# تنقية وتوصيف لايبيزات الخلايا المتعددة الانوية (Polymorpho nuclear) المعزولة من حليب الابقار المصابة بالتهاب الضرع

ازهار جواد الموسوي* غازي منعم عزيز** عامر محمد علي الشيخ*

## الملخص

تمت تنقية لايبيزات الخلايا المتعددة الانوية PMN المتحصل عليها من حليب بقرة مصابة بالتهاب الضرع المفتعل، باستخدام المبادل الأيوني Diethyl Amino Ethyl Cellulose (DEAE – cellulose) بابعاد (1.5×28) سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ (0.005 مولاروpH 7) والترشيح الهلامي عبرهلام السيفادكس (Sephadex G – 50) بابعاد (1.5 ×32) سم. تمت الموازنة والأسترداد بمحلول 0.2 مولار فوسفات الصوديوم الدارئ ذي الأس الهيدروجيني 7 وبسرعة جريان 10 مل / ساعة وبواقع 4 مل / جزء. امكن الحصول على ثلاث صور انزيمية أعطيت الرموز A، B وC، وكانت الحصيلة الإنزيمية وعدد مرات التنقية والفعالية النوعية 48.97، 23.87 و37.16% ؛ 24.19 ، 13.30 و19.01 مرة ، 63.63 ، 35 و50 وحدة/ملغم للإنزيمات الثلاثة تباعا. اختبرت نقاوة الإنزيمات الثلاثة بأجراء الترحيل الكهربائي اذ ظهر ان جميع الإنزيمات كانت ذات نقاوة جزئية، ثم درس بعض من صفاتها التي شملت الوزن الجزيئي وكان 6000 و 13600 و15800 دالتون للانزيمات A ، B وC تباعا والأس الهيدروجيني الأمثل والذي بلغ للإنزيم (A) 7.5 ولإنزيمي (B) و(C) كان 6.5. ولوحظ ان فعالية اللايبيزات تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة لغاية 40º م للإنزيم A و30º م للإنزيم B و45º م للإنزيم C، ثم انخفضت الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة حتى بلغت 0.01 ، 0.015 و0.04 وحدة/ مل للإنزيمات الثلاثة تباعا في درجة حرارة 70م. وبلغت قيمة طاقة التنشيط (Activiation Energy) اللازمة لتحويل المادة الأساس إلى ناتج للإنزيم (A) 9.57 وللإنزيم (B) 10.68 وللإنزيم (C) 6.58 كيلو سعرة / مول. لوحظ حدوث انخفاض في فعالية اللايبيزات الثلاثة عند معاملتها بأيونات الزئبق، فقد بلغت الفعالية المتبقية للإنزيم (A) 39.9 و35%، وللإنزيم (B) 20 و14% وللإنزيم (C) 37 و26.4% عند المعاملة بتركيز 1 و5 ملى مولار على التوالي، وأدت أيونات النحاس ايضا إلى تثبيط واضح في فعالية الإنزيمات اذ كانت الفعالية المتبقية للإنزيمات A، B

وبواقع C 49.3 ، 26.5 و40% تباعا عند معاملتها بتركيز 1 ملى مولار في حين كانت 35 ، 12.4 و34.8% تباعا عند معاملتها بتركيز 5 ملي مولار، كذلك لوحظ حدوث انخفاض في الفعالية الإنزيمية عند حضنها مع أيونات الحديد لمدة 30 دقيقة، اذ كانت نسبة الفعالية المتبقية 72، 58 و39.9% للإنزيمات الثلاثة تباعا عند معاملتها بتركيز 1 ملي مولار. وانخفضت اكثر عند معاملتها بتركيز 5 ملي مولار اذ بلغت 58، 52 و37.5% تباعا. ولم تظهر Phenyl Methyl Sulfonyl Flouride (PMSF) تأثيرا في فعالية الإنزيمات الثلاثة إذ احتفظت الإنزيمات بكامل فعاليتها عند حضنها بالتركيزين ذاتيهما من هذه المادة، في حين انخفضت فعالية الإنزيمات الثلاثة قليلا بوجود العوامل الكلابية (chelating agents) مثل EDTA عند هذين التركيزين، وانخفضت فعالية الإنزيمات الثلاثة بشكل واضح عند استخدام 2- mercaptoethanol. احتوت بروتينات اللايبيزاتA ، B وC على جزء كربوهيدراتي بنسبة 19.25 ، 15.47 و28.65% تباعا.

---

جزء من اطروحة الدكتوراه للباحث الاول.

*كلية الزراعة – جامعة بغداد–بغداد، العراق.

**كلية العلوم – جامعة بغداد–بغداد، العراق.

# المقدمة

تعد إنزيمات اللايبيز من المصادر البايولوجية المختلفة ذات التأثير الكبير والمختلف من حيت فعاليتها وتخصصها وخاصة ما يتعلق منها في صناعة الألبان، لذا جرت محاولات عديدة لعزل لايبيزات الحليب بشكل نقي لتحديد ومعرفة أسلوب عملها وتخصصها، فقد حصل **Harper** وجماعته (**14**) على جزأين من بروتينات الحليب لهما فعالية لايبيز مختلفة من حيث قيم الاس الهيدروجيني، أما **Saito** و**Hashimoto** (**22**) فقد حصلوا على تركيز اكبر من الإنزيم بمقدار **3–5** مرات عند استعمال الطرد المركزي وكروماتوكرافيا الورق. أشار **Harper** وجماعته **(14)** إلى احتواء الخلايا الجسمية على إنزيم لايبيز داخلي يبلغ وزنه الجزيئي **7000** دالتون عندما قاما بأجراء عملية الترحيل الكهربائي لمعلق الخلايا الجسمية على هلام الاكريل امايد المتعدد. ذكر **Bastion** وجماعته (**4**) ان فعالية لايبيزات الخلايا البيض تكون أقصاها في أس هيدروجيني **7.5** وان أفضل درجة حرارة لعمل لايبيزات الخلايا البيض هي **37**ºم اما الراوي (**2**) فقد لاحظ ان أفضل درجة حرارة لعمل لايبيزات الخلايا البيض عند استخدام الثلاثي بيوترين والانترالبيد بنسبة **2%** كانت **40**ºم.

ينشط إنزيم اللايبيز بوساطة الأيونات الثنائية التكافؤ مثل الكالسيوم والمغنسيوم **(23)**، فقد ذكر **Constantin** وجماعته (**10**) ان لأيون الكالسيوم دوراً في زيادة السرعة الأولية للإنزيمات المحللة للدهون، وأوضح **Kates**(**15**) أن دور أيون الكالسيوم في التنشيط يعود إلى قدرته على إزالة التأثير المثبط للأحماض الدهنية بتكوين صابون الكالسيوم. ومن ثم يمنع أعادة تكوين آصرة الأستر مع الأحماض الدهنية. تعمل الأيونات الموجبة كأيونات مضادة للشحنة السالبة للأحماض الدهنية التي تتجمع عند السطح البيني وخاصة أيونات الكالسيوم وذلك لتكوين ملح الكالسيوم للحامض الدهني (**13**).

اشار **Gerard** وجماعته (**12**) عند دراستهم تأثير العناصر المعدنية المختلفة فـي فعالية إنزيم **Esterase** (***Mucor miehaii***) إلى ان $ZnCl_2$ كان له تأثير معنوي في تثبيط فعالية الإنزيم عند **pH 6.5** و**8**، وان مركبات $FeSo_4(NH_4)_2SO_4$ ، $MnCl_2$ و$CuSO_4$ اظهرت تاثيرا تثبيطيا في فعالية الإنزيم وكان تاثير $MnCl_2$ التثبيطي اكبر عند الاس الهيدروجيني **8** مقارنة مع **6.5**.

