استخلاص وتنقية أنزيم الليبوكسيجينيز Lipoxygenase من لحم الدجاج المحلي

أ.د. اياد نافع يحيى
الجامعة المستنصرية – كلية التربية الأساسية
أ.د. سند باقر محمد
جامعة بغداد – كلية العلوم للبنات
منى محمد زيدان
وزارة التربية – مديرية تربية الرصافة/1

الخلاصة

تضمنت الدراسة اختيار افضل طريقة لاستخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز من لحم الدجاج المحلي، من بين ثمان طرائق، و كان كلوريد الصوديوم (10)% هو الأفضل في استخلاص الأنزيم بفعالية كلية بلغت (918810) وحدة. ركز المحتوى البروتيني باستخدام كبريتات الأمونيوم (60)%من بين خمس طرائق للتركيز (التنقية الجزئية)، وأكملت مراحل التنقية باستخدام التبادل الأيوني والترشيح الهلامي بعمود DEAE – Sephadex- A50، ومن ثم استخدام الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل (Sephacryl S – 300) إذ بلغت الفعالية النوعية (17.10) وحدة / مل والفعالية الكلية (393) وحدة والحصيلة الأنزيمية مقدارها (42.9)% وعدد مرات التنقية (7.50) مرة. وثم التأكد من نقاوة الأنزيم بأجراء عملية الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة للبروتين إذ ظهرت حزمة بروتينية واحدة في هلام متعدد أكريل أمايد، وقدر الوزن الجزيئي للأنزيم بطريقة الترشيح الهلامي وكان (85) كيلودالتون .

الكلمات المفتاحية : أنزيم الليبوكسيجينيز ، استخلاص الأنزيمات ، تنقية الأنزيمات، لحم الدجاج

المقدمة

لقد أظهرت الدراسات الأولى للأنزيمات أنها تشترك مع البروتينات في كثير من الخواص وقد فشل الباحثون الأوائل في عزل الأنزيمات حتى امكن من عزل أنزيم اليوريز Urease على شكل بلورات نقية واثبت ان الأنزيم عباره عن بروتين أو معقد بروتيني معدني ، عالي الوزن الجزيئي و يعمل ضمن الجسم الحي كعامل مساعد لكثير من التفاعلات الأيضية ، ، وقد تكـــون الأنزيمات بروتينات بسيطة أو بروتينات متبادلـــة تحتـــاج إلى مجموعة غير بروتينيـــة لفعاليتها البيولوجية .وهناك الكثير من العوامل تؤثر في فعالية الأنزيمات مثل ال pH ودرجه الحرارة ، المذيبات والتراكيز الملحية يمكـــن ان تغير تركيب البروتين وعليه فان هـــذه العوامل ستؤثر فـــي مستوى فعاليـــة الأنزيمات.

أنزيم الليبوكسيجينيز Lipoxygenase من الأنزيمات الحاوية على الحديد والتي تحفز عملية Dioxygenation للأحماض الدهنية غير المشبعة (Liavonchanka وآخرون ، 2006 ؛ Moraes و2014 , Eliana) ، تم العثور عليه في النباتات والحيوانات والأحياء المجهرية والمادة الأساس له في النباتات هو الحامض الدهني لينوليك (Linoleic 2 : 18) واللينولينيك (Linolenic 3 : 18) ، في حين أشار جاسم (2004) إلى ان الأنزيم الحيواني يحفز إنتاج هيدروبيروكسيد الحامض الدهني الأراجيدونك (Arachidonic 20 : 4) ، وإنتاج مركبات وسطية هيEicosanoids التي تلعب دور في حدوث الالتهابات . ان المركبات الوسطية الناتجة من فعل الليبوكسيجينيز في الثديات هي الليوكترينات Leukotriene، حيث وجدت إنها من احد الأسباب في العديد من حالات التهاب المفاصل ومرض الصدفية والربو القصبي والسرطان ويعتقد ان لها دور كبير في تصلب الشريان وشيخوخة الدماغ وعدوى نقص المناعة البشرية وأمراض الكلى (Marija وآخرون ، 2014).

لقد أشار الباحث Liu، (1998) إلى ان أنزيم الليبوكسيجينيز ، قد تم اكتشافه في عام (1928) من قبل Boun و Hass وذلك في أثناء ملاحظتهم اللون الأصفر في عجين الحنطة بعد إضافة كميات قليلة من طحين فول الصويا على الرغم من اعتقادهم في ذلك الوقت ان سبب فقدان اللون في عجين الحنطة هو تحطم الكاروتين إلا انه وجد بعدها ان الصبغة المحطمة بشكل رئيسي هي الزانثوفيلات، وبعد ذلك وجد الباحثان Ander و Hou في عام (1932) ان فول الصويا تحوي أنزيما يؤكسد الدهون غير المشبعة

وسمياه أنزيم الليبوكسيديز lipoxdase، وهو الأنزيم الذي أعطته لجنه تسميه الأنزيمات التابعة لاتحاد الكيميائيين الحيويين اسم الليبوكسيجينيز Lipoxygenase والذي يقع تحت رقمُ (Linoleate:Oxidoreductase) EC1.13.11.12 . ان أنزيم الليبوكسيجينيز من الأنزيمات التي تحفز أضافه جزيئه أوكسجين إلى الحوامض الدهنية غير المشبعة والتي تحتوي على الجزء الفعال Cis , Cis - pentadiene – 1 ,4 لتعطي الهيدروبيروكسيدات ناتجا، (Silva وجماعته ،2001 ؛ Rrichard وجماعته،2001). ونظرا لعدم وجود دراسة مستفيضه عن أنزيم الليبوكسيجنيز في لحوم الدجاج فان هدف هذه الدراسة هو استخلاص و تنقيه أنزيم الليبوكسيجنيز من لحم الدجاج المحلي.

طرائق ومواد العمل

تحضير (عينة البحث) لحم الدجاج

تم شراء اربع من الدجاج المحلي من الأسواق المحلية لغرض أجراء البحث ، إذ كان يؤخذ لحم الدجاج بعد فصله عن الجلد والعظم ويقطع إلى قطع صغيرة ، ثم يثرم بواسطه مثرمة اللحم ويوضع في أكياس النايلون وتغلق بأحكام وتخزن في المجمدة Freezer لحين أجراء التحليلات اللازمة عليها.

التحليلات الكيميائية

أجريت التحليلات الكيميائية بمكررين اثنين على لحم الدجاج المحلي، وقدرت الرطوبة والرماد حسب ما جاء في .A.O.A.C، (1999) ، و قدرت النسبة المئوية للدهن باستخدام طريقة Soxhelt الموصوفة من قبل Osborne و Voogt (1987)،باستخدام مذيب إيثر البترول Petroleum ether، و قدرت نسبة الألياف الخام، بحسب الطريقة الوارد ذكرها في .A.O.A.C (1999) ، حيث أخذت عينة بوزن (2) غم بعد إزالة الدهن منها بطريقة Soxhelt والموصوفة من قبل McNichol (2012). و جرى تقدير نسبة البروتين بحسب طريقة مايكروكلدال Micro - kjeldahl (A.O.A.C. ، 1999) واستعمل العامل (6.25) لتحويل نسبة النتروجين الكلي إلى النسبة المئوية للبروتين. و تم تقدير نسبه الكربوهيدرات على أساس إنها المادة المتبقية بعد طرح نسبه الرطوبة والرماد والبروتين والألياف والدهن من (100). وتم حساب القيمة الحرارية على أساس:

القيمة الحرارية (كيلو سعرة / 100 غم) = (4 X P) + (9 X F) + (3.75 X C)

حيث ان: P : النسبة المئوية للبروتين و F : النسبة المئوية للدهن و C : النسبة المئوية للكربوهيدرات . قيست دالة الحموضة حسب طريقه Myers ،(2010) ، باستعمال جهاز الـــ PH من نوع PYe-unicam.

استخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز من لحم الدجاج المحلي

لغرض تحديد الطريقة الأفضل لاستخلاص أنزيم الليبوكسيجنيز من لحم الدجاج المحلي فقد استخدمت ثمانية طرائق مختلفة وصفت من قبل التميمي (1996) و محيسن (2007) منها:

الاستخلاص بالماء المقطر؛ الاستخلاص بمحلول 10% كلوريد الصوديوم ؛ الاستخلاص بمحلول 0.2 % كلوريد الكالسيوم ؛ الاستخلاص بمحلول 0.2 % كلوريد البوتاسيوم ؛ الاستخلاص بمحلول 0.2 مول / لتر دارئ الخلات 5 pH ؛ الاستخلاص بمحلول 0.2 مول / لتر دارئ الفوسفات7pH ؛ الاستخلاص بمحلول الكليسرول 20% و الاستخلاص بمحلول 0.5 % كربونات الصوديوم Na2CO3.

فعالية الأنزيم

وقدرت الفعالية الأنزيمية تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Liu، (1977) والمتبعة من قبل Abdulla، (2013).

تقدير البروتين

اتبعت طريقة Lowry ، وآخرون (1951) الموصوفة من قبل Everette وآخرون (2010) لتقدير تركيز البروتين في المراحل المختلفة من الدراسة .

تنقية الليبوكسيجينيز

أجريت عملية استخلاص الأنزيم من لحم الدجاج المحلي حسب الطريقة التي أعطت اعلى فعالية وهي الاستخلاص بمحلول كلوريد الصوديوم (10)%. وتم تركيز المستخلص الأنزيمي باستخدام خمس طرائق مختلفة وذلك لتحديد الطريقة المثلى لتركيز الأنزيم (التنقية الجزئية) للحصول على اعلى فعالية نوعية واعلى نسبة مئوية من الحصيلة الأنزيمية (Yield) والطرائق الخمس هي:- **الترسيب بكبريتات الأمونيوم** بنسبة إشباع تراوحت بين (40 – 60)% ، **الترسيب بالكحول الأثيلي** حيث تم تركيز المستخلص الأنزيمي بإضافة حجوم معينه من الكحول الأثيلي تدريجيا مع التحريك المستمر للحصول على نسب مئوية متدرجه من الكحول تراوحت بين (30–50%) ،

الترسيب بالأسيتون المبرد حيث مزج الأسيتون المبرد مع المستخلص الأنزيمي بنسبه (1:0.5)) (1:1,2:1,3:1,4:1) (حجم/حجم) وأضيف الأسيتون تدريجيا مع التحريك المستمر داخل حمام ثلجي ، **التركيز بالترشيح الفائق** حيث استخدمت خليه الترشيح الفائقة السرعة سعه (50 مل) من نوع (Amicon - Model K-52PS , MAX) الهولندية الصنع واستخدم المرشح Diaflo Ultra filter من نوعXM-100 بعد نقعه بالماء المقطر لمده ساعه واحده حيث تثبت الخلية ويضاف المستخلص الأنزيمي في مستودع الخلية وتغلق . واستخدم النيتروجين لدفع المستخلص بضغط (3.5) كغم/ سم ووضعت الخلية على خلاط مغناطيسي لحين انتهاء الترشيح الفائق وبذلك يكون المستخلص قد ركز ثم يقاس الحجم وتركيز البروتين وفعالية الأنزيم (السعدي ، 2014)، و**التركيز بحبيبات السفادكس G. 25 الجافة** حيث يضاف المستخلص الأنزيمي إلى أنبوب الديلزة (النضح الغشائي) ويحاط بطبقة من حبيبات السفادكس G. 25 يوضع في طبق داخل الثلاجة وحتى اليوم التالي، ثم يتم قياس الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين (التميمي، 1996).

التنقية الكلية

تمت التنقية الكلية بمرحلتين الأولى كان باستخدام كروموتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام مادة DEAE Cellulose – Sephadex A 50 وبالطريقة التي وصفها (Whitaker،1972)، والمرحلة الثانية كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام مادة السيفاكريل (Sephacryl S-300) المجهز من شركة Pharmacia السويدية .

تعين نقاوة الأنزيم

اتبعت الطريقة التي ذكرها (Garfine، 1990) في تعيين نقاوة الأنزيم وهي طريقه الترحيل الكهربائي في هلام متعدد أكريل أمايد بغياب العوامل الماسخة (Poly acryl amid electrophoresis under non denatured condition).

الوزن الجزيئي للأنزيم

تم تتعين الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجنيز المنقى بطريقه الترشيح الهلامي.

النتائج والمناقشة

التحليل الكيمياوي للحم الدجاج المحلي

يبين الجدول (1) نتائج التحليل الكيميائي لمكونات لحم الدجاج المحلي وتضمن تقدير النسبة المئوية للرطوبة، البروتين، الدهن، الألياف الخام، الرماد والكربوهيدرات، وكذلك تم حساب القيمة الحرارية وقياس دالة الحموضة (الأس الهيدروجيني) ، وكانت القيم المقدرة (65.1 ، 23.8 ، 3.2 ، 1.2 ، 1.6 ،5.1) % للرطوبة، البروتين، الدهن ، الألياف الخام ، الرماد والكربوهيدرات على التوالي.

جدول (1)التحليل الكيميائي لمكونات لحم الدجاج المحلي

المكونات	(%)	المكونات	
الرطوبة	65.1	القيمة الحرارية (كيلو سعره/ 100 غم)	143.125
البروتين	23.8		
الدهن	3.2	دالة الحموضة pH	6.5
الألياف الخام	1.2		
الرماد	1.6		
الكربوهيدرات	5.1		

وبلغت القيمة الحرارية لكل (100) غم من لحم الدجاج المحلي (143.125) كيلو سعرة، ودالة الحموضة (6.5). ويلاحظ من النتائج انخفاض نسبة الدهن وارتفاع البروتين وذلك لفصل الجلد والأنسجة الدهنية الأخرى، ثم أخذت العينة على أساس اللحم فقط .

وقدر القيسي وآخرون، (2007) نسبة الرطوبة ، البروتين، الدهن والرماد في لحم صدر دجاج صنف Lohman بـــ (70.60، 21.57، 6.57 و0.50)% على التوالي. كما قدر الشميري (2007) نسبة الرطوبة في لحم فخذ الدجاج المحلي اليمني ولحم فخذ الدجاج التجاري صنف Rose 308 بـــ (70.5 و 66.8)% على التوالي ، فيما بلغت قيم نسبة الرماد (1.8 و 2.5) % على التوالي، وتساوت نسبة البروتين حيث بلغت (23)% واعزى السبب لتناولهم نفس مكونات العليقة المقدمة لهم وتحت نفس الظروف .

وفي دراسة Souza وآخرون، (2011) قدروا نسبة الرطوبة ،البروتين، مستخلص الإيثر، والرماد في لحم صدر ذكور الدجاج البرازيلي بـــ (75.60، 22.35، 0.75 و1.01)% على التوالي، وفي لحم صدر إناث الدجاج البرازيلي (75.37، 22.70، 0.65

و 0.93)% على التوالي. ووجدوا ان درجة الحموضة (5.76) هي نفسها في لحم الذكور والإناث.

وقدر Peter وآخرون، (2012) نسبة الرطوبة ، البروتين والدهن في لحم صدر الدجاج من صنف Ross 308 بـــ (73.97، 23.28 و 1.07)% على التوالي، وذكروا يتأثر التحليل الكيميائي للحوم الدواجن بعدة عوامل من أهمها العمر ، الجنس، الوزن، السلالة ومستوى التغذية كما أنها تختلف تبعًا لنوع القطعة المأخوذة منها العينة.

استخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز

تحديد الطريقة المثلى لأستخلاص الأنزيم

أستخلص أنزيم الليبوكسيجينيز باستخدام محاليل مختلفة تم اختيارها اعتماداً على المراجع العلمية في مجال استخلاص الأنزيمات (Whitaker, 2004 ؛ الجميلي وفيحاء، 2013 ؛ Bai وآخرون،2013 ؛ Jebor وآخرون،2014).

درست كفاءة ثمانية طرائق لاستخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز من لحم الدجاج المحلي ، إذ أظهرت النتائج المبينة في الجدول (2) اختلاف الفعالية النوعية للأنزيم باختلاف المحاليل الدارئة والأس الهيدروجيني المستخدم. وقد عد الاستخلاص بمحلول كلوريد الصوديوم (10)% أفضـــل المحاليل، من حيث يساعد على استخلاص الأنزيم بكفاءة عالية مقارنةً مع محاليل الاستخلاص الأخرى، بسبب زيادة السعة الأيونية والتي تساعد على تحطيم جدار الخلية (لحم الدجاج) وتحرير أنزيم الليبوكسيجينيز.

