مجلة الزراعة العراقية مجلد15 عدد1 ص130-137 شباط/2010

دراسة تأثير أنزيمات الخلايا البيض المحللة للدهون في لبيدات الحليب وتحديد الظروف المثلى لعملها

مروان خالد حسون* جاسم محمد صالح السعدي** عامر محمد علي صالح*

الملخص

أجريت هذه الدراسة للتعرف على تأثير أنزيمات الخلايا البيض الموجودة بشكل طبيعي في الحليب على تحليل دهون الحليب والظروف المثلى لعملها. كانت قيم الحموضة ΔADV **1.863** ، **3.525** ، **3.818** ، **4.706** لدى اضافة **2.5** ، **5** ، **7.5** ، **10%** على التوالي من مجنس عالق الخلايا البيض المعزولة من حليب طبيعي وذلك بعد مرور **72** ساعة على حضن الحليب في **4°م**.

حددت أفضل الظروف اللازمة لفعالية لايبيزات الخلايا البيض اتجاه مادتي الاساس وهما ثلاثي بيوترين والانترا لبيد، اذ كان أفضل أس هيدروجيني وأفضل درجة حرارة وأفضل تركيز للمادة الأساس (للايبيزات مجنس عالق الخلايا البيض) هي **7.5** ، **40°م**، **2%** على التوالي و لكلتا مادتي الاساس.

المقدمة

ان المستوى المرتفع للحوامض الدهنية الحرة والفعالية العالية للايبيز في حليب الضرع الملتهب قد تعزى الى الزيادة في اعداد الخلايا البيض التي من المحتمل تضيف لايبيز آخر الى لايبيز الحليب الطبيعي، اضافة الى ان انزيمات الخلايا البيض المحللة للبروتين قد تعمل على فك ارتباط انزيم ليبوبروتين لايبيز غير الفعال من الجسيمة الكازينية وتحوله الى انزيم اكثر نشاطاً (**16**).

تتباين أعداد الخلايا الجسمية في الحليب بأختلاف الظروف البيئية والصحية للحيوانات وقد ذكر **Murphy** وجماعته **(14)** أن تركيز الحوامض الدهنية الحرة في الحليب يزداد بزيادة أعداد الخلايا البيض فيه.

لقد أوضح **Lee** وجماعته **(13)** أن الخلايا البلعمية الكبيرة الموجودة في الحليب لها القدرة على أبتلاع كميات كبيرة من دهن الحليب, ومن ثم تحليله وهي الميكانيكية لتحليل دهن الحليب إذ تمتلك الخلايا البلعمية الكبيرة والتي هي أحدى أنواع الخلايا البيضاء القابلية على الالتصاق على سطح حبيبات الدهن في الحليب وهضمها (**12**،**15**) وتسهم الخلايا البلعمية الكبيرة والتي تشكل غالبية الخلايا البيض الموجودة في الحليب الطبيعي بحدود **0.1%** من فعالية الأنزيمات المحللة للدهون في الحليب الطبيعي ، لكن عند زيادة أعداد هذه الخلايا إلى (2.5×10^6) خلية/مل من الحليب فأن فعالية الأنزيمات المحللة للدهون في الحليب تزداد بمقدار **11.6%** مقارنة بفعالية هذه الأنزيمات في الحليب الطبيعي **(3**،**17)**، و هذا ما أكده **Wang** وجماعته **(17)** إذ وجد أن التركيز العالي من الخلايا البلعمية الكبيرة يزيد من فعالية أنزيم اللايبوبروتين لايبيز (**LPL**) للحليب الطازج المخزون، وأضاف **Azzara** و **Dimick (3)** أن الخلايا البلعمية الكبيرة المعزولة من الغدة اللبنية لحليب الأبقار تحتفظ بفعاليتها الأنزيمية لأكثر من **120**ساعة، كما أن سلوك أنزيمات الخلايا البلعمية الكبيرة المحللة للدهون كان مشابهاً لسلوك **LPL** الحليب الطبيعي في العديد من الصفات إذ ان أنزيماتها تحتاج إلى **apo-C II** لتنشيطها وأقصى فعالية لها جزء من رسالة ماجستير للباحث الاول.

