استخلاص وتنقيـة وتوصيف وربط ببسـين الاغنام

منير عبود جاسم و *زينة كاظم عيسى

قسم علوم الاغذية - كلية الزراعة - جامعة البصرة - العراق

المستخلص

هدفت الدراسة الحالية الى استخلاص انزيم الببسين EC:3.4.23.1 من معدة الاغنام وتنقيته ودراسة بعض صفاته وربطه، استخلص الانزيم باستعمال خمسة محاليل استخلاص لغرض تحديد افضل محلول استخلاص وقد اوضحت نتائج الدراسة ان محلول كلوريد الصوديوم 6% الحاوي على 2% حامض البوريك هو افضل محلول استخلاص حيث اعطى اعلى فعالية نوعية للانزيم والتي بلغت 14.3 وحدة/ملغم .ركز المحتوى البروتيني للمستخلص الانزيمي الخام باستخدام كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع تراوحت بين 30-70% ، ثم اجريت عملية الديلزة باستعمال الماء المقطر ، اكملت خطوات تنقية ببسين الاغنام باستخدام عمود كروماتوغرافيا التبادل الايوني DEAE- Sephadex A-50 ثم الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-100 وبلغت عدد مرات التنقية 27.64 مرة وبحصيلة 18.4%. بينت نتائج الكشف عن نقاوة ببسين الاغنام وجود حزمة بروتينية واحدة للانزيم عند الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير ماسخة بغياب مادة SDS . وكان الوزن الجزيئي لببسين الاغنام 33700 دالتون عند تقديره بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد المتعدد بوجود مادة SDS. تم ربط ببسين الاغنام النقي بالاكار بتركيز 3%،وبلغت الفعالية المتبقية لببسين الاغنام المرتبط بالاكار 25% بعد استخدامه 7 مرات ،وبلغت الفعالية المتبقية لببسين الاغنام المرتبط بالاكار22% عند خزنه لفترة 60 يوم على درجة حرارة 4 م . وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحللية لببسين الاغنام الحر والمرتبط هو 2 ، بينما اعطى الرقم الهيدروجيني 5.8 اعلى فعالية تخثرية لببسين الاغنام الحر والمرتبط وان الفعالية التخثرية تقل مع ارتفاع الرقم الهيدروجيني من 5.8 الى 7،ووجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات ببسين الاغنام الحرهو 2 وان الانزيم الحر والمرتبط فقدا فعاليتهما عند الارقام الهيدروجينية القاعدية 8 و9 . كانت درجة الحرارة المثلى للفعالية التحللية لببسين الاغنام الحر 35م والمرتبط 45م ، بينما كانت درجة الحرارة المثلى للفعالية التخثرية لببسين الاغنام الحر والمرتبط هي 35م. وكانت درجة الحرارة المثلى لثبات ببسين الاغنام الحر والمرتبط تتراوح بين 15-35م وان ببسين الاغنام النقي الحر والمرتبط فقد فعاليته بالكامل عند 75م و85 م على التوالي .بلغت طاقة التنشيط لفعالية ببسين الاغنام الحر والمرتبط 8.13 كيلو سعره. مول-1، 10.79 كيلو سعره. مول-1 على التوالي.

كلمات مفتاحية: الببسين , استخلاص , تنقية , الاغنام , ربط الانزيم

* البحث جزء من أطروحة الدكتوراه للباحث الثاني

Extraction, Purification, Characterization and Immobilization of Sheep Pepsin

Munir A. Jasim and *Zena K. Al -Essa

Department of Food Science – Faculty of Agriculture – University of Basrah - Iraq

Abstract

The present study aimed to isolate pepsin enzyme Ec : 3.423.1 from sheep stomach and purified it , it's characteristics were studied as free and immobilize under various conditions. The enzyme was extracted from the stomach using five extraction solutions in order to find out the extraction solution , the study revealed that sodium chloride (6%) with Boric acid (2%) solution was the best extraction solution which gave the highest specific activity 14.3 unit / mg .Protein content for the crude enzyme extracts were concentrated using saturated ammonium sulfate in arrange of 30-70%, Dialysis was done using distilled water. Ion exchange chromatography DEAE–Sephadex A-50 was used to complete purification of Sheep pepsin followed by gel filtration using Sephadex G-100, Purification Folds 27.64 time and the yield was 18.4%.

Electrophoresis process using poly acrylamide gel in the absence of SDS observe the presence of one protein band which indicates the complete purification of Sheep pepsin. Sheep pepsin molecular weight was 33700 Dalton when it was evaluated using poly acrylamide electrophoresis in the presence of SDS. The sheep pepsin was immobilized with agar in 3% concentration. The remainder enzyme activity for agar Immobilized Sheep pepsin were 25% after 7 times using and the remainder enzyme activity for agar Immobilize Sheep pepsin were 22% which stored for 60 days in 4°C. The optimal pH for proteolytic activity for free and Immobilize Sheep pepsin was 2,On other hand the pH value 5.8 was the highest clotting activity for free and Immobilize Sheep pepsin. The clotting activity decreased with the increase of pH for 5.8-7.The optimal pH for the stability of free and Immobilize

Sheep pepsin are 2.The free and Immobilize enzymes lost their activities at alkaline pH values 8 and 9.

The optimal temperatures of proteolytic activity for free Sheep pepsin was 35 °C and 45°C for its Immobilized form. The optimal temperature for clotting activity for free and Immobilize Sheep pepsin was 3°C .The optimal temperature for free and Immobilize sheep pepsin stability ranged from 15 to 3°C. Both free and Immobilize Sheep pepsin lost their activities completely at 75°C, 85°C respectively. The activation energy for free and immobilize pure Sheep pepsin was 8.13 kcal. Mol-1 and 10.79 kcal. Mol-1 respectively.

Keyword: Pepsin, Extraction, Purification Sheep, Characterization , Immobilization

* Part of Ph.D dissertation of the second author

المقدمة

تعد البروتيزات احد الانزيمات المهمة صناعياً حيث تمثل 60 % من الانزيمات المسوقة تجارياً ويمكن الحصول عليها من المصادر المكروبية والنباتية والحيوانية Godfrey and Reichelt (9)، وللبروتيزات تطبيقات متعددة في صناعات متنوعة مثل الصناعات الغذائية ، صناعة المستحضرات الصيدلانية ، صناعة المنظفات ودباغة الجلود (4 و 17). يعد الببسين (EC:3.4.23.1) من البروتيزات الحامضية ذات الفعالية العالية في البيئة الحامضية (2) ، وهو موجود في العصير المعدي بتركيز 400 ملغم/لتر وظيفته كسر البروتين الغذائي في المعدة ، اذ يفرز الببسين من خلايا الغشاء المخاطي المعدي بهيئة غير فعالة تعرف بالببسينوجين الذي يتحول الى ببسين بواسطة التحلل البروتيني (24). ان تنقية الانزيمات عملية مكلفة جداً وان استعماله يكون غير اقتصادي ، لان الانزيم يستعمل مرة واحدة فقط ولا يمكن استعماله مرة اخرى (1)، لذلك كرست العديد من الابحاث للحصول على طريقة يرتبط فيها الانزيم بمادة داعمة بحيث يكون من السهولة اضافته في العمليات التصنيعية المختلفة ومن ثم ازالته (11).

هدفت الدراسة الى استغلال المخلفات الحيوانية (معدة الاغنام)في استخلاص انزيم الببسين وتحديد افضل محلول لاستخلاصه و تنقيته وتوصيفه وربطه ودراسة تأثير بعض العوامل المختلفة على فعاليته التحللية.

المواد وطرائق العمل

1-استخلاص الانزيم: استخلص أنزيم البيسين من معدة الأغنام بأستخدام خمسة محاليل أستخلاص ثم تم اختيار المحلول الأمثل لأستخلاص الأنزيم على اساس الفعالية النوعية للأنزيم الناتجة من كل محلول استخلاص.

محاليل الأستخلاص هي:1-ماء مقطر،2- محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز10%:حضر بأذابة100غم من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر (23). 3- محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز6 % الذي يحتوي على 2 % من حامض البوريك Boric acid ،حضر بأذابة 60غم من كلوريد الصوديوم و20 غم من حامض البوريك في كمية من الماء المقطر ثم ، اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر(16). 4-محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.3،حضر بأذابة 5.453غم من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين NaH_2PO_4 مع 9.709غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na_2HPO_4 في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى7.3 اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر(10). 5 – محلول-Tris acetic acid بتركيز0.4 مولار ورقم هيدروجيني 7.6، حضر بأذابة 12.1غم من Tris مع كمية من الماء المقطر ثم اضيف اليه 17.5 مل من حامض الخليك ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر (10).

اتبعت طريقة (23) لاستخلاص أنزيم البيسين مع اجراء بعض التغييرات عليها، حيث أخذت المعدة الطازجة وأزيلت محتوياتها والأسطح الدهنية وغسلت بالماء البارد وحفظت بالتجميد لمدة 24 ساعة ثم فرمت ومزجت مع محلول الاستخلاص بنسبة2:1 (وزن:حجم) وجنست بخلاط كهربائي (blender) لمدة 10 دقائق ،بعدها وضع المستخلص بالمجمدة لمدة ساعتين ثم اجري له طرد مركزي $15,000\ _xg$ على درجة حرارة 4 م لمدة 15 دقيقة. أهمل الراسب وجمع الراشح وعدل الرقم الهيدروجيني له الى 1.8 باستخدام محلول حامض الهيدروكلوريك HCl بتركيز 1مولار وترك لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة المختبر ثم اجري له طرد مركزي مرة اخرى وعدل الرقم الهيدروجيني له الى 5.5 باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 1مولار. قدرت الفعالية التحللية حسب طريقة (25) و قدرت الفعالية التخثرية حسب طريقة (3)، واستعملت طريقة Lowery و Resobrough (14)في تقدير تركيز البروتين خلال مراحل التنقية المختلفة .