جدول (2) طرائق استخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز من لحم الدجاج المحلي

ت	المعاملة	الحجم مل	الفعالية وحدة/مل	تركيز البروتين ملغم/مل	الفعالية النوعية وحدة/ملغم	الفعالية الكلية وحدة
1	ماء مقطر	40	5610	9.4	596.8	224400
2	كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$	34	6210	8.96	693.1	211140
3	دارئ الفوسفات 0.2 مول/لتر pH 7	41	1560	9.98	156.3	63960
4	كلوريد البوتاسيوم KCl	41	7710	7.55	1021.2	316110
5	محلول الكليسرول 20%	37	12090	10.59	1141.6	447330
6	كلوريد الصوديوم NaCl 10%	41	22410	9.84	2277.4	918810
7	دارئ الخلات 0.2 مول/لتر pH 5	40	8520	10.45	815.3	340800
8	كربونات الصوديوم 0.5%	40	16350	9.55	1712.1	654000

وبلغت الفعالية النوعية للأنزيم (2277.4) وحدة/ ملغم بروتين والفعالية الكلية (918810) وحدة عند الاستخلاص بمحلول كلوريد الصوديوم (10)%، وتلاه محلول الاستخلاص كربونات الصوديوم (0.5)% إذ بلغت الفعالية النوعية (1712.1) وحدة/ ملغم بروتين، والفعالية الكلية (654000) وحدة. وتراوحت قيم الفعالية النوعية والفعاليـــة الكليـــة لمحاليل الاستخلاص الثمانية بين (156.3 – 2277.4) وحدة/ ملغم بروتين و (63960 - 918810) وحدة على التوالي، حيث كانت ادنى قيمة للاستخلاص بمحلول دارئ الفوسفات (0.2) مول / لتر وبدالة حموضة (7).

تعزى قابلية محلول كلوريد الصوديوم 10 % العالية في استخلاص أنزيم الليبوكسيجينيز إلى أن زيادة القوة الأيونية التي تؤدي إلى فك الترابطات بين الأنزيم والمواد الخلوية الأخرى وزيادة ذائبيته في محلول الأستخلاص مما أدى بدوره إلى زيادة الفعالية النوعية للأنزيم. وان الأنزيم يحتاج إلى محاليل أستخلاص ذات قوة أيونية عالية لتحريره (مسعود، 2009 ; Abed ، 2010 ; يحيى وآخرون، 2011). ومن الجدير بالذكر ان عملية الاستخلاص وارتفاع أو انخفاض الفعالية النوعية في المستخلصات الخام المتحصل عليها يعتمد على نوع الأنزيم ومصدر الأنزيم نباتي أو حيواني أو من الأحياء المجهرية، كذلك يعتمد 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 دالة حموضة منخفض وذات قوة أيونية عالية لتسهيل عملية الاستخلاص لأنزيم الليبوكسيجينيز (Whitaker ،2004 ؛ محيسن وآخرون، 2008 ؛ Abdulla،2013 ؛ الفكيكي ،2013). ترتبط بعض الإنزيمات ارتباطا وثيقا بأغشية بعض عضيات الخلية مثل الغشاء البلازمي و المايتوكوندريا البلاستيدات الخضراء والشبكة الأندوبلازمية، وعليه، فانه كثيرا ما يكون من الصعب فصلها. بيد أن معظم الإنزيمات تُكون محاليل غروية في الماء يمكن إلى حد ما فصلها بسهولة، وبنفس الطرق المستخدمة للبروتينات الأخرى (Nicholas ، 2012) .

وفي البداية، كثيراً ما كانت عملية فصل البروتينات عملية طويلة وشاقة تعتمد على تمايز (اختلاف) الذوبان في محاليل مختلفة للإنزيم موضوع الدراسة وللبروتينات الأخرى الخاملة والموجودة كملوثات. وان الاستخلاص بمحلول كلوريد الصوديوم ينتج عنه

الترسيب لان أيونات الألكتروليت (electrolyte) تتحد مع الماء مما يقلل من كمية المحلول المتوافرة لذوبان الغرويات الموجودة. إن تغيير الدالة الحامضية لخليط من البروتينات يؤدي إلى ترسيب تمايزي (differential precipitation) أيضا ذلك لان ذائبية كل بروتين يتكون فيه الخليط تكون اقل ما يمكن عند نقطة التعادل الكهربائي(Donald, 2014).

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 دالة الحموضة الأمثل للفعالية و نقطة التعادل الكهربائي والثبات وكذلك درجة الحرارة المثلى للفعالية والثبات في المستخلص الأنزيمي الخام ولكون النتائج التي تم الحصول عليها كانت متطابقة مع نتائج صفات الأنزيم المنقى نفسها لذلك تم ذكرها في فقرات توصيف الأنزيم بغية الاختصار.

التنقية الجزئية للأنزيم

أستخدمت طرائق مختلفة لتنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من مصادر مختلفة كان الهدف منها إزالة أحتمال تداخل المواد الأخرى الموجودة في المستخلص الخام في أثناء دراسة صفات الأنزيم. (محيسن وآخرون،2008).

يقصد بتنقية الأنزيم القيام بمجموعة من الخطوات الكيميائية والفيزيائية المتعاقبة بهدف الحصول على مستخلص أنزيمي نقي أو شبه نقي والتخلص من أكبر قدر ممكن من الماء، البروتينات، والمواد الأخرى كالشوائب والصبغات (الراوي،2007 ؛ Al-Shammary، 2011) . 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 Whitaker ، 2004 ؛ Burgess و Deutscher، 2013 ؛ Abdulla، 2013).

الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم Concentration by ammonium sulfate

تعد عملية الترسيب بالأملاح المتعادلة من العمليات الضرورية في تنقية الأنزيمات للتخلص 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 تأثيـــــرها في البروتين (الراوي،2007 ؛ Zhang وآخرون ، 2009 ؛ الطائي،2011 ؛ Aziz و Hala, 2013; Nooralabettu ، 2014) فيحدث الترسيب بالأملاح بفعل معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والأخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما يؤدي ذلك إلى انخفاض ذائبيتها وترسبها وتسمى هذه العملية (Salting out) (التمليح الخارجي)، (Abdulla، 2013).

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.

ويلاحظ من الجدول (3) ان الفعالية النوعية للأنزيم كانت بين (0.280 – 5.700) وحدة /ملغم بروتين ما بين نسبتي الإشباع (40)% إلى (60)% وهذا يعني أن نسبة الإشباع 40% لم ترسب أنزيم الليبوكسيجينيز وإنما رسبت بروتينات أخرى بدليل أن فعالية الأنزيم كانت منخفضة جداً وهي (4.12) مل مقارنةً بالفعالية عند نسبة إشباع (60)% والتي بلغت (43.78) مل و أن الفعالية النوعية بنسبة إشباع (60)% كانت (5.7) وحدة/ملغم بروتين مقارنةً بـــ (0.280) وحدة/ ملغم بروتين بنسبة إشباع (40) % وأن عدد مرات تنقية الأنزيم المركز بكبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع (60)% كانت (2.5) وبحصيلة أنزيمية مقدارها (62.0)%، أن هذه النسبة من الحصيلة الأنزيمية وعدد مرات التنقية هي اعلى من النسب الأخرى في طرائق التركيز المستخدمة لذلك اعتمدت هذه الطريقة .

وقد أستخدم Al-Shammary، (2011) هذه الطريقة في تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من الفطر *Fusarium proliferatum* وبنسب إشباع (70)% وأيضاً أستخدمها Mahmod وRawya،(2013) في تنقيه أنزيم الليبوكسيجينيز من خلايا دم الذكور المصابين بأمراض الأوعية الدموية وبنسب إشباع تتراوح بين (0–55)%، وكذلك أستخدمها Abremond، (2013) في تنقية الأنزيم من المشيمة البشرية بنسبة إشباع من (30)% إلى (80)%، واستخدم كبريتات الأمونيوم العديد من الباحثين في تركيز الأنزيمات من مصادرها المختلفة منهم Aslam وآخرون،(2013) في تنقية أنزيم الأنفرتيز invertase من الخميرة *Saccharomyces cerevisia* وبنسبة (85)%.

