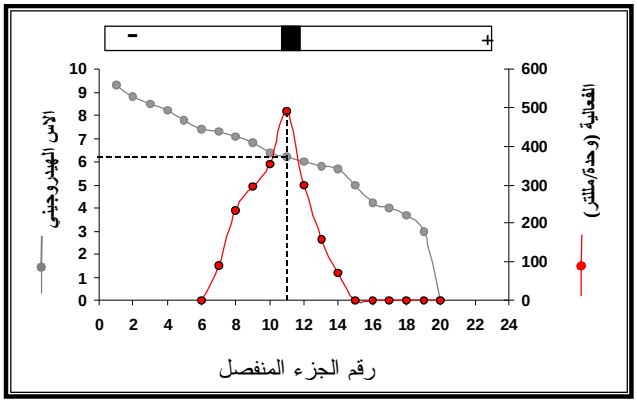
صغيرة مشحونة يطلق عليها الأمفولايت (Ampholytes). وتتحرك جزيئات البروتين بصفتها جزيئات امفوتيرية تحمل شحنة موجبة وسالبة في المجال الكهربائي ضمن هذا التدرج إلى أن تصل نقطة تعادلها الكهربائي فتقف وتتمركز بشكل حزمة في ذلك الموقع (1971,Wrigley). وتعني نقطة التعادل الكهربائي هذه أن محصلة الشحنة التي يحملها البروتين تساوي صفراً عند ذلك الأس الهيدروجيني، إن قيم (PI) للبروتينات تختلف بحسب محتوى البروتين من الحموض الأمينية (Wynne و Yada، 1991)



الشكل (4) تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني المحلي بتقنية الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل (S - 300).

ووجد أن نقطة التعادل الكهربائي للأنزيم من بذور الفول السوداني تساوي 6.2 كما في الشكل (5)، وهذه النتيجة قريبة مما وجده الباحث الأعرجي (2000) في فول الصويا، وجد أن (PI) يساوي 5.2. أما Kermasha وآخرون (1997) فذكروا أن (PI) لأنزيم الليبوكسيجينيز يتراوح بين 5.2 و5.8، في حين أن الباحثين Reynolds و Klein (1982) وجدا أن نقطة التعادل الكهربائي لأنزيم الليبوكسيجينيز في بذور البزاليا هي 4.05، في حين وجدت في كريات الدم الحمراء ضفدع أمريكي كبير هي 7.1 (Shen و Herman، 2000)، أما جاسم (2004) فوجد أن (PI) للأنزيم نفسه في بذور الترمس كانت تساوي6.1. وقد ذكر المشكور (1985) أن قيم نقاط التعادل الكهربائي لأنزيم الليبوكسيجينيز في الفول السوداني تتراوح ما بين 4.7 و8، إذ جاءت النتيجة ضمن حدود

قيم نقاط التعادل الكهربائي التي ذكرها المشكور. جاءت نتائج Singleton وآخرون (2005) متطابقة مع نتائج هذا البحث عند قياسهم نقطة التعادل الكهربائي لأنزيم الليبوكسيجينيز في الفول السوداني من صنف أجنبي (أمريكي). ومن الجدير بالذكر ن نقطة التعادل الكهربائي تختلف باختلاف مصدر الأنزيم فيما إذا كان نباتياً أو حيوانياً أو من أحياء مجهرية فضلاً عن العوامل الوراثية والبيئية لمصدر الأنزيم.

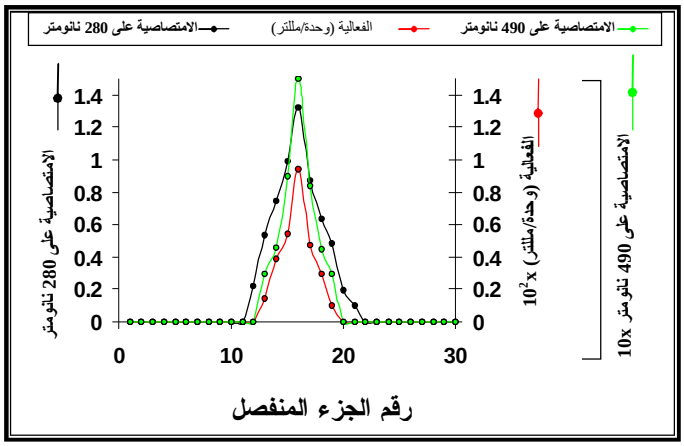


الشكل (5) تعيين نقطة التعادل الكهربائي بطريقة تبئير تعادل الشحنة باستخدام امفولايت بأرقام هيدروجينية (3.5 - 10).

المحتوى الكربوهيدراتي للأنزيم

عند تقدير نسبة الكربوهيدرات في أنزيم الليبوكسيجينيز المنقى من الفول السوداني كانت النتيجة عند تقديرها بطريقة الفينول- حمض الكبريتيك أن الأنزيم يحتوي على 13 % كربوهيدرات. وهذه النتيجة اتفقت مع ما توصل إليه الأعرجي (2000) من أن أنزيم الليبوكسيجينيز المنقى من فول الصويا يحتوي على كربوهدرات بنسبة 10.3 %، أما نسبة الكربوهيدرات في الأنزيم المنقى من بذور الترمس فكانت 7.41% (جاسم، 2004). ومن أجل التحقق من وجود ارتباط تساهمي بين الجزء الكربوهيدراتي والبروتيني لأنزيم الليبوكسيجينيز مرر الأنزيم على هلام السيفاكريل (S-300) مع استرداد الأجزاء بقوة أيونية عالية باستخدام دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.1 مول والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.3 مول، أظهرت النتائج تطابق قمة البروتين على طول موجي 280 نانومتراً، وقمة الكربوهيدرات على طول موجي 490 نانومتراً، مع قمة تقدير فعالية الأنزيم على طول موجي 420 نانومتراً تطابقاً تاماً والشكل (6) يوضح وجود ارتباطات تساهمية بين الكربوهيدرات والبروتين، ولأن الدارئ المستخدم في موازنة العمود كان ذا قوة أيونية عالية تكفي لفك الارتباطات اللاتساهمية

التي لو كانت موجودة لظهرت قمة الكربوهيدرات بسلوك مغاير لقمة البروتين والفعالية (حسن، 1996). وتختلف نسبة الكربوهيدرات في أنزيم الليبوكسيجينيز من مصدر إلى آخر فهي تختلف في البزاليا عن الفول السوداني عن نبات الترمس وعنه في فول الصويا. ومن الجدير بالذكر أن وجود الكربوهيدرات في الأنزيمات قد يجعلها أكثر ثباتاً وأكثر ذوباناً في الماء، لذا أجريت بعض الدراسات لربط أنزيمات معينة مع مواد كربوهيدراتية معقدة كالدكستران لزيادة ثباتها الخزني والحراري ومنع تأثير المثبطات فيها (Marshall, 1980) .