أشار **Baral** و**Fox** (**5**) أن إنزيم اللايبيز الخارج خلوي المنتج من بكتريا ***Pseudomonas tolaasii*** الممرضة نباتياً يثبط بوساطة **EDTA** بدرجة اكبر من **O- phenantroline** ولم يظهر أي تأثير تثبيطي من قبل **PMSF** ويستعيد الإنزيم نشاطه بوساطة أيون الكالسيوم. ويعد التهاب الضرع من الأمراض المهمة التي تصيب الحيوانات اللبونة في العالم لذلك اهتم الكثير من الباحثين بدراسته (**16،24**) وهو المرض الأكثر كلفة بين ماشية الحليب اذ بينت بعض الإحصائيات التي اجريت في الولايات المتحدة الامريكية أن هذا المرض يؤدي إلى خسارة اقتصادية تصل إلى مليار دولار سنويا وهذه الخسارة ناتجة عن انخفاض أنتاج الحليب وفي هذا الصدد أشار **Mahler** و**Cordes** (**17**)، **Mc Dowll** (**18**) الى أن الإصابة بمرض التهاب الضرع أدت إلى انخفاض إنتاج الحليب بنحو **28%**، فضلا عن تكاليف العلاج وأسعار الأبقار التي تحل محل الأبقار المصابة. نظرا الى انتشار مرض التهاب الضرع بالعراق وما يسببه من خسارة كبيرة ولعدم وجود دراسة على النطاق المحلي تهتم بدراسة صفات إنزيمات اللايبيز المنتجة من الخلايا المتعددة الانوية **PMN** فقد هدفت هذه الدراسة إلى تنقية وتوصيف لايبيزات الخلايا **PMN** بطرائق الفصل الكروماتوغرافية المعروفة، وتحديد دور بعض المضافات الكيميائية التي تساعد في تثبيط انزيمات اللايبيز التي تنتجها الخلايا **PMN**.

# مواد وطرائق البحث

## افتعال التهاب الضرع

لاحداث التهاب الضرع المفتعل حقنت ارباع ضرع بقرة سليمة تابعة لحقل أبقار قسم الثروة الحيوانية – كلية الزراعة – جامعة بغداد بمقدار 2 مل من الذيفان الداخلي (Endo toxin) لبكتريا *Escherichia coli* تركيزه 4 مايكرو غرام/ مل (مذاب في المحلول الملحي الفسيولوجي 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في كل ربع (21).

## الكشف عن التهاب الضرع

استعمل اختبار الوايت سايد (White side test) كما ذكره الراوي (1). العد المجهري التفريقي لأنواع الخلايا البيض في الحليب: شخصت أنواع الخلايا البيض في نماذج الحليب بالطريقة المجهرية كما وصفها Coles (9)، بعدها عزل عالق الخلايا البيض من الحليب باستعمال الطريقة التي وصفها Azzara وDimick (3).

## عزل الخلايا اللمفاوية والبلعمية الكبيرة والمتعددة الانوية من الخلايا البيض

اتبعت الطريقة التي ذكرها Azzara وDimick (3) وباستخدام Ficoll بثلاثة تراكيز مختلفة (45، 16 و7%).

## تحضير مجنس عالق الخلايا المتعددة الانوية

أخذ عالق خلايا PMN المخفف بمحلول pbs وإجريت له عملية تجنيس بوساطة المجنس اليدوي الزجاجي الصغير وبعدها إجريت عملية نبذ مركزي على سرعة 250×g ولمدة 10 دقائق وعلى درجة حرارة 4م، اخذ الرائق الذي يمثل مجنس عالق الخلايا PMN لإجراء التجارب اللاحقة عليه.

تقدير تركيز البروتين: استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل Bradford (8).

## تقدير فعالية اللايبيزات

حسب طريقة Bier (6) والمذكورة من قبل الراوي (2). وعرفت وحدة الفعالية بأنها كمية الإنزيم القادرة على تحرير مايكرومكافئ واحد من الحامض خلال دقيقة واحدة تحت ظروف التقدير.

## تنقية إنزيمات اللايبيز

نقيت انزيمات اللايبيز باتباع عدة خطوات تضمنت تقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل الايوني DEAE-cellulose المنشط، تبعا للطريقة الموصوفة من قبل Whitaker (27) والذي تمت موازنته بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.005 مولار واس هيدروجيني 7، وعبئ ليعطي عموداً بأبعاد 1.5×28سم. تم تركيز المحلول الإنزيمي باستخدام السكروز. ثم مرر على عمود المبادل. واجريت خطوت الغسل بمحلول الموازنة نفسه. وبدأ بجمع الأجزاء (البروتينات غير المرتبطة) بسرعة جريان 16 مل/ ساعة وبواقع 4 مل للجزء الواحد، كما تمت متابعة البروتين في الأجزاء المتجمعة بقياس امتصاص الضوء على طول موجي 280 نانومتر وقيست الفعالية الأنزيمية للأجزاء غير المرتبطة، بعدها استردت البروتينات المرتبطة بالمبادل باستخدام محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز0.005 مولار واس هيدروجيني 7 وبتدرج ملحي خطي من كلوريد الصوديوم، وجمعت الأجزاء الفعالة وقيس فيها كل من الحجم للمحلول الانزيمي والفعالية وتركيز البروتين لتعيين الفعالية النوعية للإنزيم ثم ركز النموذج باستخدام السكروز لتهيئته للخطوة اللاحقة. باستعمال تقنية كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي في عمود Sephadex G-50 اذ حضرهلام Sephadex G-50 بحسب تعليمات الشركة المجهزة (Pharmcia Fine Chemicals) وعبأ ليعطي عمودا بأبعاد 1.5×32

سم، وتمت موازنته بمحلول محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز **0.2** مولار واس هيدروجيني **7**. مرر المحلول الإنزيمي المركز بعد خطوة التبادل ألايوني على عمود هلام **Sephadex G-50** وإجريت عملية الاسترداد بوساطة محلول الموازنة اعلاه. جمعت الأجزاء بواقع **4** مل للجزء الواحد وبسرعة جريان **10** مل / ساعة، إذ تمت متابعة البروتين في الأجزاء المنفصلة بقراءة الامتصاص على طول موجي **280** نانومتر وقدرت فعاليتها، بعدها جمعت الأجزاء الفعالة وقيس فيها كل من حجم المحلول الانزيمي وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين، ثم وزعت المحاليل الإنزيمية المنقاة في أنابيب اختبار وتم تجميدها.

### اختبار نقاوة الانزيمات

اتبعت طريقة **Pailjiac** (**20**) باستخدام الهلام المتعدد الاكريلامايد تحت ظروف غير ماسخة.

