دراسة بعض صفات انزيم لايبيز البنكرياس الكبدي لسرطان البحر *Portunus pelagicus* (L. 1758)

روضة محمود العلي   صباح مالك حبيب الشطي   عمار ياسر جاسم السراجي

قسم علوم الأغذية- كلية الزراعة -جامعة البصرة   قسم الفقريات- مركز علوم البحار-جامعة البصرة

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة إلى تقدير بعض الصفات لإنزيم اللايبيز المنقى من سرطان البحر *Portunus pelagicus* , إذ بلغ الوزن الجزيئي للإنزيم 30100 دالتون مقدره بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود العوامل الماسخة (SDS-PAGE). وكان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم 8 واظهر الإنزيم ثباتاً بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين 7- 9 في درجة حرارة 37 م لمدة 30 دقيقة. بلغت درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم 40 م أما الثبات الحراري للإنزيم فقد احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة 25 – 35 م لمدة 30 دقيقة عند الرقم الهيدروجيني الأمثل للثبات. أظهرت نتائج دراسة الثوابت الحركية للإنزيم, إن معدل قيم ثابت ميكالس (Km) لتفاعل إنزيم اللايبيز تجاه زيت الزيتون بلغ 0.57 ملي مولاري وان معدل قيم السرعة القصوى (Vmax) بلغ 188.4 مايكرومول/دقيقة.

المقدمة

إن اللايبيزات Carboxylic ester hydrolases (3.1.1.3) هي إنزيمات تعمل على تحلل الاواصر الاسترية في الأسيل كليسرول acylglycerol محررة أحماض دهنية وكلسيرول (Gupta *et al*., 2004). تضم إنزيمات التحلل الدهني نخبة من الإنزيمات المهمة التي تتميز بتعدد استعمالاتهاومن أهمها Phospholipases A1 (EC 3.1.1.32) و Phospholipases A2 (EC 3.1.1.4) و Phospholipases C (EC 3.1.4.3) و Phospholipases D (EC 3.1.4.4) (Voet and Voet, 1995). تضم عائلة اللايبيزات وخصوصاً في الفقريات لايبيز اللايبوبروتين Lipoprotein lipase (LPL) و اللايبيز الكبدي Hepatic lipase (HL) ولايبيز البنكرياس Pancreatic lipase (PL) (Hide *et al*., 1992). نالت إنزيمات التحلل الدهني اهتماماً منقطع النظير بسبب إمكانياتها العالية لاستعمالها في التقانات الحياتية , وتعد اللايبيزات واحدة من أهم المحفزات الحيوية في مجالات تطبيق التقانات الحياتية والتي لاقت نجاحاً كبيراً باستعمال اللايبيز في تخليق البوليمرات الحيوية والوقود الحيوي وإنتاج المستحضرات الصيدلانية والمواد الكيميائية الزراعية ومركبات النكهة (Joseph *et al*., 2007).بينت اغلب الدراسات إن اللايبيز يتمتع بمواصفات خاصة تختلف عن باقي الإنزيمات ومنها درجة حرارته المثلى العالية, هذا يعني انه لا يمسخ بسهولة ويبقى محافظاً على خواصه بهذه الحدود. وقدرته على تحمل درجات حرارية عالية تصل الى 60 م ولمدة ساعة كاملة تقريباً محافظاً على 80 % من فعاليته النوعية, وهذه المواصفات التي يتمتع بها اللايبيز أعطاه دوراً كبيراً في مجال التطبيق والنظم الصناعية, لذا يرى بعض الباحثون أن اللايبيز سوف يلعب دوراً كبيراً في المستقبل القريب لا يقل شأناً عن إنزيمات البروتيز والاميليز في المجالات الصناعية والغذائية (Hasan *et al*., 2006).

تعمل اللايبيزات بمدى واسع من التفاعلات, إذ تحلل الأسيل كلسيرول acylglycerol , ومدى واسع من الاسترات الأخرى (الاسترات البسيطة , والفوسفولبيدات وغيرها), وللايبيزات القدرة على عمل تفاعلات عكسية بوجود المذيبات العضوية مكونة بذلك الاسترات ester synthesis, أو يحدث تبادل لمجاميع الأسيل acyl groups بين مختلف الأسيل كلسيرول والكحولات والاسترات والأمينات (interesterification and transesterification) (Schmidt-Dannert, 1999; Pandey *et al*., 1999; Bornscheuer, 2002; Gupta *et al*., 2004)

*جزء من رسالة ماجستير للباحث الثالث

مواد وطرائق العمل

تقدير فعالية اللايبيز : قدرت فعالية اللايبيز المنقى من سرطان البحر *Portunus pelagicus* , بمتابعة تحرير الأحماض الدهنية من خلال التحلل المائي لمستحلب زيت الزيتون بفعل اللايبيز حسب الطريقة الموصوفة من قبل Macedo *et al.* (1997) والتي ذكرها Prazeres *et al.* (2006).

تعرف الوحدة الإنزيمية:- بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحرير واحد مايكرومول من الحامض الدهني خلال دقيقة واحدة في المليلتر الواحد.

دراسة صفات اللايبيز المنقى Characterization of the purified lipase

درست بعض صفات اللايبيز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر وتضمنت:-

تقدير الوزن الجزيئي Molecular mass determination

قدر الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد بوجود العوامل الماسخة SDS - PAGE الموصوفة من قبل (Garfin, 1990) مع إجراء بعض التحويرات.