الشكل (6) إثبات وجود ارتباط تساهمي بين الجزء الكربوهيدراتي والأنزيم باستخدام طريقة الترشيح الهلامي في عمود السيفاكريل S-300 بأبعاد (1.5 x 58)سم، تمت الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ 0.1 مول والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.3 مول وبسرعة 30 مل/ساعة وبواقع 5 مل للجزء الواحد.

الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم(الدالة الحمضية)

قدر الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم الليبوكسيجينيز المنقى من بذور الفول السوداني بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين 4 و10، ويوضح الشكل (7) أن فعالية الأنزيم تزداد بزيادة الأس الهيدروجيني وتبلغ الحد الأقصى عند الأس الهيدروجيني 7، مما يعني أنه يمثل الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم. في حين لوحظ انخفاض فعالية الأنزيم عند الأس الهيدروجيني الأقل من 4.5 وكذلك انخفاض الفعالية الأنزيمية عند الاقتراب من الأرقام الهيدروجينية الحمضية والقاعدية المتطرفة، وإن الأنزيم يميل

إلى العمل بشكل أفضل عند القيم القريبة من التعادل، ويأتي هذا الانخفاض في الفعالية نتيجة تأثير الأس الهيدروجيني لوسط التفاعل في مجاميع معينة قابلة للتأين توجد في الأنزيم وفي مواد الأساس وفي معقد الأنزيم – المادة الأساس (ES) ومعقد الأنزيم- الناتج (EP) (1972, Whitaker). ومن الضروري الأخذ بالاعتبار اختلاف قيم pH الأمثل للفعالية باختلاف مواد الأساس المستعملة للتفاعل (1962, Wilder). اتفقت هذه النتائج مع ما أشارت إليه الدراسات السابقة التي تناولت توصيف الأنزيم إذ وجد أن الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم الليبوكسيجينيز في الفول السوداني هو 7. (المشكور، 1985)، أما السلطان وآخرون (2004) فقد أشاروا إلى أن الأس الأمثل للأنزيم في الفول السوداني هو 7.5 عند استعمال حمض اللينولييك كمادة أساس. ووجد جاسم (2004) أن الأس الأمثل لأنزيم الليبوكسيجينيز في بذور الترمس يساوي 7.5، أما في فول الصويا فقد وجد أن الأس الهيدروجيني يتراوح بين 8 و 8.5 (Schaller وآخرون، 1999 والأعرجي، 2000). والأس الهيدروجيني الأمثل لأنزيم الليبوكسيجينيز في طحين القمح هو 6.8 (Roberto وآخرون، 1999). أما من مصدر حيواني (عضلات الخنزير) فإن الأس الأمثل للأنزيم هو 7.5 (Gada وآخرون، 1999). وفي دراسة سابقة وجد Dillard وآخرون (1960) أن الأس الأمثل لأنزيم الليبوكسيجينيز يختلف باختلاف المادة الأساس إذ وجد انه عند استخدام اللينولييك كمادة أساس فإن الأس الأمثل للأنزيم من الفول السوداني هو 8، أما عند استخدام كليسيريد اللينولييت فكان الأس الهيدروجيني الأمثل لعمل الأنزيم هو 7.5 أما Nor (1980) فلاحظ أن أعلى فعالية لأنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني عند استخدام حمض اللينولييك كمادة أساس عند أس هيدروجيني 6. يتضح من ذلك أن الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم في مدى يبعد عن الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية قد يعزى إلى الصورة الأيونية غير المناسبة لمادة الأساس أو الأنزيم أو إلى كليهما أوإلى إيقاف تثبيط فعالية الأنزيم أو.... الخ وإلى جميع هذه التأثيرات مجتمعة (Elliott و Elliott و 2006).

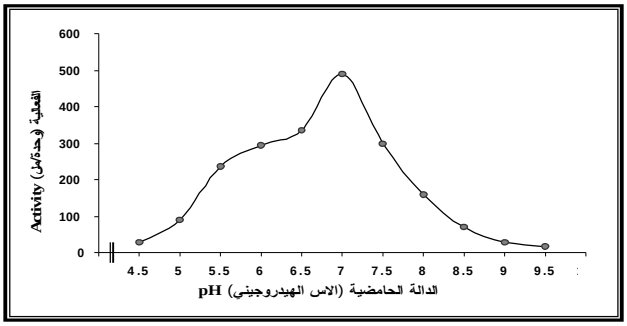
الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات فعالية الأنزيم

لدراسة تأثير الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم قيد الدراسة تم حضنه مع محاليل دارئة تراوح أسها الهيدروجيني بين 4 – 10 ومدة 30 دقيقة في درجة حرارة 35م°. ويتضح من خلال الشكل (8) أن الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم يتراوح بين 6.5 و8.5 إذ لوحظ انخفاض ثباتية الأنزيم عند الأس الهيدروجيني الحمضي والقاعدي المتطرف البعيد عن هذا المدى،يعود هذا الانخفاض إلى مسخ جزيئة البروتين أو هيئة الموقع الفعال أو ربما تغير التركيب الثانوي والثالثي للأنزيم ومن ثم فقدان الفعالية الأنزيمية (1976,Segel)، إذ احتفظ الأنزيم بما يقارب 90.2 – 100% من فعاليته عند الأس الهيدروجيني 6.5-8.5، أما عند الأس الهيدروجيني 5 - 10 فبقي

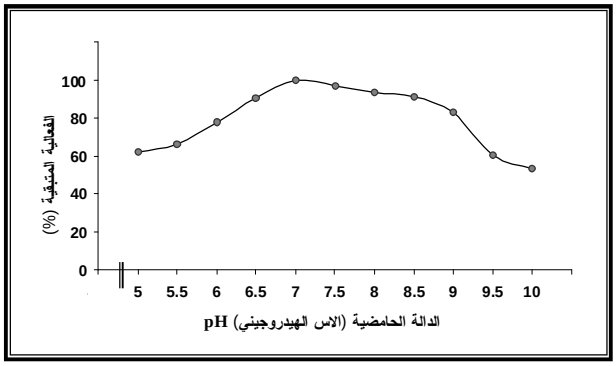
الأنزيم محافظاً على 62.3 % و53.3 % من فعاليته. جاءت هذه النتائج متفقة مع ما أشارت إليه دراسات أخرى تناولت ثبات أنزيم الليبوكسيجينيز في الفول السوداني منها المشكور (1985)، السلطان وآخرون (2004)، Singleton وآخرون (2005) إذ وجدوا أن الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم يتراوح بين 6.5 و9 باستخدام حمض اللينولييك كمادة أساس. وإن الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم يعتمد على عدة عوامل مثل درجة الحرارة والقوة الأيونية والطبيعة الكيميائية للمحلول الدارئ وتركيز المواد الحافظة وتركيز إيونات المعادن (المنشطات والمثبطات) وتركيز مادة الأساس وتركيز الأنزيم، كما ينبغي ملاحظة أن الأنزيم قد يكون ثابتاً مدة طويلة من الزمن عند أس هيدروجيني مختلف كلياً عن الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية (Segel, 1976).

