دراسة تأثير الايونات المعدنية و العوامل المختزلة والكلابية ومواد الشد السطحي والمواد الصابونية على فعالية انزيم اللاييز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة

بتول محمود الانصاري علي احمد ساهي ضياء فالح الفكيكي

الملخص

اجريت الدراسة لمعرفة تأثير الايونات المعدنية والعوامل المختزلة والكلابية في فعالية اللاييز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة واظهرت النتائج ان لايونات الزئبقيك والخارصين والحديدوز بتركيزي 1 و5 ملي مولاري تاثير تثبيطي في فعالية الإنزيم، اذ بلغت الفعالية المتبقية 63.2 و68.9 و66.1% على التوالي، في حين احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند تركيز 5 مولاري بوجود ايونات الكالسيوم والبوتاسيوم. كمااظهرت العوامل الكلابية والمختزلة أن لل EDTAعملا تنشيطيا عند حضنه مع اللاييز بتركيزي 1 و5 ملي مولاري. ولوحظ ان اللاييز لا ينتمي الى مجموعة الانزيمات الفلزية(metalloenzyme).اما اليوريا فكان لها عمل تنشيطي على فعالية الانزيم عند تركيزي1 و5 مولاري، في حين بلغت الفعالية المتبقية للانزيم 86.2%عند حضنه مع 1% Mercaptoethanol -2، بينما كانت الفعالية المتبقية للانزيم عند حضنه مع كل من Hydrogen peroxide وSodium hypochlorid 74.7 و75.8 % على التوالي بتركيز 0.1%. ولوحظ ان لمواد الشد السطحي تاثيرا واضحا في فعالية الانزيم عند تركيزي 1 و5 %،اذ احتفظ الانزيم بفعاليته كاملة عند حضنه مع كل من Triton X- 100 وTween 20 عند تركيز1%.وبينت النتائج ان فعالية اللاييز اظهرت ثباتية عالية في وجود المنظف Sar ،إذ بلغت الفعالية المتبقة 99.1%.

المقدمة

حظيت لاييزات البذور اهتماماً كبيراً في الاونة الاخيرة بعدها محفزات بايولوجية وهي اكثر اماناً وصديقة للبيئة واظهرت مزايا عديدة تفوقت بها على اللاييزات الميكروبية والحيوانية كالخصوصية وانخفاض التكلفة وتوفرها وسهولة عزلها وتنقيتها وامكان استخدامها بديلا للانزيمات التجارية واستعمالها في الصناعات الغذائية وصناعة المنظفات ودباغة الجلود وصناعة المستحضرات الصيدلانية والدوائية(16) . يوجد انزيم اللاييز على نطاق واسع في الطبيعة ولكن تم العثور على تراكيز عالية نسبيا في البذور وبالخصوص البذور الزيتية الغنية بنسبة الكليسيريدات الثلاثية التي تكون مصدر طاقة كامنة في النباتات التي تنمو حديثا وبشكل عام تكون البذور غنية بالكليسيريدات الثلاثية وفي اثناء مرحلة الانبات لايمكن للبذور ان تستفاد منها الابوجود اللاييزات التي تنشط اثناء مرحلة الانبات لتحرر الاحماض الدهنية من اجل توفير الطاقة اللازمة لعملية الانبات(12).لذا يهدف البحث الى دراسة تاثير الايونات المعدنية والعوامل المختزلة والكلابية ومواد الشد السطحي والمواد الصابونية في فعالية اللاييز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة.

المواد وطرائق البحث

تأثير الايونات المعدنية والمركبات الكلابية والمختزلة في فعالية انزيم اللاييز المنقى

استخدم في هذه الدراسة انزيم اللاييز المنقى بعد استخلاصه من بذور فول الصويا المنبتة حسب طريقة Abigor وجماعة (4) مع اجراء بعض التحويرات عليها. طحنت بذور فول الصويا غير المنبتة والمنبتة ومزجت مع محلول الاستخلاص المبرد (الذي اعطى اعلى فعالية نوعية للانزيم) وبنسبة خلط 10:1 (وزن/حجم)، وضع المستخلص

جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.