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللايبيز Optimum pH

قدرت الفعالية الإنزيمية وفق الفقرة اعلاه مع استعمال المحاليل الدارئة الآتية ذات قيم رقم هيدروجيني مختلفة تراوحت بين 3 – 12 بدلاً من الدارئ Tris – HCl بتركيز 0.02 برقم هيدروجيني 8 المستعمل في تقدير الفعالية وهي:-

دارئ خلات الصوديوم بتركيز0.05 مولاري بمدى رقم هيدروجيني (4 – 5).

دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.05 مولاري بمدى رقم هيدروجيني (6 – 7).

دارئ Tris – HCl بتركيز 0.05 مولاري بمدى رقم هيدروجيني (8 – 9).

دارئ Tris – NaOH بتركيز 0.05 مولاري بمدى رقم هيدروجيني (10 - 12).

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثباتية اللايبيز pH stability of lipase

مزجت حجوم متساوية من الإنزيم المنقى مع المحاليل الدارئة المحضرة في أنابيب اختبار وحضنت في الحمام المائي عند درجة حرارة 37 م لمدة 30 دقيقة ثم نقلت الأنابيب مباشرة إلى حمام ثلجي , وقدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية عند الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم, وعبر عن الفعالية الإنزيمية المتبقية كنسبة مئوية (%), ورسمت العلاقة بين النسبة المئوية للفعالية الإنزيمية المتبقية والرقم الهيدروجيني لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم.

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية اللايبيز Optimum temperature

قدرت فعالية الإنزيم وعلى مدى من درجات الحرارة تراوحت بين 25 – 80 م ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة مقابل فعالية الإنزيم لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم.

تعيين درجة الحرارة المثلى لثباتية اللايبيز Thermostability of lipase activity

حضن 1 مل من المحلول الانزيمي المنقى بدرجات حرارية مختلفة شملت 30 و40 و50 و60 و70 و80 و90 م لمدة 30 دقيقة, بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي ثم قدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية (%) حسب الفقرة ورسمت العلاقة بين النسبة المئوية للفعالية المتبقية ودرجات الحرارة المختلفة لتحديد الدرجة الحرارية المثلى لثباتية الإنزيم.

تعيين الثوابت الحركية للايبيز Determination of lipase kinetics

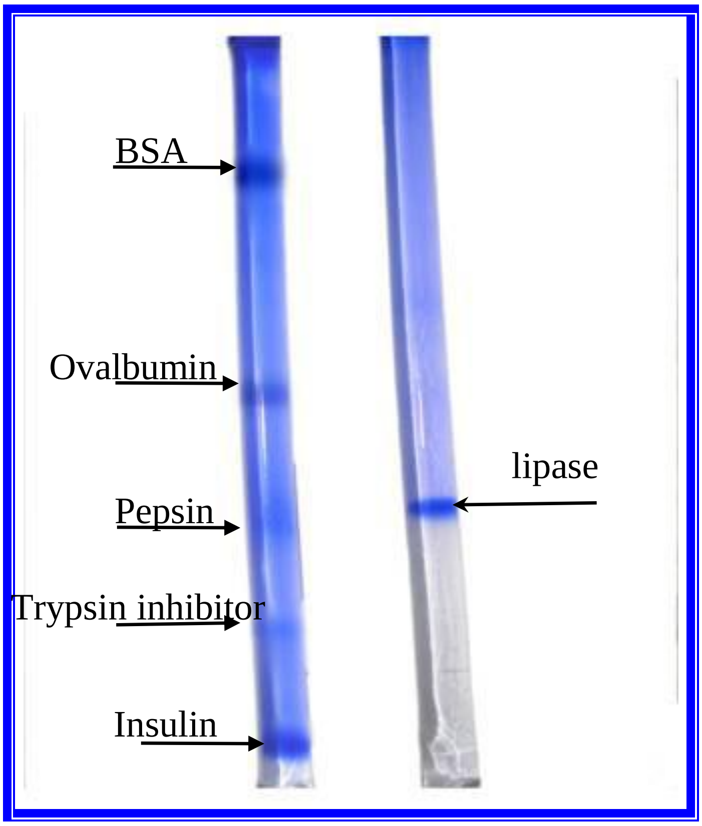
تم تحضير تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة زيت الزيتون تراوحت بين (0.01 – 2.5) مولاري في دارئ Tris – HCl وقدرت قيم ثابت ميكالس (Km) والسرعة القصوى (Vmax) من رسم العلاقة بين السرعة الأولية (V) وتراكيز المادة الخاضعة [S] باستعمال الطرائق التالية المذكورة من قبل Segel (1976).

