

توصيف أنزيم Glucose - 6 - Phosphate Dehydrogenase (G6PD)

المنقى من عزلة محلية لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1

حميد مجيد العبيدي

قسم علوم الاغذية والتقانة الاحيائية

كلية الزراعة - جامعة بغداد

* محمد عبد الرزاق الصوفي

قسم علوم الاغذية والتقانة الاحيائية

كلية الزراعة - جامعة تكريت

الخلاصة

بلغ الوزن الجزيئي لانزيم (G6PD) المنقى من عزلة الخميرة 56 كيلودالتون مقدراً بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة، وكان الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم 7.5، وامتلك الانزيم ثباتاً واسعاً في مدى من قيم الاس الهيدروجيني كان بين 5.5 - 8.

كانت درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الانزيم المنقى 50 م عند الاس الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم، وفقد الانزيم 4.6، 17.6، 51.7 % من فعاليته الاصلية عند خزنه بدرجة حرارة -18، 4، 25 م لمدة 7 ايام على التوالي، في حين بلغت طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الاساس الى ناتج 12.3 كيلوسعرة / مول.

اظهر كل من كلوريد المغنيسيوم والمنغنيز تأثيراً منشطاً للانزيم، بينما لم يلاحظ أي تأثير منشط لكلوريد الالمنيوم، النيكل، الحديدوز وخليط كلوريد المغنيسيوم والمنغنيز، وقد اظهرت الكربونات تأثيراً منشطاً لفعالية الانزيم، بينما كانت المركبات المختزلة والعوامل المعدنية الرابطة ذات تأثير مثبط لفعالية الانزيم، وبلغ معدل قيمة Michaelis Constant (Km) للانزيم المنقى تجاه Glucose-6-phosphate (G-6-P) بوجود Nicotinamide - adenin dinucleotide - phosphate (NADP⁺) 0.34 ملي مولار وبلغت السرعة القصوى Maximum Velocity (Vmax) 4.08 ملي مولار / دقيقة، بينما كان معدل قيمة (Km) للانزيم المنقى تجاه (NADP⁺) بوجود (G-6-P) 0.29 ملي مولار وبلغت السرعة القصوى (Vmax) 1.81 ملي مولار / دقيقة.

- تاريخ استلام البحث: 2006/9/4

- بحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.

المقدمة

بتأثير (NADPH)، لذا فان الانزيم إذا ما وجد في محيط معين لا يتم فيه أكسدة (NADPH) المتكون بسرعة سيؤدي ذلك إلى تحلل الشكل الرباعي إلى الشكل الثنائي ثم الأحادي، واستنتج (Kahn وجماعته، 14) أن الأواصر الأيونية Ionic Bonds هي الأساس في استقرار الشكل المزدوج داخل الشكل الرباعي للانزيم بينما تحافظ الأواصر الكارهة للماء Hydrophobic Bonds على استقرار الشكل الأحادي داخل الشكل الثنائي من خلال دراسة تأثير القوة الأيونية والاس الهيدروجيني على

توجد جزيئة أنزيم (G6PD) (EC: 1.1.1.49) يشكلين فعالين هما الشكل الثنائي Dimer والشكل الرباعي Tetramer وتتحدد هذه الأشكال بتأثير الاس الهيدروجيني والقوة الأيونية بحسب الظروف المحيطة، إذ تزيد القوة الأيونية العالية والمحيط القاعدي من وجود الشكل الثنائي بينما يزيد المحيط الحامضي والقوة الأيونية العالية من وجود الشكل الرباعي (Au وجماعته، 3)، وأشار (Scott، 25) و (Segade وجماعته، 26) إلى أن تحلل الشكل الثنائي ثم الشكل الأحادي غير الفعال يكون

كريات الدم الحمراء للإنسان، الأساس (G6P)، واثبت (Ozols، 23) أن موقع ارتباط العامل المساعد (NADP^+) بالأنزيم يكون بواسطة الحامض الأميني (Gly - 399) والحامض (Gly - 491) للأنزيم المنقى من Lumenal Endoplasmic Reticulum، وأشار المصدر ذاته إلى أن الأنزيم يحتوي على مجموعة كربوهيدرات مرتبطة بالحامض الأميني (Asn - 138) والحامض (Asn - 263)، واكد ذلك (Reilly و Allred، 24) في اشارتهم إلى أن الأنزيم المنقى من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* هو من نوع البروتينات السكرية Glycoproteins، لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى توصيف انزيم (G6PD) المنتج من عزلة محلية لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* لتحديد خصائص هذا الانزيم والظروف المؤثرة في فعاليته وثباته.

المواد وطرائق العمل

3.0 - ومحلول خلاات الصوديوم الدارئ بتركيز 1 مولار بمدى قيم اس هيدروجيني كانت بين 5.0 - 6.5 ومحلول (Tris - HCL) الدارئ بتركيز 1 مولار بمدى قيم اس هيدروجيني كانت بين 7.0 - 9.0، وجرى تقدير الفعالية الانزيمية بواسطة المحاليل الدارئة المحضرة ورسمت العلاقة بين فعالية الانزيم (وحدة / مللتر) تجاه قيم الاس الهيدروجيني المختلفة لتعيين الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم المنقى، وتم تعيين الاس الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بمزج 0.3 مللتر من انزيم (G6PD) المنقى مع 0.3 مللتر من المحاليل الدارئة الوارد ذكرها سابقاً في انابيب اختبار وجرى حضنها في حمام مائي بدرجة حرارة 25م لمدة 30 دقيقة، بعدها نقلت الانابيب الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية باستخدام المحلول الدارئ الامثل لفعالية الانزيم ورسمت العلاقة الخطية بين الفعالية المتبقية للانزيم (%) تجاه قيم الاس

الشكل التركيبي لأنزيم (G6PD) المستخرج من ولاحظ (Beutler وجماعته، 5) أن (NADP^+) يزيد من ثبات الأنزيم واستقراره في حين تؤدي إزالته إلى تحلل الأنزيم لوحدها غير فعالة تعود إلى شكلها الطبيعي الفعال عند إضافة (NADP^+) إليه مرة أخرى، وانطبق الشيء ذاته على وجود (G-6-P) الذي يزيد وجوده من استقرار وثباتية الأنزيم بينما فقدانه يؤدي إلى تحلل الأنزيم للشكل غير الفعال، وقد وجد (Kahn وجماعته، 13) أن جزيئة الأنزيم المنقاة من دم الإنسان تحوي حوالي (18) مجموعة سلفهيدريل ($-\text{SH}$)، وبين (Gronenborn وجماعته، 10) أن الأنزيم المنقى من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* يحوي الحامض الأميني (Lysine) في موقعه الفعال بشكل متتابع ما بين الحامض الأميني (93 - 100) في جزيئة الأنزيم، وتشكل مجموعة (ϵ - amino) لهذا الحامض نقطة الربط ما بين (NADP^+) والمادة

تقدير الفعالية الانزيمية:

قُدرت الفعالية الانزيمية تبعاً للطريقة التي قام بوصفها (Bergmeyer، 4).

تقدير تركيز البروتين:

استخدمت الطريقة التي وصفها (Lowry وجماعته، 17).

تعيين الوزن الجزيئي

اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة الموصوفة من قبل (Weber و Osborn، 33).

تعيين الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم

استخدمت محاليل دارئة بتركيز 1 مولار بمدى قيم اس هيدروجيني تراوحت بين 3.0 - 9.0 في تعيين الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم، وشملت هذه المحاليل كل من محللول سترات الصوديوم الدارئ بتركيز 1 مولار بمدى قيم اس هيدروجيني كانت بين 4.5

75، 90 دقيقة، وبرد المزيج بعدها بواسطة حمام ثلجي وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية.

تأثير الخزن في فعالية الانزيم

جرت متابعة يومية للفعالية الانزيمية المتبقية

لانزيم (G6PD) المنقى من خلال خزنه بدرجات حرارة مختلفة بلغت -18، 4، 25م ولمدة 7 ايام.