كلية الزراعة ،جامعة البصرة، البصرة، العراق.

على المحرك المغناطيسي لمدة 3 ساعات في حمام ثلجي، رشح المستخلص بقماش ململ واجري النبذ المركزي للمستخلص عند حرارة 4 م° بسرعة (7000 xg) لمدة 30 دقيقة، وكان الناتج الحاصل عليه هي طبقة الدهن في الاعلى والراسب في الاسفل والراشح، ازيلت الطبقة الدهنية وهمل الراسب، قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين للراشح لاستخراج الفعالية النوعية. حضرت كل من المحاليل الأيونية والمركبات الكلابية والمختزلة بتركيزين 1و5 ملي مولاري لكل من كلوريد الصوديوم، وكلوريد البوتاسيوم، كلوريد الكالسيوم، كلوريد الزئبقيك، كبريتات الحديدوز، يوريا، كبريتات الخارصين، EDTA وحضر كل من 2- مركبتوايثانول، بيروكسيد الهيدروجين، هايبوكلوريد الصوديوم بتركيز 1% وذلك بإذابتها في كمية من الماء المقطر الخالي من الايونات. وقدرت الفعالية الانزيمية بحضن 1 مل من الإنزيم المنقى مع 1 مل من كل تركيز من تراكيز المحاليل المذكورة آنفا بصورة منفصلة على حرارة 37 م° لمدة 60 دقيقة، ثم نقلت الأنابيب مباشرة إلى حمام ثلجي، وقدرت الفعالية الإنزيمية على أساس الفعالية المتبقية وحسب طريقة Akpinarو Degerli(10) وعبر عن الفعالية الإنزيمية المتبقية كنسبة مئوية(%).

تأثير مواد الشد السطحي وبعض المواد الصابونية في فعالية انزيم اللاييز المنقى

حضرت مواد الشد السطحي بتركيزين (1 و5) % (وزن:حجم) بصورة منفصلة لكل من المواد المستعملة التالية: Triton X-100, Tween 80 ,Tween 20 وتم تحضير محلول SDS بتركيز 0.1 %. حضرت مجموعة من المواد الصابونية التجارية التالية Sar ,Taje ,Doux Pearl, بتركيز0.1 % بنسبة (وزن:حجم). حضن 1مل من الانزيم المنقى مع 1مل من كل مادة بشكل منفصل عند حرارة 37 م° لمدة 60 دقيقة وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية كنسبة مئوية(%) وحسب طريقة كل من Kumarasinghe و Weerasooriya(17).

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج المبينة في جدول(1) الفعالية المتبقية للاييز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة إذ اظهر كلوريد الزئبقيك بتركيزي 1و5 ملي مولاري انخفاضا في الفعالية الإنزيمية إذ بلغت الفعالية المتبقية للاييز 75.0و63.2% على التوالي، في حين بلغتا الفعالية المتبقية 97.0و94.8% عند معاملة الإنزيم مع كلوريد الصوديوم بالتراكيز نفسها وقد اظهر كل من كلوريد الكالسيوم و كلوريد البوتاسيوم بتركيز5 ملي مولاري عملا تنشيطيا في فعالية الانزيم اذ بلغتا الفعالية الإنزيمية المتبقية 106.0و100.6% على التوالي.