تأثير درجة الحرارة في فعالية الأنزيم

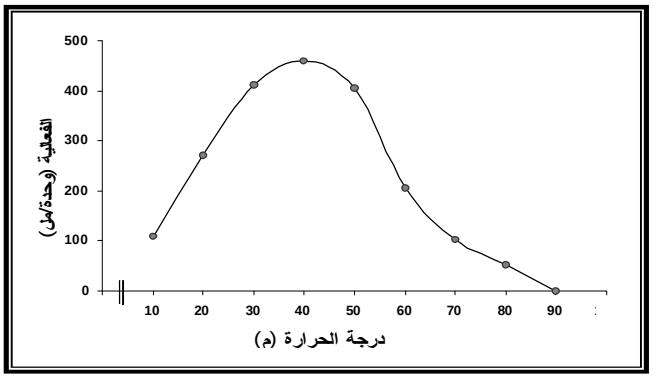
دراسة تأثير درجة الحرارة لفعالية الأنزيم المنقى من بذور الفول السوداني أجري التفاعل الأنزيمي بدرجات حرارة تراوحت بين 10-90 م°، وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (9) ازدياد الفعالية بزيادة درجة الحرارة والتي بلغت أقصاها عند 40 م°، فكانت الفعالية الأنزيمية عند هذه الدرجة 460 وحدة/ مل، ثم بدأت بعدها بالانخفاض تدريجياً بزيادة درجة الحرارة لتصل عند درجة حرارة 80 م° إلى 53 وحدة/ مل حتى يفقد الأنزيم فعاليته بالكامل بدرجة حرارة 90 م°. تعتمد درجة الحرارة المثلى على تركيز الأنزيم وتركيز مادة الأساس وزمن التعريض والأس الهيدروجيني ووجود المنشطات والمثبطات والبروتينات الواقية وغيرها، كما يتوقف نشاط معظم الأنزيمات في الحال تقريباً عند تعريضها لدرجات حرارة تقترب من 100م° (Aurand و Woods, 1998). يعود سبب الزيادة في سرعة التفاعلات الأنزيمية بارتفاع درجة الحرارة إلى زيادة التصادمات بين جزيئات الأنزيم وجزيئات المادة الأساس بفعل زيادة الطاقة الحركية للجزيئات في درجة الحرارة العالية (Segel, 1976)، أما انخفاض فعالية الأنزيم في درجات الحرارة العالية خلاف درجة الحرارة المثلى فقد يكون ناجماً عن تغيير التركيب الثلاثي مع احتمال حصول تمسخ للأنزيم Denaturation مما يسبب تغييراً في الموقع الفعال للأنزيم وفقدان فعاليته (الدلالي، 1983 ;Narayanan وآخرون، 1998). تأتي هذه النتائج متفقة مع ما أشارت إليه الدراسات التي تناولت تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيم الليبوكسيجينيز بأن أقصى فعالية لهذا الأنزيم تقع بين درجتي الحرارة 30 و40 م° وتتلاشى فعاليته عند ازدياد درجة الحرارة حتى يفقد فعاليته بالكامل عند درجة حرارة 90م° (Ding وآخرون، 1996)، واتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه السلطان وآخرون (2004) إذ وجد إن درجة الحرارة المثلى لأنزيم الليبوكسيجينيز في الفول السوداني هي 40 م°. أما في بذور الترمس فكانت درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم هي 35 م° (جاسم، 2004)، في حين وجد في دقيق القمح أن درجة الحرارة المثلى لأنزيم الليبوكسيجينيز هي 40 م°.



الشكل (7) منحنى الأس الهيدروجيني (الدالة الحمضية) الأمثل لفعالية أنـــزيم الليبوكـــسيجينيز المنقى من الفول السوداني.



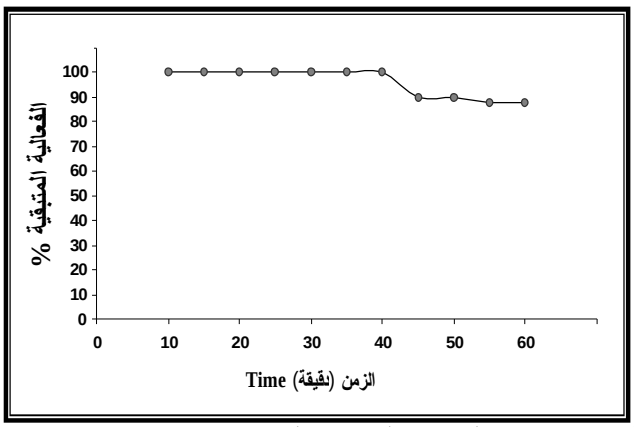
الشكل (8) منحنى الأس الهيدروجيني (الدالة الحمضية) الأمثل لثبـــات أنـــزيم الليبوكـــسيجينيز المنقى من الفول السوداني.



الشكل (9) درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم باستخدام حمض اللينولييك كمادة أساس وبأس هيدروجيني 7.

الحرارة المثلى لثبات للأنزيم

يوضح الشكل (10) نتائج حضن الأنزيم بدرجات حرارية تراوحت بين 20 و 70 م° مدة 15 دقيقة فقد لوحظ أن الأنزيم احتفظ بكامل فعاليته الأنزيمية عند حضنه بدرجة حرارة 40 م° لمدة 15 دقيقة أخذت بعدها الفعالية بالانخفاض بعد مرور 45 دقيقة على المعاملة الحرارية، كما إن الأنزيم فقد 10% من فعاليته بعد مرور 50 دقيقة، وفقد الأنزيم من فعاليته 12% بعد معاملته بدرجة الحرارة المذكورة مدة 50 - 60 دقيقة.