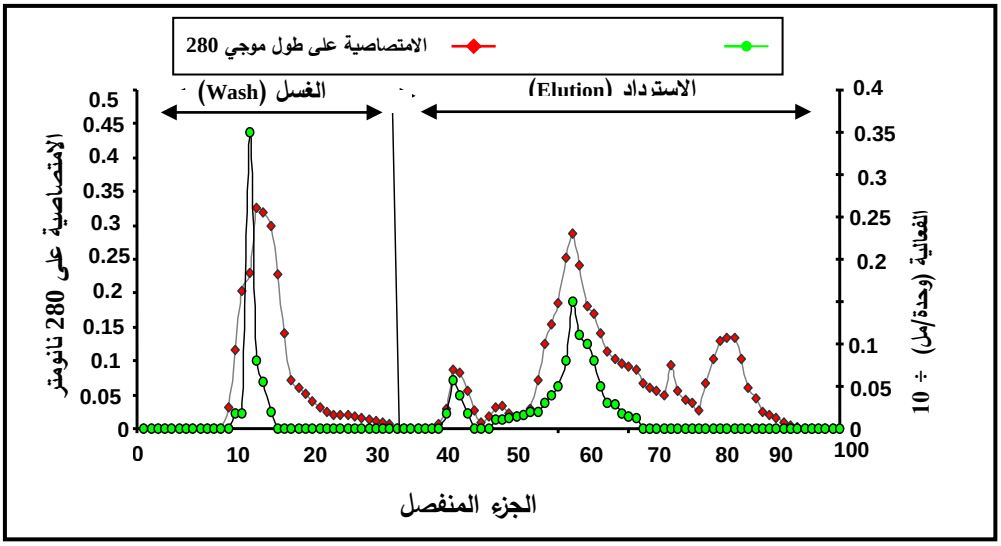
### توصيف الإنزيم

قدر الوزن الجزيئي لإنزيمات اللايبيز بطريقة الترشيح الهلامي تبعا للطريقة التي ذكرها **Steelwagen** (**26**) باستعمال البروتينات القياسية ( **insulin, 6000Da; lysozyme, 14400 Da; Trypsin, 23000 Da; Bovine Serum Albumin, 67000 Da)** وتم تعيين الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيمات عن طريق تحضير مادة التفاعل في اسس هيدروجينية مختلفة تراوحت بين **5–9**. كما حدد الاس الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم عن طريق حضن الانزيم مع محاليل دارئة بأسس هيدروجينية بين **5–9** لمدة **30** دقيقة ثم حسبت الفعالية المتبقية للانزيم. وكذلك عينت درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الإنزيمات، وتراوحت درجات الحرارة المستعملة بين **20** و**70**م كما قدرت طاقة التنشيط **(Activation energy)** اللازمة لتحويل المادة الاساس إلى ناتج من خلال رسم لوغاريتم ثابت السرعة الملاحظ **observed reaction rate** للتفاعل والمقدر بوساطة إنزيمات اللايبيز المنقاة بقياس سرعة التفاعل للإنزيمات في درجات حرارة تراوحت بين **20–70** م تجاه مقلوب درجة الحرارة المطلقة **($k^o$)** بتطبيق معادلة **Arrehenus** وميل المنحنى المرسوم (**25**). ولعرفة تأثير الايونات الفلزية والعوامل المختزلة والكلابية في فعالية الانزيم فقد حضن الانزيم مع محاليل كلوريدات الفلزات الايونية بتركيزين **1** و**5** ملي مولار بصورة منفصلة لكل ملح من الأملاح المستخدمة $CaCl_2$, $KCl_2$, $HgCl_2$, $FeCl_3$, $CuCl_2$ واذابة كل منها بمحلول فوسفات الصوديوم (بتركيز **0.2** مولار، **pH** 7 و**6.5**). وحضرت محاليل **EDTA** و**mercaptoethanol** -2 بتركيزين **1** و**5** ملي مولار بإذابتها بمحلول فوسفات الصوديوم (بتركيز **0.2** مولار، **pH** 7 و**6.5**). وحضرت مادة **PMSF** بتركيزين **1** و**5** ملي مولار بإذابتها في الكحول المثيلي. ولتقدير الكربوهيدرات استخدمت طريقة الفينول – حامض الكبريتيك الموصوفة من قبل **Dubois** وجماعته (**11**).

## النتائج والمناقشة

تبين نتائج كروموتوغرافيا التبادل الأيوني (شكل **1**) ظهور قمة واحدة للبروتين في خطوة الغسل. احتوت على فعالية إنزيمية في الأجزاء **14–19** المستحصلة من هذه الخطوة، بينما انفصلت خمسة قمم بروتينية عند استرداد البروتينات المرتبطة مع ظهور الفعالية الإنزيمية عند الأجزاء المستردة للقمتين الأولى (**44–47**) والثالثة (**51–72**) مما يدل على ان خلايا **PMN** أفرزت ثلاث صور انزيمية للايبيزات يمكن ان تكون متناظرات انزيمية للايبيز تختلف في قيم**PI** لها: الأول والمستحصل عليه بخطوة الغسل يحمل شحنة موجبة مشابهة لشحنة المبادل الأيوني اما الإنزيمين الاخرين والمستحصل عليهما بخطوة الاسترداد فيحملان محصلة شحنة سالبة معاكسة لشحنة المبادل الأيوني في الظروف المستخدمة ساعدت في ارتباطهما بالمجموعات الموجبة وهما مختلفان فيما بينهما بمحصلة الشحنة وكثافتها مما أدى إلى تباين قوة ارتباطهما بمادة

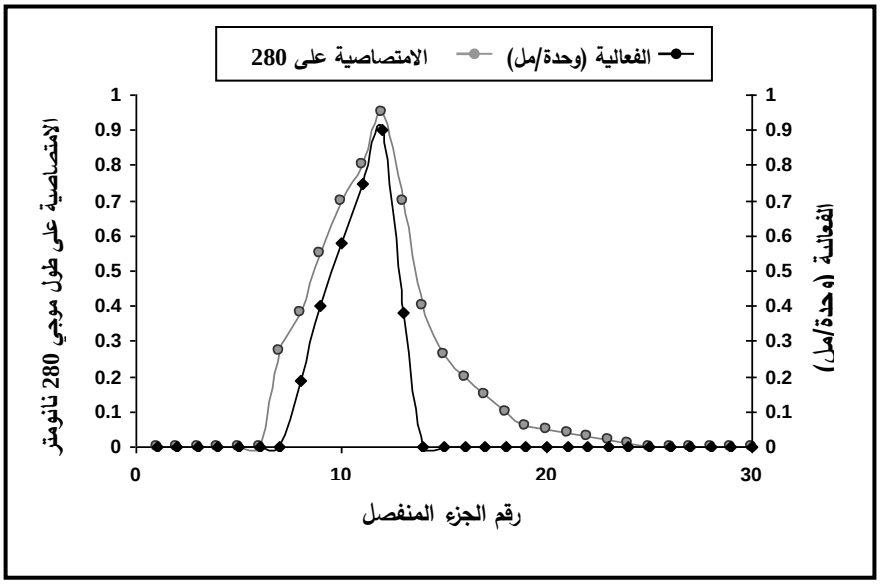
المبادل الأيوني وانفصالهما عنه بتأثير القوة الملحية المتدرجة من كلوريد الصوديوم، تمت الإشارة إلى الإنزيم المستحصل عليه من مرحلة الغسل بالحرف A وللإنزيمين المستحصل عليهما بمرحلة الاسترداد بالحرفين B وC. بلغت الفعالية النوعية لهذه البروتينات بالتتابع 18.75 ، 17.85 و19 وحدة / ملغم بروتين بعدد مرات تنقية 7.13 ، 6.78 و7.22 مرة تباعا وحصيلة إنزيمية مقدارها 57.36، 32.79 و87.23% تباعا (جدول 1). لقد استكملت عملية تنقية اللاييزات في هذه الدراسة بخطوة الترشيح الهلامي اذ لوحظ عند امرار الإنزيم A على عمود الترشيح الهلامي وجود قمة للبروتين عند قياسها على طول موجي 280 نانومتر، تمتلك فعالية إنزيمية تركزت في الأجزاء 8–13 (شكل 2). جمعت هذه الأجزاء وكانت الفعالية النوعية لها 63.63 وحدة / ملغم بروتين بعدد مرات تنقية 24.19 مرة وحصيلة إنزيمية 48.97%. أما عند إمرار الإنزيم B على عمود الترشيح الهلامي لوحظ وجود قمة للبروتين عند قياسها على طول موجي 280 نانومتر، تمتلك فعالية إنزيمية تركزت في الأجزاء 8–11 (شكل3). جمعت مع بعضها. وكانت فعاليتها النوعية 35 وحدة / ملغم بروتين بعدد مرات تنقية 13.30 مرة. وحصيلة إنزيمية 23.87%. اظهر الشكل (4) الذي يمثل تمرير الانزيم C على عمود الترشيح الهلامي وجود قمة البروتين عند قياسها على طول موجي 280 نانومتر، تمتلك فعالية إنزيمية تركزت في الأجزاء 11–17 والتي تم جمعها وكانت الفعالية النوعية لها 50 وحدة / ملغم بروتين بعدد مرات تنقية 19.01 مرة وحصيلة إنزيمية 37.16% (جدول1).