1. طريقة لاينويفربيرك Lineweaver – Burk reciprocal plot

2. طريقة هانس – وولف Hans – Woolf plot
3. طريقة وولف – اوغستنسون – هافستي Woolf – Augustinsson – Hofstee polt
4. طريقة ايدي – سكاتجارد Eadie – Sctchard plot

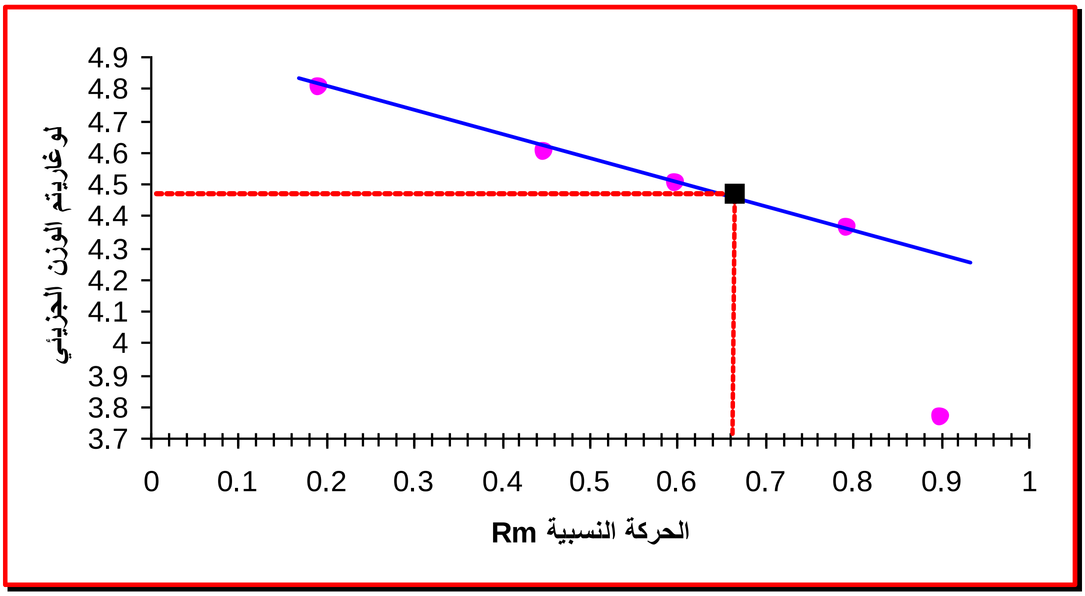
النتائج والمناقشة

قدر الوزن الجزيئي للاييز المنقى بإتباع تقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود المواد الماسخة باستعمال البروتينات القياسية الاتية(Insulin , Trypsin inhibitor , Pepsin , Ovalbumin , Bovine serum albumin) ذات أوزان جزيئية مقدارها 5000 , 20000 , 34000 , 43000 , 67000 دالتون على التوالي كما موضح في الشكل (1).



شكل(1) تقديــر الوزن الجزيئي للاييز المنقى مــن البنكرياس الكبدي لسرطان البحر باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود المواد الماسخة للبروتين.

بعد رسم العلاقة الخطية بين الحركة النسبية Rm ولوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية المستعملة في تقدير الوزن الجزيئي , وضح الشكل (2) المنحنى القياسي للترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة للبروتينات القياسية واللاييز قيد الدراسة إذ بلغ الوزن الجزيئي له 30100 دالتون. إن استعمال SDS يسهم في تحطيم التركيب الرباعي للبروتين عن طريق ارتباطه بشدة بالوحدات المكونة للإنزيم ومن ثم إلغاء تأثير الشحنة أثناء عملية الفصل إذ إن الفارق في الوزن الجزيئي للوحدات المكونة للإنزيم هو العامل الوحيد والمحدد لعملية الفصل على هلام الاكريل امايد المتعدد (Segel, 1976).

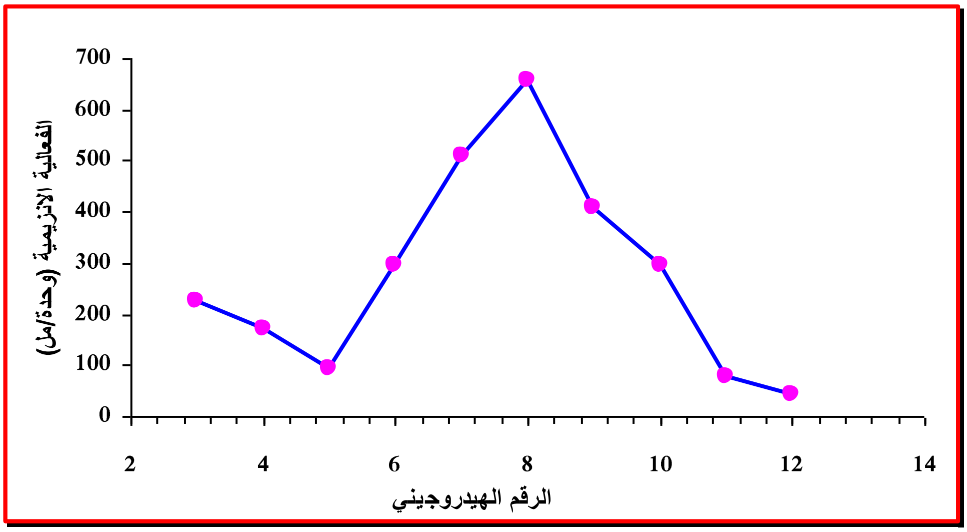


شكل(2) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي للاييبز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود المواد الماسخة للبروتين.