2- تنقية الانزيم: تم ترسيب الانزيم باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة تشبع 30-70% ثم اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة g $_{\times}$1911.6 لمدة نصف ساعة بعدها اجريت عملية الديلزة للانزيم تجاه الماء المقطرلمدة24 ساعة مع تبديل الماء كل 12 ساعة, ومرر المحلول الأنزيمي المديلز على عمود المبادل الايوني DEAE – Sephadex A-50 واجريت خطوة الغسل Washing بمحلول محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.02 مولار وبرقم هيدروجيني5.3 وبسرعة جريان 60 مل في الساعة وبواقع 5 مل للجزء الواحد.

جمعت الأجزاء المفصولة من العمود وتمت متابعة الامتصاصية على طول موجي 280 نانومتر للاجزاء المفصولة وعند وصول الامتصاصية إلى الخط الصفري Base line جرت عملية الاسترداد Elution للبروتينات المرتبطة على المبادل الايوني السالب باستعمال محلول الغسل و محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.02 مولار _كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 1 مولار وبرقم هيدروجيني 5.3 بتراكيز متدرجة من (0-1)مولار باسلوب التدرج الملحي الخطي وتمت متابعة الامتصاصية للاجزاء المفصولة من العمود خلال عملية الاسترداد على طول موجي 280 نانومتر ،ثم جمعت الأجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها.

ثم أجريت عملية الديلزة للأجزاء الفعالة (المحتوية على الفعالية الإنزيمية) التي تم جمعها من خطوة التنقية السابقة بالماء المقطر وذلك للتخلص من كلويد الصوديوم الذي استخدم بالتدرج الملحي الخطي لاسترداد الإنزيم.بعدها مرر المحلول الإنزيمي الناتج من خطوة التنقية السابقة على عمود الفصل Sephadex G-100 وأجريت عملية الاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.02 مولار وبرقم هيدروحيني 6.3، وجمعت الأجزاء المتدفقة من العمود في أنابيب اختبار بمعدل 3 مل لكل أنبوب وبسرعة جريان 20 مل في الساعة. قرأ الامتصاص لكل جزء من الأجزاء المفصولة عند طول موجي 280 نانومتر وقيست فعالية الإنزيم في القمم المفصولة ثم جمعت الأجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها.

3- توصيف الانزيم: اتبعت طريقة Laemmli (13) والموصوفة من قبل Garfin (8) في اختبار نقاوة الإنزيم وتقدير وزنه الجزيئي.

عين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم باستعمال المحاليل الدارئة التالية بتركيز 0.2 مولار ،1-محلول الفوسفات الدارئ يتكون من حامض الفوسفوريك وفوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين للحصول على الارقام الهيدروجينية (1 و 2 و 3) .2-محلول الخلات الدارئ يتكون من حامض الخليك وخلات الصوديوم للحصول على الارقام الهيدروجينية (4 و 5) 3-محلول الفوسفات الدارئ يتكون من فوسفات الصوديوم احادية وثنائية الهيدروجين للحصول على الارقام الهيدروجينية (6 و 7 و 8) 4-محلول Tris_Hcl الدارئ للحصول على الرقم الهيدروجيني (9)،قدرت الفعالية التحليلية ثم رسمت العلاقة بين الفعالية التحللية للانزيم وقيم الارقام الهيدروجينية لتعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم التحللية،كما عين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بخلط حجم معين من الانزيم مع حجم مساوٍ له من المحاليل الدارئة بارقام هيدروجينية متدرجة من 1-9 وحضن بدرجة حرارة35 م لمدة نصف ساعة ثم نقل الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية التحللية .تم تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم التحللية وذلك بتقدير الفعالية في مدى من درجات الحرارة تراوح بين 15_85 م.كما تم تعيين الثبات الحراري بحضن حجم معين من الانزيم بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 15- 85 م لمدة 15 دقيقة ثم نقل الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية التحللية

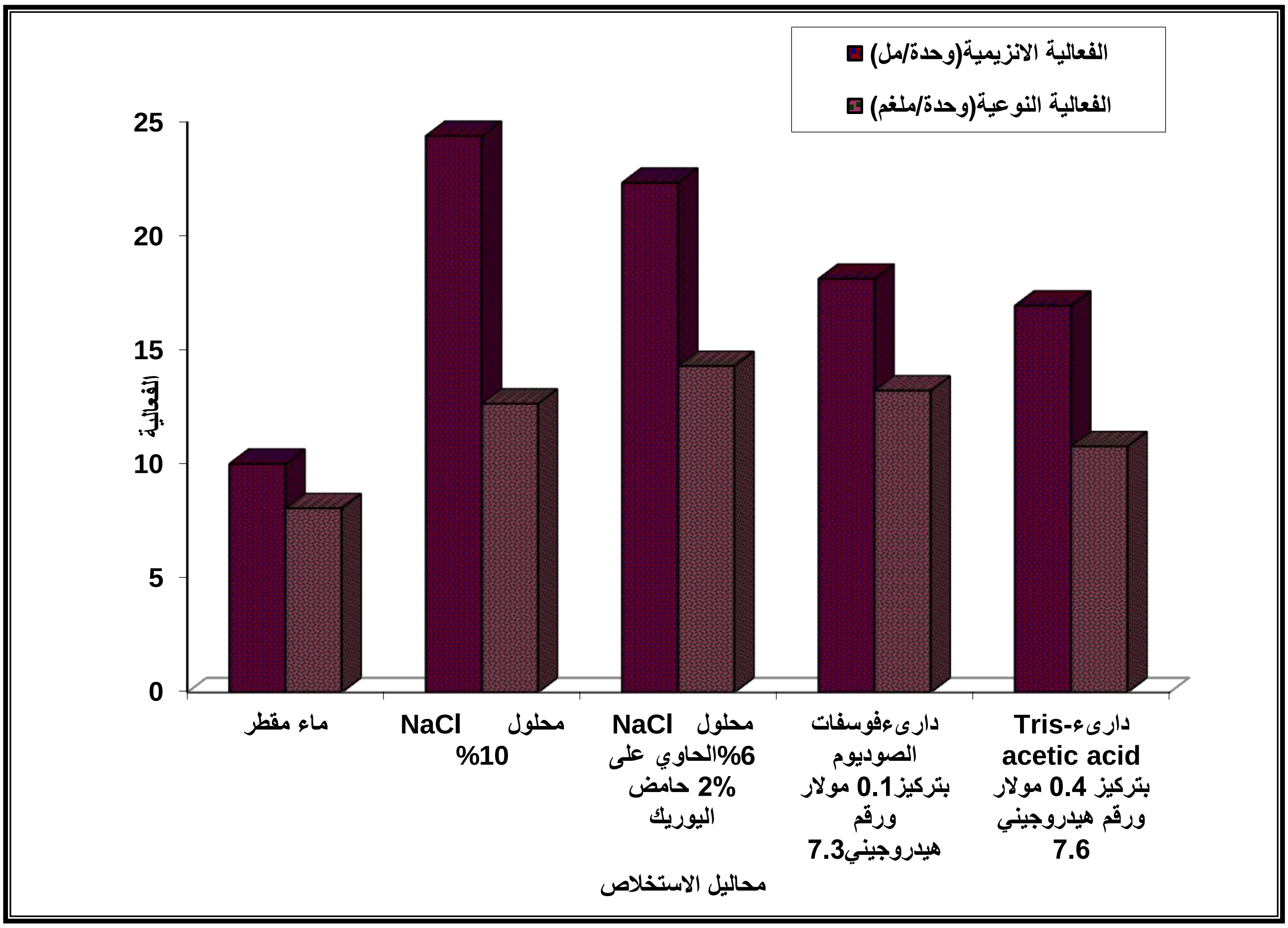
4- ربـط الانــزيم: ربـط الانـزيم باتبــاع الطريقــة الموصــوفة مــن قبــل Shubber (22) وبتركيز 3%.

النتائج والمناقشة

استخلاص الانزيم

تم استخلاص انزيم الببسين من معدة الاغنام باستعمال خمسة انواع من محاليل الاستخلاص تمثلت بالماء المقطر، محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 10% ، محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 6 % الحاوي على 2 % حامض بوريك ، محلول فوسفات الصوديوم الداريء بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.3 ومحلول Tris-acetic acid بتركيز 0.4 مولار برقم هيدروجيني 7.6 .

اشارت النتائج الموضحة في الشكل (1) الى ان افضل محلول لاستخلاص الببسين هو محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 6% الحاوي على 2% حامض بوريك، اذ انه اعطى اعلى فعالية نوعية والتي كانت 14.3 وحدة /ملغم مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى حيث تراوحت الفعالية النوعية فيها بين 8.04-13.49 وحدة/ملغ .