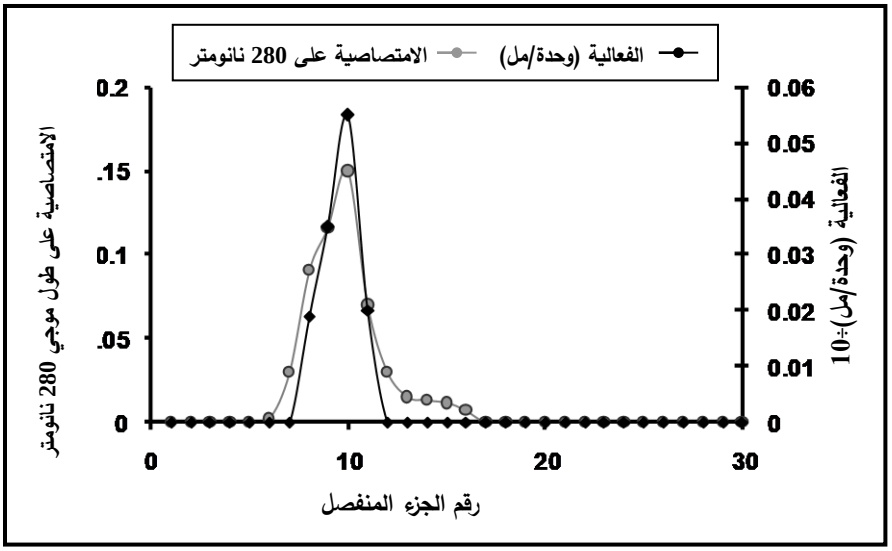

شكل 1: كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيمات اللاييز من خلايا PMN باستخدام عمود المبادل الايوني (DEAE –Cellulose) بابعاد (1.5×28) سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ (0.005 مولار واس هيدروجين 7) وتم الاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتدرج ملحي خطي (0.1–1) مولار وسرعة جريان 16 مل / ساعة وبواقع 4 مل / جزء.

جدول 1: خطوات تنقية إنزيمات اللاييز من خلايا PMN

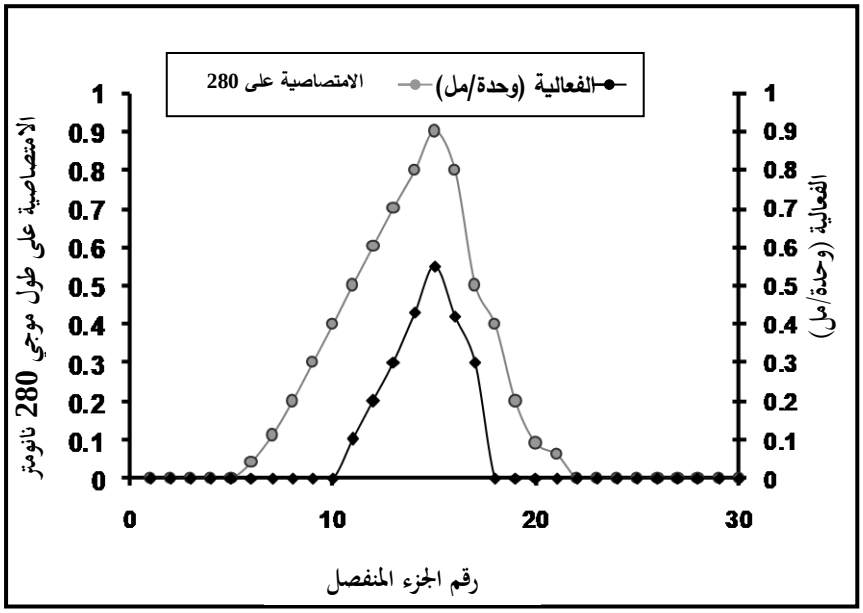
| الخطوة | الحجم (مل) | الفعالية (وحدة/مل) | تركيز البروتين (ملغم/مل) | الفعالية النوعية (وحدة/ملغم) | الفعالية الكلية (وحدة) | عدد مرات التنقية | الحصيلة (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| المستخلص الإنزيمي الخام | 12.5 | 1.83 | 0.696 | 2.63 | 22.88 | 1 | 100 |
| المبادل الأيوني DEAE محلول الغسل | | | | | | | |
| إنزيم (A) | 17.5 | 0.75 | 0.040 | 18.75 | 13.13 | 7.13 | 57.39 |
| محلول الأسترداد | – | – | - | – | – | – | – |
| إنزيم (B) | 15.0 | 0.50 | 0.028 | 17.85 | 7.50 | 6.79 | 32.79 |
| إنزيم (C) | 35.0 | 0.57 | 0.030 | 19.00 | 19.95 | 7.22 | 87.19 |
| الترشيح الهلامي Sephadex( G – 50) | | | | | | | |
| إنزيم (A) | 16.0 | 0.70 | 0.011 | 63.64 | 11.2 | 24.20 | 49.12 |
| إنزيم (B) | 13.0 | 0.42 | 0.012 | 35.00 | 5.46 | 13.30 | 23.98 |
| إنزيم (C) | 17.0 | 0.50 | 0.010 | 50.00 | 8.50 | 19.01 | 37.15 |




شكل 2: الترشيح الهلامي لتنقية إنزيم (A) من خلايا PMN بأستخدام عمود هلام Sephadex G-50 بابعاد (1.5 ×32) سم وتم الأسترداد بمحلول 0.2 مولار فوسفات الصوديوم الدارئ ذي الاس الهيدروجيني 7 وبسرعة جريان 10 مل / ساعة وبواقع 4 مل / جزء.




شكل3: الترشيح الهلامي لتنقية إنزيم (B) من خلايا PMN بأستخدام عمود هلام (Sephadex (G-50 بابعاد (1.5 ×32) سم. وتمت الموازنة والأسترداد بمحلول 0.2 مولار فوسفات الصوديوم الدارئ ذي اس الهيدروجيني 7 وبسرعة جريان 10 مل/ساعة وبواقع 4 مل / جزء.

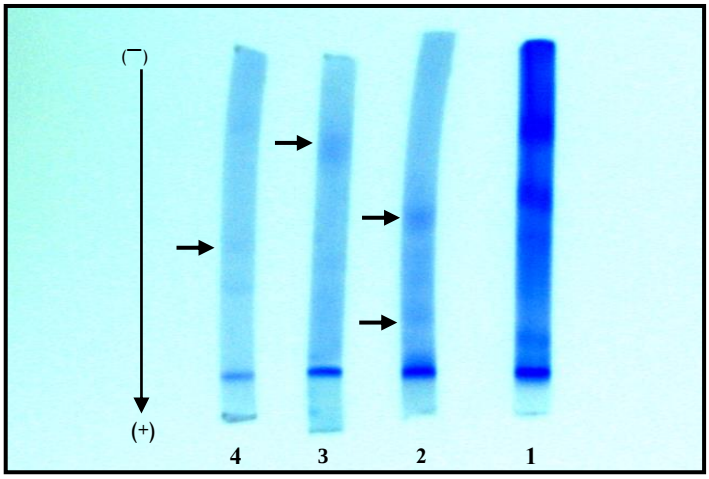



شكل4: الترشيح الهلامي لتنقية إنزيم (C) من خلايا PMN بأستخدام عمود هلام (Sephadex (G-50 بابعاد (1.5 ×32) سم وتمت الموازنة والأسترداد بمحلول 0.2 مولار فوسفات الصوديوم الدارئ ذي اس الهيدروجيني 7 وبسرعة جريان 10 مل / ساعة وبواقع 4 مل / جزء.