وكذلك استخدمها Nadeemullatt و Hamid، (2013) في تركيز أنزيم الكالين بروتيز من بكتريا *Bacillus subtilis* وكذلك استخدمها Fadel وآخرون ،(2014) في تركيز أنزيم الزايلينيز xylanase من دقيق الذرة البيضاء، وأستخدمها أيضا Shinde و Rashmi، (2014) في تركيز أنزيم ألفا أميليز α-Amylase من سلالات بكتيرية مختلفة وبنسب إشباع (85)%.

جدول (3) 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	41	22.40	9.84	2.277	918.40	1	100
1	كبريتات الأمونيوم %40 %60	 13 13	 4.12 43.78	 14.7 7.67	 0.280 5.700	 53.560 569.140	 0.123 2.500	 5.83 62.00
	المستخلص الخام	42	22.10	9.62	2.300	928.200	1	100
2	الترشيح الفائق	7	40.50	6.90	5.870	283.500	2.600	31.00
	المستخلص الخام	42	22.40	9.40	2.380	940.800	1	100
3	الأسيتون المبرد	12	30.50	6.50	4.790	366.000	2.010	38.90
	المستخلص الخام	43	22.20	9.70	2.240	955.000	1	100
4	الكحول الأثيلي %30 %50	 13 13	 3.90 29.10	 13.60 7.10	 0.280 4.100	 50.700 378.300	 0.122 1.800	 5.30 40.00
	المستخلص الخام	43	22.40	9.80	2.285	963.000	1	100
5	السيفادكس G-25	12	29.80	7.30	4.100	358.000	1.800	37.20

التركيز بالترشيح الفائق Concentration by Ultra – Filtration

تعد من الطرائق المستخدمة على نطاق واسع على المستويات المختبرية 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 (3) النتائج المتحصل عليها من هذه الطريقة عند تركيز الأنزيم إذ كانت الفعالية النوعية (5.87) وحدة/ملغم بروتين وبعدد مرات تنقية (2.6) مرة وبحصيلة أنزيمية (31.0)%.

استخدمها السلطان وآخرون (2004) في تركيز الليبوكسيجينيز من فستق الحقل إذ حصل على عدد مرات تنقية (2.28) مرة وبحصيلة أنزيمية (41.95)%، وأيضاً أستخدمها محيسن ، (2007) في تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور فستق الحقل إذ حصل على عدد مرات تنقية (2.95) مرة وبحصيلة أنزيمية (27)% . كذلك استخدمها Abed ،(2010) في تنقية أنزيم اللاكتيز من دماغ الأغنام حديثة الولادة. وقد وجد السعدي وآخرون، (2014) إنها طريقة مجدية في تركيز البروتين المرتبط بالفيبرونكتين Fibronectin من المكورات العنقودية الذهبية .

الترسيب بالأسيتون البارد Precipitation by Cold Acetone

يمكن توضيح فائدة الأسيتون البارد في الترسيب بأنه يحدث تكتل لجزيئات البروتين مع بعضها بإرتباط المجاميع المشحونة ومن ثم زيادة قوة التجاذب Attraction Force، إذ يؤدي خفض قيمة ثابت الفصل الكهربائي إلى زيادة قوة التجاذب، وبما أن قيمة ثابت الفصل للمذيبات العضوية (الإيثانول، الميثانول، الأسيتون) هي (30) وهي أقل مما هي لقيمة ثابت الفصل للماء (80) فسوف يؤدي ذلك إلى مضاعفة قوة التجاذب ومن ثم إلى ترسيب البروتين. ولتفادي حدوث تمسخ للبروتينات (لأنزيمات) Denaturation عند أستخدام المذيبات العضوية نتيجة كسر الأواصر الكارهة للماء Hydrophobic bonds الموجودة في التركيب الجزيئي للبروتين يستخدم الأسيتون البارد. وقد استخدمت في هذا البحث خمس نسب خلط للأسيتون البارد مع مستخلص الأنزيم هي (1 : 0.5 ؛ 1 : 1؛ 1 : 2 ؛ 1 : 3 و 1 : 4) (حجم/حجم) لترسيب الأنزيم من مستخلصاته، أظهرت النتائج أفضلية نسبة الخلط (1 : 2) على بقية النسب من حيث الفعالية النوعية المتحصل عليها لذلك اعتمدت في ترسيب الأنزيم من مستخلصاته كمـــا موضح في الجدول (3). وقد ساهم في تحقيق تنقية جزئية للأنزيم بلغت (2.01) مرة وبحصيلة مقدارها (38.9)%.

وقد أستخدم هذه الطريقة كثير من الباحثين في تنقية الأنزيم إذ أستخدمها السلطان وجماعته (2004) في تنقية الأنزيم من فستق الحقل وحصلـــــوا على فعالية نوعية

(65.58) وحدة/ملغم وعدد مرات تنقية (2.35) مرة وحصيلة أنزيمية بلغت (45.64)% وأكد السلطان وآخرون، (2004) ان تركيز أنزيم الليبوكسيجينيز من فستق الحقل بأستخدام الأسيتون البارد والكحول هي أفضل الطرائق. وأستخدمها أيضاً محيسن (2007) في تركيز المستخلص الأنزيمي لليبوكسيجينيز من فستق الحقل. واستخدمها أيضا Abremond وآخرون (2013) في تركيز أنزيم الليبوكسيجينيز من المشيمة البشرية ، وكذلك استخدمها Nadeemullatt و Hamid، (2013) في تركيز أنزيم الكالين بروتيز alkaline protease من بكتريا*Bacillus Subtilis*، أما Adeleke وآخرون،(2013) فقد استخدم طريقة التركيز بالأسيتون عند تنقية أنزيم السلوليز Cellulase من الكاكاو.

التركيز بالكحول الأثيلي Precipitation by Ethanol

يوضح الجدول (3) نتائج ترسيب الأنزيم باستخدام كحول الأثيل البارد إذ تراوحت الفعالية النوعية بين (0.28–4.1) وحدة/ ملغم بروتين للأنزيم المركز كحول الأثيل عند رفع نسبته في المستخلص الخام من (30)% إلى (50)% مقابل (2.24) وحدة/ ملغم بروتين في المستخلص الخام، عليه فان عدد مرات التنقية الذي حصلنا عليه ما بين النسبتين المذكورتين من كحول الأثيل بلغ (2) مرة كخطوة أولى من خطوات التنقية وعلى مرحلتين في الأولى أضيف كحول الأثيل إلى المستخلص الخام بتركيز (30)% أهمل الراسب المتكون (قليل الفعالية النوعية) إذ بلغت الفعالية (3.9) وحدة ثم رفع تركيز الكحول في الراشح إلى (50)% إمعانا في ترسيب الأنزيم وجمع الراسب وأذابته في اقل كمية من المحلول الدارئ إذ بلغت الفعالية في هذه النسبة من الكحول (29.1) وحدة.

من الجدير بالذكر أن عملية الترسيب بفعل المذيبات العضوية (الميثانول، الإيثانول، الأسيتون.. الخ) القابلة للامتزاج بالماء (Water Miscible) تعتمد على ثابت الفصل الكهربائي Dielectric constant لهذه المذيبات العضوية الذي هو أوطأ 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 ان كثيراً من الباحثين ومنهم Abdulla ، (2013) ؛ Abremond ; Karamanos, (2014) (2013) أستخدموا كبريتات الأمونيوم في تركيز الأنزيمات ومنها الليبوكسيجينيز، إلا أن بعضهم أكد كفاءة التركيز بالمذيبات العضوية مثل كحول

الأثيل والأسيتون وفضل عدد كبير منهم ترسيب الأنزيمات من مستخلصاتها الخام بالمذيبات العضوية دون اللجوء إلى الترسيب بالأملاح. (Zhang وآخرون، 2009 ؛ Rifaat وآخرون، 2010 ؛ يحيى وآخرون،2011 ؛ Zhang وآخرون، 2013).