تأثير بعض كلوريدات المعادن في فعالية الانزيم

استخدمت العديد من كلوريدات المعادن شملت

كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ ، كلوريد الالمنيوم $AlCl_3$ ،

كلوريد النيكل $NiCl_2$ وكلوريد الحديدوز $FeCl_2$

بتركيز بلغت 1، 5، 10 ملي مولار لكل منها، اذ جرى اضافتها الى مزيج التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية.

تأثير المواد الكيميائية في فعالية الانزيم

استخدمت عدة مواد كيميائية شملت

$CaCO_3$ ، $NaCO_3$ ، EDTA، Sodium citrate،

Sodium azide، Thio urea، - 2.4 - fluoro - 1

Mercaptoethanol، dinitrobenzene، phosphate 5 - Pyridoxal

بتركيز 0.1، 1، 10 ملي مولار لكل منها، اذ جرى

اضافتها الى مزيج التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية.

تعيين الثوابت الحركية

جرى تعيين ثابت ميكالس (Km) والسرعة

القصى (Vmax) للانزيم المنقى تجاه (G-6-P)

بتركيز كانت بين 0.1 - 1.0 ملي مولار بوجود

(NADP⁺) بتركيز 0.5 ملي مولار، وتجاه (NADP⁺)

بتركيز كانت بين 0.1 - 1.0 ملي مولار بوجود (G-6-P)

(P) بتركيز 0.5 ملي مولار، وجرى تقدير الفعالية

الانزيمية ورسمت العلاقة الخطية بين السرعة الاولى

لتفاعل الانزيم المنقى (V) وتركيز المواد الاساس (S)

بطريقة Lineweaver - Burk Plot، اذ حسب قيم

ثابت ميكالس (Km) والسرعة القصى (Vmax) للانزيم

المنقى (Segel، 27) واستخرج المعدل العام لهذه القيم.

الهيدروجيني المختلفة لتعيين الاس الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم المنقى.

- تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الانزيم وتعيين طاقة التنشيط

عينت درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم

بحضن 2.5 مللتر من محلول مزيج التفاعل الحاوي على

المحلول الدائري الامثل لفعالية الانزيم المنقى بدرجات

حرارة مختلفة قدرها 25، 30، 35، 40، 45، 50، 55،

60، 65، 70، 75، 80م في انابيب اختبار لمدة 10 دقائق

ثم اضيف لها 0.2 مللتر من محلول انزيم (G6PD)

المنقى تبعتها اضافة 0.3 مللتر من محلول المادة

الاساس (G-6-P) بصورة مباشرة، وقدرت الفعالية

الانزيمية ورسمت العلاقة الخطية بين فعالية انزيم

(G6PD) المنقى تجاه درجات الحرارة المختلفة لتعيين

درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم، وجرى تقدير طاقة

التنشيط لتحويل المادة الاساس الى ناتج من خلال رسم

لوغاريتم ثابت السرعة الملاحظ (Observed (Kobs

reaction rate للتفاعل والمقدر بواسطة انزيم (G6PD)

المنقى بقياس سرعة التفاعل للانزيم عند درجة حرارة

كانت بين 25 - 80م تجاه مقلوب درجة الحرارة المطلقة

(K) بتطبيق معادلة ارينوس وميل المنحنى المرسوم

(Segel، 28)، بينما حددت درجة الحرارة المثلى لثبات

الانزيم بتوزيع 0.2 مللتر من المحلول الدائري الامثل لثبات

الانزيم ذي اس هيدروجيني مقداره 6.5 في انابيب اختبار،

بعدها حضنت بدرجات حرارة مختلفة قدرها 35، 40،

45، 50، 55، 60، 65، 70م لفترة 10 دقائق ثم اضيف

لها 0.2 مللتر من محلول انزيم (G6PD) المنقى

وحضن المزيج لمدة 10 دقائق بعدها بردت الانابيب

بوساطة حمام ثلجي وجرى تقدير الفعالية الانزيمية

ورسمت العلاقة الخطية بين فعالية الانزيم المتبقية (%)

تجاه درجات الحرارة المختلفة لتعيين درجة الحرارة المثلى

لثبات الانزيم، كذلك فقد مزج 0.2 مللتر من المحلول

الدائري الامثل لثبات الانزيم مع 0.2 مللتر من محلول

انزيم (G6PD) في انبوبة اختبار، بعدها حضن المزيج

بدرجة حرارة 50م لمدد زمنية قدرها 15، 30، 45، 60،

النتائج والمناقشة

تقدير الوزن الجزيئي

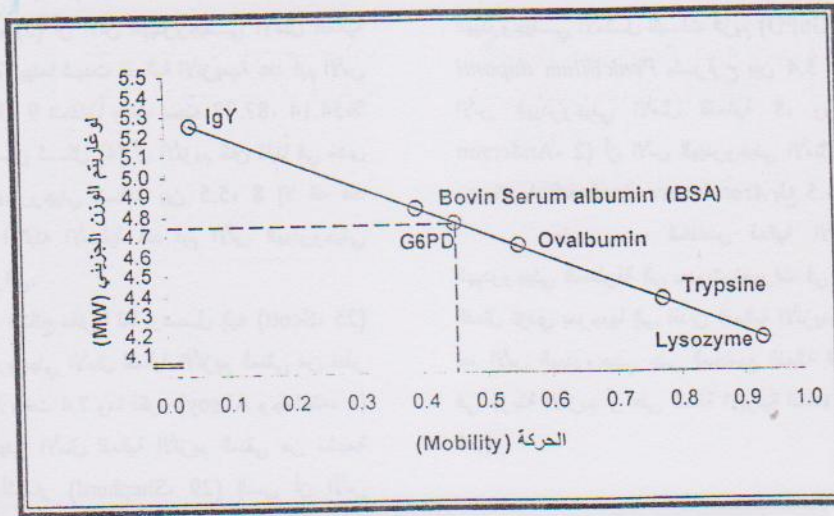
قدر الوزن الجزيئي لأنزيم (G6PD) المنقى باتباع طريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد بوجود العوامل الماسخة باستخدام البروتينات القياسية المتمثلة بـ Lysozyme، Bovine serum albumin، Ovalbumin، Trypsin، IgY ذات أوزان جزيئية مقدارها 14.4، 23، 43، 67، 180 كيلودالتون على التوالي.

رسمت العلاقة الخطية بين الحركة Mobility ولوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية المستخدمة في تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم المنقى، شكل (1) والذي بلغ 56 كيلودالتون.

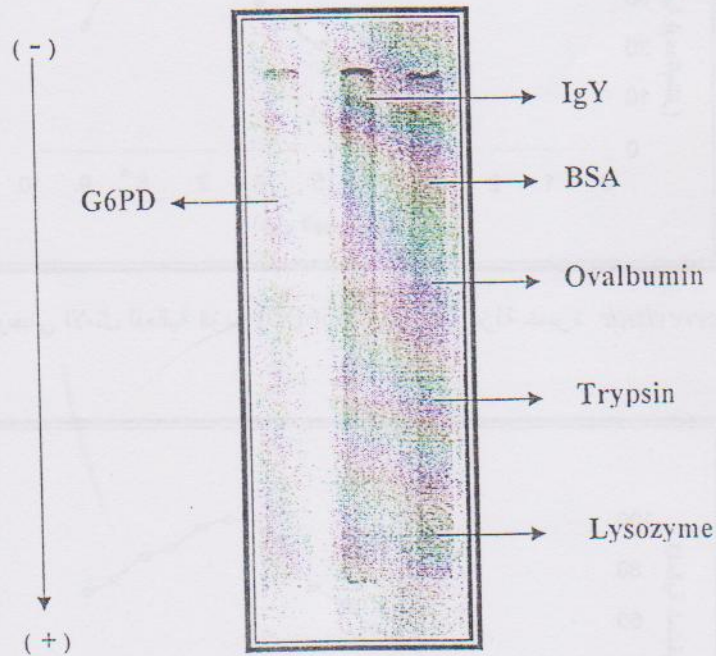
جاءت هذه القيمة ضمن المدى المذكور من قبل (Gronenborn وجماعته، 10) والتي تتراوح بين 22 - 58 كيلودالتون لأنزيم المنقى من خميرة *Saccharomyces cerevisiae*، إذ وجد (Scott، 25) أن الوزن الجزيئي لأنزيم المنقى من فطر *Neurospora crassa* بلغ 57 كيلودالتون مقدراً بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد

بوجود العوامل الماسخة، و أشار (Jeffery وجماعته، 12) إلى أن الأنزيم المنقى من خميرة *Pichia jadinii* امثلك وزناً جزيئياً مقداره 59.4 كيلودالتون مقدراً بطريقة الترحيل الكهربائي، بينما ذكر (Broek وجماعته، 6) أن الوزن الجزيئي لأنزيم المنقى من فطر *Aspergillus niger* بلغ 58.95 كيلودالتون مقدراً بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد بوجود العوامل الماسخة.

تختلف قيمة الوزن الجزيئي لأنزيم (G6PD) تبعاً للطريقة المستخدمة في تقديره، إذ يتألف هذا الأنزيم من أربع وحدات متماثلة في الوزن الجزيئي (Gronenborn وجماعته، 10)، وعليه فأن تقدير الوزن الجزيئي بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد بوجود العوامل الماسخة تعطي الوزن الجزيئي للوحدة الواحدة من جزيئة الأنزيم والتي تظهر بشكل حزمة بروتينية واحدة بسبب امتلاك الوحدات الأربع من الأنزيم نفس الوزن الجزيئي وهذا ما تم ملاحظته من خلال الترحيل الكهربائي، شكل (2).



شكل (1): المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لأنزيم (G6PD) المنقى من عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1 بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للبروتين.



شكل (2): تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم (G6PD) المنقى من عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1 بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للبروتين.

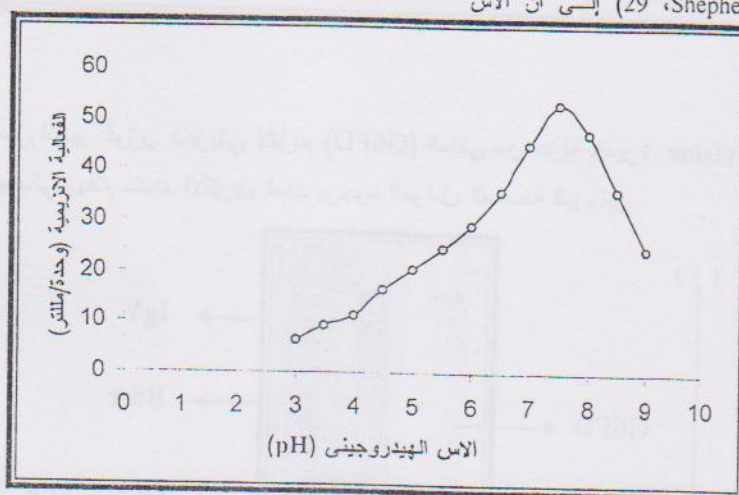
البيدروجيني الأمثل لثبات أنزيم (G6PD) المنقى من فطر *Penicillium duponti* يتراوح بين 5.4 - 7 في حين كان الأس البيدروجيني الأمثل للفعالية 8، ووجد (Anderson و Anderson، 2) أن الأس البيدروجيني الأمثل للفعالية الأنزيم المنقى من بكتريا *Azotobacter vinelandii* بلغ 8.5.

يعزى سبب انخفاض فعالية الأنزيم عند قيم الأس البيدروجيني المتطرفة إلى حدوث تغييرات في هيئة الأنزيم أو الموقع الفعال تؤدي بموجبها إلى فقدان الفعالية الأنزيمية، إذ يؤثر التغيير في قيم الأس البيدروجيني على المجاميع الفعالة القابلة للتأين والموجودة في جزيئة الأنزيم أو على الحالة الأيونية للمادة الأساس (Whitaker، 34).

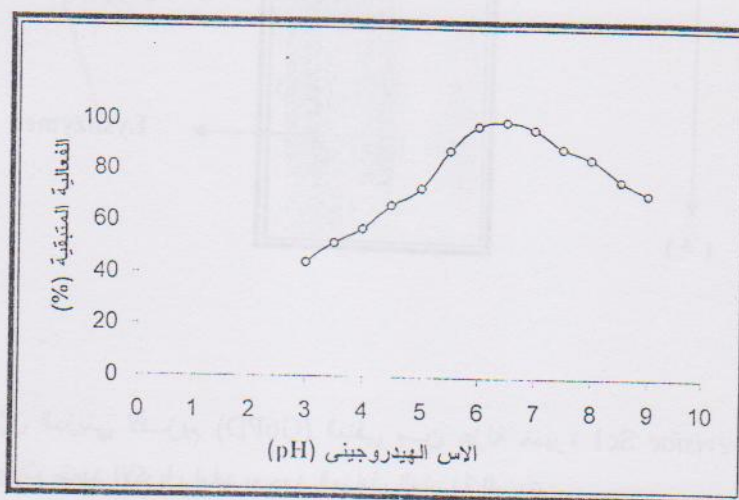
تأثير الأس البيدروجيني (pH) في فعالية وثبات أنزيم (G6PD)

أظهر شكل (3) أن الأس البيدروجيني الأمثل للفعالية أنزيم (G6PD) بلغ 7.5، بينما شيدت الفعالية الأنزيمية عند قيم الأس البيدروجيني المتطرفة 3، 9 انخفاضاً بلغت نسبته 87.97، 54.14% على التوالي، ويلاحظ من شكل (4) أن الأنزيم كان ثابتاً في مدى واسع من قيم الأس البيدروجيني كانت بين 5.5، 8 إلا أنه فقد 55.98، 28.6% من فعاليته الأصلية عند قيم الأس البيدروجيني المتطرفة 3، 9 على التوالي.

جاءت هذه النتائج مقارنة لما توصل إليه (Scott، 25) من أن قيمة الأس البيدروجيني الأمثل للفعالية الأنزيم المنقى من فطر *Neurospora crassa* بلغت 7.4 وما ذكره (Aksoy وجماعته، 1) من أن الأس البيدروجيني الأمثل للفعالية الأنزيم المنقى من مشيمة الإنسان بلغ 7.8، وأشار (Shepherd، 29) إلى أن الأس



شكل (3): منحنى الاس البيدروجيني الامثل لفعالية انزيم (G6PD) المنقى من عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae*. Sc1



شكل (4): منحنى الاس البيدروجيني الامثل لثبات انزيم (G6PD) المنقى من عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae*. Sc1

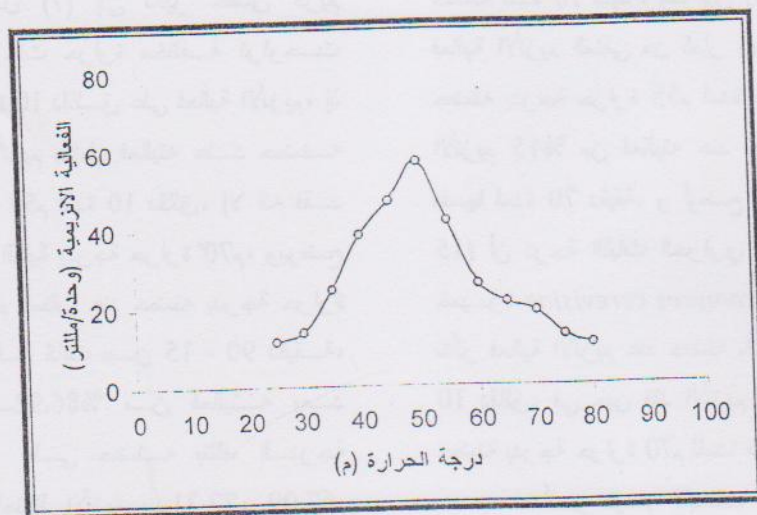
تأثير درجة الحرارة في فعالية وثبات أنزيم (G6PD) وتعيين طاقة التنشيط

أن درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم (G6PD) المنقى من مشيمة الإنسان كانت 50م.