*كلية الزراعة – جامعة بغداد–بغداد، العراق.
**كلية التقنية الزراعية– حلبجة – سليمانية، العراق.
تاريخ تسلم البحث: آذار/**2005**
تاريخ قبول البحث:تموز/**2008**

كان في **8.2 pH** ويمكن تثبيطها بأستعمال **1** مولاري من كلوريد الصوديوم ، أما الهيبارين فله القدرة على تعزيز تنشيط فعالية الأنزيم المحلل للدهون المستخلص من الخلايا البلعمية الكبيرة كما هو الحال لـ **LPL** الحليب الطبيعي **(10)**. كذلك بين **Rossi** و**Kiesel (15)** أن الفعالية الأنزيمية للخلايا المحببة تعمل على هضم حبيبات الدهن في الحليب.

هدف هذا البحث الى التعرف على أثر زيادة الخلايا البيض في الحليب على تحلل دهون الحليب وتحديد الظروف المثلى لعملها.

المواد وطرائق البحث

تم الحصول على نماذج حليب الأبقار (الخام) من حقل أبقار قسم الثروة الحيوانية التابع إلى كلية الزراعة – جامعة بغداد.

حسب عدد الخلايا الجسمية والبيض بالطريقة المجهرية كما وصفت في نشرة **International Dairy Federation** (**8**) وباستعمال المجهر الضوئي بقوة تكبير (**100×10**).

عزل عالق الخلايا الجسمية من الحليب باستعمال الطريقة التي وصفها **Azzara** و **Dimick (3)**, وتم التخلص من الخلايا الطلائية الموجودة في عالق الخلايا الجسمية للحصول على الخلايا البيض باستعمال الطريقة التي وصفها **Al-Graibawi (2)**.

أُخذ عالق الخلايا البيض المخفف بمحلول داريء الفوسفات الملحي (**PBS**)، وأجريت له عملية تجنيس بوساطة المجنس اليدوي الزجاجي و أجريت عملية نبذ مركزي على سرعة **250×g** ولمدة **10** دقائق وعلى حرارة **4** ^{o}م . اخذ الرائق الذي يمثل مجنس عالق الخلايا البيضاء لاجراء التجارب اللاحقة عليه. قدر تركيز الحوامض الدهنية الحرة (**ΔADV**) واعتمدت طريقة التقدير كما ذكرها **Frankel** و**Tarassuk** (**6**) وتم تقدير فعالية اللايبيزات الخام في مجنس عالق الخلايا البيضاء بطريقة وكما ذكرها العامري (**1**). عرفت وحدة الفعالية بانها كمية الانزيم القادرة على تحرير مايكرومكافئ واحد **(1meq)** من الحامض الدهني خلال دقيقة واحدة وتحت ظروف التقدير .

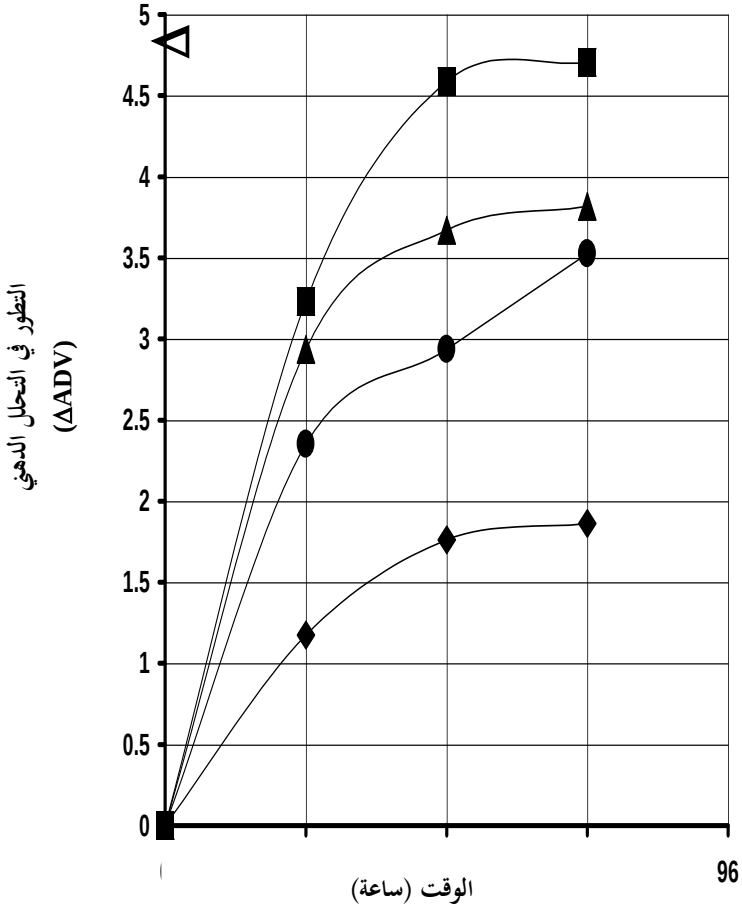
تم استعمال نوعين من المحاليل الدارئة بتركيز **0.2** مولاري لغرض الحصول على قيم مختلفة للأس الهيدروجيني ذلك من اجل تعيين الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية لايبيزات مجنس عالق الخلايا البيض [محلول دارئ فوسفات الصوديوم بأسس هيدروجينية **(8, 7.5, 7, 6.5, 6, 5.5)** ومحلول دارئ الترس **(Tris)** حامض الهيدروكلوريك بأسس هيدروجينية **(9,8.5)**]. و استعمل المحلول الدارئ ذو الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللايبيزات لتحديد افضل تركيز من مادتي الأساس وهما التراي بيوترين والانترالبيد لفعالية لايبيزات الخلايا البيض وكانت التراكيز المستخدمة هي **(2.8,2.4,2,1.6,1.2,0.8,0.4)%**.