شكل رقم (1) مقارنة بين محاليل استخلاص انزيم الببسين من معدة الاغنام

ان الاختلافات الموجودة في قيم الفعالية النوعية لمحاليل الاستخلاص يمكن ان تعزي الى اختلاف ذائبية البروتينات الموجودة في انسجة المعدة باختلاف محاليل الاستخلاص والتي تنعكس

على تركيز البروتين وهذا بدوره يؤثر على الفعالية النوعية لانزيم الببسين .

تنقية انزيم الببسين

1- تركيز الانزيم: ركز انزيم الببسين باستخدام املاح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع متدرجة تراوحت بين 20-90 %، وكانت افضل نسبة اشباع لتركيز ببسين الاغنام من 30-70% حيث جمع الراسب الناتج من الطرد المركزي واذيب في قليل من الماء المقطر وتمت ديلزته تجاه الماء المقطر للتخلص من كبريتات الامونيوم ثم قيست فعالية الانزيم وتركيز البروتين فيه واعطت هذه الخطوة فعالية انزيمية ونوعية مقدارها 54.2% وحدة /مل و44.42 وحدة /ملغم على التوالي، وحققت هذه الخطوة تنقية جزئية للانزيم بلغت 3.1 مرة وحصيلة انزيمية مقدارها 48.5% كما موضح في الجدول (1).

2- كروماتوكرافيا التبادل الايوني: اجريت عملية التبادل الايوني كخطوة ثانية لتنقية ببسين الاغنام المركز بكبريتات الامونيوم والمديلز الناتج من خطوة التنقية الاولى. استخدم المبادل DEAE-Sephadex A50 في هذه الخطوة وهو مبادل ايوني للشحنات السالبة (Anion-charges) الذي يمكن ان يفصل بواسطة خليط من البروتينات بالاعتماد على طبيعة شحنتها.

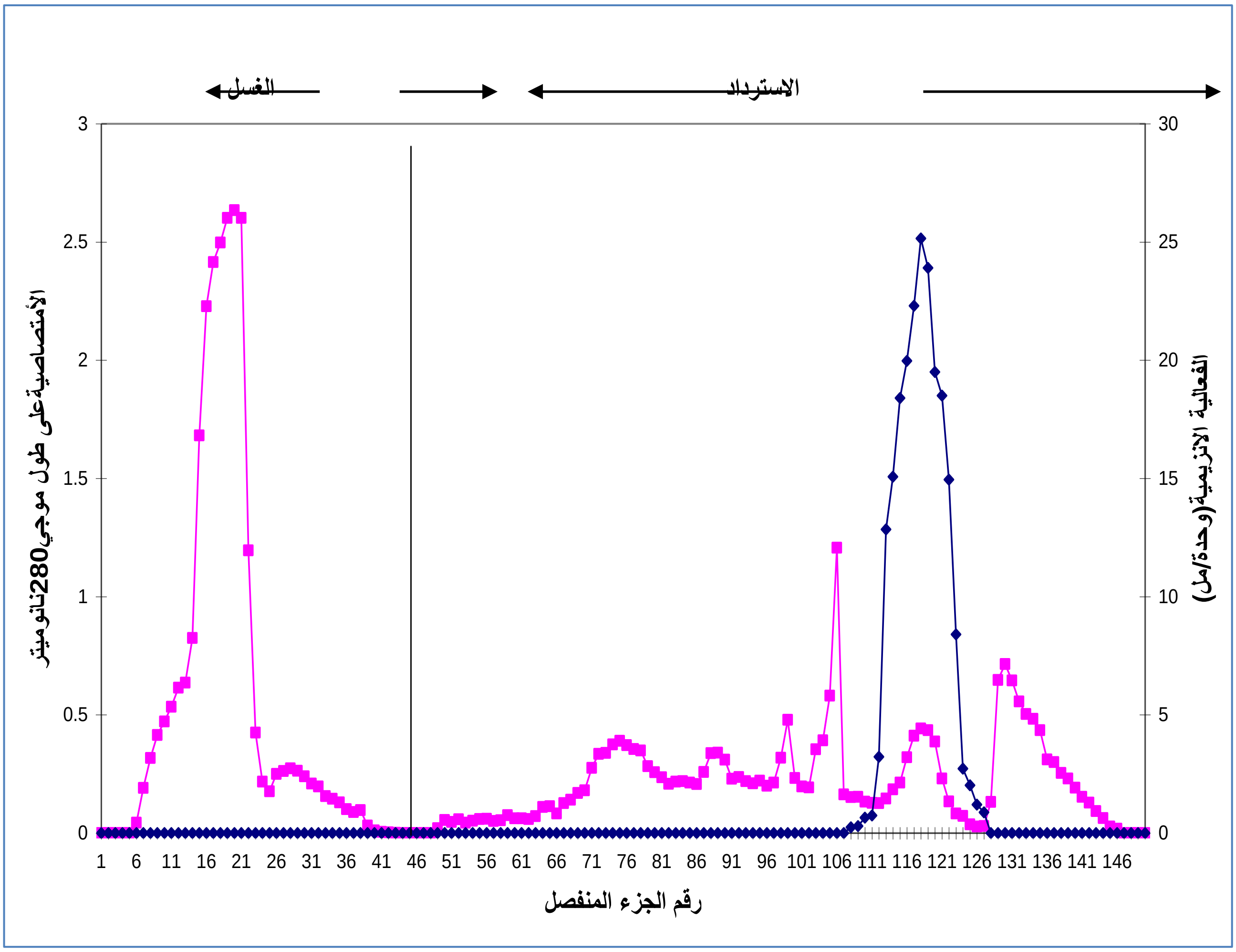
مرر المحلول الانزيمي المركز على المبادل الايوني DEAE-Sephadex A50 الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارىء بتركيز 0.02 مولار ورقم هيدروجيني 5.3 واستقبلت الاجزاء المفصولة بسرعة جريان 60 مل/ساعة ، قيست الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر للاجزاء المفصولة من المبادل خلال مرحلة الغسل Washing وبينت النتائج في الشكل (2) ظهور قمة بروتينية واحدة تخلو من الفعالية الانزيمية مما يدل على ان هذه القمة تضم البروتينات ذات الشحنة الموجبة (Cation) وخروجها في مرحلة الغسل نتيجة لحصول تنافر للشحنات بينها وبين مادة المبادل .

ان خلو هذه القمة من انزيم الببسين يدل على انه يحمل شحنة سالبة جعلته يرتبط بقوة بالمبادل الايوني ، لذلك اجريت عملية استرداد الانزيم بأسلوب التدرج الملحي الخطي باستخدام محلول كلوريد الصوديوم بتركيز (0-1) مولار وبمعدل جريان 60 مل في الساعة .

قيست الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر ولوحظ ظهور عدة قمم بروتينية وان هناك قمة واحدة اعطت فعالية انزيمية (تحليلية) دون القمم الباقية، جمعت اجزاء هذه القمة والتي تضم الانابيب من 108-127 وقدر حجمها وتركيز البروتين فيها وفعاليتها حيث بلغت فعاليتها الانزيمية 12.62 وحدة /مل اما فعاليتها النوعية فبلغت 200.79 وحدة /ملغم ، وبذلك بلغ عدد مرات التنقية في مرحلة التبادل الايوني 14.02 مرة اما الحصيلة الانزيمية فبلغت 26.41% كما موضح في الجدول (1).