يؤدي ازدياد درجات الحرارة إلى حصول تغييرات واضحة في مكونات التفاعل التي تضم كل من الأنزيم والمادة الأساس (White وجماعته، 35)، مما يؤدي إلى حصول زيادة مستمرة في فعالية الأنزيم بسبب زيادة فرصة حدوث التصادمات Collisions نتيجة لزيادة الطاقة الحركية Kinetic Energy لجزيئات المواد المتفاعلة بفعل تأثير درجات الحرارة، إلا أن ازدياد درجة الحرارة عن الدرجة الحرارية المثلى للتفاعل تؤدي إلى حدوث انخفاض في الفعالية الأنزيمية بسبب تأثيرها بشكل سلبي في مكونات التفاعل (Whitaker، 34).

يشير شكل (5) إلى حصول زيادة واضحة في الفعالية الأنزيمية بازدياد درجة حرارة التفاعل حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 50م، ثم انخفضت الفعالية بشكل تدريجي حتى بلغت 18.04% من فعالية الأنزيم القصوى عند درجة حرارة 80م.

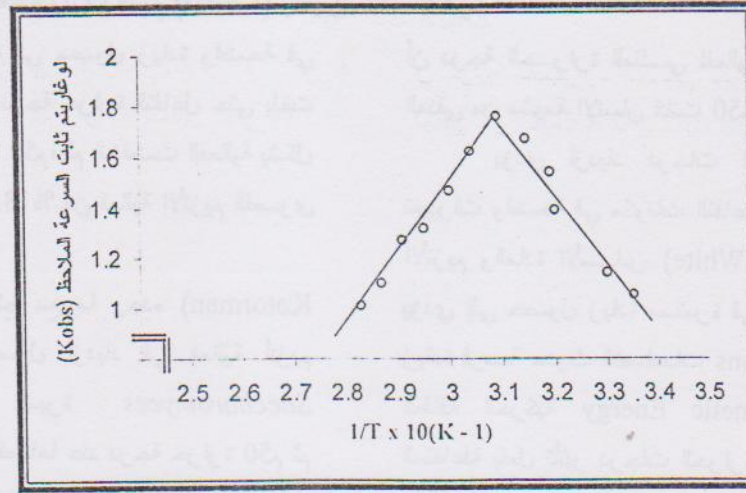
اتفقت هذه النتائج مع ما وجدته (Kotorman وجماعته، 15) من حصول ازدياد في فعالية أنزيم (G6PD) المنقى من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 50م ثم انخفضت لتصل إلى 73.5% من الفعالية القصوى عند درجة حرارة 80م، وأشار (Aksoy وجماعته، 1) إلى



شكل (5): منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم (G6PD) المنقى من عذلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae*. Sc1

وجماعته، 15) من قيمة طاقة تنشيط بلغت 11.8 كيلوسعة / مول للأنزيم المنقى من خميرة *Saccharomyces cerevisiae*، وتباينت مع كل ما وجدته (Shepherd، 29) من أن قيمة طاقة التنشيط للأنزيم المنقى من فطر *Penicillium duponti* قد بلغت 9.57 كيلوسعة / مول، وما أشار إليه (Aksoy وجماعته، 1) من حصولهم على قيمة طاقة تنشيط بلغت 8.16 كيلوسعة / مول للأنزيم المنقى من مشيمة الإنسان.

يظهر شكل (6) العلاقة بين لوغاريتم سرعة تفاعل أنزيم (G6PD) ومقلوب درجة الحرارة المطلقة طبقاً لمعادلة أرينوس، إذ بلغت قيمة طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الأساس إلى ناتج 12.3 كيلوسعة / مول، وتعد هذه القيمة ضمن المدى المعروف لقيم طاقة التنشيط (E_a) لتفاعلات تحويل المادة الأساس إلى ناتج وتقع بين 6 - 15 كيلوسعة / مول (Whitaker، 34). وقد تقاربت هذه النتائج مع ما حصل عليه (Kotorman



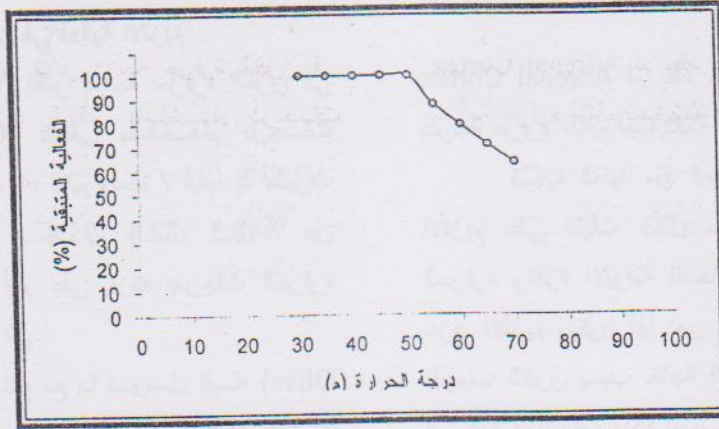
شكل (6): منحنى أرينوس لتقدير طاقة التنشيط لأنزيم (G6PD) المنقى من عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae*. Sc1

حضنه لمدة 70 دقيقة، كما بين (Utarabhand، 32) أن فعالية الأنزيم المنقى من ثمار زيت النخيل لم تتأثر لدى حضنه بدرجة حرارة 55م لمدة 5 دقائق، في حين فقد الأنزيم 15% من فعاليته عند حضنه بالدرجة الحرارية نفسها لمدة 70 دقيقة، و أوضح (Kotorman وجماعته، 15) أن درجة الثبات الحراري للأنزيم المنقى من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* بلغت 50م ولم تتأثر فعالية الأنزيم عند حضنه بتلك الدرجة الحرارية لمدة 10 دقائق، في حين فقد الأنزيم 31% من فعاليته عند حضنه بدرجة حرارة 70م للمدة الزمنية نفسها.

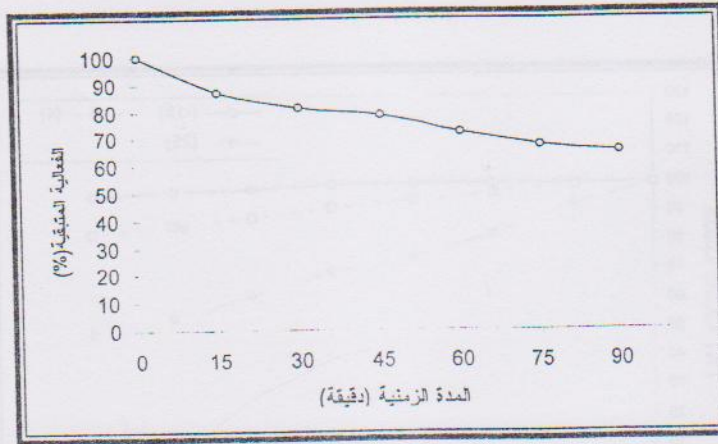
تتأثر قيم الثبات الحراري للأنزيمات غالباً بعوامل عدة منها القوة الأيونية للمحلول الدارئ (Wilder، 36) أو تخصص المادة الأساس أو العامل المرافق (Eriksson و Svensson، 30) أو وجود مواد أخرى مع الأنزيم (Whitaker، 34) أو الأس البيدروجيني للوسط (Segel، 28) أو الوزن الجزيئي للأنزيم (McLellan و Robinson، 20).