تباينت الدراسات في تقدير الوزن الجزيئي للاييبز وتحديد عدد الوحدات المكونة له ومدى احتوائه على الأواصر ثنائية الكبريت التي يكونها الحامض الأميني السستاين وذلك تبعاً لاختلاف المصدر الإنزيمي وطرق القياس المتبعة. اذ اوجد Maurin and Gal (1996) أن الوزن الجزيئي للاييبز المنقى جزئياً من الأنابيب الاعورية لسمك التونة ذو الزعنفة الصفراء *Thunnus albacares* يقارب 60000 دالتون. أما الوزن الجزيئي للاييبز المأخوذ من البنكرياس الكبدي للحبار Squid البحري *Ommastrephes bartramii* فقد كان بمقدار 33000 دالتون باستعمال الترحيل الكهربائي بوجود العوامل الماسخة SDS (Sukarno *et al*., 1996), ذكر Fendri *et al.* (2006) أن الوزن الجزيئي للاييبز المنقى من بنكرياس الدجاج بلغ 50000 دالتون باستعمال الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بتركيز 13% بوجود العوامل الماسخة. كما بينت دراسة Chakraborty and Raj (2008) ظهور حزمة واحدة على هلام الاكريل امايد المتعدد بوجود العوامل الماسخة SDS بوزن جزيئي مساوٍ 74800 دالتون للاييبز المعزول من بكتيريا *Bacillus licheniformis* MTCC 6824. بلغ الوزن الجزيئي للاييبز 32200 دالتون المنقى من فطر *Aspergillus niger* NCIM 1207 مقدرا بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود العوامل الماسخة SDS (Mhetras *et al*., 2009).

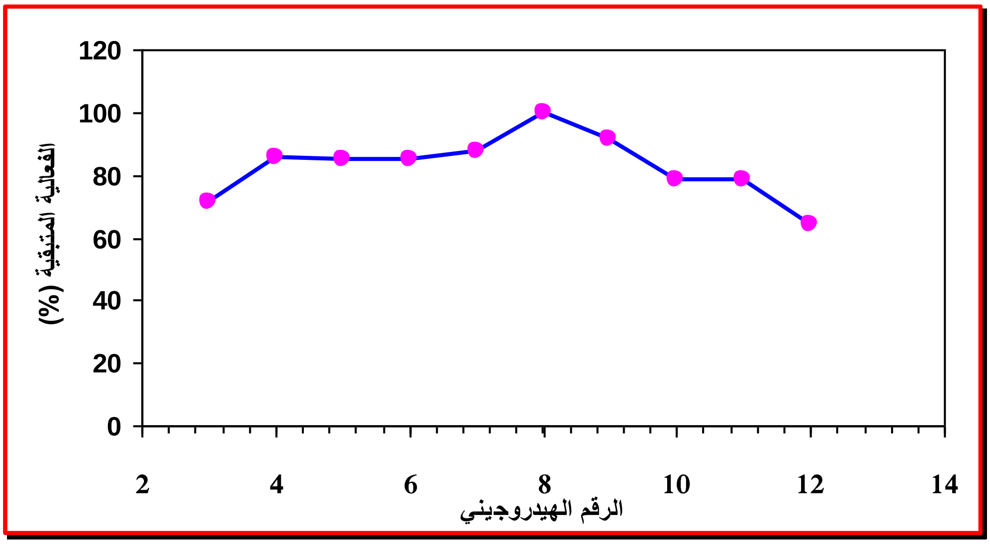
تمت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية اللاييبز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين (3 – 12), وبينت النتائج الموضحة في الشكل (3) إن الإنزيم اظهر فعالية عالية في مدى من الرقم الهيدروجيني تراوح بين (7 – 9), في حين بلغ الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية 8, إذ أعطى الإنزيم أقصى فعالية إنزيمية مقدارها 650 وحدة/مل , وثبطت الفعالية في المدى القاعدي الحاد للأرقام الهيدروجينية ويفقد الإنزيم أيضاً فعاليته عند الأرقام الهيدروجينية الحامضية, إن سبب الانخفاض في الفعالية يعود إلى تأثر واحد أو أكثر من المجاميع الأيونية الموجودة في الموقع الفعال للإنزيم أو المادة الخاضعة أو كليهما بسبب تغير الحالة الأيونية لهذه المجاميع وانعكس ذلك على قابلية الإنزيم للارتباط بالمادة الخاضعة , إذ أن القيم المتطرفة تسبب اختلافا في ترتيب الشحنات الموجودة على السلاسل الطرفية المتأينة لجزيئة الإنزيم بشكل كبير مقارنة بترتيب الشحنات تحت الظروف الاعتيادية ويترتب على ذلك تغير تركيب الشكل الرباعي إلى

تركيب أكثر عشوائية إضافة إلى اختلاف التركيب الثلاثي للإنزيم أي تغير الحالة الطبيعية للإنزيم Denaturation (دلالي, 1983 ;Segel, 1976).



شكل (3) منحنى الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللايبيز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر.