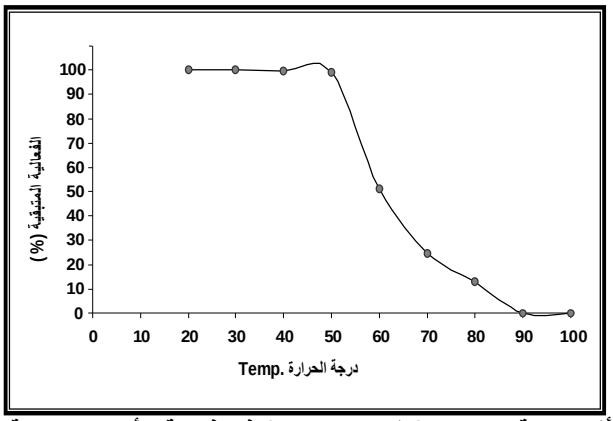


الشكل (10) تأثير المدة الزمنية للمعاملة الحرارية (الثبات الحراري) في فعالية أنزيم الليبوكسيجينيز بدرجة حرارة 40 م° مدة زمنية تراوحت بين (50 و60 دقيقة).

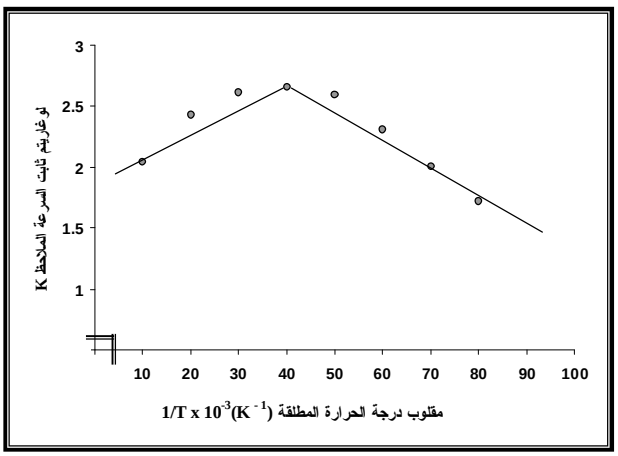
وعند حضن أنزيم الليبوكسيجينيز بدرجات حرارة 20 – 90 م° مدة 15 دقيقة كما في الشكل (11) يلاحظ أن الأنزيم احتفظ بكامل فعاليته بدرجة حرارة 40-50 م°، وفقد نحو 49 % عند درجة حرارة 60 م°، وفقد 75.5% عند درجة حرارة 70م° في حين كان الفقدان في الفعالية الأنزيمية 87 % عند درجة حرارة 80م°، وتستمر الفعالية بالانخفاض عند درجة حرارة 90م° إذ تصل فعالية الأنزيم إلى الصفر. مما سبق يمكن القول: إن درجة الثبات لهذا الأنزيم تراوحت بين 40 - 60 م°. إن عدم ثبات أنزيم الليبوكسيجينيز تجاه درجة الحرارة العالية قد يعود إلى تغيير طبيعة البروتين Denaturation بفعل الحرارة.اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه السلطان وآخرون (2004) من أن الثبات الحراري لأنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني يتراوح بين 50 - 60 م°، وكذلك إن الثبات الحراري للأنزيم من فول الصويا يتراوح بين 35-60 م° (الاعرجي، 2000)، أما جاسم (2004) فقد وجد أن الثبات الحراري للأنزيم من بذور الترمس يتراوح بين 20 و40 م°.إن اختلاف قيم الثبات الحراري للأنزيم يختلف باختلاف المادة الأساس المستعملة فضلاً عن القوة الأيونية للدارئ والوزن الجزيئي للأنزيم (1962,Wilder) وكذلك اختلاف المصدر المنقى منه الأنزيم ووجود مواد أخرى مع الأنزيم مثل الكربوهيدرات (1972 ,Whitaker).

طاقة التنشيط

حسبت طاقة التنشيط (Ea) لتحويل المادة الأساس إلى ناتج بفعل أنزيم الليبوكسيجينيز من الفول السوداني عن طريق العلاقة بين لوغارتيم ثابت سرعة التفاعل الملاحظ (K) ومقلوب درجة الحرارة المطلقة (1 / T) وفق معادلة أرهينوس(Bernhard و Whitaker ، 1972)



الشكل (11) تأثير درجة الحرارة (الثبات الحراري) في فعالية الأنزيم بدرجة حرارة من (20 - 90 م) لمدة 15 دقيقة.



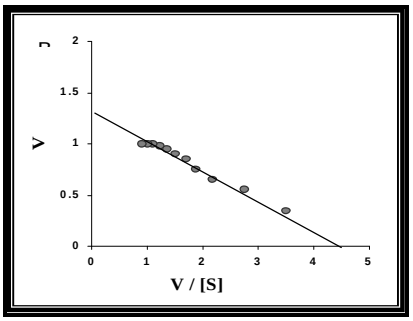
الشكل (12) منحنى ارهينوس لتعيين طاقة التنشيط لفعالية أنزيم الليبوكسيجينيز المنقى من الفول السوداني.

ويلاحظ من الشكل (12) أن قيمة طاقة التنشيط لفعالية أنزيم الليبوكسيجينيز بلغت 9.48 كيلو سعره/ مول وتقع هذه القيمة ضمن المدى الذي ذكره Whitaker(1972) من أن قيمة طاقة التنشيط لمعظم التفاعلات الأنزيمية تتراوح بين 6 – 15 كيلو سعره/ مول، وتعد القيم المنخفضة لطاقة التنشيط دليلاً على الطاقة الحفزية للأنزيم في تحويل المادة الأساس إلى ناتج وبذلك تؤدي الأنزيمات دوراً مهماً في زيادة سرعة التفاعلات بوصفها محفزاً لخفض طاقة التنشيط، وبذلك تكون سرعة التفاعلات الأنزيمية أعلى من سرعة التفاعلات غير الأنزيمية في درجات الحرارة المألوفة. اتفقت هذه النتائج لقيمة طاقة التنشيط لأنزيم الليبوكسيجينيز مع ما توصل إليه AL-Obaidy وSiddiqi (1981) في تعيين طاقة التنشيط للأنزيم من الفول فقد بلغت 7.9 كيلو سعره/ مول، وأيضاً اتفقت مع ما توصل إليه Ding وآخرون (1996) للأنزيم نفسه المنقى من فول الصويا 9.68 كيلو سعره/ مول، أما الباحث جاسم (2004) فوجد أن طاقة التنشيط للأنزيم من بذور الترمس بلغت 8.04 كيلو سعره / مول. أما في الفول السوداني فقد اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه Narayanan وآخرون (1998) من أن قيمة طاقة التنشيط لأنزيم الليبوكسيجينيز كانت 9.5 كيلو سعره/ مول واتفقت أيضاً مع نتائج السلطان وآخرون (2004) إذ بلغت قيمة طاقة التنشيط لأنزيم الليبوكسيجينيز 9.24 كيلو سعره/ مول. تعرف طاقة التنشيط بأنها أقل كمية من الطاقة يجب أن تمتلكها الجزيئات لتتحول إلى نواتج، وبمقارنة قيمة طاقة التنشيط للأنزيم قيد الدراسة مع القيم المذكورة يمكن القول: إن هذا الأنزيم يمتلك كفاءة عالية في تحويل المادة الأساس إلى ناتج. أما طاقة التنشيط لمسخ الأنزيم فقد بلغت 24.3 كيلو سعره/ مول، وهي قيمة منخفضة في ضوء ما ذكره Whtaker وBernhard (1972) من أن طاقة التنشيط لمسخ الأنزيم لمعظم التفاعلات الأنزيمية تتراوح بين 40 و150 كيلو سعره/ مول، وبهذا يمكن القول: إن أنزيم الليبوكسيجينيز هو أنزيم حساس تجاه الحرارة لأن طاقة التنشيط لمسخ الأنزيم منخفضة.