التركيز بحبيبات السفادكس الجافة G-25

Concentration by dry granules of sephadex G-25

تظهر النتائج الموضحة من الجدول (3) أن هذه الخطوة قد حققت تنقية جزئية للأنزيم مقدارها (1.8) مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها (37.2)% وهي نتيجة جيدة في تركيز الأنزيم، لكن ان عملية التركيز بحبيبات السفادكس الجافة G-25 أعطت تنقية جزئية أقل من الترسيب بالأسيتون البارد ومساوية لكحول الأثيل ولكنها كانت اقل من طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم والترشيح الفائق.

اتفقت النتائج المتحصل عليها مع ما توصل إليه محيسن وآخرون، (2008) إذ حصل على حصيلة أنزيمية (34)% وعدد مرات تنقية بلغت (2.74)مرة عند تنقية الأنزيم من فول الصويا.

أن معظم الدراسات المتوفرة في مجال تنقية الليبوكسيجينيز لم تشر إلى استخدام حبيبات السفادكس كطريقة لتركيز المستخلصات الأنزيمية، لقد تم أستخدامها حالياً بديلاً عن مادة متعدد الأثيلين كلايكول Poly ethylene Glycol غير المتوفرة حاليا والغالية الثمن.

تنقية الأنزيم (التنقية الكلية) Final purification of enzyme (Totally)

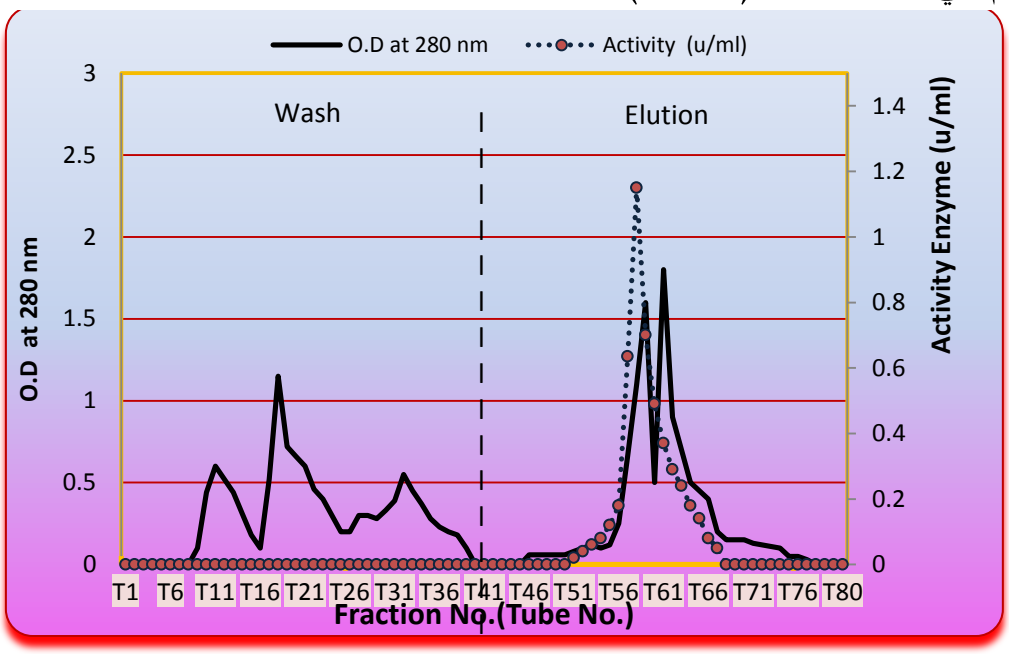
تضمنت التنقية الكلية لأنزيم الليبوكسيجينيز المستخلص من لحم الدجاج المحلي خطوتين هي :

التبادل الأيوني Ion exchange

تم أمرار الأنزيم المنقى جزئياً بكبريتات الأمونيوم على عمود المبادل الأيوني السالب DEAE Cellulose Sephadex-A50 (بأبعاد 1.6 x58 سم) الذي تمت موازنته بدارئ فوسفات الصوديوم بتركيز (0.01) مول / لتر ,وبدالة حموضة (7) ثم قيست الامتصاصية على طول موجي (280) نانومتر.

يوضح الجدول (4) ان الحصيلة الأنزيمية بلغت (62.2) % وبعدد مرات تنقية (2.5) مرة في خطوة التنقية الجزئية وهي خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم، وأزداد

عدد مرات التنقية إلى (5.57) مرة في خطوة التبادل الأيوني (Ion Exchange)، ظهرت ثلاث قمم (Peaks) ضمن مرحلة الغسل (Washing) وكانت خالية من الفعالية الأنزيمية تماماً مما يؤكد ارتباط الأنزيم بالمبادل الأيوني السالب، ان محصلة الشحنات المحمولة على الأنزيم في أحوال الاسترداد هي شحنات سالبة تتنافر مع شحنة الأنزيم لذلك تنزل بمرحلة الغسل. أما في مرحلة الاسترداد (Elution) نلاحظ ظهور قمة واحدة تحتوي على الفعالية التي تؤكد وجود الأنزيم في هذه المرحلة ، مما يؤكد ان شحنة الأنزيم هي شحنة سالبة (شكل 1).



شكل (1) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الهلامي للمستخلص الخام لأنزيم الليبوكسيجينيز من لحم الدجاج المحلي بعمود (DEAE - Sephadex A50) الذي تمت موازنته بدارئ فوسفات الصوديوم بتركيز (0.01) مول / لتر وبأس هيدروجيني (7) ثم قيست الامتصاصية على طول موجي (280) نانومتر، وبواقع 5 مل للجزء الواحد.

ازدادت الفعالية النوعية للأنزيم من (2.28) وحدة/ملغم بروتين في مرحلة الأنزيم الخام و(5.71) وحدة/ ملغم بروتين في مرحلة التنقية الجزئية بكبريتات الأمونيوم إلى (12.7) وحدة/ ملغم بروتين في خطوة التبادل الأيوني. جمعت الأجزاء الحاوية على فعالية عالية وتم قياس حجمها والفعالية وتركيز البروتين فيها. ان كروموتوغرافيا التبادل الأيوني تتميز بالعديد من المزايا منها الدقة والقدرة العالية وسهوله التعامل والقدرة على التنشيط للاستخدام لمرات عديدة إلى جانب البساطة في مبدأ الفصل الذي يعتمد على

اختلاف الشحنة (AL-kubaissy ، 2011 AL-Shammary, 2011 ; Abdulla، 2013) .

لقد كانت النتائج المستحصل عليها من هذه الخطوة مقاربة مع ما توصل اليها محيسن، (2007) إذ حصل على (57.5)% كحصيلة أنزيمية عند تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الفول السوداني، بينما حصل Mahmod و Rashed ، (2013)، على حصيلة أنزيمية (51.2)% عند تنقية الأنزيم من دم الذكور المصابين بأمراض الأوعية الدموية ، وحصل Abdulla ، (2013) ،على حصيلة أنزيمية (60)% عند تنقيه الأنزيم نفسة من الفطر *Pleurotus ostreatus*.

جدول (4) خطوات تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من لحم الدجاج المحلي

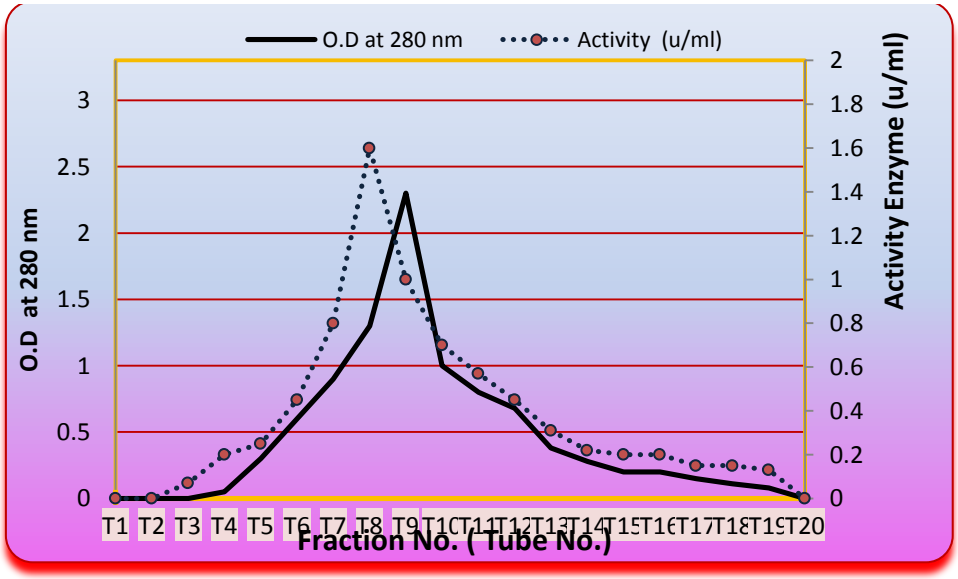
ت	الطريقة	الحجم مل	الفعالية وحدة/مل	تركيز البروتين ملغم/مل	الفعالية النوعية وحدة/مل	الفعالية الكلية وحدة	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
1	المستخلص الخام	41	22.30	9.77	2.28	914.3	1.00	100
2	كبريتات الأمونيوم %60	13	43.78	7.67	2.71	569.1	2.50	62.2
3	التبادل الأيوني DEAE-Cellulose Sephadex – A50	30	15.40	1.20	12.70	462.0	5.57	50.5
4	الترشيح الهلامي Sephacryl S-300	30	13.10	0.77	17.10	393.0	7.50	42.9