## تحديد نقاوة الإنزيمات بالترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بغياب المواد الماسخة

يبين الشكل (5) ظهور حزم بروتينية عدة في المسار– رقم 1 – الذي يمثل المستخلص الإنزيمي الخام، بينما يلاحظ ظهور حزمتين بروتينية في المسار– رقم 2 – الذي يمثل إنزيم اللايبيز A المعزول من خلايا PMN المنقاة بالترشيح الهلامي تمثل احدى الحزمتين إنزيم A ويمكن ان يعزى ظهور الحزمة الاخرى مع إنزيم A إلى وجود نسبة ضئيلة من البروتينات الملوثة، وظهور حزمة بروتينية مفردة في كل من المسار– رقم 3 – والذي يمثل الإنزيم B والمسار رقم 4 –

الذي يمثل الإنزيم C. وهذا يؤكد الاشكال (2، 3، 4) للترشيح الهلامي اذ لم يتطابق منحنى البروتين مع الفعالية، لذا يكون الإنزيم منقى جزئيا.

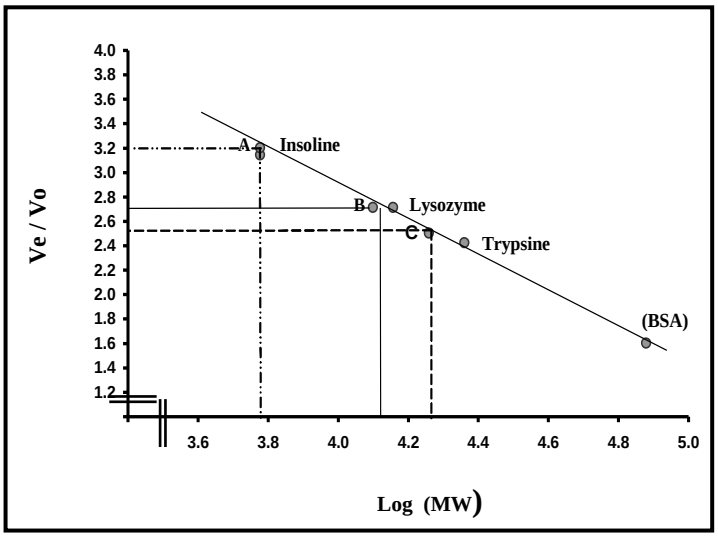



شكل 5: الترحيل الكهربائي لإنزيمات اللاييزالمنقاة والمنتجة من خلايا PMN باستخدام متعدد الاكريل اميد بتركيز 15 % عند ظروف غير ماسخة، إذ تشير الأسهم إلى الحزم البروتينية.

1 – المستخلص الخام 2 – إنزيم A 3 – إنزيم B 4 – إنزيم C

## توصيف إنزيمات اللاييز

الوزن الجزيئي: قدر الوزن الجزيئي لإنزيمات اللاييزA و B وC قيد الدراسة بوساطة تقنية الترشيح الهلامي وكان 6000 ، 13600 و15800 دالتون تباعا (الشكل 6).

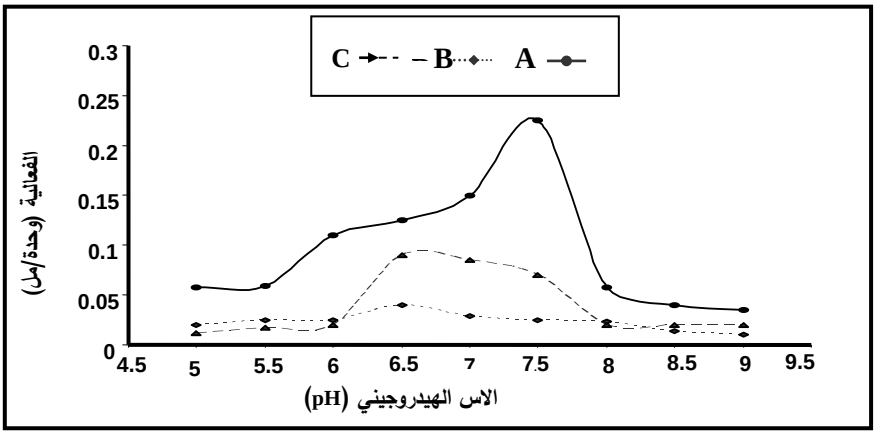



شكل 6: المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لإنزيمات اللاييز (A،B،C) المنقاة من خلايا PMN بطريقة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G – 50.

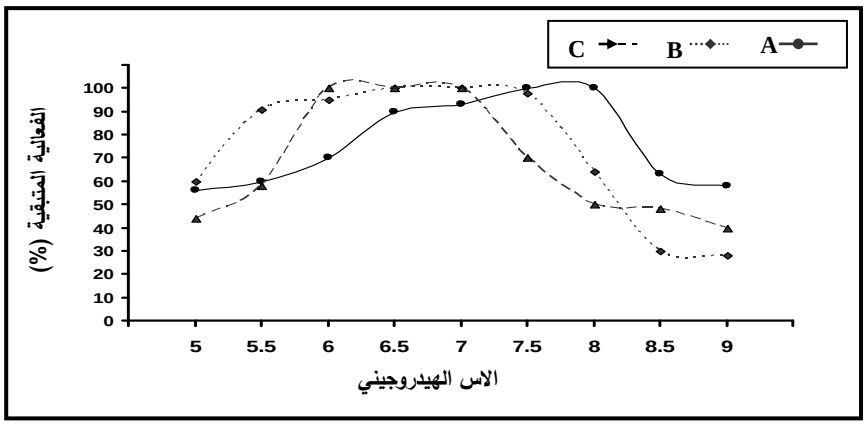
## تعيين الاس الهيدروجيني (pH) الامثل لفعالية وثبات إنزيمات اللاييز:

بينت النتائج الموضحة في الشكل (7) ان الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية إنزيم (A) كان 7.5 وإنزيمي (B) و(C) كان 6.5 وهذه النتيجة تتوافق الى حد ما مع ما اشارت اليه دراسات سابقة (2، 4) ان الاس الهيدروجيني الامثل

لفعالية إنزيمات لايبيز الخلايا البيض كان 7.5. ويلاحظ من الشكل (8) ان اللايبيز (A) يمتلك ثباتا تجاه الاس الهيدروجيني عند القيم الكائنة بين 6–8 اذ احتفظ باكثر من 70% من فعاليته، الا انه فقد بحدود 43% من فعاليته عند الاس الهيدروجيني 5، بينما احتفظ بمقدار 60% من فعاليته عند الاس الهيدروجيني 9، أما الإنزيم (B) فأنه يمتلك ثباتا تجاه الاس الهيدروجيني عند القيم 5.5–7.5 اذ احتفظ باكثر من 90% من فعاليته، إلا انه فقد بحدود 40% من فعاليته عند الاس الهيدروجيني 5، بينما احتفظ بمقدار 28% من فعاليته عند الاس الهيدروجيني 9، وان الإنزيم (C) يمتلك ثباتا تجاه الاس الهيدروجيني عند القيم المتعادلة 6 – 7 اذ احتفظ باكثر من 98% من فعاليته، الاانه فقد بحدود 55% من فعاليته عند الاس الهيدروجيني 5، بينما احتفظ بمقدار 40% من فعاليته عند الاس الهيدروجيني 9. ويمكن ان يعود سبب انخفاض فعالية اللايبيزات في الاسس الهيدروجينية الحامضية إلى تأثير حموضة الوسط في تركيب بروتين الإنزيمات وتأين المجموعات الموجودة في الموقع الفعال، وان زيادة قيم الاس الهيدروجيني عن الحد الامثل يؤدي إلى مسخ البروتين وتغير تركيب الموقع الفعال وفقدان فعالية الإنزيم (25)، وقد يحدث مسخ لا عكسي في المحاليل الشديدة الحامضية او القاعدية مما يؤدي إلى تغيير طبيعة الموقع الفعال وفقدان الإنزيم لفعاليته (28). يمكن الاستدلال من النتائج ان لانزيمات اللايبيز مدى ثبات يمتد من القيم المتعادلة إلى القيم القاعدية، اذ يمكن خزنه ضمن هذا المدى مع ضمان احتفاظه بقيمة جيدة من فعاليته. ومن هذا يتضح ان الاس الهيدروجيني للحليب الطازج قد يكون مناسبا للحفاظ على فعالية لايبيزات PMN وبالتالي ابراز نشاطه في الحليب الخام.