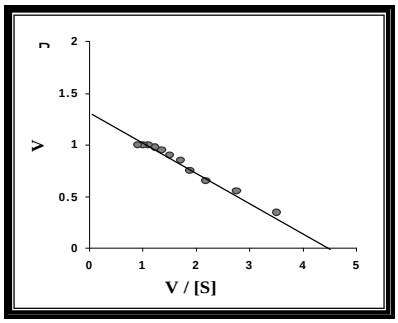
الثوابت الحركية للأنزيم

قُدّرت قيم ثابت ميكالس Michaels constant (Km) والسرعة القصوى Maximum Velocity (Vmax) والتي منها يستخرج الثابت الحفزي Catalytic Constant (kcat) اعتماداً على تركيز الأنزيم، وقدرت هذه القيم لأنزيم الليبوكسيجينيز المنقى من بذور الفول السوداني باستخدام حمض اللينولييك Linoleic acid وحمض اللينولينيك Linoleacid كمادة أساس، وبعد تقدير سرعة التفاعل الأولية لكل تركيز من التراكيز السابقة لمادتي الأساس رسمت العلاقة بين التركيز [s] والسرعة الأولية (V) باستخدام خمس طرائق مختلفة كما في الشكل (13 و14)، والسبب الرئيسي في استخدام هذه الطرائق الخمس المختلفة هو بغية الاقتراب من القيم الحقيقية لهذه الثوابت ولمقارنة أي من مادتي الأساس أفضل لفعالية الليبوكسيجينيز.قد أظهرت النتائج الموضحة في

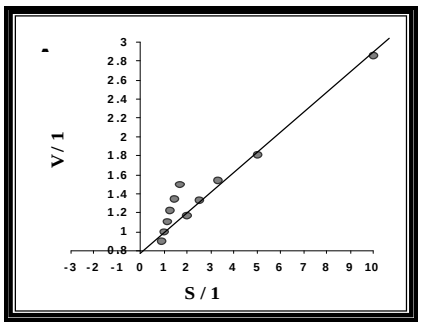
الجدول (4 و5 و6) أن معدل قيم ثابت ميكالس Km بلغ 0.280 ,0.326 ملغم/مل لكل من حمض اللينولييك واللينولينيك، ولما كان ثابت ميكالس يعبر عن ألفة الأنزيم تجاه المادة الأساس وأنه كلما كانت قيمه ثابت ميكالس Km منخفضة كانت ألفة الأنزيم تجاه المادة الأساس عالية (1976, Segel) لذلك إن أقل قيمة لـ Km هي 0.28 تدل على تركيز مادة الأساس عندما تكون سرعة التفاعل مساوية لنصف السرعة القصوى. وهو بذلك ذو قيمة ثابتة ومميزة للأنزيم ولمادة التفاعل. ويعد هذا مؤشراً مهماً في توصيف الأنزيمات من مصادر مختلفة إذ تحدد قيمته العددية الملائمة النسبية لمواد الأساس المختلفة لأنزيم معين. أما معدل سرعة القصوى Vmax فكان 1.29، 0.68 لكل من حمض اللينولييك واللينولينيك وتدل القيمة الكبرى 1.29 على الألفة العالية بين الأنزيم والمادة الأساس (حمض اللينولييك). وقد أشار Whitaker (1972) ,Segel (1976) إلى أنه يمكن الاستدلال من المادة الأساس الأكثر ملاءمة لعمل الأنزيم من خلال استخراج قيمة Km/Vmax فكلما كانت هذه القيمة عالية كانت ألفة الأنزيم تجاه المادة الأساس عالية أيضاً، أو من خلال استخراج قيمة Vmax/Km فكلما كانت هذه القيمة منخفضة وقريبة من القيمة الصفرية عدت الألفة بين الأنزيم والمادة الأساس عالية (1976, Segel). قد بلغت متوسط قيمة Km/Vmax 4.65 لحمض اللينولييك، أما لحمض اللينولينيك، فقد بلغ متوسط قيمة Km/Vmax 2.20 إذ تدل النسبة العالية على أعلى ميل ظاهري لمادة الأساس تجاه الأنزيم (2006, Elliott, Elliott). أما قيم Vmax / Km فقد بلغت 0.128 لحمض اللينولييك مقارنة بـ 0.476 لحمض اللينولينيك وإن أقل قيمة باتجاه القيمة الصفرية هي التي تدل على ألفه وملاءمة المادة الأساس للأنزيم لذلك تم اختيار حمض اللينولييك كأفضل مادة أساس لأنزيم الليبوكسيجينيز في هذه الدراسة. إنّ النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة اتفقت مع كثير من الدراسات السابقة. إذ وجد Al-Obaidy (1975) أن قيمة **Km** لأنزيم الليبوكسيجينيز من الفول باستخدام حمض اللينولييك كمادة أساس تساوي 2.8×10^{-3}M، في حين ما وجد Leoni وآخرون (1985) أن قيمة **Km** للأنزيم المنقى من بذور عباد الشمس وباستخدام حمض اللينولييك مادة أساس تساوي 6.7×10^{-6}M، أما جاسم (2004) فوجد أن قيمة **Km** لأنزيم المنقى من بذور الترمس قد بلغت 0.43 ملغم/مل باستخدام حمض اللينولييك كمادة أساس. قيمة **Km** للأنزيم المنقى من بذور الترمس قد بلغت 0.43 ملغم/مل باستخدام حمض اللينولييك كمادة أساس.