جدول رقم (1) نتائج خطوات تنقية إنزيم الببسين المستخلص من معدة الاغنام

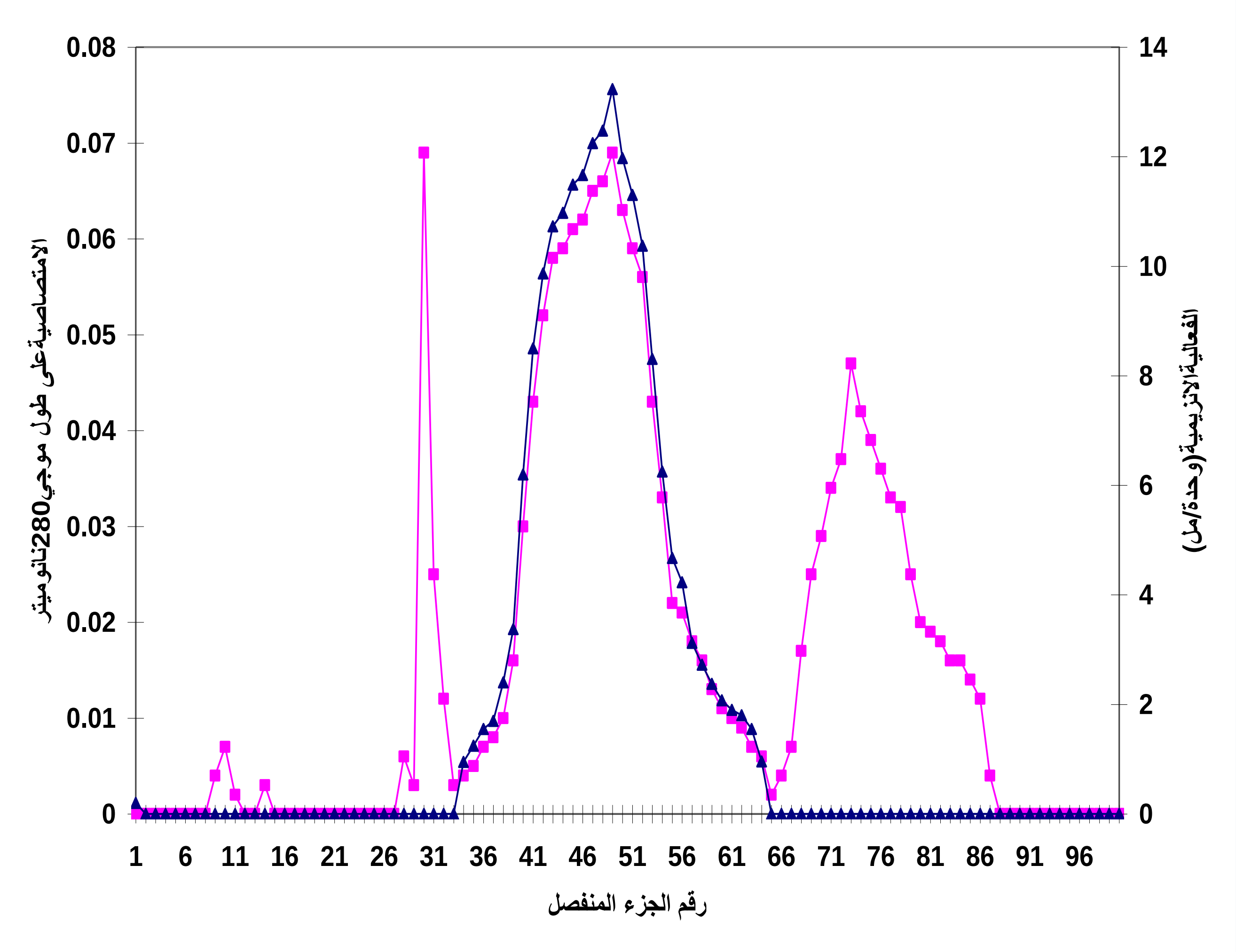
ت	خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية الانزيمية	تركيزالبروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
1	المستخلص الخام	150	22.35	1.56	14.32	3352.5	1	100
2	التركيز بكبريتات الامونيوم	30	54.2	1.22	44.42	1626	3.10	48.5
3	التبادل الايوني	70	12.65	0.063	200.79	885.5	14.02	26.41
4	الترشيح الهلامي	65	9.5	0.024	395.83	617.5	27.64	18.4



شكل رقم (2) كروماتوكرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم الببسين المستخلص من معدة الاغنام باستعمال عمود DEAE-Sephadex A50 بابعاد (1.6 × 40) سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارىء بتركيز 0.02 مولار ورقم هيدروجيني 5.3 بسرعة جريان 60مل/ساعة بواقع 5 مل /جزء

3- الترشيح الهلامي

جـرت موازنـة عمـود الترشـيح الهلامـي Sephadex Gl00 باسـتعمال محلـول فوسـفات الصـوديوم الـدارىء بتركيـز 0.02 مـولار ورقـم هيدروجيني 6.3 بعدها اضيف المحلـول الانزيمي الناتج من خطوة التبـادل الايوني الى عمود الترشيح الهلامـي واسـترد الانـزيم بـالمحلول الـدارىء نفسـه بسرعة جريان 20 مل/ساعة .

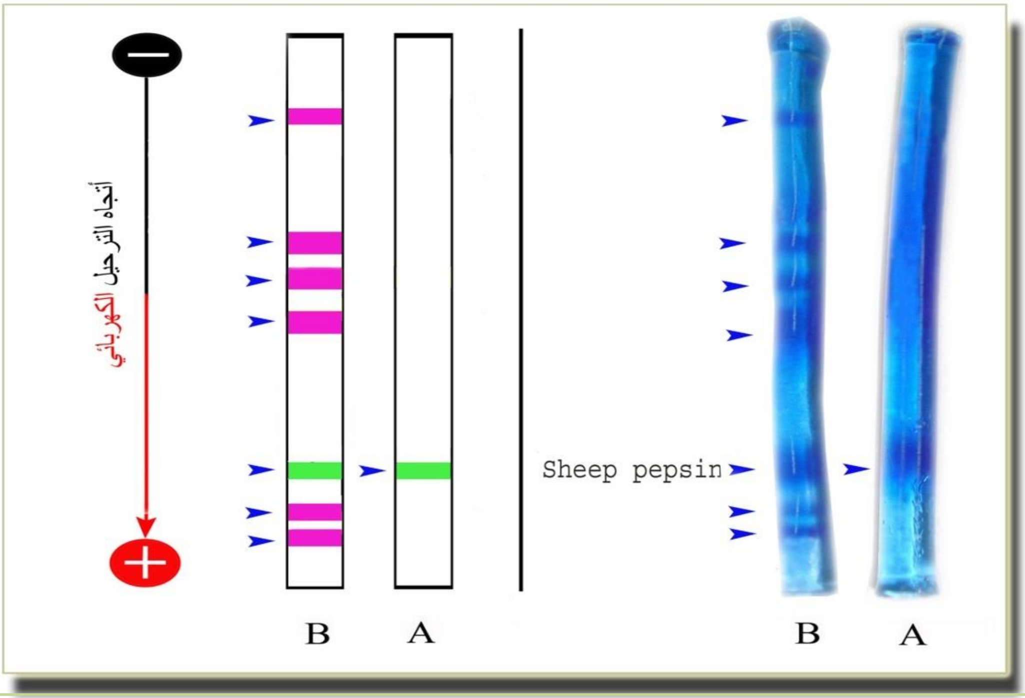


شكل رقم (3) الترشيح الهلامي لانزيم الببسين المستخلص من معدة الاغنام باستعمال عمود Sephadex G-100 وبابعاد (2.5×80)سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.02 مولار ورقم هيدروجيني 6.3 بسرعة جريان 20 مل/ساعة بواقع 3 مل / جزء

اظهـرت النتـائج الموضحـة في الشكل (3) وجود ثلاث قمم عند قياس الامتصاصية على طول موجـي مقداره 280 نـانوميتر للاجـزاء المسـتردة ،وعند قياس الفعاليـة الانزيميـة لاجزاء هـذه القمم ظهر ان فعاليـة الانزيم (التحليلية) كانت محصـورة بالانابيب مـن 34-64 والتـي تمثـلت بقمـة مطابقـة لقمـة البـروتين الثانيـة ممـا يـدل دلالـة اوليـة علـى نقـاوة الانـزيم . جمعـت اجـزاء هـذه القمـة وقـدر حجمها وتركيز البروتين فيها وفعاليتها حيث بلغـت الفعاليـــة الانزيميـــة والنوعيـــة 9.5 وحـــدة /مـــل ، 395.83 وحـــدة /ملغـــم علـــى التـــوالي ، وان هـــذه الخطـوة حققت حصـيلة انزيميـة مقدارها 18.4% بعـدد مـرات تنقيـة 27.64 مـرة كمـا موضـح فـي الجدول (1).

تعيين نقاوة الانزيم

يوضح الشكل (4) نتائج الترحيل الكهربائي لانزيم الببسين المنقى من معدة الاغنام



❖ A : الإنزيم المنقى بواسطة الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-100
❖ B: المستخلص الأنزيمي الخام

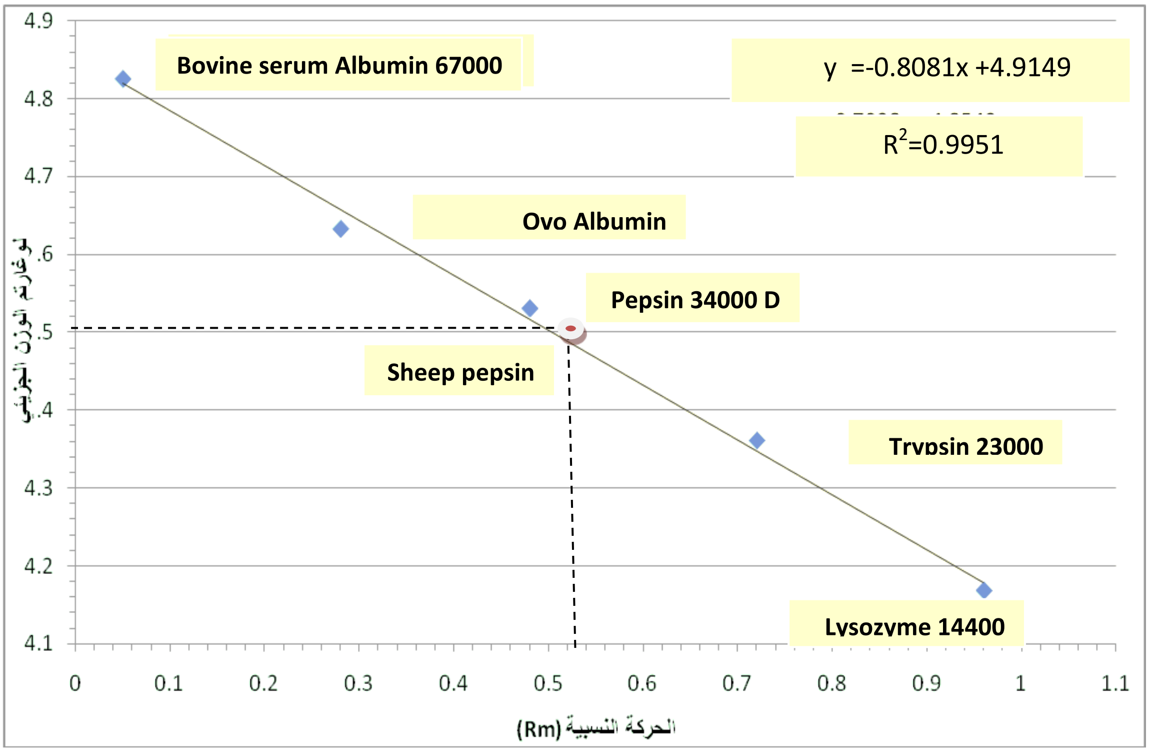
شكل رقم (4) الترحيل الكهربائي للببسين الاغنام بغياب المادة الماسخة SDS في هلام الاكريل امايد

اجريت عملية الترحيل الكهربائي بغياب المواد الماسخة للتأكد من نقاوة الانزيم وخلوه من أي بروتينات او انزيمات اخرى ، اذ يلاحظ من الشكل ظهور حزمة بروتينية واحدة في الهلام الذي يعد احد الدلائل على نقاوة الانزيم وهذا يدل ايضا على ان الخطوات والظروف التي استعملت في استخلاص وتنقية الانزيم كانت كفوءة بالقدر الذي تم فيه الحصول على حزمة بروتينية واحدة لانزيم الببسين في اختبار تعيين نقاوته .