شكل 7: فعالية إنزيمات اللايبيز (A،B،C) المنقاة من خلايا PMN باسس هيدروجينية مختلفة باستخدام الثلاثي بيوترين محلولا للتفاعل.




شكل 8: تأثير قيم مختلفة من الاس الهيدروجيني (5–9) في ثبات انزيمات اللايبيز A، B وC المنقاة من خلايا PMN، حضنت الإنزيمات لمدة 30 دقيقة مع محاليل دارئة بأسس هيدروجينية مختلفة.

## تأثير درجة الحرارة في فعالية وثبات اللايبيزات

بينت نتائج تأثير درجات الحرارة المختلفة (20–70) م في فعالية اللايبيزات المستحصلة من خلايا PMN (شكل 9)، ان فعالية اللايبيزات تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة لغاية 40º م للإنزيم A و30º م للإنزيم B و45º م للإنزيم C، ثم انخفضت الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة حتى بلغت 0.01 ، 0.015 و0.04 وحدة/ مل للإنزيمات الثلاثة تباعا عند درجة حرارة 70م، ويعود سبب ذلك إلى ان سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة درجة الحرارة ضمن مدى معين بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات، الا ان ارتفاع درجات الحرارة عن حدود معينة يؤدي إلى مسخ الإنزيم وتحطم تركيبة الثلاثي وبالتالي انخفاض فعاليته (19،25)، تعد هذه النتائج متوافقة مع ما ذكرسابقا (4) ان درجة الحرارة المثلى لعمل لايبيزات عالق الخلايا البيض هو 37º م وكما وجد الراوي (2) ان درجة الحرارة المثلى لعمل لايبيزات عالق الخلايا البيض هو 40º م. كما يلاحظ ان الإنزيم (A) احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة 20 – 40 م لمدة 30 دقيقة، ثم بدأت الفعالية بالانخفاض مع ارتفاع درجة الحرارة وفقد 62% من فعاليته الكلية عند حضنه بدرجة حرارة 70م، اما اللايبيز (B) فقد احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة 20– 37 م لمدة 30 دقيقة، ثم بدأت الفعالية بالانخفاض مع ارتفاع درجة الحرارة اذ فقد نسبة عالية من فعاليته بحدود 80% عند حضنه بدرجة حرارة 60 م، في حين يلاحظ ان اللايبيز (C) احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارية 20–50 م لمدة 30 دقيقة الا انه فقد 25% من فعاليته الكلية بدرجة حرارة 70م (شكل 10). ان انخفاض فعالية إنزيمات اللايبيز قيد الدراسة عند حضنها بدرجات حرارة اعلى من 45º م يأتي نتيجة تأثير الحرارة في التركيب الثلاثي للبروتين. وقد يؤدي إلى مسخ البروتين وفقدان فعاليته، وهو ما لوحظ عند حضن الإنزيمات بدرجة حرارة 70م اذ فقدت نسبة عالية من فعاليتها. وبلغت قيمة طاقة التنشيط (Activiation Energy) اللازمة لتحويل المادة الأساس إلى ناتج للإنزيم (A) 9.57 كيلو سعرة / مول وللإنزيم (B) 10.68 كيلو سعرة / مول وللإنزيم (C) 6.58 كيلو سعرة / مول، تعد هذه القيم ضمن المدى المعروف لقيم طاقة التنشيط (Ea ) لتفاعلات تحويل المادة الأساس إلى ناتج والتي تقع بين 6–15 كيلو سعرة / مول (27) (الشكل 11). استنادا إلى ما ذكر سابقاً يبدوان الإنزيم C يمتلك كفاءة عالية في تحويل المادة الأساس (ثلاثي بيوترين) إلى ناتج أعلى مقارنة مع الإنزيمين الآخرين (AوB).

## تأثير الأيونات المعدنية

لوحظ انخفاض في فعالية اللايبيزات الثلاثة عند معاملتها بأيونات الزئبق، فقد بلغت الفعالية المتبقية للإنزيم (A) 39.9 و35%، وللإنزيم (B) 20 و14% وللإنزيم (C) 37 و26.4% عند المعاملة بتركيزي 1 و5 ملي مولار على التوالي، وأدت أيونات النحاس ايضا إلى تثبيط واضح في فعالية الإنزيمات اذ كانت الفعالية المتبقية للإنزيمات A، B و Cبواقع 49.3، 26.5 و40% تباعا عند معاملتها بتركيز 1 ملي مولار في حين كانت 35، 12.4 و34.8% تباعا عند معاملتها بتركيز 5 ملي مولار، كذلك لوحظ حدوث انخفاض في الفعالية الإنزيمية عند حضنها مع أيونات الحديد لمدة 30 دقيقة، اذ كانت نسبة الفعالية المتبقية 72، 58 و39.9% للإنزيمات الثلاثة تباعا عند معاملتها بتركيز 1 ملي مولار وانخفضت اكثر عند معاملتها بتركيز 5 ملي مولار اذ بلغت 58، 52 و37.5% تباعا (جدول 2).

يبدو ان لأيونات الكالسيوم والبوتاسيوم دورا في زيادة الفعالية الإنزيمية، ولهما تأثيرا في تحفيز الإنزيمات اذ ازدادت نسبة الفعالية المتبقية للإنزيمات عند حضنها مع أيونات الكالسيوم بتركيز 5 ملي مولار اذ بلغت 106، 101 و103% للإنزيمات A، B وC تباعا، بينما كانت الفعالية المتبقية 98 ، 96 و98% للإنزيمات الثلاثة تباعا عند حضنها مع أيونات البوتاسيوم بتركيز 1 ملي مولار وبقيت محتفظة بمعظم فعاليتها عند معاملتها بتركيز 5 ملي مولار. ان الانخفاض الحاصل في الفعالية الإنزيمية يمكن ان يعزى إلى تكوين معقدات مع المجموعات الفعالة في الإنزيم مما يؤدي إلى اعاقة ارتباط الإنزيم بالمادة الأساس وتأثيره في الحفز بوساطة الإنزيم لتحويل مواد التفاعل إلى ناتج (18)، كما ان لأيونات العناصر المعدنية الثقيلة تأثيرا في تركيب الإنزيم وفي موقعه الفعال، اذ لها تأثير مثبط لا تنافسي لبعض الإنزيمات اذ تقوم بأكسدة مجموعات SH– في الموقع الفعال.