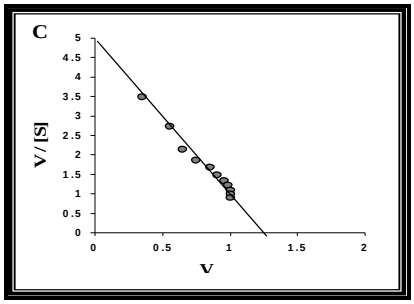
A



B

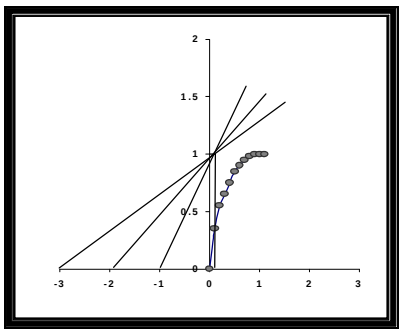


D



C

Fig (23).
A: Lineweaver–Burk plot.
B: Woolf–Augustinson Hofstee polt.
C: Eadia–Scatchard plot.
D: Hanes–Woolf plot.
E: Estesthal Cornish Bowden plot.



E

الشكل (13) الثوابت الحركية لأنزيم الليبوكسيجينيز تجاه حمض اللينولييك

الجدول (4) قيم الثوابت الحركية لأنزيم الليبوكسيجينيز تجاه حمض اللينولييك لطرائق الرسم المختلفة تبعا لطرائق الرسم المختلفة

mg/ml [S]	V Unite	1/[S]	1/V	[S]/V	V/[S]
0.1	0.35	10	2.857	0.285	3.5
0.2	0.55	5	1.818	0.363	2.75
0.3	0.65	3.33	1.538	0.461	2.166
0.4	0.75	2.5	1.33	0.533	1.875
0.5	0.85	2	1.17	0.588	1.7
0.6	0.90	1.66	1.11	0.66	1.5
0.7	0.95	1.42	1.652	0.73	1.35
0.8	0.98	1.25	1.02	0.81	1.22
0.9	1.0	1.11	1	0.9	1.11
1	1.0	1	1	1.0	1
1.1	1.0	0.90	1	1.1	0.90

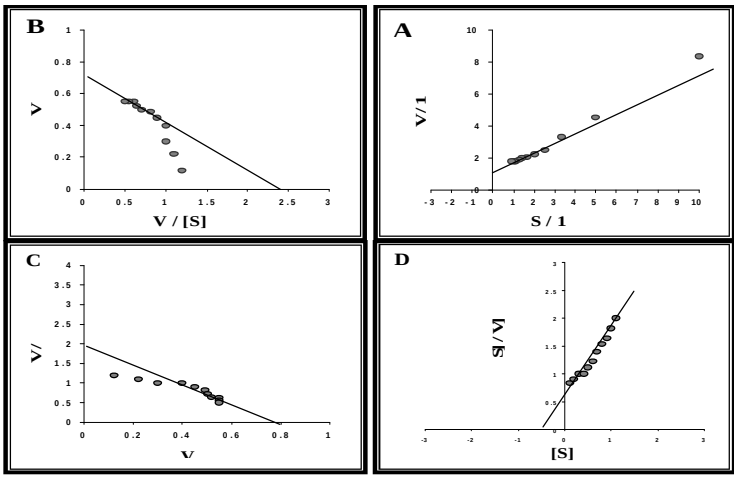
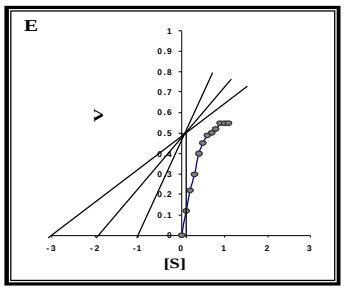


Fig (14)
A: Lineweaver–Burk plot.
B: Woolf–Augustinson Hofstee polt.
C: Eadia–Scatchard plot.
D: Hanes–Woolf plot.
E: Estesthal Cornish Bowden plot.



الشكل (14) الثوابت الحركية لأنزيم الليبوكسيجينيز تجاه حمض اللينولينيك

تأثير المثبطات المعدنية في فعالية أنزيم الليبوكسيجينيز

اختبر تأثير مجموعة من المواد الكيمياوية في فعالية الأنزيم الخام والمنقى كمواد مثبطة، ويوضح الجدول (7) النتائج التي تم الحصول عليها، إذ يلاحظ أن تأثير كل من هذه المثبطات (EDTA، 8-Hydroxy quinoline، 1:10 phenan throline، α- α Dipridy) في فعالية أنزيم الليبوكسيجينيز مختلف إذ كانت نسبة التثبيط في المستخلص الخام (44.6, 84.8, 58.7, 69.1) في حين كانت نسبة التثبيط في فعالية الأنزيم المنقى (70.1,95.1,93.3,79.2)، ويلاحظ أن النسبة المئوية لتثبيط الأنزيم المنقى أعلى مقارنة مع المستخلص الخام ويعزى ذلك إلى وجود شوائب بروتينية في المستحضر الخام التي تكون قد حالت دون تأثير المثبطات في الأنزيم مباشرة. أكدت الدراسات الحديثة احتواء الليبوكسيجينيز من مصادر مختلفة على بعض العناصر المعدنية مثل الحديد والكالسيوم والمنغنيز والفسفور، وهذا يوضح سبب تأثره بالمثبطات المعدنية إذ إن المعدن يشكل جزءاً مهماً من تركيب الأنزيم مما يؤدي إلى تكوين معقدات تؤدي إلى تثبيط فعالية الأنزيم (Kuo وآخرون، 1997). لذا فإن تأثير الأنزيم قيد الدراسة يعزى إلى وجود مثل هذه المعادن في تركيبه، ويؤكد koch (1996) أن الكالسيوم يدخل في تركيب الأنزيم وإن إضافته إلى وسط التفاعل بنسب معينة يؤدي إلى زيادة فعالية الأنزيم. اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه Al-Obaidy وSiddiqi (1981) عند تأثير هذه المثبطات في فعالية الليبوكسيجينيز في بذور الفول والحمص، كما تتفق مع ما توصل إليه Burow وآخرون (2000) من أن فعالية الأنزيم في فول الصويا تثبط بالمثبطات المذكورة نفسها، والذي أكد أن الليبوكسيجينيز من بذور الفول السوداني يثبط بهذه المثبطات المعدنية التي تعطي دليلاً كبيراً على احتمال اشتراك المعادن في تركيب الأنزيم. وقد حصل جاسم (2004) على نتائج مشابهة عند تثبيط الأنزيم من بذور الترمس.

