IBN AL- HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI VOL. 23 (3) 2010

Use of Partial Purified Lipase From local Chicken kidney for Improvement the Flavor of Butter Fat

A. N. Al-Hasnawi, M. A. Al-Soufi ,R. A. Aziz
Department of Science, College of Basic Education, University of Al-Mustansiriya
***Center for Market Research and Consumer Protection, University of Baghdad**

Abstract

Lipase was extracted by Sodium acetate buffer (pH=6; 0.05M) Containing 0.1M NaCl. Enzyme content of crude extract was concentrated by gradual addition of ammonium sulfate at 30-60% saturation. The dialyzed extract was purified on ion-exchange chromatography through DEAE–Cellulose and gel-filtration chromatography through sephacryl S-200 column. The specific activity, enzyme yield and fold purification were 54.06 unit/mg, 42.6% and 10.88 respectively. The molecular weight of the Lipase was 43.651 KDa as determined by gel-filtration chromatography through sephacryl S-200 column. Partial purified lipase used for the improvement of the flavor of butter fat after 12 hours for storage.

استعمال أنزيم اللايبيز المنقى جزئيا من كبد الدجاج المحلي في تحسين خواص الدهن الحر

علي نوري الحصناوي، محمد عبد الرزاق الصوفي*، رغد أكرم عزيز
قسم العلوم / كلية التربية الأساسية – الجامعة المستنصرية
*** مركز بحوث السوق وحماية المستهلك – جامعة بغداد**

الخلاصة

استعمل محلول خلات الصوديوم الدرائ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.1 مولار لاستخلاص الأنزيم من كبد الدجاج، ورسب الأنزيم بملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع تراوحت بين 30-60% تلاها امراره على المبادل الايوني DEAE-Cellulose ثم الترشيح الهلامي باستعمال المرشح Sephacryl S-200 للحصول على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 54.06 وحدة/ملغم وحصيلة بلغت 42.6% وبعدد مرات تنقية 10.88 مرة، وبلغ الوزن الجزيئي للأنزيم 43.651 كيلو دالتون عند تقديره باتباع تقانة الترشيح الهلامي باستعمال المرشح الهلامي Sephacryl S-200، وجرى اختبار الأنزيم المنقى جزئيا في تحسين خواص الدهن الحر من خلال متابعة التغير الحاصل في أنموذج الدهن الحر الحاوي على أنزيم اللايبيز المنقى جزئيا، إذ أصبحت رائحة الدهن مقبولة بعد مرور 12 ساعة على الخزن.

المقدمة

ينتمي أنزيم اللايبيز إلى مجموعة الانزيمات المحللة Hydrolytic Enzymes (Hydrolases) الذي يمتلك التسمية النظامية EC: 3.1.1.3 وفقا للتصنيف المعتمد من الاتحاد العالمي للكيمياء الحياتية [1]، ويؤدي دوراً مهماً في أيض الخلية من خلال التفاعلات التي يعمل بها على كسر رابطة معينة في جزيئات المادة المتفاعلة وإضافة جزيئة ماء إلى المواد الناتجة التي غالبا ما تكون تفاعلات عكسية [2]، ويقع أنزيم اللايبيز ضمن مجموعة أنزيمات Esterases التي تعمل على تحليل الأواصر الاسترية في الدهون والزيوت والتي يطلق عليها بـ Carboxylic Esterase، كما يعرف اللايبيز بأنه أحد أنزيمات التحلل المائي لاسترات الكليسيرول الذي يعمل على تحليل الأواصر الاسترية للدهون، ويتطلب عمل أنزيم اللايبيز وجود الكليسيريدات الثلاثية ذي درجة الذوبان الواطئة في الماء مادة أساس [3]، وينتج عن فعل أنزيم اللايبيز بعد أن يقوم بتحليل الأواصر الاسترية في الظروف الطبيعية كلا من الكليسيرول والأحماض الدهنية، إلا انه يقوم بعكس التفاعل عند فقدان الماء ليكون الكليسيريدات الثلاثية من الكليسيرول والأحماض الدهنية الحرة بعملية الاسترة [4]، ويقوم أنزيم اللايبيز بعمله هذا عن طريق تعرفه للمواقع المحددة في جزيئة الكليسيريدات الثلاثية ومهاجمته للأحماض الدهنية في الموقع الأول والثالث من مواقع الكربون بشكل منفرد أو مجتمع معا، إلا انه لا يهاجم الحامض الدهني في الموقع الثاني في جزيئة الكليسيرول الذي ينتقل إلى موقعه مع الأحماض الدهنية من خلال قيام جزيئة الكليسيرول الأحادية بتنظيم نفسها والتخلص من الحامض الدهني المرافق لها عن طريق دفعه إلى الأحماض الدهنية المنفصلة عن جزية الكليسيريدات الثلاثية [5].

يتواجد الأنزيم بشكل واسع في الكائنات الحية ويتم استخراجه وإنتاجه على المستوى التجاري من مصادر مختلفة، إذ تمثل الفطريات نسبة 50% من الإنتاج العالمي في حين تشكل المصادر البكترية والحيوانية والنباتية نسب مقدارها 25 و8 و4 % على التوالي من الإنتاج العالمي لهذا الأنزيم [6 ; 7]، وللأنزيم استعمالات واسعة في المجالات التطبيقية المختلفة، إذ يستعمل في مجال الصناعات الغذائية مثل صناعة الألبان من خلال مساهمته في تحليل دهن الحليب، وزيادة ظهور نكهة الجبن ،والإسراع في عملية الإنضاج [8]، كما يستعمل في تحسين خواص الدهن الحر من خلال التخلص من الرائحة غير المقبولة لهذا النوع من الدهون [9]، كما يستعمل في صناعة الخبز لتحسين الطعم والمحافظة على صفات الخبز وجعله اكثر ثباتا في درجات حرارة الخزن عن طريق إضافته مع أنزيم الاميليز إلى عجينة الخبز [10]، وفي المجالات الأخرى يستعمل اللايبيز بشكل واسع في صناعة الزيوت الصناعية وإنتاج صابون ذي نوعية عالية وصفات جيدة، فضلا عن استعماله في صناعة المنظفات عن طريق إضافته إلى مستحضرات التنظيف التجارية [11]، كما يستعمل في مجال الصناعات الصيدلانية ومستحضرات التجميل [12] وإنتاج الوقود الحيوي [13]، ونظراً لاحتواء كبد الدجاج على نسبة عالية من هذا الأنزيم من خلال