يشير شكل (7) إلى تأثير حضن أنزيم (G6PD) المنقى بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 30 - 70م لمدة 10 دقائق على فعالية الأنزيم، إذ يبين الشكل احتفاظ الأنزيم بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة 30 - 50م لمدة 10 دقائق، إلا أنه فقد 36.54% من فعاليته الكلية بدرجة حرارة 70م، ويوضح شكل (8) ثبات الأنزيم المنقى عند حضنه بدرجة حرارة 50م لمدد زمنية مختلفة كانت بين 15 - 90 دقيقة، إذ احتفظ الأنزيم بـ 86.92% من فعاليته بعد مرور 15 دقيقة على حضنه بتلك الدرجة الحرارية، بينما احتفظ الأنزيم بـ 72.31، 67.09، 64.84% من فعاليته عند حضنه لمدة 60، 75، 90 دقيقة على التوالي.

اتفقت النتائج المشار إليها مع ما توصلت إليه العديد من الدراسات المتعلقة بالثبات الحراري لأنزيم (G6PD)، إذ أشار (Shepherd، 29) إلى أن درجة الثبات الحراري للأنزيم المنقى من فطر *Penicillium duponti* بلغت 50م ولم تتأثر الفعالية لدى حضن الأنزيم بتلك الدرجة الحرارية لمدة 10 دقائق، بينما فقد 22% من فعاليته في الدرجة الحرارية ذاتها عند



شكل (7): منحنى الثبات الحراري لأنزيم (G6PD) المنقى من عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1 والمحضن بدرجات حرارة 30 - 70م لمدة 10 دقائق.



شكل (8): منحنى الثبات الحراري لأنزيم (G6PD) المنقى من عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1 والمحضن بدرجة حرارة 50م لمدة زمنية كانت بين 15 - 90 دقيقة

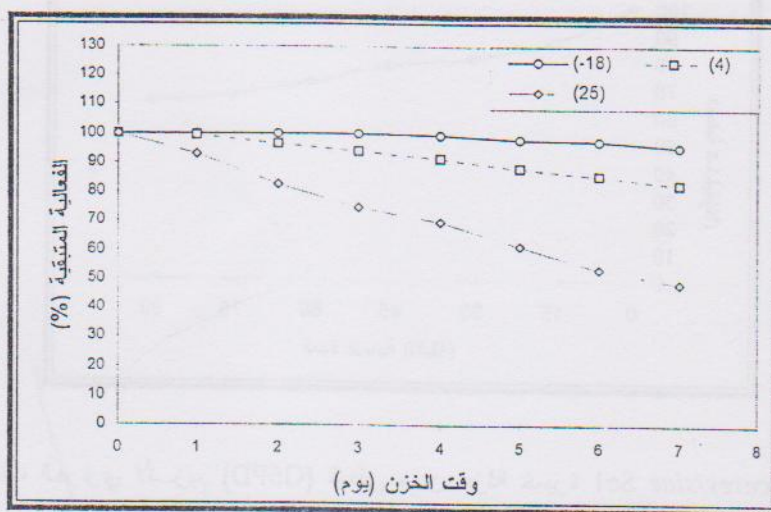
تأثير درجة حرارة الخزن في فعالية الأنزيم

يبين شكل (9) تأثير درجة حرارة الخزن في فعالية أنزيم (G6PD) المنقى باستخدام درجات حرارة مختلفة -18، 4، 25م ولمدة 7 أيام، إذ أظهرت النتائج احتفاظ الأنزيم بـ 95.4، 82.4، 48.3% من فعاليته بعد مرور 7 أيام على خزنه بدرجات الحرارة السابقة الذكر وعلى التوالي.

اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Olive و Levy، 22) من أن أنزيم (G6PD) المنقى من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* فقد 7% من فعاليته الأصلية الابتدائية بعد مرور شيرين عند خزنه بدرجة حرارة -20م، أما (McKerns، 19) فقد أشار إلى أن أنزيم (G6PD) المنقى من Cow

Adrenal Cortex لم يفقد شيئاً من فعاليته عند خزنه بدرجة حرارة -30م لمدة ثلاثة اشهر.

تسبب العديد من العوامل المتداخلة تحديد قدرة الأنزيم على الثبات خلال مدة الخزن، إذ تعد درجة الحرارة والقوة الأيونية للمحاليل الدارئة المستخدمة في خزن الأنزيم ويكون لها دور كبير في ثبات الأنزيم تحت ظروف الخزن بسبب حاجة الشكل الفعال لجزيئة الأنزيم إلى قوة أيونية محددة تضمن بقاءه بشكل ملائم لاتمام عملية الربط والتحليل، إضافة إلى الأنواع الجزيئية Molecular Species والتي تعد من أهم العوامل التي تحدد ثبات الأنزيم خلال مدة الخزن (Heidrich وجماعته، 11).



شكل (9): تأثير درجة حرارة الخزن في فعالية أنزيم (G6PD) المنقى من عذلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* المخزون بدرجات حرارة -18، 4، 25م لمدة 7 أيام.

تأثير كلوريدات المعادن في فعالية الأنزيم

يوضح شكل (10) تأثير عدد من كلوريدات المعادن في فعالية أنزيم (G6PD) المنقى التي اشتملت على كل من $MnCl_2$ ، $AlCl_3$ ، $NiCl_2$ ، $FeCl_2$ ، $MgCl_2$ بتركيزات 1، 5، 10 ملي مولار، إذ يلاحظ أن كلوريد المغنيسيوم كان له دور منشط في فعالية الأنزيم عند التركيزات 1، 5 ملي مولار مقارنة بالأنزيم غير المعامل، فقد ازدادت الفعالية بنسبة 28.91، 31.15% على التوالي، بينما انخفضت الفعالية بنسبة 7.21% عند تركيز 10 ملي مولار، كذلك فقد أظهر كلوريد المنغنيز قدرته على زيادة فعالية الأنزيم المنقى مقارنة بالأنزيم غير المعامل، إذ يلاحظ ازدياد الفعالية بنسبة 12.16، 3.02% عند تركيز 1، 5 ملي مولار، بينما حصل انخفاض للفعالية عند تركيز 10 ملي مولار بمقدار 11%، وأظهر مزيج كلوريد المغنيسيوم والمنغنيز بنسبة 1:1 (وزن:وزن) والمعد بتركيزات 1، 5، 10 ملي مولار انخفاضاً بنسبة 2.63، 14.71، 21.54% من فعاليته الأصلية على التوالي.

يعود السبب في زيادة فعالية الأنزيمات بوجود هذه الأيونات الثنائية الشحنة إلى قدرتها على تكوين أواصر من نوع Co - Ordinate تنتج عنها مركبات معقدة ذات ثمانية اوجه يطلق عليها Octahedral، بينما يعزى الانخفاض الحاصل في الفعالية إلى أن الزيادة في تركيز هذه الأيونات يؤدي إلى تقليل الفعالية كذلك فإن أيون المنغنيز يتميز بكبر حجمه مقارنة بأيون المغنيسيوم وعليه فإنه قد يعمل على حجب الموقع الفعال لجزيئة الأنزيم عن تمييز المادة الأساس والارتباط بها وبالتالي عدم قدرة الأنزيم على إتمام عمله بشكل كامل (Whitaker، 34).