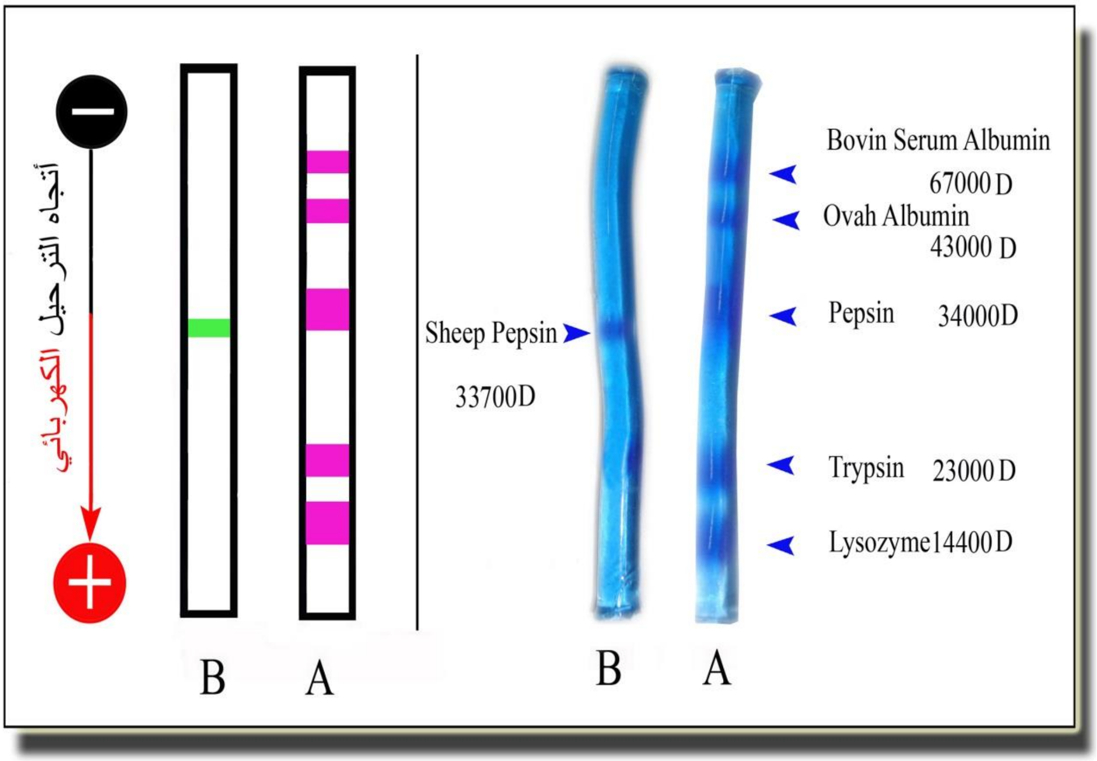
تعيين الوزن الجزيئي

تم تقدير الوزن الجزيئي لببسين الاغنام النقي باتباع طريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود المواد الماسخة باستعمال البروتينات القياسية .

يبين الشكل (5) العلاقة بين لوغارتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية للبروتينات معلومة الوزن الجزيئي Relative mobility (Rm) المستخدمة في تقدير الوزن الجزيئي للانزيم النقي.قيست الحركة النسبية Rm للانزيم ومن خلال القيمة المستحصل عليها امكن تحديد الوزن الجزيئي ووجد انه يساوي 33.700 دالتون .



شكل رقم (5) منحني تقدير الوزن الجزيئي لببسين الاغنام بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد المتعدد وبوجود المادة الماسخة SDS و2- مركابتوايثانول



❖ A : البروتينات القياسية معلومة الوزن الجزيئي

❖ B : ببسين الاغنام في هلام الاكريل امايد بوجود المادة الماسخة SDS

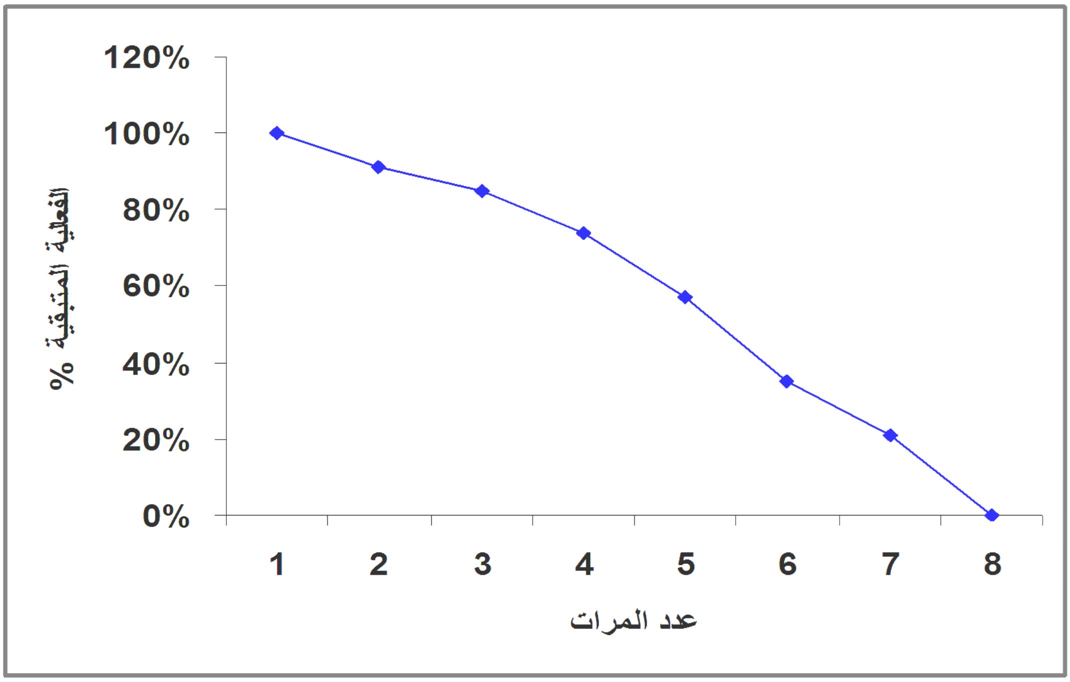
شكل رقم (6) الترحيل الكهربائي لببسين الاغنام والبروتينات القياسية في هلام الاكريل امايد بوجود المادة الماسخة SDS و 2-مركابتو ايثانول

ربط ببسين الأغنام النقي بالحجز بالاكار

تم ربط انزيم الببسين المنقى كلياً من معدة الاغنام باستخدام طريقة الحجز بالاكار بتركيز 3% بعدها قدرت كفاءة ربط الانزيم ووجد انها تبلغ 63%.

تـأثير عدد مرات استعمال الانزيم المرتبط على الفعالية

درس تـأثير عـدد مـرات اسـتعمال قطـع الاكـار المحتوية علـى ببسين الاغنـام النقـي على الفعالية المتبقية للانزيم المرتبط ،وتبين النتائج في الشكل (7) الى امكانية استعمال الانزيم المرتبط لغاية 7 مرات لكن الفعالية الانزيمية تـقل مع زيادة عـدد مـرات الاسـتعمال .حيـث احتفظـا ببسـين الاغنام النقي بـ 74% عند الاستعمال الرابع ، بينما احتفظ بـ 21% عند الاستعمال السابع وانه فقد فعاليتـه بأكملها عنـد الاسـتعمـال الـثامن ،جـاءت هـذه النتائج مقاربة الى ما توصـل اليـه Altun و Cetinus (1) عند دراستهما تأثيـر عـدد مـرات استعمال ببسـين الخنـازير المرتبط بحبيبات الكيتوسـان حيث وجدا ان فعالية الانـزيم تـنخفض مـع اسـتمرار الاسـتعمال وانها بلغت 20% عند الاستخدام السابع.