الترشيح الهلامي Gel Filtration

تلت خطوة التبادل الأيوني إمرار المحلول الأنزيم الناتج عن الخطوة السابقة على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-300 الذي تمت موازنته باستعمال دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز (0.01) مول وبدالة حموضة (7) ثم جمعت الأجزاء المستردة من العمود وقيست الامتصاصية الضوئية على طول موجي (280) نانومتر. في هذه الخطوة أمكن الحصول على قمة بروتينية ذات فعالية عالية، و الشكل (2) يوضح أن قمة الفعالية تكاد تكون متطابقة تقريباً مع قمة البروتين، أن هذه الخطوة تعد دليلاً على نقاوة الأنزيم، إذ أرتفع عدد مرات التنقية في هذه الخطوة إلى (7.5) مرة و بحصيلة أنزيمية مقدارها (42.2) % كما في الجدول (4) وهذه النسبة المئوية تعبر عن كفاءة الفصل الجيد.

ان خطوة الترشيح الهلامي يكون مبدأ الفصل فيها معتمدا على الوزن الجزيئي، حيث ان الجزئيات صغيرة الوزن الجزيئي تدخل في داخل دقائق الهلام وتتحرك فيه بينما الجزيئات كبيرة الوزن الجزيئي تعبر من بين دقائق الهلام وبسرعة اكبر من الأولى، ان مادة (Sephacryl S-300)المستخدمة له خاصيه مقاومه الانضغاط وسرعه الجريان التي تساعد على الفصل الجيد والسريع فضلا عن سهوله استخدامه لكونه يكون معلق وليس باودر مثل مادة الـــ Sephadex ويحتاج إلى تحضير وموازنة، والثبات لمدة طويلة (Pratl و Cornely ، 2013 ؛ السعدي وآخرون،2014).

اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (محيسن،2007) إذ نقى أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الفول السوداني، كما أن نتائج تنقية الأنزيم قيـــد الدراســـة جـــاءت بمستـــوى اعلـــى قليلاً من النتائج التي حصل عليها Abdulla، (2013) إذ حصل على حصيلة أنزيمية مقدارها (36) % عند تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من Pleurotus ostreatus وبخطوات التنقية نفسها أي ان هذه الدراسة حققت تقدماً بمقدار(6) % من ناحية الحصيلة الأنزيمية، أما Al- Shammary ، (2011) فحصل على(57.03) كحصيلة أنزيمية عند تنقية أنزيم الليبوكسيجينيز من الفطر Fusarium proliferatum وبالخطوات نفسها، ثم قام بجمع أجزاء الاسترداد الحاوية على الفعالية وحفظها بالمجمدة لحين الاستعمال ، وبنفس الطريقة جمعنا أجزاء الاسترداد وحفظت بالتجميد لحين الاستعمال لغرض التوصيف.

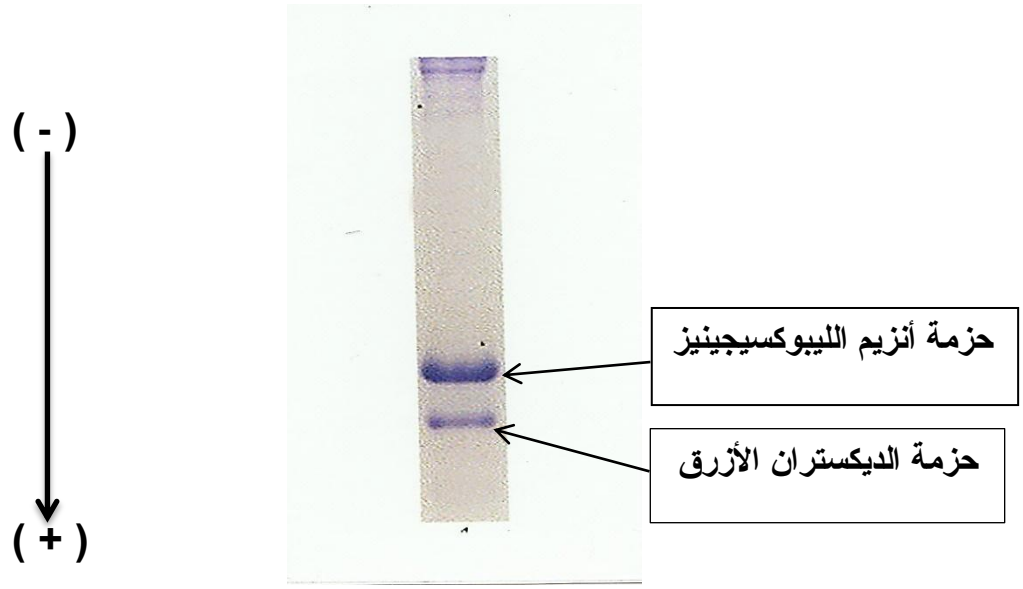


شكل (2) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل (S-300) بأبعاد (58 x 1.6) سم، تمت الموازنة بأستخدام محلول فوسفات الصوديوم الدارئ وبواقع 3 مل للجزء الواحد.

تعين نقاوة الأنزيم

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 بكبريتات الأمونيوم مما يشير إلى نقاوة الأنزيم حد التجانس (Sawheney و Singh، 2005 ؛ Abdulla ، 2013).

ومن الأدلة الأخرى على نقاوة الأنزيم ظهور حزمة واحدة أيضاً عند تعيين نقطة التعادل الكهربائي بطريقة تبئير تعادل الشحنة كما في الشكل (3). فضلاً عن السلوك الكروماتوغرافي للأنزيم المنقى خلال الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل S-300 كما في الشكل (2) إذ كانت قمة الفعالية متطابقة تطابقاً شبه تام مع قمة الامتصاص على طول موجي (280) نانومتر.



شكل (3)الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) بهلام الأكريل أمايد بغياب العوامل الماسخة لأنزيم الليبوكسيجينيز المنقى من لحم الدجاج المحلي