المقارنة مع المصادر الأخرى، لذا فقد هدف هذا البحث إلى إنتاج اللايبيز وتنقيته جزئيا من كبد الدجاج المحلي واستعماله في تحسين خواص الدهن الحر.

المواد وطرائق العمل

تحديد المحلول الامثل لاستخلاص الأنزيم:

استعملت محاليل استخلاص عديدة شملت كل من ماء المقطر وماء المقطر الحاوي على 0.1 مولار من كلوريد الصوديوم ،ومحلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 ،ومحلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على 0.1 مولار من كلوريد الصوديوم لتحديد المحلول الأمثل لاستخلاص الأنزيم، وتم الاستخلاص باستعمال 10 غم من كبد الدجاج المطي الذي قطع إلى قطع صغيرة بمساحة حوالي 0.5 سم لكل قطعة واضيف له 50 مللتر من محلول الاستخلاص المبرد وجرى استخلاصه بوساطة خلاط كهربائي مدة 5 دقائق، بعدها تم التخلص من الشوائب بوساطة قطة من قماش الململ ثم اجري النبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4 م وبسرعة مقدارها 5000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة للمستخلص وتم التخلص من الراسب والحصول على الرائق الذي يمثل المستخلص الأنزيمي الخام.

تقدير الفعالية الانزيمية:

قدرت الفعالية الأنزيمية وفقا للطريقة التي قام بوصفها [14] باستعمال p-nitro phenyl butyrate (pNPB) مادة أساس، و قدرت الفعالية الأنزيمية بالاعتماد على قياس الامتصاص الضوئي للمادة الناتجة عند طول موجي مقداره 410 نانومتر، وعرفت وحدة الفعالية الأنزيمية بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتحرير ملي مول واحد من مادة p-nitro phenyl خلال الدقيقة الواحدة تحت ظروف التفاعل المتمثلة بحضن الأنزيم لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 40 م.

تقدير تركيز البروتين:

قدر تركيز البروتين وفقا للطريقة الموصوفة من [15] باستعمال ألبومين المصل البقري (BSA) Bovine Serum Albumin بروتينا قياسيا، في حين تم الكشف عن تركيز البروتين خلال خطوات الفصل الكروماتوكرافي باستعمال الامتصاص الضوئي على موجة مقدارها 280 نانومتر.

تحديد الطريقة المثلى لتركيز الانزيم:

أ- التركيز باستعمال ملح كبريتات الامونيوم:

استعملت نسب إشباع تراوحت بين 20-90%، وذلك بإيصال المستخلص الأنزيمي الخام إلى نسبة الإشباع المطلوبة ثم فصل الرواسب المتكونة بعد كل إضافة بوساطة النبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4 م وبسرعة مقدارها 10000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة، وجرى إذابة الرواسب المتكونة بعد كل إضافة بوساطة محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.01 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6، وبعد تحديد نسب الإشباع التي أعطت أعلى فعالية إنزيمية، جمعت الرواسب المتكونة وأذيبت في المحلول الدارئ نفسه واجريت له عملية التنافذ الغشائي حيال الماء المقطر مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 4 م مع استبدال الماء المقطر كل 6 ساعات، تلاها تجفيد الأنزيم.

ب- التركيز باستعمال الكحول الاثيلي المبرد:

تم تركيز المستخلص الأنزيمي بإضافة أحجام معينة من الكحول الاثيلي المبرد ذي تركيز 98% تدرجيا مع التحريك المستمر للحصول على نسب مئوية متدرجة من الكحول تراوحت من 20-80%، ثم فصلت الرواسب المتكونة بعد كل إضافة بالنبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4 م وبسرعة مقدارها 10000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة وأذيب الراسب المتكون من كل مرحلة في اقل كمية من دارئ الفوسفات وقدرت الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين فيه.

تنقية الانزيم:

أ- تنقية الانزيم بأستعمال المبادل الايوني DEAE-Cellulose:

نقي الأنزيم وفقا لما وصفه [16] مع إجراء بعض التحوير، إذ مرر المحلول الأنزيمي المركز من الخطوة السابقة على عمود المبادل الايوني DEAE-Cellulose ذي أبعاد 30 x 1.5 سم، وبعد غسل المبادل بضعف حجمه بوساطة محلول الموازنة خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6، استردت الأجزاء المرتبطة بسطح المبادل بوساطة التدرج الملحي الخطي بمحلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على كلوريد الصوديوم بتراكيز متدرجة من 0-1 مولار، وجمعت الأجزاء المنفصلة بواقع 3.5 مللتر/جزء وبسرعة جريان مقدارها 42 مللتر/ساعة بوساطة التدرج الملحي الخطي، بعدها قيس الامتصاص الضوئي عند طول موجي مقداره 280 نانومتر للأجزاء المنفصلة وقدرت الفعالية الأنزيمية وحدة/مللتر، وجمعت الأجزاء القريبة من قمة منحنى الفعالية ،وقيست الفعالية الأنزيمية لها وحدة/مللتر، وتركيز البروتين ملغم/مللتر، واستخرجت الفعالية النوعية وحدة/ملغم بعد رسم العلاقة الخطية بين رقم الجزء المنفصل لكل من الأجزاء غير المرتبطة والمرتبطة حيال كل من الفعالية الأنزيمية وقراءة

البروتين عند طول موجي مقداره 280 نانومتر، بعدها أجريت عملية التنافذ الغشائي للأجزاء التي جمعت حيال محلول الموازنة خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 تلاها تركيز المحلول الأنزيمي بالتجفيد.