استعمل المحلول الدارئ ذو الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللايبيزات وتركيز المادة الأساس التي أعطت أعلى فعالية لتعين درجة الحرارة المثلى لفعالية لايبيزات الخلايا البيض إذ استخدمت درجات حرارة هي **55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20** درجة مئوية.

النتائج والمناقشة

دراسة تاثير إضافة مجنس عالق الخلايا البيض في تطور التحلل الدهني في الحليب المبستر

يلاحظ في الشكل (1) تأثير إضافة نسب مختلفة من مجنس عالق الخلايا البيض الحاوي على 0.768×10^6 خلية/مل والمعزولة من حليب طبيعي على تطور التحلل الدهني للحليب المبستر بعد الحضن على 4ْم ولمدة 72 ساعة. أذ تصل الزيادة في مقدار ΔADV عند إضافة مجنس عالق الخلايا البيضاء المعزول من حليب طبيعي إلى4.706 بعد مرور 72 من الحفظ عند أضافتها بتركيز 10% . كما يلاحظ أزدياد التحلل الدهني في الحليب بزيادة نسبة مجنس عالق الخلايا البيض المضاف اليه وأزدياد فترة الحضن ويعزى سبب التطور المتزايد في التحلل الدهني يعود إلى الدور الفعال للخلايا البيضاء وذلك من خلال قدرتها على افراز الأنزيمات المحللة للدهون التي تقوم بتحليل الدهن وانتاج الأحماض الدهنية الحرة (9،16).



شكل1: تأثير إضافة نسب مختلفة من مجنس عالق الخلايا البيض المعزولة من حليب طبيعي (2.5, 5, 7.5, 10) في تطور التحلل الدهني للحليب المبستر والمحضن على 4 °م ولمدة 72 ساعة علماً أن المجنس يمثل عدد الخلايا البيض 0.768×10^6 خلية / مل من العالق المستخدم.

تحديد أفضل الظروف لفعالية لايبيزات الخلايا البيض المعزولة من حليب طبيعي

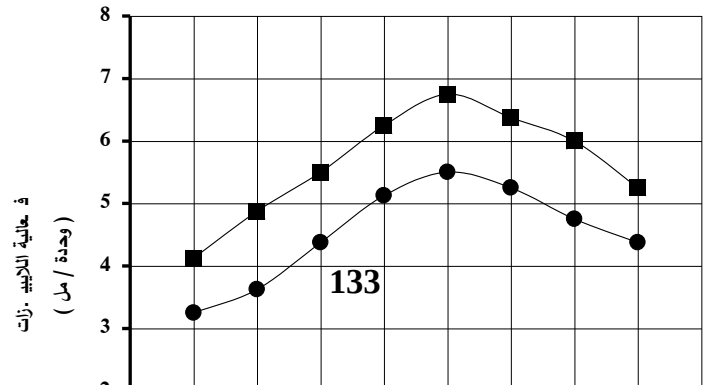
الأس الهيدروجيني الأفضل الأمثل لفعالية لايبيزات الخلايا البيض