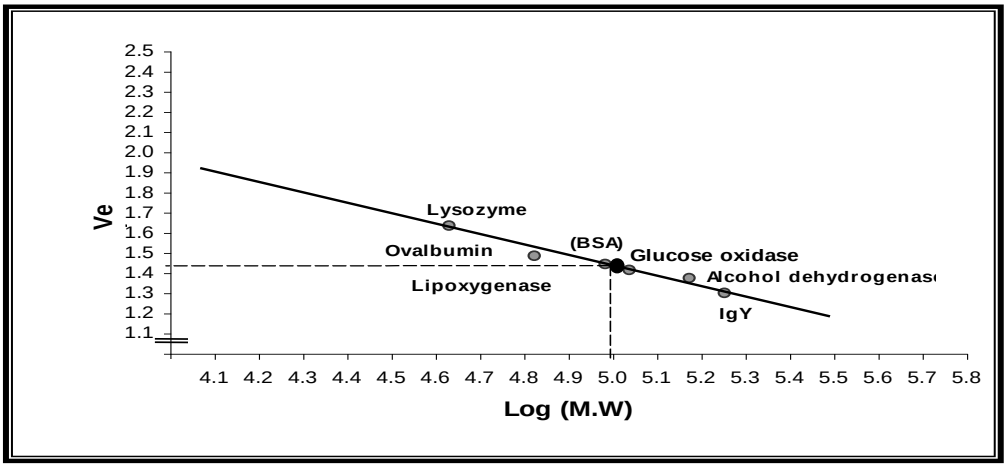
الوزن الجزيئي Molecular Weight

يمكن استخدام الترشيح الهلامي ليس لفصل البروتينات المختلفة في أوزانها الجزيئية فحسب، بل وبعد معايرة العمود (باستخدام مواد ذات أوزان جزيئية معروفة) يمكن أن تزودنا بقيمة تقديرية للوزن الجزيئي الظاهري لإنزيم لا يعرف وزنه الجزيئي. أتبعت طريقة الترشيح الهلامي Gel Filtration على عمود السيفاكريل (-300S) بأبعاد (1.6 x 58) سم في تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز وتم تعيين حجم الفراغ Void Volume (Vo) للعمود بأستخدام الدكستران الأزرق (2000)، كما تم تعيين حجوم الأسترداد للبروتينات القياسية (Ve) التي شملت اللايسوزايم Lysozyme، الأوفاالبومين Ovalbumin، البومين المصل البقري Bovine Serum (B.S.A Albumin)، الكلوكوز أوكسيديز Glucose Oxidase، أنزيم الكحول منزوع الهيدروجين AL-Cohol dehydrogenase والكلوبيولين المناعي IGY، استخرجت منها قيم Ve / Vo فكانت مساوية إلى 2.05 ؛ 1.66 ؛ 1.51 ؛ 1.44 ؛ 1.32 ؛ 1.33 على التوالي. وعند أمرار أنزيم الليبوكسيجينيز وتحت نفس الظروف التي أمررت بها البروتينات القياسية كانت نسبة حجم استرداد الأنزيم إلى حجم الفراغ Ve/ Vo مساوية إلى 1.46 كما في جدول (5). وعند إسقاط هذه القيمة على منحنى العلاقة الخطية بين نسبة حجم الاسترداد إلى حجم الفراغ Ve/Vo للبروتينات القياسية المعلومة الوزن الجزيئي ظهر أن الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز المستخلص من لحم الدجاج المحلي (85) كيلو دالتن كما في الشكل (4).

يختلف الوزن الجزيئي للأنزيم حسب مصادره ففي المصادر النباتية ، فقد قدر Somnath وأخرون (2013) الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز المستخلص من فول الصويا بـــ (97) كيلو دالتون. وقدر Lu وآخرون، (2013) الوزن الجزيئي للأنزيم بـــــ (70) كيلودالتون عندما استخلصوا الأنزيم من بكتريا E. coli . وقدر Meng وآخرون (2014) الوزن الجزيئي للأنزيم بـــــ (73) كيلودالتون عندما استخلصوا أنزيم الليبوكسيجينيز من الكمثري الأبيض الصيني.

جدول (5) يوضح العلاقة بين حجم الاسترداد وحجم الفراغ (Ve / Vo) وبين الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية لاستخراج الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز

البروتين القياسي	حجم الاسترداد Ve مل	حجم الاسترداد/ حجم الفراغ Ve / Vo	الوزن الجزيئي كيلودالتون	لوغاريتم الوزن الجزيئي
Lysozyme	112	2.05	14	4.14
Ovalbumin	90	1.66	22	4.36
Bovine Serum Albumin (B.S.A)	82	1.51	67	4.36
Glucose oxidase	78	1.44	232	5.36
Alcohol dehydrogenase	76	1.32	400	5.60
IGY	72	1.33	180	5.20
Lipoxygenase	79	1.46	85	4.97



شكل (4) تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز من لحم الدجاج المحلي بتقنية الترشيح الهلامي بعمود الـــسيفاكريل (S - 300).

وفي المصادر الحيوانية ، قدر Sailesh وآخرون، (1994) الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز المستخلص من رحم إناث الأغنام بـــــ (66) كيلودالتون. وقدر Samuel وأخرون (2008) الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز المستخلص من خلايا دم الأرانب بـــــ (78) كيلودالتون، و قدر Min و Ahn (2009) الوزن الجزيئي لخليط من لحوم الأبقار والدواجن بـــــ (97) كيلودالتون. وأشار Bo وآخرون، (2010) ان الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز من المصادر الحيوانية المختلفة يتراوح بين (75 – 90) كيلودالتون ، كما أكد Bo وآخرون (2012) ذلك حيث ذكروا ان الوزن الجزيئي لأنزيم الليبوكسيجينيز من المصادر الحيوانية يتراوح بين (75 – 90) كيلودالتون وذكر أيضا ان الوزن الجزيئي للأنزيم من المصادر النباتية يتراوح بين (94 – 105) كيلودالتون.

المصادر

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

الجميلي، عصام فاضل و خليل ،فيحاء مقداد (2013). تنقيه وتوصيف أنزيم Endoglucanase من العزلة المحلية *Aspergillus* spp مجلة بغداد للعلوم . 3 (10) : 32 – 41.

الراوي ،ظافر فخري عبد القادر (2007) إنتاج وتوصيف أنزيم السيليليز المعزولة من عزله من البكتريا محليه cytophaga مجله جامعه الأنبار للعلوم الصرفة ، 1 (1) : 44 – 56 .

السعدي ،عادل عبيد حسوني ؛ فاضل، عباس كزاز؛ رياض ،سعدي (2014) .استخلاص وتنقيه البروتين المرتبط بالفيبرونكتين من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية. مجله جامعه بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية. 22 (3) : 70 – 81 .

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

الطائي ،عبد الرحمن رشيد ،(2011).استخلاص وتنقيه اليوريز من البكتريا proteus vulgaris المعزولة من الأطفال المصابين بالتهابات المجاري البولية في العراق ،مجله ديالى للعلوم الزراعية ، 2 : 30–37.

الفكيكي، ضياء فالح (2013).استخلاص وتنقيه وتوصيف الفا أميليز المستخلص من حبوب الذرة البيضاء ،مجله أبحاث البصرة ،العدد الأول ،المجلد الأول.

القيسي، غالب علون ؛ العبيدي، ابتسام جواد وجعفر، ميسون روضان. (2007). مقارنة تأثير إضافة نوعين من المعززات الحيوية وتأثيرها في التحليل الكيميائي لكل من عضلة لحم الصدر ولحم الفخذ. مجلة علوم الدواجن العراقية، 2 (2) : 66–76.

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

مسعود، أسماء محمود. (2009). استخلاص أنزيم البيروكسيديز الذائب من ثمرة الطماطة المحلية *Lycopersicon esculentum* L. وتنقيته جزئيا. المجلة العراقية للعلوم، 50 (2) : 175 – 181.

محسين ، ابتسام كريم ، (2007). استخلاص وتنقية وتوصيف أنزيم الليبوكسيجينيز Lipoxygenase من بذور فستق الحقل *Arachis hypogea* L. رسالة ماجستير، كلية التربية الأساسية – الجامعة المستنصرية .

محيسن، ابتسام كريم ؛ يحيى، أياد نافع ؛ الأعرجي، سند باقر(2008) ،استخلاص وتنقيه أنزيم الليبوكسيجينيز من بذور الفول السوداني .

يحيى، أياد نافع ؛ الحصناوي ،علي نوري ؛ ابتسام كريم، حسين عبد الأمير (2011) .استخلاص وتنقيه أنزيم البيتاكالاكتوسايديز من دماغ الماعز حديثه الولادة ،مجله جامعه دمشق للعلوم الأساسية المجلد(27) العدد الأول: 34 – 53.

Abdulla, Qabass Liwaa. (2013). Extraction, Purification and Characterization of Lipoxygenase From *Pleurotus ostreatus* . A Thesis to the college of Science - University of Baghdad. The Degree of Master.

Abdullah, Q. ; AL-Jibori1, M. and AL-Arrji, S. (2014). Extraction, purification and characterization of lipoxygenase from Pleurotus ostreatus. Iraqi Journal of Science, 55(1): 61-69.

Abed, A. N. , 2010 .Isolation and Purification of β-galactosidase From New Born Sheep Brain. Iraqi Journal of Science,.50(3): 437-443.