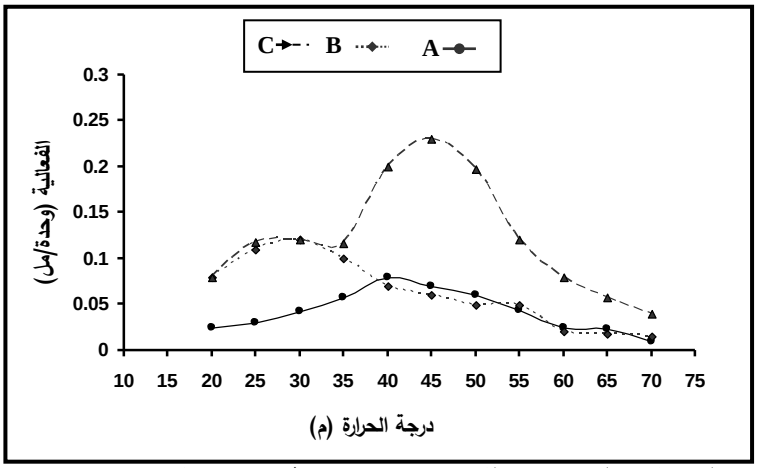
## تأثير العوامل المختزلة والكلابية في فعالية اللايبيزات

لوحظ ان فعالية إنزيمات اللايبيز انخفضت عند حضنها مع المركب المختزل (2- mercaptoethanol) بتركيز 1 ملي مولار اذ بلغت 20، 16.4 و39.5% للإنزيمات A، B وC على التوالي وانخفضت بشدة عند حضن الإنزيمات مع 5 ملي مولار اذ بلغت 8، 10 و16.4% للإنزيمات الثلاثة تباعا جدول (3)، مما يدل على ان اللايبيزات قيد الدراسة تتأثر بوجود هذا المركب بسبب احتواء الموقع الفعال فيها على مجموعة ثنائية الكبريت (-S-S-). كما لوحظ تأثر الإنزيمات قليلا بوجود EDTA التي تعد من العوامل الكلابية العاملة على سحب أيونات العناصر المعدنية الثنائية الشحنة الموجودة في تركيب الإنزيم او وسط التفاعل، مما لا نستطيع الجزم بانتماء الإنزيمات قيد الدراسة إلى مجموعة اللايبيزات المعدنية (metallo lipases) ضمن الظروف والتراكيز المستخدمة للمادة الكلابية EDTA قيد الدراسة (جدول 3). ويشير الجدول نفسه الى عدم

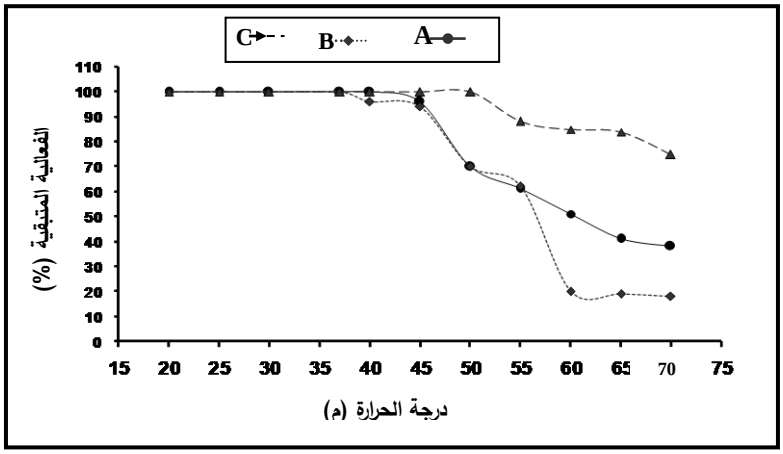
تأثر فعالية اللايبيزات الثلاثة عند حضنها مع الفنيل مثيل سلفونيل فلورايد (PMSF) وعند المعاملة بتركيزي 1 و5 ملي مولار مما يدل على ان الإنزيمات قيد الدراسة هي ليست من نوع الإنزيمات السيرينية.

## المحتوى الكربوهيدراتي لبروتينات اللايبيزات

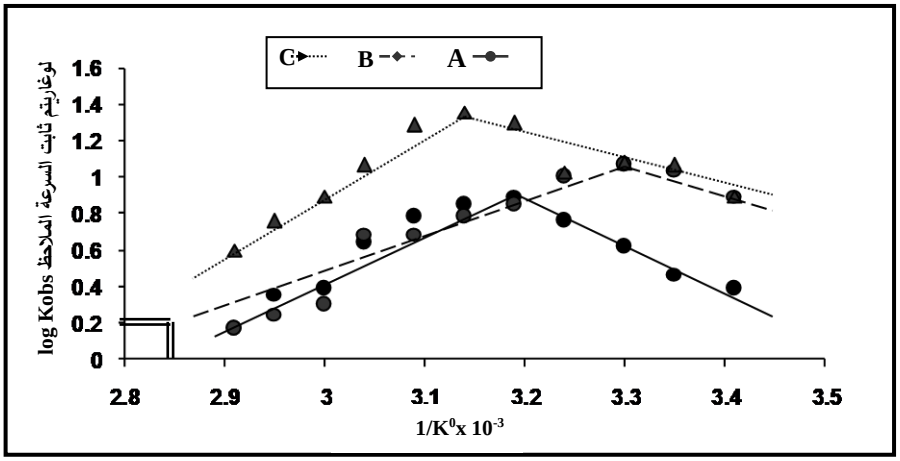
يبين جدول (4) ان البروتينات المكونة للايبيزات A، B وC تحتوي على جزء كربوهيدراتي يمثل نسبة 19.25 ، 15.47 و28.65% كربوهيدرات على التوالي، ويتضح من دراسة هذه النتائج ان هناك ارتباطا تساهميا بين الجزء البروتيني والجزء الكربوهيدراتي والذي يعطي الجزء البروتيني وظيفة وقائية تتمثل بالحماية تجاه تفاعلات التحلل الذاتي (7) ويحد من العوامل المثبطة لنشاطات البروتينات.




شكل 9: تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيمات اللايبيز A ، B وC المنتجة من خلايا PMN، اجري التفاعل بدرجات حرارة مختلفة لمدة 30 دقيقة بأستخدام ثلاثي بيوترين محلولا للتفاعل.




شكل 10: تأثير درجات الحرارة في ثبات إنزيمات اللايبيز A، B، C عند حضنها بدرجات حرارة مختلفة لمدة 30 دقيقة ثم قدرت الفعالية بأستخدام ثلاثي بيوترين مادة اساس.




**شكل 11**: منحنى ارينيوس لتقدير طاقة التنشيط لإنزيمات اللايبيز المنقاة من خلايا **PMN**.

**جدول 2**: تأثير الأيونات المعدنية في فعالية إنزيمات اللايبيز المنقاة من خلايا **PMN**

| الملح المعدني | التركيز (ملي مولار) | الفعالية المتبقية (%) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | إنزيم (A) | إنزيم (B) | إنزيم (C) |
| $HgCl_2$ | 1 | 39.9 | 20.0 | 37.0 |
| | 5 | 35.0 | 14.0 | 26.4 |
| $CuCl_2$ | 1 | 49.3 | 26.5 | 40.0 |
| | 5 | 35.0 | 12.4 | 34.8 |
| $FeCl_2$ | 1 | 72.0 | 58.0 | 39.9 |
| | 5 | 58.0 | 52.0 | 37.5 |
| $CaCl_2$ | 1 | 100 | 100 | 100 |
| | 5 | 106 | 101 | 103 |
| KCl | 1 | 98 | 96 | 98 |
| | 5 | 100 | 96 | 100 |

**جدول 3**: تأثير العوامل المختزلة والكلابية في فعالية إنزيمات اللايبيز (A، B وC) المنقاة من الخلايا **PMN**، بعد حضن الإنزيمات مع المركبات المختزلة والكلابية لمدة **30** دقيقة

| المادة | التركيز (ملي مولار) | الفعالية المتبقية (%) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | إنزيم (A) | إنزيم (B) | إنزيم (C) |
| 2-mercaptoethanol | 1 | 20 | 16.4 | 39.5 |
| | 5 | 8.0 | 10.0 | 16.4 |
| EDTA | 1 | 97.0 | 89.9 | 97 |
| | 5 | 92.0 | 85.0 | 90 |
| PMSF | 1 | 100 | 99 | 98 |
| | 5 | 98 | 98 | 97 |

*القراءات تمثل متوسطا لمكررين.