شكل رقم(7) عدد مرات استعمال ببسين الاغنام النقيً المرتبط بالاكار بتركيز 3%

الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الببسين

قدر الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحليلية لببسين الاغنام النقي الحر والمرتبط بمدى من الارقام الهيدروجينية تتراوح بين 1-9 وبينت النتائج الموضحة في الشكل (8) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لببسين الاغنام النقي الحر والمرتبط بلغ 2 ،حيث اعطى اقصى فعالية عند هذا الرقم الهيدروجيني والتي بلغت 9.6 وحدة /مل للحر و 8.45 وحدة/مل للمرتبط . نلاحظ من النتائج انخفاض الفعالية التحللية لكلا الانزيمين الحر والمرتبط منهما بارتفاع الرقم الهيدروجيني عن 3 ويأتي هذا الانخفاض نتيجة لتاثير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في المجاميع القابلة للتأين الموجودة في الموقع الفعال او لتغيير الحالة الايونية للمادة الاساس او لتغيير الحالة الايونية لمعقد الانزيم – المادة الاساس (ES) ومعقد الانزيم الناتج (EP) (7 و 26). جاءت هذه النتائج مقاربة لما وجده Fox وآخرون (6) من ان قيمة الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحللية لببسين الاغنام النقي بلغ 1.8 ،والى ما توصل اليه Shah وآخران (21) من ان الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحللية لببسين الخنازير الحر هو 2 وللمرتبط براتنج SRF (Salicylic acid-resorcinol-Formaldehyde) كان يتراوح بين 2-4 .

الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الببسين

تم تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات ببسين الاغنام النقي الحر والمرتبط بحضنه لمدة دقيقة في محاليل دارئة تراوحت ارقامها الهيدروجينية بين 1-9 . اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (9) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات

ببسين الاغنام النقي الحر والمرتبط هو 2 ولوحظ احتفاظ الانزيم الحر ب 75% من فعاليتة التحللية عند الرقم الهيدروجيني 1 بينما احتفظ الانزيم المرتبط ب 82% من فعاليته التحللية عند نفس الرقم الهيدروجيني ، وان ببسين الاغنام الحر والمرتبط ينخفض ثباته مع ارتفاع الرقم الهيدروجيني عن 2 وانه فقد فعاليته عند الارقام الهيدروجينية القاعدية 8 و9 .

درجة الحرارة المثلى لفعالية الببسين

تشير النتائج في الشكل(10) الى حصول زيادة واضحة في الفعالية التحللية بزيادة درجة حرارة التفاعل حتى بلغت اقصاها عند درجة حرارة 35 م لببسين الاغنام النقي الحر، وان درجة حرارة المثلى للمرتبط كانت 45 م حيث بلغت الفعالية التحللية 14.5 وحدة /مل للحر و 13.8 وحدة /مل للمرتبط. بعد ذلك انخفضت الفعالية التحللية بزيادة درجة الحرارة لتصل الى 4.56 وحدة /مل لببسين الاغنام النقي الحر عند 65 م والى 4.13 وحدة /مل لببسين الاغنام النقي المرتبط عند 75 م والى 10.4 وحدة /مل لببسين الدجاج المنقى جزئيا الحر عند 75مْ والى 14.3 وحدة /مل لببسين الدجاج المنقى جزئيا المرتبط عند 75مْ. ان زيادة سرعة التفاعلات الانزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة يعود الى زيادة الطاقة الحركية للجزيئات ومن ثم زيادة التصادمات بين جزيئات الانزيم وجزيئات المادة الاساس ، اما انخفاض الفعالية الانزيمية عند الدرجات الحرارية العالية فانه يعود الى امتصاص الجزيئات المتفاعلة لطاقة عالية مما يؤدي الى تغيير التركيب الثلاثي للانزيم ومن ثم مسخه وفقدانه جزء من فعاليته (20).

جاءت هذه النتائج متفقة مع ما ذكره Pletschke (19) في ان درجة الحرارة المثلى للفعالية التحليلية لببسين النعام تراوحت بين 40-60 م، والى ما توصل اليه Altun و Cetinus (1) في ان درجة حرارة المثلى لفعالية ببسين الخنازير التحللية كانت تتراوح بين 30-40 م للببسين الحر وبين 40-55م للببسين المرتبط بحبيبات الكيتوسان .

درجة الحرارة المثلى لثبات الببسين

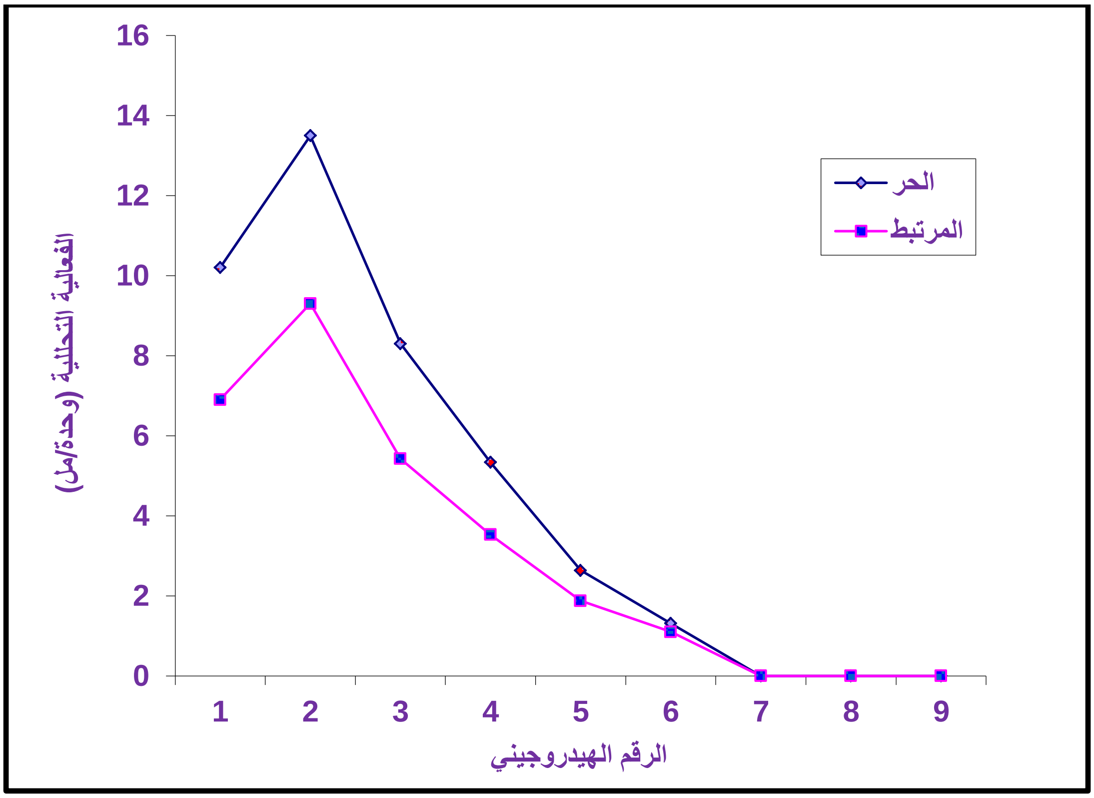
يوضح الشكل (11) نتائج حضن ببسين الاغنام النقي الحر والمرتبط بدرجات حرارة تراوحت بين 15-85 مْ لمدة 15 دقيقة وتبين النتائج ان ببسين الاغنام النقي الحر والمرتبط احتفظ بكامل الفعالية التحللية والتخثرية بدرجة حرارة تراوحت بين 15-35 م ،وان الفعالية التحللية انخفضت مع ارتفاع درجة الحرارة حيث احتفظ الانزيم الحر بـ 44% من فعاليته واحتفظ المرتبط بـ 62% من فعاليته عند درجة حرارة 45م بعد ذلك انخفضت الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة الى ان فقدت بالكامل عند درجة حرارة 75م للحر و85 م للمرتبط , ويعزى سبب انخفاض فعالية الانزيم مع ارتفاع درجة الحرارة الى ان الحرارة العالية تؤثر في تركيب الانزيم اذ تؤدي الى مسخه وتغيير هيئة الموقع الفعال مما يؤدي الى فقدان فعاليته (15) . كذلك نلاحظ من النتائج ان الانزيم المرتبط اكثر ثباتاً من الانزيم الحر وذلك لان عملية الربط تعطي حماية للموقع الفعال الخاص بالإنزيم (18) .