بـ- تنقية الانزيم بأستخدام المرشح الهلامي Sephacryl S-200:

أجريت خطوة التنقية وفقا لما وصفه [17] بأستعمال عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 ذي ابعاد 1.5 x 60 سم، إذ مرر 5 مللتر من المحلول الأنزيمي المحضر بتركيز 20 ملغم/مللتر باستعمال محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.15 مولار محلول إذابة وموازنة واسترداد وجمعت الأجزاء المنفصلة بواقع 3 مللتر/جزء وبسرعة جريان مقدارها 18 مللتر/ساعة، وبعد غسل عمود الترشيح الهلامي بضعف حجمه بوساطة محلول الموازنة، قرأت الأجزاء المنفصلة عند موجة ضوئية طولها 280 نانومتر وقيست الفعالية الأنزيمية وحدة/مللتر، ثم جمعت الأجزاء القريبة من القمة الحاوية على فعالية أنزيم اللايبيز وجرى قياس الفعالية الأنزيمية وحدة/مللتر وتركيز البروتين ملغم/مللتر واستخرجت الفعالية النوعية وحدة/ملغم للأنزيم بعد رسم العلاقة الخطية بين رقم الجزء المنفصل حيال كل من الامتصاص الضوئي عند موجة طولها 280 نانومتر والفعالية الأنزيمية وحدة/مللتر، بعدها أجريت عملية التنافذ الغشائي للمحلول الأنزيمي حيال الماء المقطر مدة 12 ساعة ثم جفد الأنزيم وحفظ بدرجة حرارة التجميد -18م.

تقدير الوزن الجزيئي:

اتبعت تقانة الترشيح الهلامي في تقدير الوزن الجزيئي للأنزيم المنقى جزئيا وفقا للطريقة التي قام بوصفها [18] مع إجراء تحوير تمثل باستبدال مادة الترشيح الهلامي Sephadex G-100 المستعملة من المصدر المشار إليه أعلاه بمادة Sephacryl S-200 وباعتماد ظروف الفصل أنفسها التي اتبعت في خطوة التنقية بالترشيح الهلامي، وجرى تحديد الوزن الجزيئي لأنزيم اللايبيز بوجود بروتينات قياسية مختلفة تمثلت بـ IgY وLactoferin وOvalbumin وLysozyme ذي أوزان جزيئيه تبلغ 180 و81 و42 و14.4 كيلودالتون على التوالي.

استعمال انزيم اللايبيز في تحسين نكهة الدهن الحر:

اتبعت الطريقة الموصوفة من [19] في استعمال أنزيم اللايبيز المنقى جزئيا لتحسين نكهة الدهن الحر، إذ إذيب 250 غم من الزبد المنتج محليا بوساطة التسخين، ثم رشح الدهن المذاب باستعمال قطعة من قماش الململ حاوية على طبقات قطنية عديدة للتخلص من الشوائب المتبقية والرواسب غير المرغوب بها، ووزع الدهن المرشح في دورقين محكمي الغلق وبواقع 50 مللتر/دورق، بعدها أضيف إلى أحد الدوارق 5 مللتر من الإنزيم المنقى جزئيا بتركيز 10 ملغم/مللتر عن طريق إذابته في محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.01 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 وتعقيمه باستعمال مرشح بقطر 0.22 مايكرون، في حين أضيف للدورق الثاني 5 مللتر من المحلول الدارئ نفسه المستعمل في إذابة الأنزيم المنقى جزئيا، ثم ضخ غاز النتروجين لكلا الدورقين لمنع النشاط الميكروبي، تلاه الحضن بدرجة حرارة 37 م مع التحريك المستمر مدة 48 ساعة جرى خلالها تقدير الفعالية الأنزيمية وتقييم رائحة الدهن المعامل وأنموذج السيطرة خلال 6 و12 و24 و48 ساعة على التوالي.

النتائج والمناقشة

تحديد المحلول الامثل لاستخلاص الأنزيم:

يبين الشكل (1) اختلاف الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين والفعالية النوعية لأنزيم اللايبيز المستخلص من كبد الدجاج باختلاف محاليل الاستخلاص المستعملة، إذ يلاحظ حصول زيادة في الفعالية النوعية بشكل واضح عند زيادة تركيز كلوريد الصوديوم المضاف إلى محلول الاستخلاص، وقد أظهرت النتائج تفوق محلول الاستخلاص خلات الصوديوم الدرائ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.1 مولار على بقية محاليل الاستخلاص، إذ أعطى هذا المحلول فعالية نوعية مقدارها 3.55 وحدة/ملغم في حين أعطت محاليل الاستخلاص الأخرى محلول خلات الصوديوم الدرائ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 ومحلول ماء المقطر الحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.1 مولار ومحلول ماء المقطر فعالية نوعية مقدارها 2.22 و1.74 و1.41 وحدة/ملغم على التوالي.