تأثير الأيونات الموجبة في فعالية الليبوكسيجينيز

درس تأثير بعض الأيونات الفلزية في فعالية أنزيم الليبوكسيجينيز، وذلك بحضن الأنزيم مع محاليل كلوريدات الفلزات، وتوضح النتائج المدونة في الجدول (8) الاختلاف في تأثير ايونات هذه الفلزات في فعالية الأنزيم، ويشير الجدول إلى أن لبعض الإيونات الفلزية الموجبة تأثيراً منشطاً لفعالية الأنزيم مثل الكالسيوم والمغنيسيوم والمنغنيز والنيكل، والأخرى لها تأثير مثبط مثل ايونات النحاس والحديد والزنك. ومن الجدير بالذكر أن الأنزيمات الحاوية على إيونات المعادن Metallo protein لها تخصص إلى أيون موجب معين ولكن يمكن لأيونات موجبة أخرى تنشيط الأنزيم. ويتضح من الجدول أنه على الرغم من كون الكالسيوم أكثر الأيونات المنشطة لفعالية الأنزيم فإن هناك إيونات أخرى مثل النيكل والمغينسوم والمنغنيز لها تأثير منشط بدرجة عالية ومحسوسة في التفاعل، أما إيونات الحديد والنحاس والزنك فإنها مثبطة للتفاعل. يتطلب التأثير المثبط للحديد دراسات أكثر بالنظر إلى نتائج البحوث الحديثة والتي أوضحت احتواء

الليبوكسيجينيز من فول الصويا والفول السوداني على الحديد في تركيبها (Liu ,1998). وقد وجد الأعرجي (2000) عند تثبيط فعالية إنزيم الليبوكسيجينيز في فول الصويا باستخدام عدد من الأيونات مثل النحاس والحديد ووجد أنها مثبطات التنافسية Competitive Inhibtor، بينما وجد أن الكالسيوم هو أكثر الأيونات قابلية على تنشيط فعالية الأنزيم ويليه المنغنيزثم المغنيسيوم.وقد ذكر الصوفي (2001) أن الأيونات المعدنية لها دور مهم في الحفاظ على جزيئة الأنزيم وفي زيادة فعاليته من خلال المشاركة في تبادل الألكترونات أو تقريب الأنزيم والمادة الأساس بعضها من بعض بأواصر تناسقية Co.Ordinate bond أو مسك المجاميع المتفاعله في الشكل الثلاثي الأبعاد (Three dimensional orientation) وقد تعمل على استقرارية التركيب الفعال للأنزيم إلا أن التراكيز العالية من هذه الايونات تكون ذات تأثير سلبي في الأنزيم. اتفقت النتائج المتحصل عليها مع النتائج التي ذكرها السلطان وآخرون (2004) من أن ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم والمنغنيز والنيكل تنشيط فعالية أنزيم الليبوكسيجينيز في الفول السوداني في حين أن إيونات النحاس والحديد والزنك تثبط من فعالية الأنزيم. وقد تم الاستنتاج من هذه الدراسة إن الأنزيم من البروتينات السكرية يحتوي على الكربوهيدرات بنسبة 13% عند تقديرها بطريقة الفينول- حمض الكبريتيك، وإن الأنزيم المنقى من الفول السوداني يماثل في معظم خواصه تلك الموجودة في الأنسجة الحيوانية أو المنتجة من الأحياء المجهرية ولاسيما الفطريات، كما توضح هذه الدراسة أن الأنزيم من الأنزيمات التي تحتوي على المعادن Metallo Enzymes ويكون حساساً بشكل كبير لأيونات الكالسيوم والنيكل والمغنيسيوم والمنغنيز والتي تزيد من فعاليته بينما تثبط فعاليته إيونات النحاس والحديد والزنك وحساسية الأنزيم المنقى من بذور الفول اءسوداني لدرجات الحرارة العالية.

الجدول (5) قيم الثوابت الحركية لأنزيم الليبوكسيجينيز تجاه حمض اللينولينيك تبعاً لطرائق الرسم المختلفة

[S] mg/ml	V Unite	1/[S]	1/V	[S]/V	V/[S]
0.1	0.12	10	8.33	0.833	1.2
0.2	0.22	5	4.54	0.9	1.1
0.3	0.3	3.33	3.33	1	1
0.4	0.4	2.5	2.5	1	1
0.5	0.45	2	2.22	1.1	0.9
0.6	0.49	1.66	2.04	1.22	0.82
0.7	0.5	1.42	2	1.4	0.714
0.8	0.52	1.25	1.92	1.53	0.65
0.9	0.55	1.11	1.82	1.64	0.611
1	0.55	1	1.82	1.82	0.55
1.1	0.55	0.90	1.82	2	0.5

الجدول (6) الثوابت الحركية لأنزيم الليبوكسيجينيز تجاه حمض اللينولييك وحمض اللينولينيك.

حمض اللينولييك				
Methods	**Vmax**	**Km**	**Km /Vmax**	**Vmax/ Km**
L. B	1.351	0.285	4.74	0.211
W. A. H	1.220	0.263	0.64	0.215
H. W	1.315	0.250	5.26	0.190
E. S	1.22	0.269	4.53	0.220
E. C. B	1.35	0.328	4.11	0.259
Mean	1.29	0.280	4.65	0.128
حمض اللينولينيك				
Methods	**Vmax**	**Km**	**Km /Vmax**	**Vmax/ Km**
L. B	**0.625**	**0.330**	**1.89**	**0.528**
W. A. H	**0.7**	**0.318**	**2.201**	**0.454**
H. W	**0.6**	**0.30**	**2.0**	**0.5**
E. S	**0.75**	**0.340**	**2.2**	**0.45**
E. C. B	**0.75**	**0.340**	**2.2**	**0.45**
Mean	**0.690**	**0.326**	**2.2**	**0.476**

الجدول (7) تثبيط فعالية الليبوكسيجينيز باستخدام المثبطات المعدنية في المستخلص الخام والمنقى

% للتثبيط الأنزيم المنقى	% للتثبيط الأنزيم الخام	نوع المثبط
79.2	44.6	**EDTA (1×10^{-3})M**
92.3	84.8	**8- Hydroxy quinoline (0.2×10^{-3})M**
95.1	69.1	**a – a Dipridyl (0.1×10^{-3})M**
70.6	58.7	**1:10 phenan throline (0.01×10^{-3})M**

الجدول (8) تأثير الإيونات الموجبة في فعالية الأنزيم من الفول السوداني

الفعالية المتبقية %	الفعالية وحدة / مل	نوع الايون (1×10^{-3}M)
100	480.0	عدم إضافة أيون
164	775.9	$CaCl_2$
30	144.0	$CuCl_2$
45	214.0	$FeCl_2$
120	576.0	$MnCl_2$
128	616.4	$MgCl_2$
70	336.0	$ZnCl_2$
149	710	$NiCl_2$

REFERENCES المراجع

الأعرجي، سند باقر محمد. (2000). فصل أنزيم الليبوكسيجينيز ومثبط التربسين من فول الصويا صنف أباء وتنقيتهما وتوصيفهما. 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).