Aberomand, M . ; Kheirollah, A. ; Malekasgar , A. ; limohamad, M. (2013). The Inhibitory Effect of KCN, NaN3 and some Bivalent Ion of lipoxygenase activity of the purified Human. placental science (9):39-45.

AL-Kubaissy , Khalid (2011) Biochemistery , third edition , University Dar Waeel publisher, Jordon. 748 pages.

AL-Shammary, M.H.M.(2011). Production, Purification and characterization ofLipoxygenase from Fusarium Proliferatm .Athesis to the college of science Universty of Baghdad .Ph.D. in Biology.

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.

Aslam, A. and Ali, I. (2013). Purification and characterization of tow invertase from mutant strain of Saccharomyces cerevisia. Pak. J. Bot. 45(1):285-291.

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

Aziz ,G. M.; Hala ,M.A. (2013). Purification and characterization of Agarase from Bacillus .sp. current research Journal of Biological science 5(1): 13-1.

Bai, H.; Wang, H; Sun, J. ; Irafan, M. (2013). Production, purification and characterization of Novel Betaglucosidase from newly Isolated Penicillium simplicissimuch. Excli. Jornal, 12:528-540.

Bo, F. ; Zhenying, D. ; Zhibin, X. and Ning, W. (2010). Molecular analysis of lipoxygenase (LOX) genes in common wheat and phylogenetic investigation of LOX proteins from model and crop plants. Journal of Cereal Science 52: 387-394.

Bo, F. ; Zhenying, D. ; Zhibin, X. ; Daowen W. and Tao W. (2012). Molecular characterization of a novel type of lipoxygenase (LOX) gene from common wheat (Triticum aestivum L.). Mol Breeding, 30:113–124.

Burgess, R. and Deutscher, MP. (2013). Method in enzymology Vol.463,guide to protein purification ,3 rd ed Elserier AP., sabre foundation U.S.A.

Donald H. (2014). Methods in Enzymology, Structure and Function Volume 549: P.546 . Elsevier Health book, UK.

Everette, D.; Bryant, M.; Green, M.; Abbey, A.; Wangila, W. and Walker, B. (2010).Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin−Ciocalteu Reagent. J. Agric. Food Chem. 58 (14): 8139-8150.

Fadel, M. ; Keera, A. ; Abdel-Aziz, S. and Khalil, T., (2014). Clean production of xylanase from white corn flour by Aspergillus fumigates under solid state fermentation. World Applied science J. 29(3): 326-336.

Garfine, D. E. (1990) Purification procedure : electrophortic methods in : methods in Enzymology (ed. Deutscher M. P.) Vol. 182.pp: 425−441. Academic press, New York.

Jebor, M. ; Ali, Z. ; Hassan, B. (2014). Purification and characterization of glucomylase from Aspergillus niger Int. J. curr. Microbiol . 1: 63-75 .

Karamonas, Y. (2014). Purification and characterization of lactase dehydrogenase:an undergraduate Biochemistry laboratory experiment .Advance in Biochemistry., 2(1) : 14-23.

Liavonchanka, A. and Feussner, I., (2006). Lipoxygenase: occurrence, functions and catalysis. Journal of Plant Physiology 163: 348-357.

Liu, K. (1998) Soybean chemistry Technology and Utilization , ITP International Thomson publishing, chapman & Hall book , Tokyo. Medicine, 12: 415-420.

Lowry, OH.; Rosebrough NJ.; Farr AL. and Randall, RJ.(1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov,193(1):265-75.

Lu, X. ; Zhang, J. ; Liu, S. ; Zhang, D. and Xu, Z., (2013). Overproduction, purification, and characterization of extracellular lipoxygenase of Pseudomonas aeruginosa in Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol. 97(13):5793-5800.

Mahmood ,A.A. and Rashed,R.N.(2013)Separation of Lipoxygenase andEstimation of its Level in Blood of Malse with cardiovascular Disease. J.of sci., 24(2) :65-81 .

Marija, R. ; Michiharu, T. and Patrick, P. (2014). A mutation interfering with 5-lipoxygenase domain interaction leads to increased enzyme activity. J. Biol. Chem. Volume 545, 1 March 2014, P. 179–185.

McNichol J. A. (2012). Critical evaluation of various solvents systems used for the quantification of micro algal fatty acids with lyophilized samples has been reported.Lipids J. 47:195-210.

Meng, L. ; Leiting, L. ; Jim, M. and Xin, Q. (2014). Characterization of the lipoxygenase (LOX) gene family in the Chinese white pear (Pyrus bretschneideri) and comparison with other members of the Rosaceae. BMC Genomics, 15:444- 453.

Min, B. and Ahn, D. (2009).. Factors in various fractions of meat homogenates that affect the oxidative stability of raw chicken breast and beef loin. J Food Sci.,74(1): 41-48.

Moraes, P. and Eliana, G. (2014). A Comprehensive Bioinformatics Analysis of the Lipoxygenases Superfamily in Shewanella Woodyi Strain (Strain ATCC 51908/MS32) . Journal of Materials Science and Engineering B 4 (2): 34-41.

Myers, Rollie J. (2010). "One-Hundred Years of pH". Journal of Chemical Education 87: 30-35.

Nadeemulla, A. and Mukhtar, M., (2013). Partial purification of alkaline protease by mutant strain of Bacillus subtilus .Biological (Pakistan), 59(1): 165-171.

Nicholas, C. (2012). Fundamentals of Enzymology: Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins. Oxford University Press Third ed. P .496.

Nooralabettu, K.P. (2014) optimization of ammonium sulfate precipitation method to achieve high through put concentration of crude alkaline phosphate from Brown Shrimp Int. Anal Bio-sci., 2 (1): 324 – 335.

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

Pratl ,C. W. and cornely ,K. L. (2013) essential bio chemistry, Jon Wiley and son ,INC ,4th ed.

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

Riffat, M. ; Mahalawy, A. and Menofy, H., (2010). production ,optimization and partial purification of lipase. J. Applied. 5(1) : 34-53.

Sailesh, S. ; Kumar, Y. ; Prasad, M. and Reddanna, P. (1994). Sheep uterus dual lipoxygenase in the synthesis of 14,15-leukotrienes. Arch Biochem Biophys. 315(2):362-368.

Samuel, M. ; Rainer, W. ; Marina, J. and Christa, H. (2008). Purification, Characterization and Biological Dynamics of the Lipoxygenase; Its Identity with the Respiratory Inhibitors of the Reticulocyte. European Journal of Biochemistry, 96(3): 545–561.

Sawheney, S. K. and Singh Randhir. (2005) Introductory practical Biochemistry. Narosa publishing House. London.

Shinde, S. and Rashmi S. (2014). production and partial purification of Amylase from Bacterial strain International of genetic engineering and biotechnology..5(1): 57 – 62.

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., 13 (3) : 316 – 329.

Souza, X. ; Faria, P. and Bressan, M. (2011). Proximate composition and meat quality of broilers reared under different production systems. Rev. Bras. Cienc. Avic., 13(1):1516-1529

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

Whitaker,J.R(2004)"Principles ofEnzymology for Food Science" ,Marcel Dekker, Inc, New York.

Zhang ,B. ; sun ,Z. and Jian, D., (2009). Isolation and purification of alkaline Keratinase from Bacillus sp. African J. of biotechnology, 8(11) :2598-2603.

Zhang, B. ; Paynter, D. ; Wu, M. ; Jones, X. and Chengdao, L. (2013). Sequence variation and haplotypes of lipoxygenase gene LOX-1 in the Australian barley varieties. BMC Genetics 2013(15) :36 – 45.

Extraction, Purification, of Lipoxygenase From Local Chickens Meat

Muna, M. Z, Prof. Dr. Ayad, N. Y, Prof. Dr. Sand, B. M

Summary

The study included the selection of the best methods to extract the enzyme among eight methods. It appeared that have given the highest activity of the crude enzyme (total activity = 918810 unit).

The protein content was concentrated and precipitated by ammonium sulfate (60) %, 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. This method extract pure enzyme at a yield of (42.9) %, (7.50) times of purification and specific activity of (17.1) unit / ml .

The purity of enzyme was certified by poly acryl amide gel electrophoresis under non denaturing condition. And Its molecular weight was (85) KD as estimated by gel filtration

Key words: Lipoxygenase, Extraction enzymes, Purification enzymes, Chicken meat