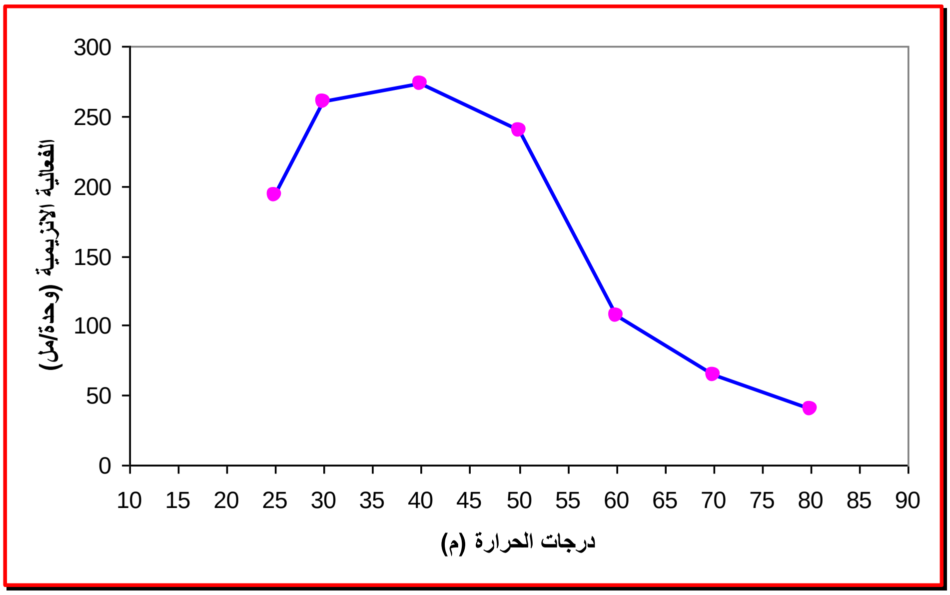
جاءت نتيجة هذه الدراسة مقاربة مع ما ذكره Rasco and Hultin (1988) بان اللايبيز المستخلص من بنكرياس سمك القرش *Squalus acanthias* كان الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية 8.5, ووجد Iijima *et al*. (1998) إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية لايبيز البنكرياس الكبدي من سمك الشانك الأحمر *Pagrus major* تراوح بين 7 – 9 , وفي دراسة أخرى تبين إن الرقم الهيدروجيني الأمثل للايبيز المنقى جزئياً من الأنابيب الاعورية لسمك البياح الرمادي *Mugil cephalus* هو 8 (Aryee *et al*., 2007). دُرس تأثير الرقم الهيدروجيني على ثبات اللايبيز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر والذي يعد من الصفات المهمة في تحديد ظروف التنقية وخزن الإنزيم, ويقع المدى الأمثل لثبات الإنزيم بين 7 – 9 بعد اختباره في مدى من الأرقام الهيدروجينية 3 – 12, إذ أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم 8, أما عند الرقم الهيدروجيني 7 و 9 فان الإنزيم احتفظ بحوالي 90 % من فعاليته.



شكل (4) منحنى الرقم الهيدروجيني الأمثل لثباتية اللايبيز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر.

يعود سبب الانخفاض في الفعالية عند القيم الهيدروجينية الحامضية أو القاعدية إلى حدوث تغير في التركيب الثانوي والثلاثي لجزيئة البروتين علاوة على تغير الحالة الأيونية للموقع الفعال للإنزيم. ولكون مصدر الإنزيم والطبيعة الكيميائية للمحلول الدارئ تعد من العوامل المهمة التي تؤثر في تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم (Segel, 1976). وقد تباينت نتائج الدراسات في تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم, إذ بين Mukundan *et al*. (1985) إلى إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم المنتج من البنكرياس الكبدي لسمك السردين الزيتي *Sardinella longiceps* تراوح بين 5 – 9.5. ذكر Akiko *et al*. (2001) إن اللايبيز المنقى من سمك البلطي النيلي Nile Tilapia احتفظ بفعاليته في مدى تراوح بين 6.5 – 8.5.

تمت دراسة تأثير درجة الحرارة في فعالية اللايبيز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر, واجري التفاعل الإنزيمي بدرجات حرارية تراوحت بين 25 – 80 م وعند الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية 8, إذ وضح الشكل (5) حصول زيادة واضحة في الفعالية الإنزيمية بازدياد درجة حرارة التفاعل حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 40 م , ثم انخفضت الفعالية بشكل تدريجي حتى بلغت 14.6 % من فعالية الإنزيم القصوى عند درجة حرارة 80 م.

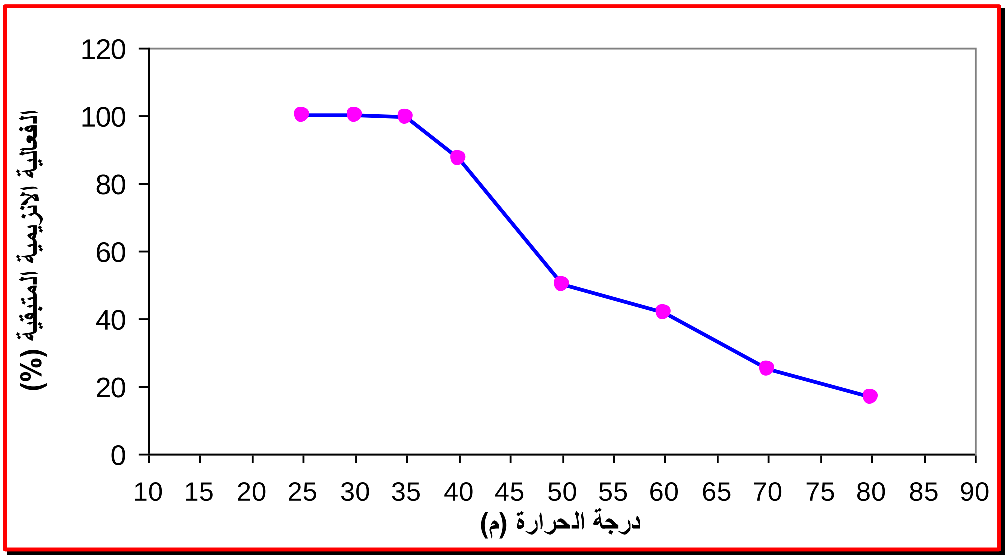


شكل (5) منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية اللايبيز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر.