**جدول 4**: نسبة الكربوهيدرات الكلية في بروتينات إنزيمات (A،B وC)*

| الإنزيم | الكاربوهيدرات الكلية بالبروتين (%) |
|---|---|
| A | 19.25 |
| B | 15.47 |
| C | 28.65 |

*القراءات تمثل متوسطا لمكررين.

# المصادر


1- الراوي، طارق ساكن حكيم (1985). الطرق العلمية لتحليل الحليب ومشتقاته. – كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق. (ترجمة).

2- الراوي، مروان خالد حسون (2003). دراسة تأثير الخلايا البيض في تطور التحلل الدهني والبروتيني في حليب الابقار. رسالة ماجستير–كلية الزراعة–جامعة بغداد، العراق.

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

4- **Bastian, E. D.; R. J Brown and C. A. Eensrom (1991). Plasmin activity and milk coagulation. J. Dairy Sci., 74: 367-368.**

5– **Baral, A. and P. F. Fox (1997). Isolation and Characterization of an extracellular lipase from *Ps. Tolassii*. Food Chemistry, 58(1-2):33-38.**

6– **Bier, M. (1955). Lipases. In: methods in Enzymology., Vol. 1 (ed. By Sidney, P.Colowich and Nathano, O. Kaplan ). Academic press, New York, San Francisco, London.**

7– **Braatz, J. A. and E. C. Heath (1974). The role of polysaccharide in secretion of protein by *Micrococcus sodoneniss*. J. Biol. Chem., 249:2536–2539.**

8- **Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle–dye binding. Anal. Biochem., 72:248-254.**

9- **Coles, E. H. (1974). Veterinary Clinical Parology, Second edition. Philadeiphia. London.**

10- **Constantin, M. J.; L. Pasero and P. Desnuelle (1960). Biochem. Biophys. Acta., 43. 103. (Cited from Brockerhoff and Jensen. 1974).**

11- **Dubois, M.; K. A. Gilles; J. K. Hamiton; P. A. Robers and F. Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 228(3):350–256.**

12- **Gerard, J. M.; C. Raoul; R. W. Isaac; S. Theresa and I. F. Louis (1977). Hydrolysis of animal and vegetable oil with *Mucor miehei* esterase. J. Agric. Food Chem., 25:5.**

13- **Godfredson, S. E. (1990). In: Microbial Enzymes & Biotechnology (eds. Fogarty, W. M. & Kelly, E. T.) p: 255- 273 Elsevier Applied Sciences. The Netherlands. (Cited from Saxena et al., 1999).**

14- **Harper, W. J.;, D. F. Schwartz and I. S. D. EL – Haqarawy (1956). A rapid silica gel method for measuring the total free fatty acid in milk. J. Dairy Sci., 39:46.**

15- **Kates, M. (1960). Lipolytic enzymes. In: Lipid Metabolism (ed. Bloch. K.).**

16- **Lescourret, C. and Coulon, J. (1994). Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. J. Dairy Sci., 77: 2289-2301.**

17- **Mahler, H. R. and, E. A. Cordes (1971). Biological Chemistry. Harper and Row Publishers. New York. USA.**

18- **Mc Dowell, R. E. (1994). Dairying with improved breeds in warm climates clinic, Publ. N. E. (cited from AL- Rawi, 2003).**

19- **Muro, T.;, Y. Tominaga and S. Okada (1984). Agric. Biol. Chem., 48(5):1223–1230.**

20- **Piljac, V.; G. Piljac and N. Bozina (1986). Horizontal electrophorsis. In: Genetic Engineering; centrifugation and electrophoresis (V. Piljac and G. Piljac, eds). Yugoslaviathe TIZ zrinski cakovec.**

21- **Salih, A. M. A. (1978). Factors effecting lipolytic activity in cows milk. Ph. D. Thesis, Faculty of Agric., Dep. Of Food Sci., Univ. of Reading, England.**

22- **Satio, Z. and Y. Hashimoto (1963). The milk lipases. V. Effects of surface – active agents and ethylenedianine tetraacetate on lipase by chromatography on anion exchange cellulose. Jap. J. Zootech. Sci., 34: 39 (cited from Dairy Sci. Abs. 26: 2346).**

23- **Saxena, R. K.; P. K. Ghosh; R. W. Gupta; S. Davidson; S. Bradoo and R. Gulati (1999). Microbial Lipases: Potential Biocatalysts for the future industry. Current Sci., 77(1):101-151.**

24- **Seegers, H.; C. Beaudeau; F. Fourichon and N. Boreille (1997). Mastitis control programs and related costs in French dairy herds. Proc. 48th Ann. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod. Vienna, p. 143-146.**

25- **Segel, I. H. (1976). Biochemical Calculation. 2nd edition. John Wiley and Sons. New York. USA.**

26- **Steelwagen, K. (1990). Gel filtration In: Methods in: Enzymology (ed. m. P. Deutscher). Vol. 182:317–328 Academic press, New York. U. S. A.**

27- **Whitaker, J. R. (1972). Principle of Enzymology for the Food Science marcel Dekker. Inc., New York. USA.**

28- **Whitaker, J. R. and P. K. Granum (1980). An absoute method for protein determination based on difference in absorbence at 235 and 280 nm. Analatic Biochemist, 190: 156 –159.**

# PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMORPHONUCLEAR LIPASES FROM MASTITIS MILK OF COWS

**A. J. Al- Mosowy*** **K. M. Azez**** **A. M. A. Al. Salih***

## ABSTRACT

**The obtained lipases extract of PMN were purified by ion exchange chromatography through DEAE–cellulose (28×1.5) cm and gel– filtration chromatography using sephadex (G-50) column (32× 1.5) cm.Three enzymes (A, B, C) were found with a yield of 48.97, 23.87 and 37.16%, purification fold were 24.19, 13.30 and 19.01 times and with specific activities of 63.63, 35 and 50 unit/mg protein respectively. The purity of enzymes were examined by polyacrylamide gel electrophoresis.**

**The purified enzymes were characterized by determining molecular weight of the enzymes A, B, C which were 6000, 13600, 15800 Dalton respectively when estimated by gel filtration using sephadex G-50 column.**

**The optimum pH for enzyme activity was 7.5 for A and 6.5 for both B and C enzymes, while the Optimum pH for enzymes stability was 6-8, 5.5-7.5 and 6-7 for enzyme A, B and C respectively.**

**The optimum temperature for enzyme activity was 40, 30 and 45ºC for A, B and C respectively. Enzyme A retained 100% of its original activity over 30 min incubation at 20-40 ºC and lost 62% of activity at 70ºC, while enzyme B was stable for 30 min at 20-37 ºC and lost 80% of activity at 60ºC, and enzyme C was stable for 30 min at 20-50 ºC and lost 25% of its activity at 70ºC. The Activition energy of conversion were 9.57, 10.68 and 6.58 Kcal/mol for A, B and C enzymes respectively.Calcium and Magnesium chlorides had slight effect at concentration of 1, 5 mM, while copper, iron and mercury chlorides had an inhibitory effect at the same concentration. PMSF had no effect on enzymes activity when incubated at these two concentration, while the activity was slighty inhibited by the chelating agents such as EDTA, the activity was also inhibited significantly by the presence of 2- Mercaptoethanol.**

**The purified A, B and C enzymes were found to contain glycoprotein which rated 19.25, 15.47 and 28.65% carbohydrate respectively.**

---

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

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

****College of Sci.- Univ. of Baghdad. – Baghdad, Iraq**