جدول1: تأثير الايونات المعدنية في فعالية اللاييز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة

المواد الكيميائية	التركيز (ملي مولاري)	الفعالية المتبقية (%)
إنزيم غير معامل	_	100
$HgCl_2$	1	75.0
	5	63.2
NaCl	1	97.0
	5	94.8
$CaCl_2$	1	97.0
	5	106.0
KCl	1	97.0
	5	100.6
$ZnSO_4$	1	77.5
	5	68.9
$FeSO_4$	1	71.8
	5	66.1

في حين بلغتا الفعالية المتبقة 77.5 و68.9 % عند معاملة الانزيم مع كبريتات الخارصين بتركيزي 1و5 ملي مولاري على التوالي، وادت كبريتات الحديدوز انخفاضا واضحاً في فعالية الانزيم اذ قدرت الفعالية الانزيمية

المتبقية للاليبيز 71.8 و66.1 % على التوالي عند معاملتها بتركيزي 1و5 ملي مولاري. تقوم الايونات المعدنية في الحفاظ على جزيئة الإنزيم والإسهام في زيادة الفعالية من خلال مشاركتها في تبادل الالكترونات أو تقريب الإنزيم والمادة الخاضعة من بعضها البعض بواسطة روابط مساعدة او مسك المجاميع المتفاعلة في الشكل الثلاثي الأبعاد (2).يوضح جدول (2) تأثير عدد مـــن العوامل المختزلة والكلابية في الفعالية المتبقية وهي EDTA وUrea بتركيـــز1و5 ملي مولاري و2-Mercaptoethanolو Hydrogen peroxide و Sodium hypochlorideبتركيز 1%. اذ بينت النتائج أن للـ EDTA عملا تنشيطيا عند حضنه مع اللاليبيز بتركيزي 1 ملي مولاري إذ بلغت الفعالية المتبقية 100.6% ولكنه تاثر قليلا عند التركيز 5 ملي مولاري فكان 97.0% وقد يدل ذلك على عدم انتماء اللاليبيز قيد الدراسة لمجموعة الانزيمات الفلزية (metalloenzyme) التي تمتاز بان ايون الفلز يمثل مركبا اساسا في الموقع الفعال للانزيم . يعتمد عليه في فعاليته (9)، اذ يعد هذا المركب من العوامل المخلبية التي تعمل على سحب ايونات المعادن ثنائية الشحنة الموجودة في تركيـب الانزيم او في وســط التفاعل. وقد لاحظ كل من Ezema ،Eze و(11) ان EDTA اظهر تاثير طفيفا في فعالية اللاليبيز المنقى من بذور البطيخ الابيض وهذا يدل على ان الانزيم لاينتمي الى الانزيمات الفلزية في حين كانت النتيجة غير متفقة مع ما وجده Gadge وجماعته(12) ان لـ EDTA تاثير مثبطا في الفعالية الانزيمية للاليبيز المستخلص من بذور فول الصويا المنبتة. وبينت النتائج لدراسات اخـرى Gaur وجماعته (13) عدم وجود اي تاثير في فعاليـــــة الانزيم المعـــــزول من بكتريا pseudomonas aeruginosa psA بوجود EDTA، كذلك وجد عبدالحميد وجماعته (3) عدم تاثر الانزيم عند معاملته بالـ EDTA ويعزى كل منهم ذلك الى ان الانزيم لاينتمي الى مجموعة الانزيمات الفلزية. أشارت النتائج في الجدول نفسه الى أن فعالية الانزيم انخفضت بوجود اليوريا Urea إذ بلغت الفعالية 83.0 و80.0 % بتركيزي 1 و5 ملي مولاري على التوالي، قد يعزى ذلك الى تأثر تركيب وطبيعة البروتين في الظروف والتراكيز المستعملة لليوريا. أما Mercaptoethanol -2 فقد بلغت الفعالية المتبقية للانزيم 86.2 % عند تركيز 1%، في حين انخفضت فعالية الانـــزيم عند اضافة بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide وهايبوكلورات الصوديوم Sodium hypochlorid بتركيز 1% اذ كانت 74.7 و75.8% على التوالي. وكانت هذه النتائج مقاربة لما وجده كل من Kumarasinghe و Weerasooriya(17) اذ بلغت الفعالية المتبقية عند اضافة بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide وهايبوكلورات الصوديوم Sodium hypochlorid بتركيز1% الى اللاليبيز المستخلص من بذور نبات المطاط فكانتا 72.14 و76.2% على التوالي. ومن تلك النتائج يمكن استنتاج إن عدم تأثر الإنزيم كثيرا في المادة المختزلة Mercaptoethanol – 2 يعود الى ان الانزيم يمتلك مجموعة سلفهايدريل (SH-) في الموقع الفعال إذ إن هذه المادة تكسر الأواصر ثنائية الكبريت (S-S) وتغير تركيب الانزيم ثمَ فقدان فعاليته (7) لذا تضاف مواد مختزلة كالسستين مثلا وعوامل كلابية مثل EDTA إلى وسط تفاعل هذا النوع من الإنزيمات تقوم بالمحافظة على مجموعة السلفهايدريل بدون أكسدة وتقوم الثانية بسحب ايونات المعادن التي قد توجد في الوسط وتؤدي إلى أكسدة مجموعة السلفهايدريل وتثبيط فعالية الإنزيم (5) .بين جدول (3) تاثير مجموعة مواد الشد السطحي في فعالية اللاليبيز المنقى من فول الصويا المنبتة والمستعملة بتركيز1 و5 (حجم/حجم %)، وقد بينت النتائج ان لمواد الشد السطحي تاثيرا واضحا في فعالية الانزيم اذ ارتفعت فعالية الانزيم عند استعمال Triton X-100 وبلغت 112% عند تركيز 1%، بينما انخفضت الفعالية الى 97% عند تركيز 5%، في حين احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند استعمال Tween 20 بتركيز 1% وانخفضت الفعالية الى 89% بتركيز 5%، كما ارتفعت فعالية الانزيم 109% عند استعمال Tween 80 بتركيز 5% وانخفضت الى 86% عند تركيز1% ويعود سبب زيادة الفعالية يعود الى ان مواد الشد السطحي تحسن من كفاءة التفاعل عند اضافتها فتسهل وصول المادة