اتفقت النتائج المشار إليها مع ما توصل إليه (McKerns، 19) من أن أيون المغنيسيوم Mg^{+2} بتركيز 1 ملي مولار يسبب زيادة في فعالية الأنزيم المنقى من Cow Adrenal Cortex بنسبة 20% عند استخدام الأس البيدرجيني الأمثل للفعالية، إلا

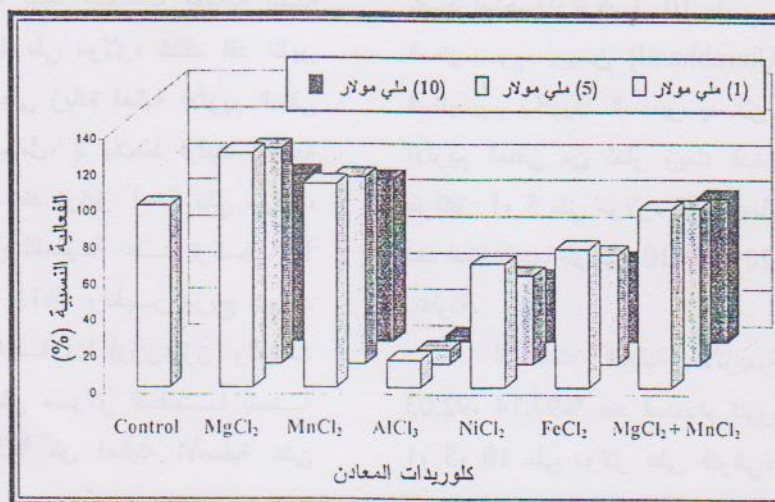
أن إضافة هذا الأيون بنفس النسبة بحدود قيم أس هيدروجيني مختلفة لا يعمل على إحداث زيادة في الفعالية، وأشار (Chilla و Domagk، 9) إلى أن إضافة أيون المغنيسيوم بتركيز 10 ملي مولار إلى الأنزيم المنقى من خميرة *Candida duponti* أعطى فعالية كاملة، في حين أظهرت النتائج المستحصل عليها لأنزيم (G6PD) حصول انخفاض في فعاليته بنسبة 7% عند استخدام تركيز 10 ملي مولار من أيون المغنيسيوم، وبين (Utarabhand، 32) أن كلوريد المغنيسيوم وكلوريد المنغنيز يعملان على تنشيط فعالية الأنزيم المنقى من ثمار زيت النخيل عند استخدامهما بتركيزات 1، 5 ملي مولار، لكنها تعمل على تثبيط فعاليته عند استخدامهما بتركيزات 10، 15، 20 ملي مولار وبنسب متفاوتة.

انخفضت الفعالية الأنزيمية بنسبة 85.45، 92.03، 97.14% عند استخدام كلوريد الألمنيوم بتركيز 1، 5، 10 ملي مولار على التوالي، وعند استخدام كلوريد النيكل بتركيزات 1، 5، 10 ملي مولار فقد الأنزيم 32.72، 51.61، 65.08% من فعاليته على التوالي، بينما انخفضت الفعالية الأنزيمية بمقدار 24.71، 39.48، 55.69% عند استخدام كلوريد الحديدوز بتركيزات 1، 5، 10 ملي مولار على التوالي.

جاءت هذه النتائج مشابهة لما أشار إليه (Cho و Joshi، 8) إلى أن أيونات Al^{+3} بتركيز 10 ملي مولار تعمل على تثبيط الأنزيم المنقى من *Saccharomyces cerevisiae* بشكل كامل بسبب ارتباطها بالموقع الفعال وبالتالي تغيير هيئة الأنزيم ومنع ارتباطه مع المادة الأساس، أما (Cartana وجماعته، 7) فقد أشاروا إلى أن كلوريد النيكل له تأثير تثبيطي على فعالية أنزيم (G6PD) المنقى من *Saccharomyces cerevisiae*، إذ يعد هذا النوع من التثبيط أحد أنواع التثبيط التنافسي Competitive Inhibitors حيث يكون للمثبط القدرة على الارتباط بالأنزيم الحر بسبب ألفته العالية ومن ثم التأثير على ارتباطه بالمادة الأساس، وبين (Szveda)

تقوم الأيونات المعدنية في الحفاظ على جزيئة الأنزيم والإسهام في زيادة فعاليته من خلال مشاركتها في تبادل الإلكترونات أو تقريب الأنزيم والمادة الأساس من بعضها البعض بواسطة روابط مساعدة - Co Ordinate bonds أو مسك المجاميع المتفاعلة في الشكل ثلاثي الأبعاد Three Dimensional Orientation (Whitaker، 34).

و Stadtman، 31) أن معقد سترات الحديدوز Fe^{+2} - Citrate يؤدي إلى تنشيط فعالية الأنزيم المنقى من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* بسبب ارتباط هذا المعقد بالأحماض الأمينية الموجودة في الموقع الفعال وبالأخص الحامض الأميني اللايسين الذي يمتلك مجموعة ϵ - amino، لذا فإن هذا الارتباط سيؤدي إلى حدوث أكسدة لهذا الحامض ومن ثم تغيير هيئة الموقع الفعال مما يؤدي إلى تقليل الفعالية.



شكل (10): تأثير كلوريدات المعادن في فعالية أنزيم (G6PD) المنقى من عذلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1 بتركيزات تراوحت بين 1، 5، 10 ملي مولار.

تأثير المواد الكيميائية في فعالية الأنزيم

12.14، 15.47% على التوالي، وقد جاءت هذه النتائج مشابهة لما أشار إليه (Levy و Olive، 22) من حصول زيادة في فعالية أنزيم (G6PD) المنقى من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* عند استخدام الكربونات $(HCO_3)^{-1}$ بشكل $CaCO_3$ ، $NaCO_3$ ، إذ بلغت الزيادة في الفعالية بنسبة 12.2، 14.9% على التوالي عند استخدام تركيز 10 ملي مولار.

أظهرت العوامل المعدنية الرابطة Metal Binding Agents تأثيراً واضحاً في فعالية الأنزيم، إذ انخفضت الفعالية عند استخدام مركب EDTA بتركيز 0.1، 1، 10 ملي مولار بنسبة 0.1، 31.69، 56.43، 80.84% على التوالي، في حين شهدت الفعالية الأنزيمية

يبين جدول (1) تأثير مجموعة من المواد الكيميائية في فعالية أنزيم (G6PD) المنقى والمستخدمة بتركيزات 0.1، 1، 10 ملي مولار، وقد أظهرت النتائج حصول انخفاض بنسبة الفعالية الأنزيمية بشكل متفاوت وحسب التراكيز لجميع المواد المستخدمة في هذه الدراسة باستثناء كل من $CaCO_3$ ، $NaCO_3$ التي أعطت زيادة في الفعالية الأنزيمية مقارنة بالمواد الأخرى، إذ ازدادت الفعالية الأنزيمية بمقدار 3.74، 9.13، 13.05% بوجود $CaCO_3$ بتركيزات 0.1، 1، 10 ملي مولار على التوالي، بينما حصلت زيادة في الفعالية الأنزيمية عند استخدام $NaCO_3$ بتركيزات 0.1، 1، 10 ملي مولار بنسبة 6.36،

إلى وجود أيون المغنيسيوم الذي يعمل على المساعدة في إتمام التفاعل وعليه فان وجود هذه العوامل تؤدي إلى مسك هذا الأيون ومن ثم تقليل الفعالية الأنزيمية (North، 21).

انخفضت الفعالية بشكل واضح عند استخدام (Mercaptoethanol - 2) بنسبة 40.29، 66.38، 75.86% وبتراكيز 0.1، 1، 10 ملي مولار على التوالي، وهذا يدل على أن أنزيم (G6PD) يتأثر بوجود هذا المركب بسبب احتواء الموقع الفعال فيه على مجموعتين من السلفيدريل (-SH) (McKerns، 19).