اتفقت هذه النتائج مع ما وجده Shah (21) في ان درجة الحرارة المثلى لثبات ببسين الخنازير الحر والمرتبط براتنج SRF

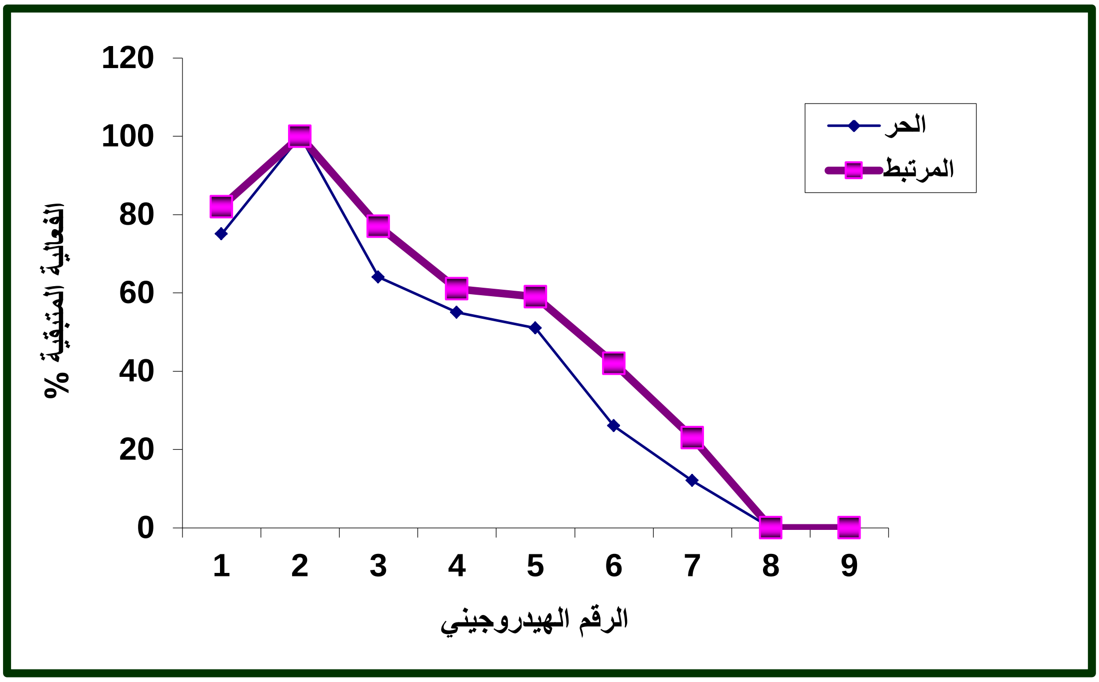
(Salicylic acid-resorcinol-Formaldehyde) كانـــت 30م وان الببســـين المرتبط كان اكثر ثباتاً من الحـر، والـى مـا توصل اليـه Klomklae (12) فـي ان درجـة الحـرارة المثلـى لثبات ببسـين سـمك A Pectoral rattail وB تراوحت من 20-40م.

طاقة التنشيط

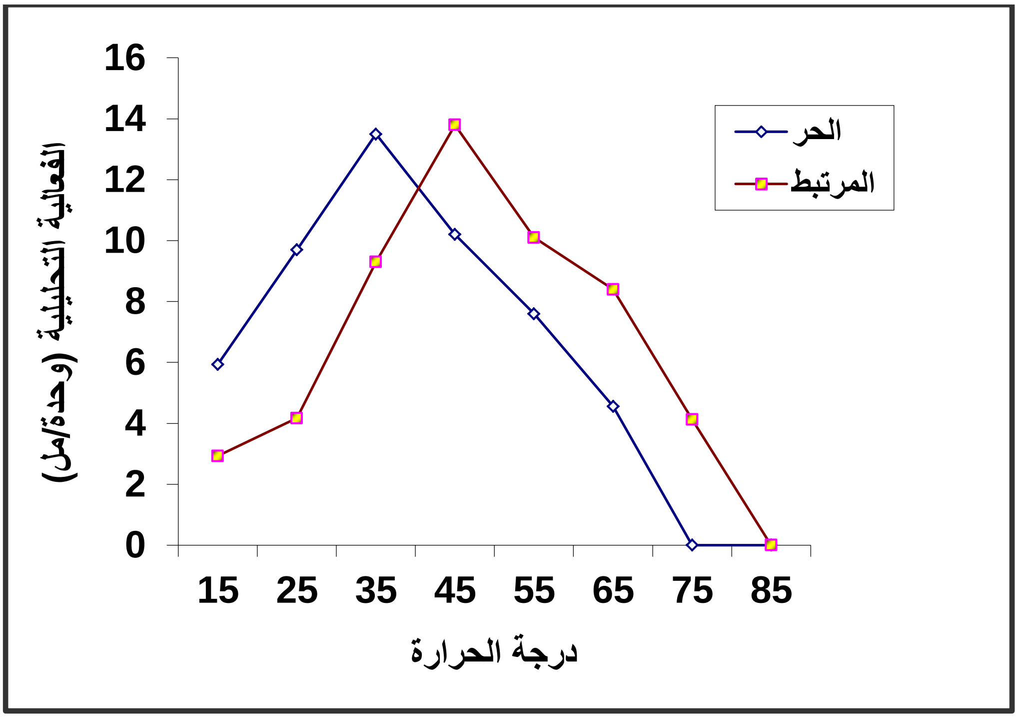
يبين الشكلين (12)و (13) العلاقة بين لوغـاريتم سـرعة التفاعـل لببسـين الاغنـام الحـر والمـرتبط بالاكـار علـى التـوالي ومقلـوب درجـة الحرارة المطلقة طبقاً لمعادلة ارينيوس ، وقد كانت قيمة طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الاساس الـى نـاتج 8.13 كيلـو سـعرة/ مـول للبسـين الحـر و 10.79 كيلوسـعرة/مول للببسـين المـرتبط بالاكـار ، وتعد هذه القيمـة ضـمن المـدى المعروف لقيم طاقة التنشيط (Ea) لتفاعلات تحويل المادة الاسـاس الـى نــاتج بواســطة الانزيمــات التــي تقــع بــين 6-15 كيلوسـعرة/مول (26). اتفقت القيمـة المستحصـلة لانزيم الببسين مع ما توصـل اليـه Brewer (5), آذ كانـت طـاقـة التنشـيط 7.257 كيلـو سـعرة / مـول لانزيم الببسين المنقى من معدة سمك القد الاطلسي Atlantic cod ومع ما وجده Altun و Cetinus (1), اذ بلغت طاقة التنشيط 8.01 كيلو سعرة/مول لببسين الخنازير .



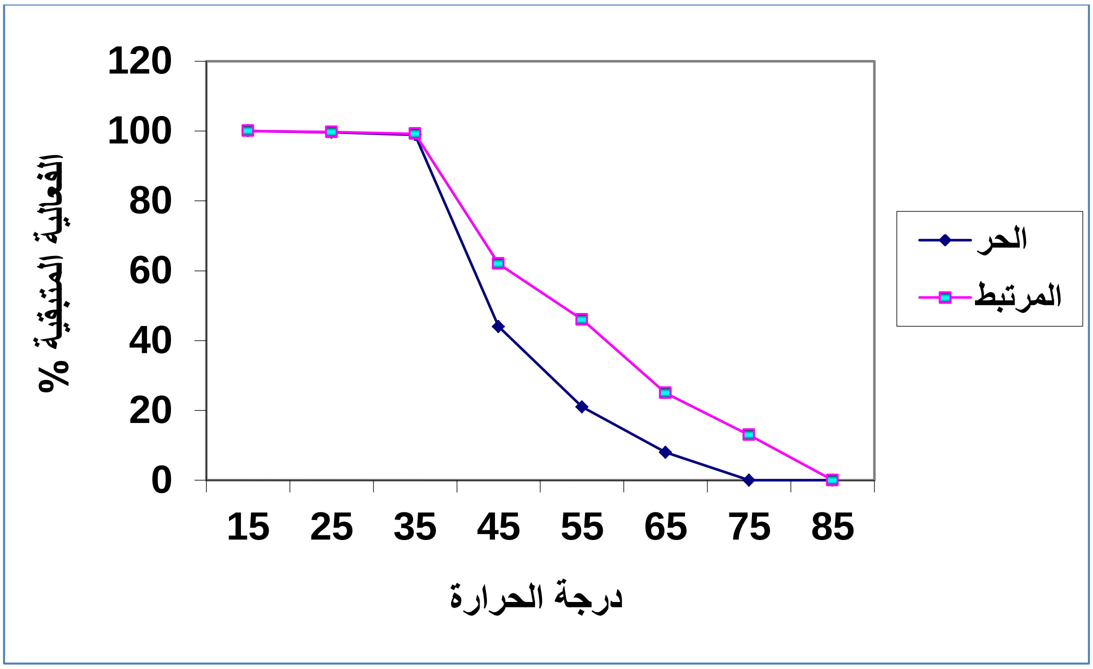
شكل رقم(8) الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية التحليلية لببسين الاغنام الحر والمرتبط بالاكار



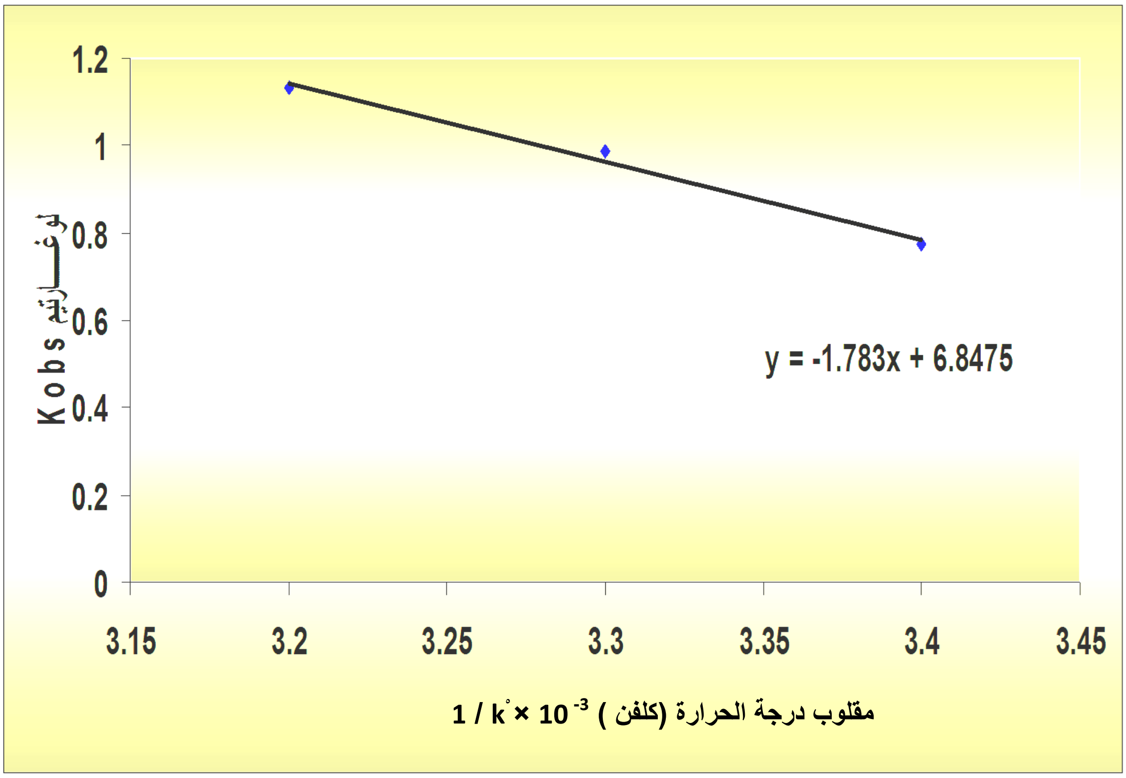
شكل رقم (9) الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الفعالية التحللية لببسين الاغنام الحر والمرتبط بالاكار