تهدف عملية الاستخلاص إلى الحصول على اكبر كمية من الأنزيم بصورته الحرة والمرتبطة من المصدر المستهدف، لذا يجب أن يتم استعمال محلول استخلاص يمكن من خلاله الحصول على افضل تركيز للأنزيم ومن ثم الحصول على أعلى فعالية نوعية [20]، وتستمد محاليل الاستخلاص قدرتها في تحرير الأنزيمات من المصادر المتواجدة فيها ولاسيما في الأنسجة الحيوانية والنباتية من خلال التركيز المولاري للأملاح المستعملة في تحضير هذه المحاليل فضلا عن تركيز كلوريد الصوديوم الذي يضاف إليها، فكلما زاد التركيز المولاري أدى ذلك إلى فك ارتباط اكبر قدر ممكن من الأنزيمات المرتبطة بنسيج المصدر، إلا أن الزيادة في التركيز المولاري لمحاليل الاستخلاص قد يؤدي إلى حصول انخفاض في الفعالية النوعية للأنزيم المستهدف نتيجة لتحرر كمية كبيرة من البروتينات الأخرى المتواجدة في النسيج الحاوي على الأنزيم الذي يراد استخلاصه [21]، لذا يجب أن تكون الفعالية النوعية (وحدة/ملغم) المعيار المعتمد عليه في تحديد كفاية عملية الاستخلاص، كما يؤدي الاس الهيدروجيني لمحلول الاستخلاص دورا مهما من خلال تأثيره في ثبات الأنزيم في محلول الاستخلاص وجعله قلقا ومن ثم يسهل فك ارتباطه من النسيج الحاوي عليه [22].

تحديد الطريقة المثلى لتركيز الانزيم:

استعمل الترسيب بملح كبريتات الأمونيوم والكحول الاثيلي المبرد لتحديد الطريقة المثلى لترسيب وتركيز أنزيم اللاييز من المستخلص الأنزيمي الخام، ويبين (الشكل، 2) حصول ازدياد واضح في الفعالية النوعية للراسب يرافقه انخفاض ملاحظ في الفعالية النوعية للرائق عند تركيز الأنزيم باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم، ويلاحظ أن افضل نسبة إشباع كانت بمدى يتراوح بين 30-60%، في حين يشير (الشكل، 3) إلى عدم حصول ازدياد واضح في الفعالية النوعية للراسب رافقه عدم حصول فقدان ملاحظ للفعالية النوعية للرائق عند ترسيب الأنزيم باستعمال الكحول الاثيلي، لذا فقد اعتمدت طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم لتركيز الأنزيم بنسبة إشباع تراوحت بين 30-60% تم من خلالها الحصول على فعالية نوعية مقدارها 22.19 وحدة/ملغم وحصيلة أنزيمية بلغت 62.74% في حين كان عدد مرات التنقية 4.46 مرة.

تستعمل طرائق التركيز بملح كبريتات الأمونيوم والكحول الاثيلي بشكل واسع في أول خطوات التنقية لغرض التخلص من اكبر قدر ممكن من الماء والبروتينات المرافقة والحصول على الأنزيم بأعلى كمية من المستخلص الخام، يعقبها إجراء التنقية بالاعتماد على خصائص الأنزيم مثل القوة الايونية، والتداخل الكاره للماء، والألفة ،والوزن الجزيئي [3 ; 16]، إلا أن تأثير هذه المواد المستعملة في ترسيب الأنزيم يتباين حسب نوع المستخلص الخام والأنزيم نفسه ومحتواه من الأحماض الأمينية واختلاف شحناتها التي يكون لها الأثر الكبير في تحديد الطريقة المثلى والتركيز الملائم لترسيب الأنزيم [23]، فقد استعمل [17] ملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع تراوحت بين 0-70% لترسيب الإنزيم من المستخلص الخام لعفن Rhizopus sp. وحصلا على الأنزيم بحصيلة مقدارها 49.7% وعدد مرات تنقية 1.4 مرة ، في حين استعمل [24] ملح كبريتات الأمونيوم بنسب إشباع تراوحت بين35-60% لترسيب الأنزيم من فطر Trichoderma Viride بفعالية نوعية مقدارها 328 وحدة/ملغم.

امرر الأنزيم المستحصل عليه بعملية الترسيب باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم على المبادل الايوني DEAE-Cellulose، ويشير (الشكل، 4) إلى ظهور قمم بروتينية عديدة عند استرداد الأنزيم بالتدرج الملحي الخطي بتركيز 0-1 مولار من كلوريد الصوديوم مع ظهور قمة واحدة للفعالية الأنزيمية، وجرى جمع الأجزاء القريبة من القمة وتحديد الفعالية وتركيز البروتين وتم الحصول على الأنزيم من خطوة التنقية هذه بفعالية نوعية بلغت 35.79 وحدة/ملغم وحصيلة مقدارها 60.52% وعدد مرات تنقية 7.20، ثم امرر الجزء المستحصل عليه على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200، إذ يظهر (الشكل، 5) وجود قمة واحدة للبروتين ترافقها قمة واحدة للفعالية الأنزيمية، وتم الحصول على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 54.06 وحصيلة بلغت 42.6% وبعدد مرات تنقية 10.88 مرة، ويبين (الجدول، 1) خطوات تنقية أنزيم اللاييز من كبد الدجاج المحلي.

استعملت طرائق عديدة لتنقية الأنزيم من مصادر مختلفة، فقد استعمل [25] الترشيح الهلامي بمادة Sephadex G-200 لتنقية الأنزيم من خميرة Candida rugosa (DM-2031) وحصلا عليه بفعالية نوعية مقدارها 64.35 وحدة/ملغم وعدد مرات تنقية 43 مرة، كذلك استطاع [18] من تنقية الأنزيم من الجراد باستعمال الترشيح الهلامي بمادة Sephadex G-100 بحصيلة بلغت 21.84% وعدد مرات تنقية 0.81 مرة، في حين تمكن [16] من تنقية الأنزيم من سمك البوري باستعمال التبادل الايوني بمادة DEAE-Cellulose و CM-Cellulose بحصيلة مقدارها 2.95% وعدد مرات تنقية وصل إلى 18.55 مرة.