قدر الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللايبيزات من مجنس عالق الخلايا البيض في هذه الدراسة باتجاه مادتي أساس هما الانترالبيد و ثلاثي بيوترين ويلاحظ من الشكل (2) ان فعالية هذه اللايبيزات قد تباينت باختلاف الأس الهيدروجيني ، إذ انه عند استخدام الانترالبيد كمادة أساس كانت فعالية لايبيزات عالق الخلايا البيض منخفضة وذلك في القيم المنخفضة من الأس الهيدروجيني، وقد ازدادت الفعالية بزيادة الأس الهيدروجيني، حتى وصلت إلى أقصى قيمة لها في الأس الهيدروجيني 7.5 ومن ثم انخفضت الفعالية بعدئذ بزيادة الأس الهيدروجيني، وجاءت هذه النتيجة مطابقة لما وجده Bastian وجماعته (4) من ان فعالية لايبيزات الخلايا البيض تعمل بشكل أفضل في أس هيدروجيني هو 7.5 ، وكذلك الحال لثلاثي بيوترين فقد كان سلوك لايبيزات عالق الخلايا البيض تجاهه مشابهاً لسلوكها تجاه الانترا لبيد إذ كان الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللايبيزات هو 7.5، ويلاحظ في الشكل (2) القيم المسجلة لفعالية لايبيزات عالق الخلايا البيض تجاه ثلاثي بيوترين كانت أعلى من تلك تجاه الانترالبيد وفي جميع قيم الأس الهيدروجيني المستخدمة في التجربة. والسبب هو ان ثلاثي بيوترين يحتوي على ثلاث وحدات من حامض البيوتريك. وهذا الحامض الدهني قصير السلسلة، وله القابلية على الذوبان والحركة على السطح الفاصل بين الدهن والماء (5) لذا تعد أكثر جاهزية للتحلل المائي بوساطة لايبيزات عالق الخلايا البيض من الانترا لبيد والذي يكون تركيبه معقداً.

درجة الحرارة المثلى لفعالية لايبيزات الخلايا البيض

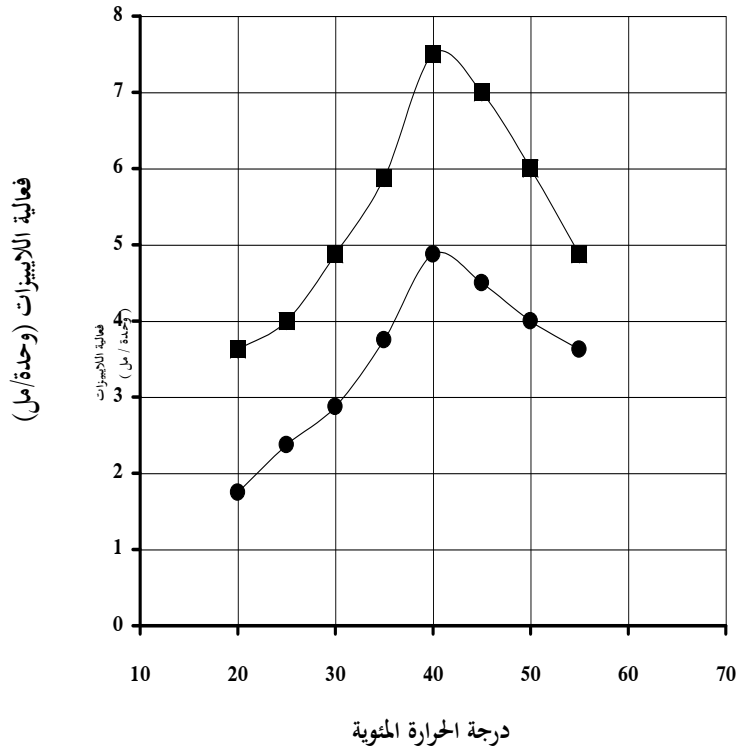
يلاحظ من الشكل (3) ان فعالية لايبيزات عالق الخلايا البيض تزداد بزيادة درجة الحرارة عند أستعمال الأنترالبيد كمادة أساس حتى وصلت اعلى قيمة لها في حرارة 40 ^{o}م ومن ثم بدأت بعدها الفعالية بالانخفاض بزيادة درجة الحرارة وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره Whitaker (18) من ان فعالية غالبية الانزيمات تزداد بزيادة درجة الحرارة حتى تصل الى حد معين تبدأ بعدها الفعالية بالانخفاض والهبوط السريع نظراً الى حدوث مسخ لجزيئات البروتين نتيجة لتأثير الحرارة في تركيبه الثلثي.