أن زيادة درجات الحرارة يؤدي إلى حصول تغيرات واضحة في مكونات التفاعل التي تضم كلا من الإنزيم والمادة الخاضعة, مما أدى إلى حصول زيادة مستمرة في فعالية الإنزيم بسبب زيادة فرصة حدوث التصادمات Collisions نتيجة لزيادة الطاقة الحركية لجزيئات المواد المتفاعلة بفعل تأثير الدرجات الحرارية إلا أن ازدياد درجة الحرارة عن الدرجة الحرارية المثلى للتفاعل تؤدي إلى حدوث انخفاض في الفعالية الإنزيمية بسبب تأثيرها بشكل سلبي في مكونات التفاعل (Whitaker, 1972; White *et al*., 1973). أما انخفاض الفعالية الإنزيمية الشديد عند الدرجات الحرارية العالية فانه يعود إلى امتصاص الجزيئات المتفاعلة لطاقة عالية مما يؤدي إلى تغير في التركيب الثلاثي للإنزيم ومن ثم مسخه وفقدان جزء من فعاليته (Segel, 1976). يختلف تأثير درجة الحرارة في فعالية اللايبيز باختلاف المصادر المأخوذ منها فقد وجد أن Patton *et al*. (1977) إن درجة الحرارة المثلى لفعالية اللايبيز المأخوذ من بنكرياس سمك القرش النمري Leopard shark هي 36 م, في حين بين Nayak *et al*. (2004) حصول زيادة في فعالية اللايبيز المعوي المنقى من احد أنواع سمك الكارب

الهندي *Labeo rohita* حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 45 م . وبين Aryee *et al.* (2007) إلى إن درجة الحرارة المثلى لفعالية اللايبيز المنقى من الأنابيب الاعورية لسمك البياح الرمادي *Mugil cephalus* بلغت 50 م.

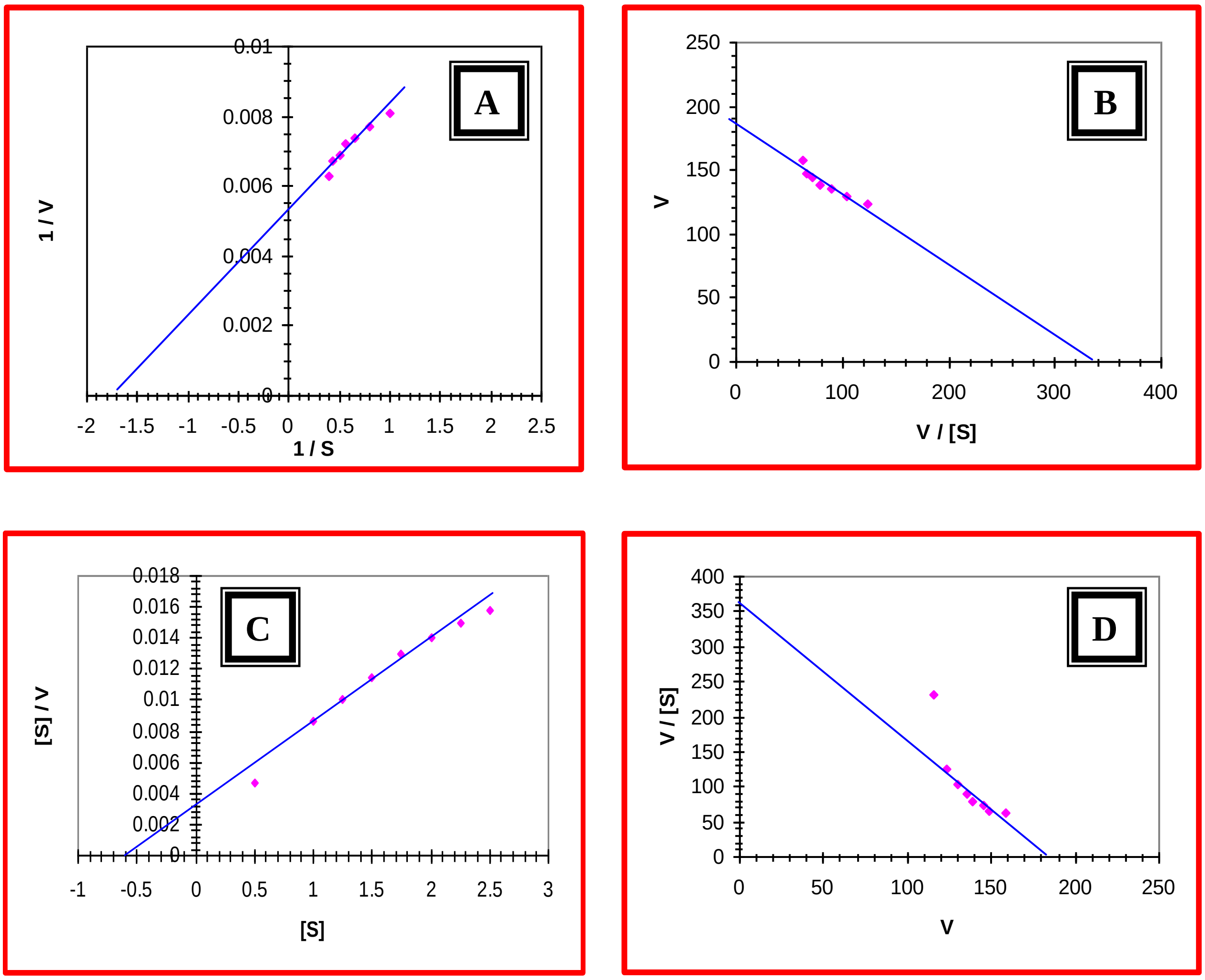
أظهرت النتائج المستحصلة من حضن اللايبيز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر بدرجات حرارة تراوحت بين 25 – 80 م لمدة 30 دقيقة , احتفاظ الإنزيم بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة 25 – 35 م (شكل 6), بعدها انخفضت الفعالية الإنزيمية تدريجياً إذ فقد 75 % من فعاليته عند درجة حرارة 70 م وفقد 85% من فعاليته في 80 م, وذلك نتيجة لتأثير الحرارة في تركيب جزيئة الإنزيم ومسخه, وتتأثر حساسية الإنزيمات تجاه الحرارة بعدة عوامل كالرقم الهيدروجيني والقوة الأيونية ووجود المواد الماسخة مع الأنزيم والوزن الجزيئي للإنزيم (Whitaker, 1972; Segel, 1976; Mclellan and Robinsson, 1987)