وشهدت الفعالية الأنزيمية انخفاضاً ملحوظاً بوجود مركب (1 - fluoro - 2,4 - dinitrobenzene) الذي يكون تأثيره على الأنزيم بشكل غير عكسي، إذ انخفضت الفعالية بنسبة 26.04، 48.17، 67.34% عند تراكيز 0.1، 1، 10 ملي مولار على التوالي، وقد تقاربت هذه النتائج مع ما توصل اليه (Levy و Olive، 22) من أن فعالية الأنزيم المنقى من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* قد انخفضت بنسبة 52، 89% عند استخدام هذا المركب بتركيز 1، 10 ملي مولار على التوالي، وأشار المصدر ذاته الى حدوث انخفاض في فعالية أنزيم (G6PD) بنسبة 40، 81، 92% عند استخدام مركب (5 - Pyridoxal phosphate) وهذا ما لاحظته الباحثان من خلال النتائج المستحصل عليها، إذ حصل انخفاض في الفعالية الأنزيمية بنسبة 37.86، 78.67، 86.42% عند استخدام التراكيز ذاتها وعلى التوالي، إذ يعد هذا المركب مثبط تنافسي مع (G6P) وغير تنافسي مع العامل المساعد (NAD) أو (NADP⁺) (Levy و Olive، 22).

انخفاضاً واضحاً عند استخدام Sodium citrate بلغت نسبته 48.74، 70.65، 91.87% بالتراكيز السابقة الذكر على التوالي، وعند استخدام Sodium azide بتركيز 0.1، 1، 10 ملي مولار انخفضت الفعالية بنسبة 12.74، 34.29، 55.62% على التوالي، في حين شهدت الفعالية انخفاضاً واضحاً عند استخدام Thio urea بالتراكيز نفسها بنسبة 24.97، 69.66، 82.79% على التوالي.

جاءت هذه النتائج مشابهة لما أشار إليه (McKerns، 19) من أن الأنزيم المنقى من Cow Adrenal Cortex يثبط بوساطة العوامل المعدنية الرابطة مثل (PCMB) - Chloromercuribenzoate التي تعمل على منع مجموعة السلفيدريل (-SH) الموجودة في بداية الموقع الفعال من الارتباط بـ (NADP⁺)، إلا أن وجود تراكيز إضافية من (NADP⁺) و (G6P) تعمل على توفير حماية كاملة للأنزيم من تأثير (PCMB)، كما أشار (Szweda و Stadtman، 31) إلى أن مركبات السترات تعمل على تثبيط فعالية أنزيم (G6PD) المنقى من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides*، إذ انخفضت الفعالية بنسبة 33، 48% عند استخدام Sodium citrate بتركيز 5، 10 ملي مولار على التوالي، في حين بين (Utarabhand، 32) أن الأنزيم المنقى من ثمار زيت النخيل فقد 28، 49، 78% من فعاليته عند استخدامه بتركيز 0.1، 1، 10 ملي مولار على التوالي.

تؤدي العوامل المعدنية الرابطة دوراً كبيراً في تثبيط فعالية الأنزيمات التي يشكل فيها أيون المعدن جزءاً أساسياً من تركيب الموقع الفعال أو تلك الأنزيمات التي تحتاج في عملها إلى وجود هذا الأيون لا تمام فعلها على اكمل وجه كما في أنزيم (G6PD) الذي يحتاج في عمله

جدول (1): تأثير المواد الكيميائية في فعالية أنزيم (G6PD) المنقى من عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* بتراكيز كانت بين 0.1، 1، 10 ملي مولار.

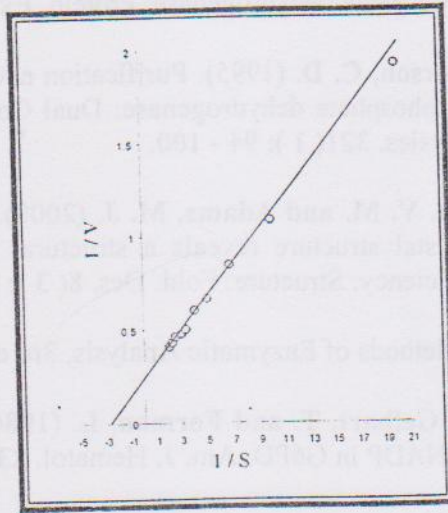
المواد الكيميائية	التركيز (ملي مولار)	الفعالية النسبية (%)
أنزيم غير معالج	-	100
EDTA	0.1	68
	1	44
	10	19
	0.1	51
Sodium citrate	1	29
	10	8
	0.1	87
	1	66
Sodium azide	10	44
	0.1	75
	1	30
	10	17
Thiourea	0.1	104
	1	109
	10	113
	0.1	106
CaCO ₃	1	112
	10	116
	0.1	74
	1	52
1 - fluoro - 2,4 - dinitro benzen	10	33
	0.1	62
	1	21
	10	14
Pyridoxal 5 - phosphate	0.1	60
	1	34
	10	24
2 - mercapto ethanol		

الثوابت الحركية

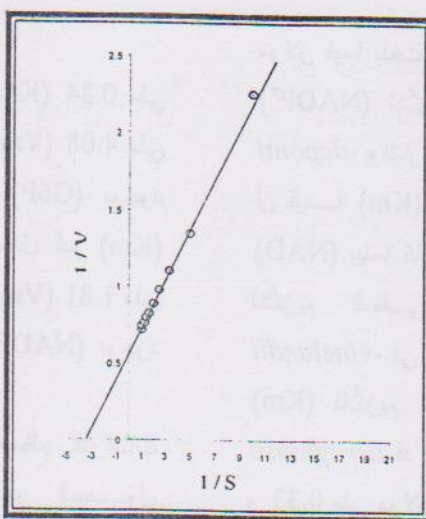
مولار فيما بلغت 0.16 ملي مولار تجاه (G6P) بوجود $(NADP^+)$ للأنزيم المنقى من فطر *Penicillium duponti*، وأشار (Anderson و Anderson، 2) إلى أن قيمة (K_m) قد بلغت 0.22 ملي مولار تجاه (NAD) بينما كانت 0.5 ملي مولار تجاه $(NADP^+)$ للأنزيم المنقى من بكتريا *Azotobacter vinelandii*، في حين بين (Ma وجماعته، 18) أن قيمة (K_m) للأنزيم المنقى من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* قد بلغت 0.53 ملي مولار تجاه (G6P) و 0.33 ملي مولار تجاه $(NADP^+)$.

بلغ معدل قيم ثابت ميكالس (K_m) 0.34 ملي مولار بينما كانت السرعة القصوى (V_{max}) 4.08 ملي مولار / دقيقة للأنزيم المنقى تجاه (G6P) بوجود $(NADP^+)$ (شكل 11)، بينما بلغ معدل قيم (K_m) 0.29 ملي مولار ومعدل قيم (V_{max}) 1.81 ملي مولار / دقيقة للأنزيم المنقى تجاه $(NADP^+)$ بوجود (G6P) (شكل 12).

تتباين قيم (K_m) في معظم الدراسات بسبب اختلاف نوع الأنزيم ومصدر الحصول عليه، فقد أشار (Shepherd، 29) إلى أن قيمة (K_m) تجاه $(NADP^+)$ بوجود (G6P) بلغت 0.43 ملي



شكل (11): الثوابت الحركية لأنزيم (G6PD) Lineweaver - Burk plot المنقى من عذلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1 تجاه (G-6-P) بتركيزات تراوحت بين 0.05 - 0.5 ملي مولار بوجود $(NADP^+)$ بتركيز 0.25 ملي مولار.



شكل (12): الثوابت الحركية لأنزيم (G6PD) Lineweaver - Burk plot المنقى من عذلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Sc1 تجاه (NADP⁺) بتركيز تراوحت بين 0.1 - 1 ملي مولار بوجود (G-6-P) بتركيز 0.5 ملي مولار.