الخاضعة الى الانزيم من خلال زيادة ثباتية السطح البيني، وتزيد من مساحة السطح البيني للدهن – الماء. اما الانخفاض في فعالية اللايبيز قد يعزى الى منحه الكثير من الشحنات الموجبة على السطح البيني مما يزيد من تنافر القوى الالكتروستاتيكية بين الانزيم والسطح البيني في حالة الاستحلاب لمادة التفاعل (13,6,1). اما الفعالية المتبقية عند استعمال SDS بتركيزي 1و5% فبلغتا 94 و91% على التوالي وجاءت هذه النتيجة غير مقاربة لما وجده كل من Kumarasinghe و Weerasooriya(17) اذ ان الفعالية المتبقية للايبيز المنتج من بذور المطاط الناضجة بلغت 103.63 % عند استعمال SDS بتركيز 1%. في حين وجد كل من Akpinar و Gorgun (14) ان لـ SDS وTriton X-100 تاثيرا مثبطا قويا للايبيز المنقى من كبد سمك الكارب Cyprinus carpio L. ولاحظا ان Triton X-100 قد ثبط الانزيم عند حضنه لمدة 2 ساعة، واكدا ان تاثير مواد الشد السطحي يعتمد في كمية المادة المضافة كما ان اللايبيزات المنقاة تختلف باختلاف مصادرها. في حين بلغتا الفعالية المتبقية 86 و79% للايبيز المعزول من بكتريا Bacillus cereus عند اضافة SDS بتركيزي 0.05 و0.5 % على التوالي (8).

جدول 2: تاثير بعض المركبات المختزلة والكلابية في فعالية اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة

المواد الكيمياوية	التركيز	الفعالية المتبقية (%)
انزيم غير معامل	–	100
EDTA	1 (ملي مولاري)	100.6
	5 (ملي مولاري)	97.0
يوريا	1 (ملي مولاري)	.083
	5 (ملي مولاري)	.080
مركبتوايثانول2-	1 % (حجم/حجم)	86.2
بيروكسيد الهيدروجين	1 % (حجم/حجم)	74.7
هايبوكلورات الصوديوم	1 % (حجم/حجم)	75.8