السلطان، أحلام مكي عبدالجبار، 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.

الصوفي، محمد عبدالرزاق علي. (2001). فصل أنزيم البيروكسيديز وتنقيته وتوصيفه من الحليب النباتي لنبات الديباج وإمكانية استخداماته التطبيقية. 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.

المظفر، سامي عبدا لمهدي. (1983). حركيات الأنزيمات. (الجزء الأول). مطبعة الخلود. بغداد. (تأليف).

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.

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

Allen, J. S.; Angelo, J. G and Robert L. O. (1997). Enzymes and oxidative stability of peanut products, southern regional research Centers, U. S. Department of Agric., New Orleans , Accymopsium series 97.

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.

Aurand, L. W and Woods, A. E. (1998). Food chemistry, The AVI. Pub Co., In west port. Et.

Boyington, J. C.; Gaffney, B. J. and Amzel, L. M. (1993). The three dimensional structure of and atachidonic acid 15- Lipoxygenase. Science (260): 1482 – 1486.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding analytical biochemistry. V. 72 : 248 -254

Burow, G. B.; Gardner, H. W. and Keller, N. P. (2000). A peanut seed Lipoxygenase responsive Aspergillus's colonization. Plant Mol. Biol. V. (42): 689 – 710.

Conbridge, D. E. C. (1985). Studies in Inorganic Chemistry Phosphorus, An Outline of its Chemistry, Bio chemistry and Technology (third Edition).

Dillard, M. G.; Henick, A. S. and Koch, R. B. (1960). Unsaturated triglyceride and Fatty acid Lipoxidase activities of navy beans, Small red beans, peanuts, green peas and lima beans. Food Res. V.(25) : 544-551

Ding, A.; Zhang, Y. and Chang, R. (1996). Advance in the research of soybean Lipoxygenase soybean. Science (china) V. 14 (1) : 67-76

Dubios, M. ; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Robers, D. A and Smith, F. (1956). Colorimetric method For determination of Sugar and related substance. Anal. Chem.. V.288 (3): 35-47

Elliott, W. H and Elliott, D. C. (2006). Biochemistry and Molecular. Biology university of Adelaide. Australia. 4th Edition Oxford university press.

Gada, J. L.; Pinto, M. C. 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

Kermasha, S.; Lavorel, V. and Bisakowshi, B. (1997). Partial characterization of lipoxygenase from fusariun proliferum. Food Biotechnology (New York) (USA) V. 9 (3) : 189-195.

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

Koch, R. B. (1996). Calcium ion activation of lipoxygenase Arch. Bio chem.. Bio phys. 125 – 303.

Kuo, J. M.; Hwang, A. and Yeh, D. B. (1997). Purification Substrate Specificity and products Ca^{+} Stimulating lipoxygenase, J. of Agric. And Food chem.. V. 45 (6) : 205 -212.

Leoni, O.; Lori, R. and Palmieri, S. (1985). Purification and properties of lipoxygenase in germinating sun flower seeds. J. Food science. V.50: 88 – 92.

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

Marshall, J. J. (1980). preservation of enzymes be conjugation with dextrin In. chemical deterioration of protein (eds. J. R. Whitaker and. Fujimaki) p. 125 American chemical Society Washington..

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

Narayanan, K. M. ; Bains, G. S. and Bhatia, D.S. (1998). Lipoxidase inhibitor in ground nut testa, chem.. Ind V. 39: 1588-1594

Nor, Z. (1980). Effect of PH manipulation during extraction of peanut proteins. Ph. D. thesis. Dept of Food science, thesis, University of I Inions Urbana-Champaign. U. S. A. .

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 .

Richard, K.; David, M.; Andrze J.; Shirley A. and Rod, K. (2001). Mutagenesis and modeling of linoleate binding to pea seed Lipoxygenase. Euro J. Biochem. V. 268: 1030 – 1040.

Roberto B., Raffaella B., Saba D., Ferdinado F., Carlo V., Luigi D., Grazia M., Natale D. and Roberto N. (1999). Purification and characterization of Lipoxygenase of enzyme from durum wheat semolina. J. of Agric. Food chemistry (USA). V.47(5):606-609.

Robinson, D.; Wu, Z. and Domoney, C. (1995). Lipoxygenase and quality of food. Food Chem. V. 54 : 33 – 43.

Scheller, G.; Jager, E.; Hoffman, B. and Schmitt, M. (1999). Soybean Lipoxygenase: substrate structure and product Selectivity. J. of Agric and Food chemistry (USA) V. 43 (7) : 1768-1774.

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

Shen, K. and Herman, C. A. (2000). partial purification and characterization of Lipoxygenase in bull Frog erythrocytes. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 127 (4) : 503 – 513.

Siddiqi, A. M. and Tappel, A. L. (1956). Catalysis of linoleate oxidation by pea Lipoxidase, Arch. Biochem. Biophys. V. 60 : 91-97

Silva, M.; Oliveira, M.; Gaoreti, D. and Lanna, A. (2001). Characterization of Lipoxygenase pathway of soybean plants resistant and susceptible to Diaphorte phaseolorum F. Sp. Meridionalis, pathogen responsible for stern canker. Rev. Bras. Fisiol. Veg. V. 13 (3) : 316 – 329.

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

Vanden , T. and Mendoza, E. T. (1982). Purification and characterization of two Lipoxygenase Iso enzymes from cowpea (vigna unguiculate (L.) walp.). J. Agric. Food chem.. V.34 : 54 – 60 .

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

Whitaker, J. R, and Bernhard. R. A. (1972). Expermets for an intxoduction to enzymology. The Whiber press. Davis. Galif.

Wilder, C. (1962). Facter affecting heat inactivation. and paratial reactivation of peroxidase purifid by ion exchange chrom atography. Food Sci. .V. 27: 567-573

Wrigley, C. W. (1971). Gel elector Focusing in "Methods in enzymology" (ed by William, R. I) V. 22 p . 559. New York.

Wynne, M. G. and Yada, R. Y. (1991). Isolation of Mucor miehi and Mucor pusilluse aspartic proteinases Form partially purified sources using preparative iso electric Focusing J. Food Biochem.. V. 15 : 347-356.