تقدير الوزن الجزيئي

قدر الوزن الجزيئي لأنزيم اللاييز باتباع تقانة الترشيح الهلامي باستعمال مادة Sephacryl S-200 بوجود بروتينات قياسية مختلفة تمثلت بـ IgY وLactoferin وOvalbumin وLysozyme ذي أوزان جزيئية تبلغ 180 و81 و42 و14.4 كيلودالتون على التوالي، وبعد تعيين حجم الفراغ (Vo) للدكستران الأزرق وحجم الاسترداد (Ve) للبروتينات القياسية (الشكل، 6)، رسمت العلاقة الخطية بين حجم الاسترداد Ve/حجم الفراغ Vo مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية لاستخراج الوزن الجزيئي لأنزيم اللاييز الذي بلغ43.651 كيلودالتون (الشكل، 7).

جاءت هذه القيمة مقاربة لما وجده [16] الذي أشار إلى أن الأنزيم المنقى من سمك البوري كان وزنه الجزيئي 46.5 كيلودالتون عند تقديره بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة، بينما بلغ 41.2 كيلودالتون عند التقدير بطريقة الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-50، ووجد [26] أن الأنزيم المنقى من خميرة Yarrowia lipolitica بلغ وزنه الجزيئي 48 كيلودالتون مقدرا بوساطة الترشيح الهلامي، في حين بين [27] أن الوزن الجزيئي للأنزيم المنقى من فطر Penicillium cyclopium بلغ 36 كيلودالتون عند تقديره بطريقة الترشيح الهلامي، بينما أشار [28] إلى أن الوزن الجزيئي للأنزيم المنقى من خميرة Kurtzmanomyces sp. بلغ 49 كيلودالتون مقدراً بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة، في حين وجد [29] أن الوزن الجزيئي للأنزيم المنقى من بكتريا Bacillus sp. يبلغ 46 كيلودالتون عند تقديره بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة.

استعمال انزيم اللايبيز في تحسين نكهة الدهن الحر:

يبين (الجدول، 2) التغير الحاصل في أنموذجي الدهن الحر الحاوي على أنزيم اللايبيز المنقى جزئيا من كبد الدجاج المحلي والأنموذج الحاوي على محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.01 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7 بعد الخزن مدة 48 ساعة، إذ يلاحظ حدوث ارتفاع طفيف في الفعالية الأنزيمية بعد مرور 6 ساعات على الحضن مع عدم حدوث تطور محسوس في تغير رائحة الدهن الحر، وبعد انقضاء 12 ساعة ارتفعت الفعالية الأنزيمية بشكل ملحوظ لتصل 2.67 وحدة/ملغم رافقها حصول تغير محسوس في رائحة الدهن الحر التي أصبحت رائحة مقبولة، وازدادت الفعالية الأنزيمية في الارتفاع لتصل بعد مرور 24 ساعة إلى 4.07 وحد/ملغم مع بقاء تطور رائحة الدهن الحر على حالها التي وصلت إليها بعد مرور 12 ساعات على الخزن، وبعد استمرار عملية الحضن مدة 48 ساعة لوحظ حصول انخفاض في الفعالية الأنزيمية لتصل إلى 0.07 وحدة/ملغم مع بقاء رائحة الدهن على حالها المقبول الذي تم الحصول عليه عند الخزن مدة 12 ساعة.

يعود التغير الحاصل في رائحة الدهن الحر المعامل بالأنزيم إلى فعل أنزيم اللايبيز وتأثيره في تحسين خواص الدهن من خلال قيامه بالتحلل المائي للدهن مما يؤدي إلى إنتاجه للأحماض الدهنية والكليسيرول تحت الظروف الطبيعية [30 , 4]، إلا إن انخفاض الفعالية الأنزيمية بعد مرور 48 ساعة على الإضافة والخزن يعود إلى أن اللايبيز يعد من الأنزيمات ذي التفاعل المتعاكس، إذ يقوم بعكس التفاعل عند عدم وجود الماء مما يؤدي إلى تكوين الكليسيريدات الثلاثية من الأحماض الدهنية الكليسيرول بعملية الاسترة [5 , 2].

المصادر

1. Sammour, R. H. (2005). Purification and partial characterisation of an acid lipase in germinating lipidbody linseedlings. Turk. J. Bot. 29: 177-184.
2. Jaeger, K. E. and Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. Oxford. 13: 390-397.
3. Vakhlu, J. and Kou, A. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology. 9(1): 69-85.
4. Shimizu, S. and Nakano, M. (2003). Structural characterization of triacylglycerol in several oils containing gamma-linolenic acid. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 60-67.
5. Saxena, R. K.; Sheoran, A.; Giri, B. and Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipase. J. Microbiol. Methods. 52(1): 1-18.
6. Kademi, A.; Lee, B. and Houde, A. (2003). Production of heterologous microbial lipases by yeasts. Indian Journal of Biotechnology. 2(3): 346-355.
7. Yang, X.; Wang, B.; Cui, F. and Tan, T. (2005). Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized Rhizopus arrhizus. Process Biochemistry. 40: 2095-2103.
8. Hiol, A.; Jonzo, M. D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L. and Comeau, L. C. (2000). Purification and characterization of an extra cellular lipase from a thermophilic Rhizopus oryzae strain isolated from palm fruit. Enzyme and Microbial Technology. 26: 421-430.
9. Fomuso, L. B. and Akoh, C. C. (2001). Enzymaticalic modification of high laurate canola to produce margarine fat. J. Agric. Food. Chem. 49(9): 4482-4487.
10. Leon, A. E.; Duran, E. and Benedito, B. C. (2000). Utilization of enzyme mixtures to retard bread crumb friming. J. Agric. Food. Chem. 50(6): 1416-1419.
11. Cox, M.; Gerritse, G.; Dankmeyer, L. and Quax, W. J. (2001). Characterization of the promoter and up stream activating sequence from the Pseudomonas alcaligenes lipase gene. J. Biotechnol. 86(1): 9-17.
12. Lopez-Amaya, C.; Marangoni, A. G.; Haard, N. F. and Simpson, B. K. (2001). Lipase: Seafood Enzyme. Utilization and Influence on Postmorten Fish Quality. Marcel Dekker, NY. 121-146.
13. Park, E. Y. and Pizarro, A. V. L. (2003). Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. Process Biochemistry. 38: 1077-1082.
14. Lin, S. F.; Chiou, C. M. and Tsai, C. Y. (1995). Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by Pseudomonas pseudoalcaligenes F-111. Biotechnology letters. 17(9). 959-962.
15. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