شكل (6) منحنى الثبات الحراري لفعالية اللايبيز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر.

تباينت الدراسات في تحديد الثبات الحراري للايبيز المنقى وذلك حسب مصدر الإنزيم فقد وجد Abdou (2003) إن اللايبيز المعزول من بكتيريا *Serratia marcescens* احتفظ بكامل فعاليته عند معاملته بدرجة حرارة 65 م. وكما بين Prazeres *et al.* (2006) إلى إن اللايبيز المنقى من فطر *Fusarium oxysporum* أبدى ثباتاً عالياً تجاه المعاملات الحرارية واحتفظ بكامل فعاليته عند درجة حرارة 50 م واحتفظ الإنزيم بـــ93 % من فعاليته على درجة حرارة 60 م.

اظهر الشكل(7) قيم الثوابت الحركية للايبيز المنقى حيال زيت الزيتون كمادة خاضعة واستخرجت قيم كل من ثابت ميكالس Michaelis-Menten constant (Km) والسرعة القصوى Maximum velocity (Vmax) باستعمال أربع طرائق لرسم العلاقة بين السرعة وتركيز المادة الخاضعة.



A = Line Weaver – Burk Reciprocal plot B = Woolf – Augutinsson – Hofstee plot
C = Hanes – Woolf plot D = Eadie – Seatchard plot

شكل (7) الثوابت الحركية للاييز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر.

بين الجدول (1) نتائج قيم Km و Vmax ومعدلاتها بالطرائق الأربع, إذ لوحظ أن معدل قيمة Km بلغت 0.57 ملي مولاري, في حين أن معدل السرعة القصوى Vmax 188.4 مايكرومول/دقيقة. ويعتمد اختلاف قيم ثابت ميكالس – منتن Km على اختلاف مصادر المستخلص منها الإنزيم والرقم الهيدروجيني والقوة الأيونية للدارئ المستعمل (Segel, 1976).

جدول (1) الثوابت الحركية للايبيز المنقى من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر.

طريقة التقدير	Km (mM)	Vmax µm/min
Lineweaver – Burk Reciprocal plot	0.62	178.57
Woolf – Augutinsson – Hofstee plot	0.55	190
Hanes – Woolf plot	0.6	200
Eadie – Seatchard plot	0.51	185
المعدل	0.57	188.4

في دراسة بين (2005) Zouari *et al.* قيم Km لإنزيمي اللايبيز المستخلص من الغدد الهاضمة في العقرب وبنكرياس الديك الرومي حيث بلغت 17 و 28.57 ملي مولاري على التوالي, وبلغت السرعة القصوى Vmax لهما 6643 و 2560 وحدة/دقيقة على التوالي باستعمال البيوترين الثلاثي كمادة خاضعة. ووجد (2007) Aryee *et al.* إن قيم Km و Vmax باستعمال *P*-nitrophenyl-palmitate كمادة خاضعة بلغت 0.22 ملي مولاري و 20 مايكرومول/دقيقة/ملغم على التوالي. تجدر الإشارة انه قيمة ثابت ميكالس تدل على تراكيز المادة الخاضعة عندما تبلغ سرعة التفاعل نصف السرعة القصوى تكون مؤشرا لمدى ألفة الإنزيم, ولهذا يعد ثابت ميكالس Km من أهم الثوابت المميزة للإنزيم كونه يعبر عن عدد من خواصه ولاسيما درجة الفته للمادة الخاضعة والتي تختلف باختلاف مصادر الإنزيم والمادة الخاضعة,حيث انه كلما كانت قيم ثابت ميكالس واطئة كلما كانت ألفة الإنزيم عالية للارتباط بالمادة الخاضعة (دلالي ، 1983 ؛Whitaker, 1972؛ Segel, 1976).

المصادر

دلالي ، باسل كامل (1983). فهم الإنزيمات, مطابع جامعة الموصل ، جامعة الموصل. (ترجمة).

Abdou, A. M. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, 86: 127 – 132.