المصادر

- Aksoy, Y.; Ogus, I. H. and Oauzer, N. (2001). Purification and some properties of human placental glucose - 6 - phosphate dehydrogenase. Protein. Expt. Purif. 21(2): 286 - 292.
- Anderson, B. M. and Anderson, C. D. (1995). Purification and characterization of *Azotobacter vinelandii* glucose - 6 - phosphate dehydrogenase: Dual Coenzyme Specificity. Archives of Biochemistry and Biophysics. 321(1): 94 - 100.
- Au, S. W.; Gover, S.; Lam, V. M. and Adams, M. J. (2000). Human glucose - 6 - phosphate dehydrogenase: The crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. Structure. Fold. Des. 8(3): 293 - 303.
- Bergmeyer, H. U. (1984). Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed. Verlag Chemie. Weinheim.
- Beutler, E.; Hartman, K.; Gelbart, T. and Forman, L. (1986). G6PD Walter Reed: Possible insight into "Structural" NADP in G6PD. Am. J. Hematol. 23: 25.
- Broek, P V. D.; Goosen, T.; Wennekes, B. and Braek, H. P. V. D. (1995). Isolation and characterization of the glucose - 6 - phosphate dehydrogenase encoding gen (gsd A) from *Aspergillus niger*. Molecular and General Genetics. 247(2): 229 - 239.
- Cartana, J.; Arola, L. and Romeu, A. (1989). Characterization of the inhibition effect induced by nickel on glucose - 6 - phosphate dehydrogenase and glutathione reductase. Enzyme. 41: 1 - 5.
- Cho, S. and Joshi, J. (1989). Inactivation of bakers yeast glucose - 6 - phosphate dehydrogenase by aluminum. Biochem. USA. 28: 3613.
- Domagk, G. F. and Chilla, R. (1975). Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase from *Candida utilis*. In: Methods in Enzymology. (eds, W. A. Wood). Vol. XLI. Part B: 205 - 208.

- Gronenborn, A. M.; Clore, G. M.; Hobbs, L. and Jeffery, J. (1984). Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase: A transferred nuclear overhauser enhancement study at NADP⁺ conformations in enzyme - coenzyme binary complexes. Eur. J. Biochem. 145: 365 - 371.
- Heidrich, E.; Lorenz, C. and Schreier, P. (1983). Thin - layer isoelectric focusing of partially purified peroxidase from tomato fruit. J. Food Chemistry. 10: 285 - 296.
- Jeffery, J.; Persson, B.; Wood, I.; Bergman, T.; Jeffery, R. and Jornvall, H. (1993). Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase: Structure - function relation ship and the *Pichia jadinii* enzyme structure. Eur. J. Biochem. 12(1): 41 - 49.
- Kahn, A.; Boivin, P and Lagneau, J. (1972). Etude cinetique et thermodynamique de la glucose - 6 - phosphate deshydrogenase erythrocytaire chez l homme. Application a 7 variantes differetes de la race noire. Biochimie. 54: 775 - 785.
- Kahn, A.; North, M. L.; Cottreau, D; Giron, G. and Lang, J. M. (1978). G6PD Vientiane: A new glucose - 6 - phosphate dehydrogenase variant with increased stability. Hum Genet. 43: 85 - 89.
- Kotorman, M. Simon, L. M. and Szajani, B. (1994). Coenzyme production using immobilized enzyme. III: Immobilization for glucose - 6 - phosphate dehydrogenase from bakers yeast. Enzyme and Microbial Technology. 16(11): 974 - 978.
- Levy, H. R. (1985). The effect of oxidized glutathion on NADPH in hibition of glucose - 6 - phosphate dehydrogenase is indirect. Biochemical. J. 231: 806 - 807.
- Lowry, O. H. Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biological Chem. 193(1): 265 - 275.
- Ma, J. F.; Hager, P. W.; Howell, M. L.; Phibbs, P. V. and Hassett, D. J. (1998). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* zwf gene encoding glucose - 6 - phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (Paraquat). J. Bacteriol. 180(7): 1741 - 1749.
- McKerns, K. W. (1975). Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase from cow adrenal cortex. In: Methods in Enzymology. (eds. W. A. Wood). Vol. XLI. Part B. 188 - 196.
- McLellan, K. M. and Robinson, D. S. (1987). The heat stability of purified spring cabbage peroxidase iso enzyme. Food Chemistry. 26: 97 - 107.
- North, M. J. (1982). Comparative biochmistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. Microb. Rev. 49: 308 - 340.
- Olive, C. and Levy, H. R. (1975). Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. In: Methods in Enzymology. (eds. W. A. Wood). Vol. XLI. Part B. 196 - 201.
- Ozols, J. (1993). Isolation and the complete amino acid sequence of lumenal endoplasmic reticulu glucose - 6 - phosphate dehydrogenase. Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America. 90(11): 5302 - 5306.
- Reilly, K. E. and Allred, J. B. (1995). Glucos - 6 - phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces serevisiae* is a glycoprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 216(3): 993 - 998.
- Scott, W. A. (1975). Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase from *Neurospora crassa*. In: Methods in Enzymology. (eds. W. A. Wood). Vol. XLI. Part B: 177 - 182.
- Segade, R.; Lgnacio, J.; Martines, R. and Fereire, M. (1985). Reversal effect of oxidized glutathione on the inhibition of glucose - 6 - phosphate dehydrogenase by NADPH. Bio. Chemical. J. 231: 805 - 806.
- Segel, I. H. (1975). Enzyme Kinetics, Behavior Analysis of Rapid Equilibrium and Steady state Systems. Wiley Interscience, New York.
- Segel, I. H. (1976). Biochemical Calculation, Jon Wiley and Sons, Inc. New York.
- Shepherd, M. G. (1975). Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase from *Penicillium duponti*. In: Methods in Enzymology. (eds. W. A. Wood). Vol. XLI. Part B: 201 - 205.

- Svensson, S. G. and Eriksson, C. E. (1971). Thermal inactivation of lipoxygenase from peas (*Pisum sativum* L.). Lebensm. Wiss. U. Technol. 5(4): 118 - 123.
- Szweda, L. I. and Stadtman, E. R. (1993). Oxidative modification of glucose - 6 - phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* by an iron (II) - citrate Complex. Archives of Biochemistry and Biophysics. 301(2): 391 - 395.
- Utarabhand, P. (1994). NADPH generating enzyme in oil palm. Biotechnology and Biology Diversity. 212: 1 - 5.
- Weber, K and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecel sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244(16): 4406 - 4412.
- Whitaker, J. R. (1972). Principle of Enzymology for Food Sciences. Marcel Dakker, Inc. New York.
- White, A.; Handler, P. and Smith, E. (1973). Principles of Biochemistry. Mc Graw - Hill Book Company. New York.
- Wilder, C. J. (1962). Factors affecting heat inactivation and paratial reactivation of peroxidase purified by ion exchang chromatography. J. Food Sci. 27: 567 - 573.

Characterization of Glucose - 6 - Phosphate Dehydrogenase (G6PD) That Purified From
Locally Isolated Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Sc1

* M. A. Al - Soufi

Dept. of Food Science & Biotechnology
College of Agriculture, University of
Tikret

H. M. Al - Obiday

Dept. of Food Science & Biotechnology
College of Agriculture, University of
Baghdad

Abstract

The molecular weight of the (G6PD) was 56 KDa as determined by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions, the pH optimum of the enzyme was 7.5 and the pH stability profile showed that the enzyme was most stable at pH values 5.5 - 8. The optimum temperature for enzyme activity and stability was 50C°. The enzyme lost 4.6, 17.6 and 51.7% of its original activity after 7 days storage at -18, 4 and 25C° respectively. The activation energy for conversion of substrate to product was 12.3 Kcal/ mol.

It was noticed that the metal chlorides MgCl₂, MnCl₂ activated the enzyme activity. Meanwhile, AlCl₃, NiCl₂ and FeCl₂ showed inhibition of the enzyme activity. However, Na₂CO₃ and Ca₂CO₃ was activator agent of the enzyme, Meanwhile, the chelating agents and the reducing compounds inhibited the enzyme activity. Kinetic studies showed (Km) and (Vmax) values for (G-6-P) at optimum (NADP⁺) concentration, 0.34 and 4.08 mM / min respectively, and for (NADP⁺) at optimum (G-6-P) concentration, 0.29 and 1.81 mM / min respectively.

* Part of Ph.D. thesis of the first author