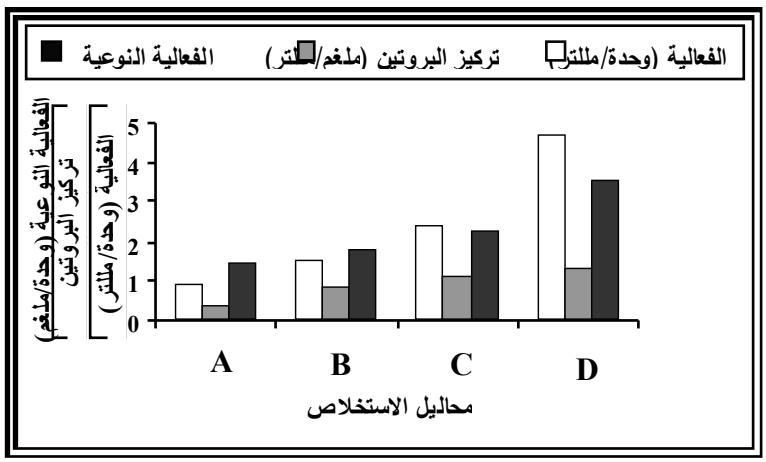
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
16. Islam, M. A.; Absar, N. and Bhuiyan, A. S. (2008). Isolation, purification and characterization of lipase from Grey mullet (Liza parsia Hamilton,1822). Asian. J. Biochem. 3(4): 243-255.
17. Koblitz, M. G. B. and Pastore, G. M. (2006). Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of Rhizopus sp. Cienc. agrotec. Lavras. 30(3): 494-502.
18. Orscelik, O.; Akpinar, M. A. and Gorgun, S. (2007). Partial Purification of Total Body Lipase from Gryllus campestris L. (Orthoptera: Gryllidae). Fen. Bilimleri. Dergisi. 28(2): 1-10.
19. التميمي، سحر غازي عمران عبد الواحد. (2005). بعض التطبيقات العملية لانزيم اللايبيز Lipase المستخلص من عفن Aspergillus niger. رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.
20. Kornberg, A. (1990). Why Purify Enzymes. In: Methods in Enzymology. (eds, M. P. Deutscher). Academic Press. New York. 182: 1-5.
21. Munoz, R. and Barcelo, R. A. (1995). Enzymes. In: Hand Book of Food Analysis. (eds, Nollet, L. M. L.). Marcel Dekker. New York. 2: 317-319.
22. Whitaker, J. R. (1972). Principle of Enzymology for Food Sciences. Marcel Dakker, Irc. New York.
23. Beisson, F.; Tiss, A.; Rivire, C. and Verger, R. (2000). Methods for lipase detection cnd assay: a critical review. European Journal of Lipid Science and Technology. 133-153.
24. Kashmiri, M. A.; Adnan, A. and Butt, B. W. (2006). Production, purification and partial characterization of lipase from Trichoderma Viride. African Journal of Biotechnology. 5(10): 878-882.
25. Benjamin, S. and Pandey, A. (2001). Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from Candida rugosa produced in solid state fermentation. Brazilian Archives of Biology and Technology. 44(2): 213-221.
26. Aloulou, A.; Rodriguez, J. A.; Puccinelli, D.; Mouz, N.; Leclaire, J.; Leblond, Y. and Carriere, F. (2007). Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from Yarrowia lipolytica. Biochem. Biophys. Acta. 1771: 228-237.
27. Yu, M. S. Q. and Tan, T. (2007). Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from Yarrowia lipolytica. Process Biochem. 42: 384-391.
28. Kakugawa, K.; Shobayashi, M.; Suzuk, O. and Miyakawa, T. (2002). Purification and charecterization of lipase from glycolipid producing yeast Kurtzmanommyces sp. Biosa. Biotechnol. Biochem. 66(5): 978-985.
29. Helisto, P.; Aktuganov, G.; Galimzianova, N.; Melentjev, A. and Korpela, T. (2001). Lytic enzyme complex of an antagonistic Bacillus sp. X-b: Isolation and purification of component. J. Chromatograph. 758: 197-205.
30. Gandhi, N. N. and Mukherje, K. D. (2000). Papaya (Carica papaya L.) Lipase with some distinct acyl and alkyl specificities as compared. Biochem. Soc. Ttans. 28(6): 977-987.