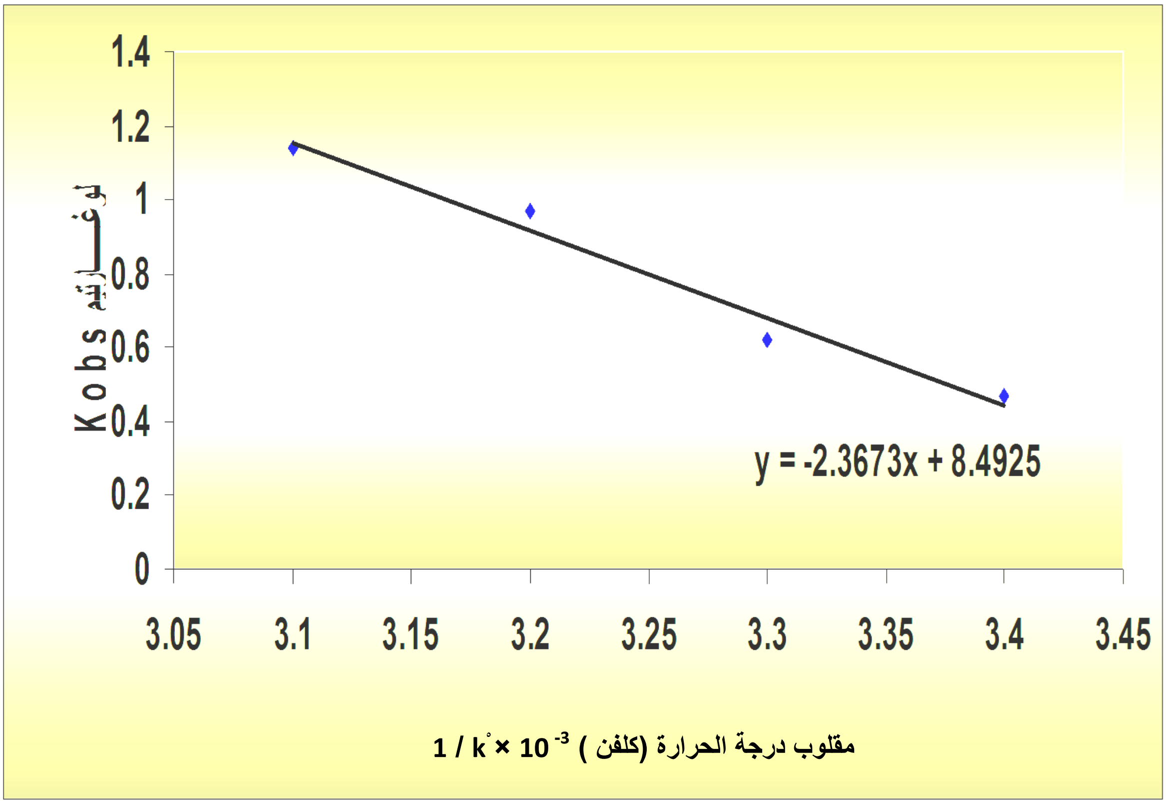
شكل رقم (10) درجة الحرارة المثلى للفعالية التحللية لببسين الاغنام الحر والمرتبط بالاكار



شكل رقم (11) درجة الحرارة المثلى لثباتية الفعالية التحللية لببسين الاغنام الحر والمرتبط بالاكار



شكل (12) منحنى ارينيوس لتقدير طاقة التنشيط للبسين الاغنام الحر



شكل رقم(13) منحنى ارينيوس لتقدير طاقة التنشيط للبسين الاغنام المرتبط

References

1- Altun, G. D. and S. A. Cetinus . 2007. Immobilization of pepsin on chitosan beads. Food Chemistry, 100:964-971.

2- Barrett , A. J. 1980. In : Protein degradation in health and disease. (Eds., Evered. D.C. and Whelan, J.) Vol.4: 1-9 CIBA Foundation symposia. Excerpt Medica. Amsterdam. Holland.

3- Berridage, N. J. 1952. An Improved method of observing the clotting of milk containing rennin. J. Dairy Res., 19:329-338.

4- Bougatef, A.; Balti, R.; Zaied, S. B.; Souissi, N. and Nasri, M. 2008. Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth

hound (*Mustelus mustelus*): purification, characterization and amino acid terminal sequences. Food Chemistry, 107:777-784.

5- Brewer, P.; Helbig, N. and Haard, N. F. 1984. Atlantic cod pepsin – characterization and use as a rennet substitute. J. Food Sci. Technol., 17(1):38-43.

6- Fox, P.F.; Whitaker, J.R. and O′ Lrary, P.A. 1977. Isolation and characterization of sheep pepsin. Biochem. J., 161: 389-398 .

7- Fullbrook, P.O. 1983. Practical limits and prospects, In “Industrial Enzymology” Application of Enzymes (Ed, T.Godfery and J .Reichelt). The National Press .London.UK.

8- Garfin, D.E. 1990. Purification Procedures Electrophoresis Methods. In: Methods in Enzymology. Murray, E.D. and Dentscher, P.J. (Eds), Vol. 182: 425-441.

9- Godfrey, T. and J. Reichelt . 1983. Industrial Enzymology. Nature Press, New York. USA.

10- Green, M.L. 1972. Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as rennet substitutes for cheddar cheese-making. J. Dairy Res., 39: 261-273.

11- Kennedy, J.F. and E. H. M. Melo . 1990. Immobilized Enzymes and cells. Chem. Eng. Prog., 86(7): 81-89.

12- Klomklao , S. ; Kishimura , H. ; Yabe M. and Benjakul, S. 2007. Purification and characterization of two pepsin from the stomach of pectoral rattail (coryphaenoides oectoralis). Comparative Biochemistry and physiology, part B, 147: 682-689.

13- LaemmLi, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage. Nature. 22:680. 685

14- Lowery, O. H.; Resobrough, N. J.; Farr, A.L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement

Press, New York. USA . pp. 51–62.

19- Pletschke, B.I.; Navde, R.J. and Oelofsen, W. 1995. Ostrich pepsin I and II: A kinetic and thermodynamic Investigation. Int. J. Biochem. Cell Biol., 27(12):1293-1302.

20- Segel, I.H. 1976. Biochemical calculations. 2nd edition, John Wiley and Sons. Inc. New York. USA .

21- Shah, B.; Kumar, S.R. and Devi, S. 1995. Immobilized proteolytic Enzymes on Resinous Materials and their use in Milk-clotting. process Biochemistry, 30(1):63-68.

22- Shubber, N.A.K. 2000. Production of gluconic acid from D-glucose by immobilization techniques in bioreactor. M.Sc. Thesis, Baghdad University.Iraq.

23- Temiz, H.; Okumus, E, Aykut, U.; Dervisoglu, M. and Yazici, F. 2008. Partial purification of pepsin from turkey proventriculus. World J.

with the folin phenol reagent. J. Biological Chem., 193(1): 265-275.

15- Maciunska, J.; Czyz, B. and Synowiecki, J. 1998. Isolation and some properties of B-galactosidase from the thermophilic bacterium thermos thermophilus. Food Chemistry, 63(4): 441 – 445.

16- Moschopoulou, E.E.; Kandarakis, I.G.; Alichanidis, E. and Anifantakis, E.M. 2006. Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. J. Dairy Research, 73:49-57.

17- Moses, V. and R. E. Cape . 1991. Biotechnology, the science and business. UK: Harwood Academic publishers:322-326.

18- Olson, A.C. and W. L. Stanley . 1974 . The use of tannic acid and phenol-formaldehyde resins with gluteraldehyde to immobilize enzymes. In: Immobilized enzymes in food and microbial processes. (Eds., Olson, A. C. and Cooney, C.L.). Plenum

Microbiol. Biotechnol., 24(9): 1851 – 1855.

24- Walsh, C. 1979. Enzymatic Reaction Mechanisms. W. H. Freeman and company. Sanfrancisco. USA.

25- Whitaker, J.R. 1958. Properties of the Proteolytic Enzymes of Commercial Ficin. J. Food Research, 22:483-493.

26- Whitaker, J.R. 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker, Inc., New York. USA . pp 571 – 579 .