أما بالنسبة لثلاثي بيوترين فقد كانت درجة الحرارة الأمثل لتحليله من قبل لايبيزات عالق الخلايا البيض هي 40 ^{o}م وهي مشابهة للحرارة الأفضل لتحليل الانترالبيد ، ان هذه النتيجة جاءت مقاربة لما وجده Bastian وجماعته (4) من ان درجة الحرارة الأمثل لعمل لايبيزات عالق الخلايا البيض هو 37 ^{o}م، وكما مبين في الشكل (3) كانت الفعالية تجاه الثلاثي بيوترين أعلى من الانترالبيد في جميع درجات الحرارة المستخدمة في التجربة ويعود السبب لكون الثلاثي بيوترين أكثر جاهزية للتحلل المائي بوساطة لايبيزات عالق الخلايا البيض من الانترا لبيد والذي يكون تركيبه معقداً (5). تتحدد درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيمات بمكونات الانزيم من الحوامض الامينية وتسلسل هذه الحوامض وطبيعة وطاقة الاواصر المسؤولة عن المحافظة على التركيب الثلثي للانزيم (7).

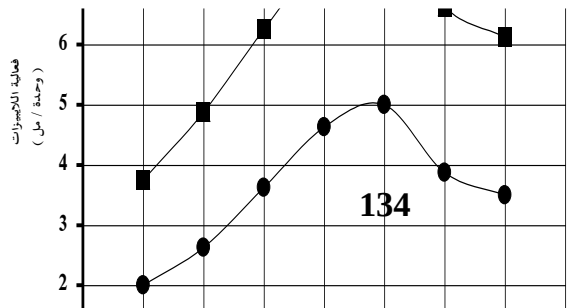


الأس الهيدروجيني (pH)

شكل 2: منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية لايبيزات عالق الخلايا البيض في محاليل دارئة بأسس هيدروجينية مختلفة وبدرجة حرارة 37 م ولمدة حضن 4 ساعات وباستعمال مادتي الأساس التراي بيوترين ■ والانترالبيد ●



3:منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية لايبيزات عالق الخلايا البيض في درجات حرارة مختلفة وبأس هيدروجيني 7.5 ولمدة حضن 4 ساعات باستعمال مادتي الاساس ثلاثي بيوترين ■ والانترا لبيد ●



النسبة المئوية للمادة الأساس

شكل **4**: منحنى أفضل نسبة مئوية من مادتي الأساس ثلاثي بيوترين ■ والانترا لبيد ● لفعالية لاييبزات عالق الخلايا البيض وبأس هيدروجيني 7.5 وباستعمال درجة حرارة 40 م ولمدة حضن 4 ساعات .

نسبة المادة الأساس الأمثل لفعالية لاييبزات الخلايا البيض

اذ اظهرت النتائج في الشكل **(4)** وباستخدام مدى من النسب المئوية من كل من الانترا لبيد وثلاثي بيوترين ان أعلى فعالية للاييبزات عالق الخلايا البيض كانت عند استعمال نسبة مادة اساس بمقدار **2%** ولكل من مادتي الاساس المستعملتين وكانت فعالية اللاييبزات تجاه ثلاثي بيوترين أعلى من الانترالبيد وهذا يعود إلى أن الكليسيريدات ذات الحوامض الدهنية القصيرة السلسلة تعد أكثر جاهزية للتحلل المائي من خلال أنزيمات عالق الخلايا البيض من المواد الأساس ذات الحوامض الدهنية الطويلة السلسلة والمعقدة التركيب وذلك بسبب قابليتها على الذوبان والحركة على السطح الفاصل بين الدهن والماء **(5)**، وبما ان الثلاثي بيوترين يتكون من الكليسيرول مرتبط مع ثلاث من وحدات من حامض البيوتريك القصير السلسلة لذلك يعد اسهل للتحلل من الانترالبيد الذي يكون تركيبه معقداً وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره **Lawrence** وجماعته (**11**) بان فعالية اللاييبزات تجاه مستحلب الثلاثي بيوترين تكون أكثر بمقدار **90** مرة من المواد الأساس الأخرى.

المصادر

1- العامري، زينب هادي عباس (**2003**). تأثير استخدام عالق بكتريا ***Pseudomonas flruorescens*** أو محلولها الأنزيمي الخام على التحلل الدهني والبروتيني لخثرة الجبن المطبوخ المحلي. رسالة ماجستير–كلية الزراعة – جامعة بغداد،العراق.