جدول (1): خطوات تنقية إنزيم اللاييز من كبد الدجاج

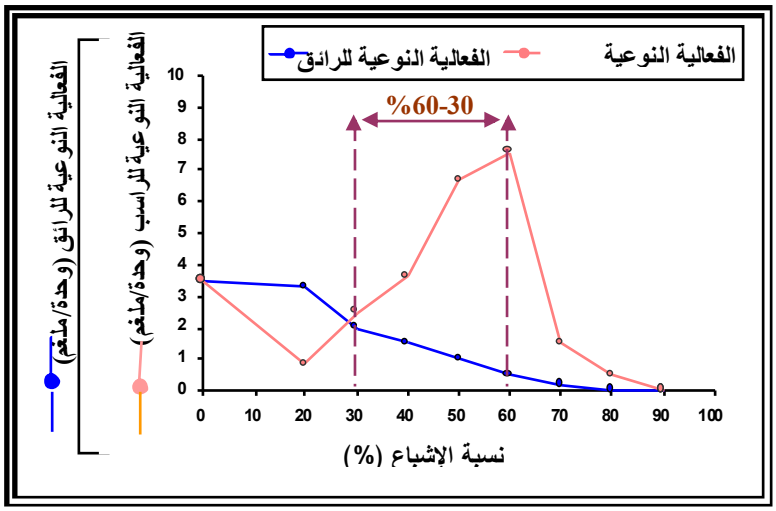
الخطوة	الحجم (مللتر)	الفعالية الأنزيمية (وحدة/مللتر)	تركيز البروتين (وحدة/مللتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الخام	100	3.43	0.69	4.97	343	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم (30-60%)	10	21.52	0.97	22.19	215.2	4.46	62.74
التبادل الايوني DEAE-Cellulose 52	20	10.38	0.29	35.79	207.6	7.20	60.52
الترشيح الهلامي Sephadex G-100	15	9.73	0.18	54.06	145.95	10.88	42.6

جدول (2): تأثير اضافة الانزيم في تحسين خواص الدهن الحر.

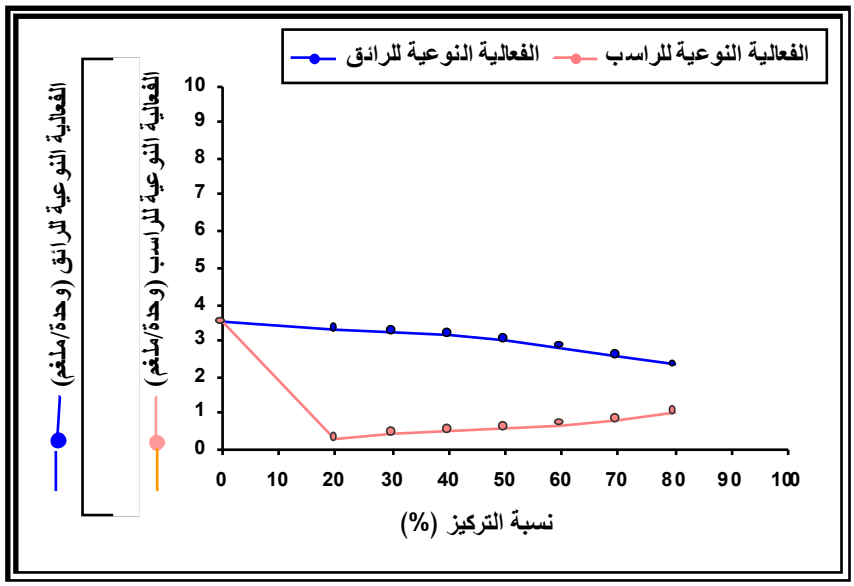
الوقت	النماذج	الفعالية (وحدة/مللتر)	الرائحة
بعد 6 ساعات	دهن حر مع دارئ الخلات	-	بدون تغير
	دهن حر مع الأنزيم	1.75	بدون تغير
بعد 12 ساعة	دهن حر مع دارئ الخلات	-	بدون تغير
	دهن حر مع الأنزيم	2.67	مقبولة
بعد 24 ساعة	دهن حر مع دارئ الخلات	-	بدون تغير
	دهن حر مع الأنزيم	4.07	مقبولة
بعد 48 ساعة	دهن حر مع دارئ الخلات	-	بدون تغير
	دهن حر مع الأنزيم	0.07	مقبولة



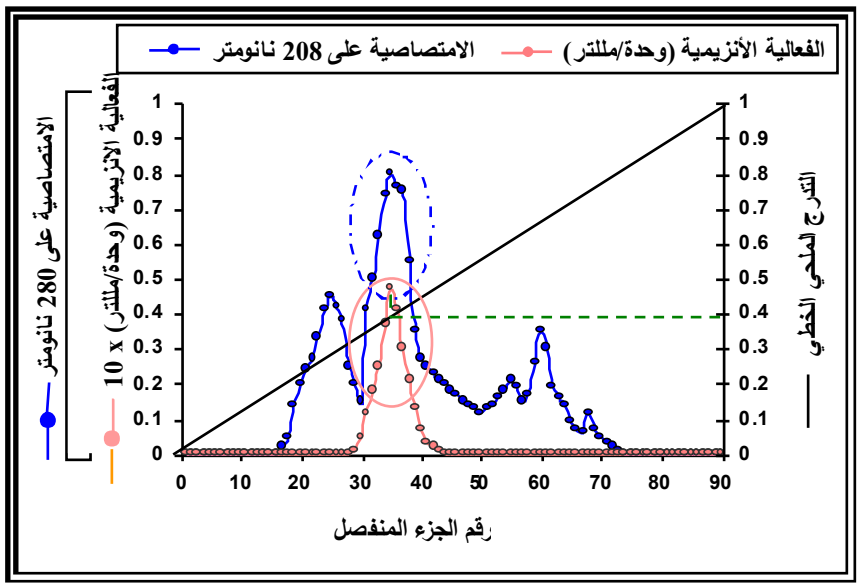
شكل (1): تحديد الطريقة المثلى لاستخلاص أنزيم اللاييز من كبد الدجاج المحلي باستعمال محاليل استخلاص عدة شملت:
A: ماء مقطر.
B: ماء مقطر حاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.1 مولار.
C: كمحلول خلات الصوديوم الدرائ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6.
D: محلول خلات الصوديوم الدرائ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.1 مولار.