جدول 3: تاثير بعض مواد الشد السطحي في فعالية اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة

مواد الشد السطحي	التركيز (حجم/حجم) %	الفعالية المتبقية (%)
انزيم غير معامل	–	100
Triton X- 100	1	112
	5	97
Tween 20	1	100
	5	89
Tween 80	1	86
	5	109
SDS	1 (وزن/ حجم)%	94
	5 (وزن/ حجم)%	91

يبين جدول(4) تاثير كل من المنظفات التجارية(Doux , Taje , Sar , Pearl) وعند تركيز 0.1% اذ ان فعالية اللايبيز اظهرت ثباتية عالية في وجود المنظف Sar وبلغت الفعالية المتبقية99.1%. وكانت هذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه كل من Kumarasinghe وWeerasooriya(17)اذ وجدا ان اللايبيز المستخلص من بذور المطاط اظهرت ثباتية عالية في وجود المنظف Sunlight فكانت الفعالية المتبقية 88%. وذكرا ان اللايبيز المناسب لصناعة المنظفات يجب ان يكون ذو ثباتية حرارية وطبيعة قاعدية محبة للماء وقادر على العمل في وجود بقية مكونات الخلطة الاخرى. بينما وجدMogensen وجماعته (15) ان التراكيز القليلة من مواد التنظيف الايونية وغير الايونية والثنائية الايون زادت من فعالية اللايبيز المنقى من بكتريا Thermomyces lanuginosus ولكن

انخفضت بالتراكيز العالية منها. وجدوا في دراسة لهم Gorgun، Akpinar و(14) ان لـ SDS و Triton X-100 تاثيرا مثبطا قـويا للايبيز المنقى مـــن كبد سمك الكارب Cyprinus carpio L. ولاحظـوا ان Triton X-100 قد ثبط الانزيم عند حضنه لمدة 2 ساعة، واكدوا ان تأثير مواد الشد السطحي يعتمد على كمية المادة المضافة كما ان اللايبيزات المنقاة تختلف باختلاف مصادرها.

جدول 4: تاثير بعض المنظفات التجارية في فعالية اللايبيز المنقى من بذور فول الصويا المنبتة

المواد الصابونية	التركيز %	الفعالية المتبقية %
انزيم غير معامل	0	100
Doux	0.1 (حجم/حجم)	83.6
Taje	0.1 (حجم/حجم)	81.9
Sar	0.1 (وزن/حجم)	99.1
Pearl	0.1 (وزن/ حجم)	83.0

المصادر

1- السراجي، عمار ياسر جاسم (2009). تنقية وتوصيف لايبيز البنكرياس الكبدي لسرطان البحر (Portunus Pelagicus (Linnaeus, 1758). رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة.

2- دلالي، باسل كامل (1983). فهم الإنزيمات. مطابع جامعة الموصل – جامعة الموصل.

3- عبد الحميد، علياء معن، و محمد خليفه خضير و مينا صباح فرمان (2013). انتاج وتنقية انزيم اللايبيز Lipase من العزلات المحلية لبكتريا pseudomonas cepacial ودراسة بعض الظروف المؤثرة في فعاليتة .مجلة ديالى للعلوم الزراعية، 5 (2): 436-450 .

4- Abigor, R. D.; P. O. Uadia; T. A. Foglia; M.J. Haas; K. Scott and B. J. Savary(2002).Partial purificationand properties of lipase from germinating seeds of Jatropha curcas. L. Journal of the American Oil chemist's Society, 79 (11): 1123-1126.

5- Arnon, R. (1970).Papain. In: Methods in enzymology (eds. G. E Perlmand and L. Lorand).Vol XIX.

6- Aryee, A .N. A.; B. K. Simpson, and R. Villalonga (2007).Lipase fraction from viscera of grey mullet (Mugil cephalus). Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. Journal of Enzyme and Microbial Technology, 40: 394-402.

7- Budhiraja, R.P. (2004). Separation chemistry. New age international (P) ltd. ISBN.13: 987-989.