2- **Al-Graibawi, M. A. A. (1998). Immunization of pregnant mares to protect foals against Rhodococcus eqwi infectin. Ph. D., Thesis, University of Baghdad,Iraq.**

3- **Azzara, C. D. and P. S. Dimick (1985). Lipolytic enzyme activity of macrophages in bovine mammary gland secretions. J. Dairy Sci., 68:1804-1812.**

4- **Bastian, E. D.; R. J. Brown and C. A. Ernstrom (1991). Plasmin activity and milk coagulation. J. Dairy Sci., 74:3677–3685.**

5- **Deckelbaum, R. J.; J. A. Hamilton; A. Moser; G. Bengtsson-Olivecrona; E. Butbul; Y. A.Carpentier; Gutman and T. Olivecrona (1990). Medium chain vs long chain triacylglycerol emulsion hydrolysis by lipoprotein lipase and hepatic lipase: Implications for the mechanism of lipase action . Bioch., 29:1136.**

6- **Frankel, E. N. and N. P. Tarassuk (1955). An extraction titration methods for the determination of free fatty acids in rancid milk and cream. J. Dairy Sci., 38:751.**

7- **Garnot , P. (1985). Heat stability of milk Clotting enzymes. Technological consequences . IDF. Bulletin. No. 194:2-5.**

8- **International Dairy Federation (1979). Somatic cells in milk. Their significance and recommended methods for Counting. Bull., 114:10.**

9- **Jurczak, M. E. and A. Sciubisz (1981). Studies on the lipolytic changes on milk from cows with mastitis. Milchwissenschaft. 36:217 (cited from Dairy Sci. Abs. 44:2468).**

10- **Khoo, J. C.; E. M. Mahone and J. L. Witztum (1981). Separation of Lipoprotein Lipase by macrophages in culture. J. Biol. Chem., 256:7105.**

11- **Lawrence, R. C.; T. F. Fryer ; B. Reiter (1967). Rapid method for quantitative estimation of microbial lipases. Nature. March, 25:1264:1265**

12- **Lee, C. S.; G. H. Mc Dowell and A. K. Lascelles (1969). The importance of macrophages in the removal of fat from the involution mammary gland. Res. Vet. Sci., 10:34-38.**

13- **Lee, C. S.; F. B. P. Wooding and P. Kemp (1980). Identification, properties, and differential count of cell population using electron microscopy of dry cow secretion, colostrum and milk from normal cows, J. Dairy Res., 47:39-50.**

14- **Murphy, S. C.; K. Cranker; G. F. Senyk and D. M. Barbano (1989). Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. J. Dairy Sci., 71:620-626.**

15 - **Rossi, C. R. and G. K. Kiesel (1977). Bovine immunoglobulin G subclass receptor sites on bovine macrophages. Am . J. Vet. Res., 38:1023.**

16 - **Salih, A. M. A. (1978). Factors affecting lipolytic activity in cows milk. Ph . D., Thesis, Faculty of Agric., Dept. of Food Sci., Univ. of Reading, England.**

17- **Wang. L. P.; A. Ungar; J. Bliumis; P. Bukberg; J. Gibson and W. V. Brown (1982). Human monocytes in culture synthesize and secrete lipoprotein lipase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 104:923.**

18- **Whitaker, J. R. (1972). Principle of enzymology for the food science و Marcel Dekker , Inc., New York.**

Iraqi J. Agric. Vol.15 No.1 pp.130–137 Feb./2010

STUDIES ON THE EFFECT OF LEUCOCYTES LIPOLYTIC ENZYMES IN MILK LIPIDS AND THE OPTIMUM CONDITIONS FOR THEIR ACTIVTIES

M. K. Hasson* **J. M. S. Al-Saadi**** **A. M. A. Salih***

ABSTRACT

This study was conducted to examine the effect of lipolytic enzymes produced by white blood cells on milk fat hydrolysis and the optimum pH, temperature and substrate concentration for their activities.

The ΔADV values after 72 hours from incubating milk at 4° c with the addition of (2.5, 5, 7.5, and 10)% of white cells homogeneous isolated from normal milk, were 1.863 , 3.525 , 3.818, 4.706 respectively.

When the substrates were tributyrin and intralipid, the optimum pH, temperature and the percentage of substrate upon which the lipases of the white cells suspension extract, were 7.5, 40°c and 2%, respectively.

Part of M.Sc thesis of the first author.

*** College of Agric. - Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq**

**** Technical college of Agric .- Helabsha-Sulymania- Iraq.**