Akiko, T.; Katsumi, T. and Ikuzo K. (2001). Purification and properties of lipase from *Tilapia* intestine: Digestive enzyme of *Tilapia*: VI. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 67: 78 – 84.

Aryee, A. N. A.; Simpon, B. K. and Villalonga, R. (2007). Lipase fraction from the viscera of grey mullet (*Mugil cephalus*). Isolation, partial purification, and some biochemical characterizatics. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 394 – 402.

Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 73–81.

Chakraborty, K. and Raj, R. P. (2008). An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, 109: 727 – 736.

Fendri, A.; Frikha, F.; Mosbah, H.; Miled, N.; Zouari, N.; Ben Bacha, A.; Sayari, A.; Mejdoub, H. and Gargouri, Y. (2006). Biochemical characterization, cloning, and molecular modeling of chicken pancreatic lipase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 451: 149 – 159.

Garfin, D. E. (1990). Purification procedures electrophoretic methods. *In:* Methods in enzymology. Murray, E. D. and Dentscher, P. J. (Eds.), Vol. 182: 425 – 441.

Gupta, R.; Gupta, N. and Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 763–781.

Hasan, F.; Shah, A. A. and Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases: *Enzyme and Microbial Technology,* 39 (2): 235 – 251.

Hide, W. A.; Chab, L. and Li, W-H (1992). Structure and evolution of the lipase superfamily. *Journal of Lipid Research*, 33: 167 – 178.

Iijima, N.; Tanaka, S. and Ota, Y. (1998). Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major. Fish Physiology and Biochemistrey*, 18: 59 – 69.

Joseph, B.; Ramteke, P. W.; Thomas, G. and Shrivastava, N. (2007). Standards review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review,* 2: 39 – 48.

Macedo, G. A.; Park, Y. K. And Pastore, G. M. (1997). Partial purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 687 – 692.

Maurin, C. and Gal, Y. L. (1996). Characterization of hydrophobic esterase from tuna (*Thunnus albacares*) Pyloric caeca. *Journal of Marine Biotechnology*, 4: 87 – 90.

Mclellan, K. M. and Robinsson, D. S. (1987). The heat stability of purified spring cabbage peroxidase isoenzyme. *Food Chemistry*, 26 : 97 – 107.

Mhetras, N. C.; Bastawde, K. B. and Gokhale, D. V. (2009). Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*, 100: 1486 – 1490.

Mukundan, M. K.; Gopakumar, K. and Nair, M. R. (1985). Purification of a lipase from the hepatopancreas of oil sardine (*Sardinella longiceps* Linnaeus) and its characteristics and properties. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 36: 191 – 203.

Nayak, J.; Nair P. G. V.; Mathew S. and Ammu K. (2004). A study on the intestinal lipase of Indian major carp *Labeo rohita*. *Asian Fisheries Science*, 17: 333 – 340.

Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Krieger, N. and Soccol, V. T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29: 119–131.

Patton, J. S.; Warner, T. G. and Benson, A. A. (1977). Partial characterization of the bile salt dependent triacyglycerol lipase from the leopard shark pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta*, 486: 322 – 330.

Prazeres, J. N. D.; Cruz, J. A. B. and Pastore, G. M. (2006). Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Brazilian Journal of Microbiology,* 37: 505 – 509.

Rasco, B. A. and Hultin, H. O. (1988). A comparison of dogfish and porcine pancreatic lipases. *In:* Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and *Molecular Biology,* 89: 671 – 677.

Schmidt-Dannert, C. (1999). Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorganic and Medicinal Chemistery*, 7: 2123 – 2130.

Segel, I. H. (1976). Biochemical Calculations. 2nd Edition., John Wiley and Sons, Inc. New York.

Sukarno; Takahashi, K.; Hatano, M. and Sakurai, Y. (1996). Lipase from neon flying Squid hepatopancreas: Purification and properties. *Food Chemistry*, 57(4): 515 – 521.

Whitaker, J. R. (1972) Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker. Inc., New York.

White, A.; Handler, P. and Smith, E. (1973). Principle of Biochemistry. McGraw-Hill Book Company. Albakiston Publication, New York.

Voet, D. and Voet, J. G. (1995). Lipids and membranes. *In:* Biochemistry, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp: 277−284.

Zouari, N.; Miled, N.; Cherif, S.; Mejdoub, H. and Gargouri, Y. (2005). Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: The scorpion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1726: 67 – 74.

A STUDY OF PARTIAL CHARACTERIZATION OF LIPASE ENZYME FROM HEPATOPANCREASE OF CRAB *Portunus pelagicus* (L. 1758)

Raodah M. Al-Ali[1] Sabah M. H. AL-Shatty[1] Amar Y.J.Al-Sraji*
[1]Food Science Department - College of Agriculture- Basrah University
*** Marine Science Center - Basrah University**

Abstract

This study aimed to assess partial characteristic of the lipase purified from crab *Portunus pelagicus*, Molecular weight of the enzyme was 30,100 Dalton on poly acrylamide gel electrophoresis under denaturating conditions, using SDS. The optimum pH of the enzyme was 8 and the enzyme showed the same activity at pH 7 – 9 and a temperature of 37 C for 30 minutes. Optimum temperature of the enzyme was 40Cº and exhibit the same activity at temperatures between 25 to 35 C for 30 minutes at the optimum pH optimum for stability. The kinetic constants of enzyme were: Michael's constant (Km) 0.57 mM and (Vmax) was 188.4 µmol / min.

*Part of MSc. thesis of the third author