8- Chen, S.; l. qian, and B. Shi (2007). Purication and properties of enantio selective lipase from a newly isolated bacillus cereus71. Process Biochemistry,42: 988-994.

9- Colla, M. C.; S. Rezzadori; J. Debon; M. Tibolla and J. Costa (2009). A solid state bioprocess for selection liase- producing filamentous fungi . National institute of health Pup-med. Index of medline

10- Degerli, N. and M. A. Akpinar (2002). Partial purification of intestinal triglyceride lipase from Cyprinion macrostomus (Heckel, 1843) and effect of pH on enzyme activity.Turk. Journal of Biology, 26: 133-143.

11- **Eze, S. O. O. and B. O. Ezema (2012). Purification characterization of lipase (EC 3.1.1.3) From the seede of cucumeropsis manni (white melon) thai. Journal of Agricultureal,45(2):115-120.**

12- **Gadge, P.P.; S.D. Madhikar; J.N. Yewle; U.U. Jadhav; A. P. Zambare and M.V. Padul. (2011). Biochemical studies of lipase from germinating oil seeds (Glycine max). American journal Biochemsitry and Biotechnologye, 7 (3): 141-145.**

13- **Gaur, R. A.; R. Gupta and S. K. Khare(2008). Purification and characterization of lipase from solvent tolerant Pseudomonas aeruginosa PseA. Process Biochemistry, 43: 1040–1046.**

14- **Gorgun S. and M.A. Akpinar (2012) Purification and characterization of lipase from the Liver of Carp, Cyprinus carpio L. Living in Lake Tödürge (Sivas, Türkiye)Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 12: 207-215.**

15- **Mogensen, J. E.; P. Sehgal and D. E. Otzen, (2005). Activation, inhibition, and destabilization of Thermomyces lanuginosus lipase by detergents. Biochemistry, 44(5): 1719-1730**

16- **Seth, S. ; D. Chakravorty; V. K. Dubey and S. Patra (2014).An insight into plant lipase research – challenges encountered. Protein Expression and Purification, 95: 13–21.**

17- **Weerasooriya M.K.B. and A.A.N Kumarasinghe (2012). Isolation of alkaline lipase from rubber seed- partial purification,characterization and its potential applications as a detergent additive. Indian Journal of Chemistry and Technology, 19: 244-249**

STUDY OF EFFECTS OF METAL IONS, CHELATING AND REDUCING AGENTS, SURFACTANTS AND DETERGENTS AGENTS ON THE PURIFIED LIPASE ENZYME ACTIVITY FROM GERMINATION SOY BEAN SEED

B. M. Alansari A.A. Sahi D. F. Alfekaik

ABSTRACT

This study is conducted to know the effectness of metal ions and reducing and chelating agent on the activity of purified lipase enzyme from germination soy bean seed. The results showed that ions of mercury and zinc ions and ferrous at concentrations of (1 and 5) m M have an inhibition effect on enzyme activity, as the remaining activity reached the values 63.2 .68.9 and 66.1% respectively , while the enzyme kept its total activity at concentration of 5 m M in the presence of calcium and potassium ions. The chelating and reducing agents showed that EDTA has an active rule when the enzyme incubated with 1 and 5 mM of lipase. And it was noticed that lipase dosn´t belong to the metalloenzyme group. For urea , it has an active rule on the enzyme activity at 1 and 5 M ,where remaining activity for the enzyme reached 86.2 % when incubated with 1 % 2-mercaptoethanol while it was 74.7 and 75.8 % respectivly when incubate with 1% of Hydrogen peroxide and Sodium hydrochloride respectively. Concentration, for enzyme kept its total activity when incubate with Triton X-100 and Tween 20 at concentration 1%. While lipase activity did n´t effected by adding commercial detergents, it also showed a high stability in present of Sar detergent where as residual activity reached 99.1 % .

Part of Ph.D Thesis of first author.
College of Agric., Basrah Univ., Basrah, Iraq.