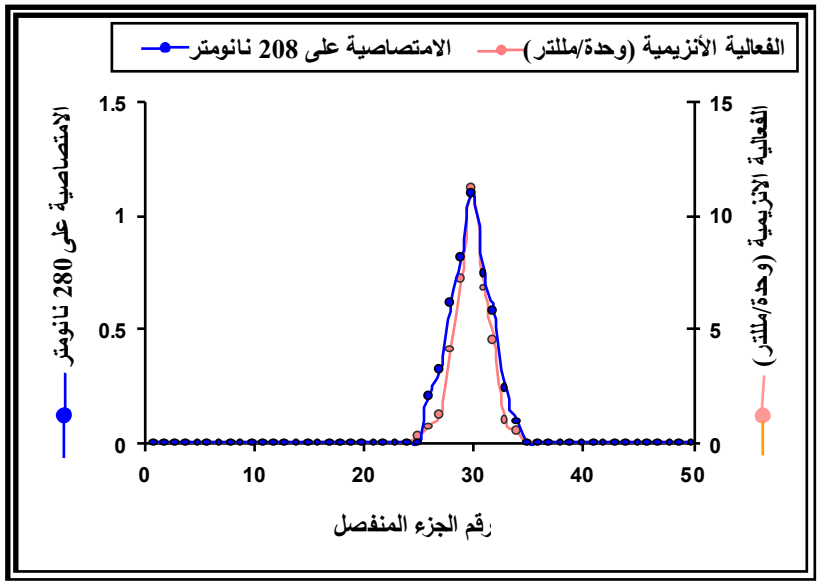
شكل (2): الترسيب التدريجي لأنزيم اللاييز من مستخلص كبد الدجاج باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم بنسب إشباع تراوحت بين 20-90%.



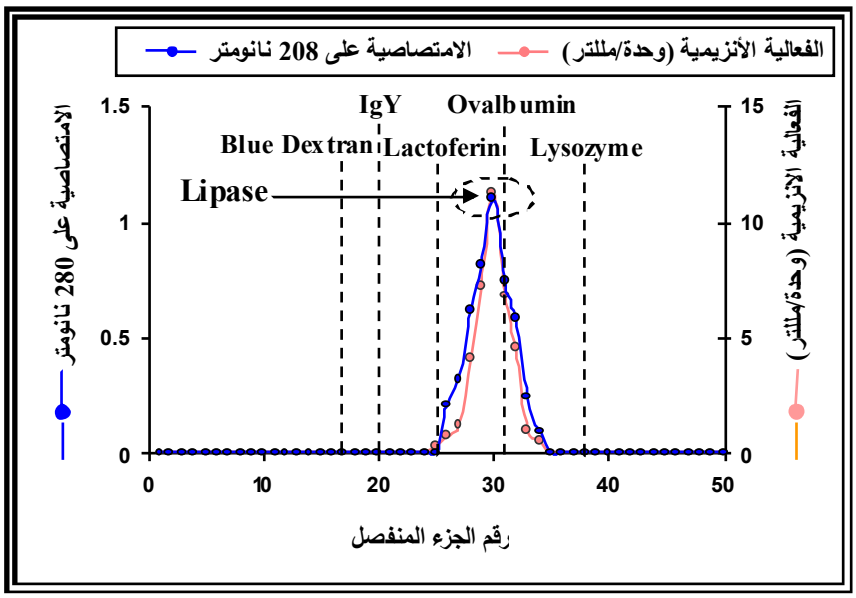
شكل (3): الترسيب التدريجي لأنزيم اللاييز من مستخلص كبد الدجاج باستعمال الكحول الاثيلي المبرد ذي تركيز 98% للحصول على نسب مئوية متدرجة من الكحول تراوحت من 20-80%.



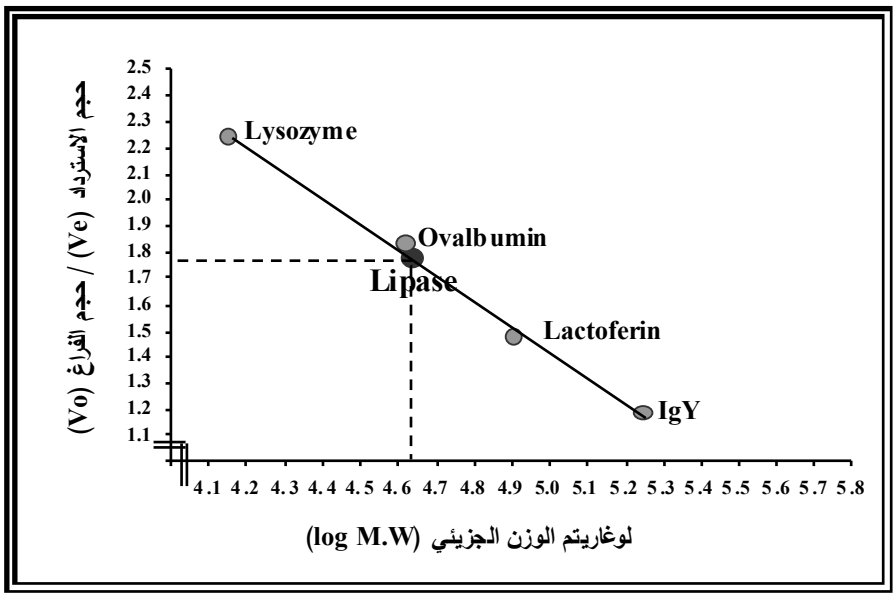
شكل (4): تنقية أنزيم اللاييز من كبد الدجاج باستعمال كروماتوغرافي التبادل الايوني بعمود DEAE-Cellulose ذي أبعاد 30 x 1.5 سم وسرعة جريان مقدارها 42 مللتر/ساعة بواقع 3.5 مللتر/جزء منفصل.



شكل (5): تنقية أنزيم اللاييز من كبد الدجاج باستعمال كروماتوغرافي الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl S-200 ذي أبعاد 60 x 1.5 سم وسرعة جريان مقدارها 18 مللتر/ساعة بواقع 3 مللتر/جزء منفصل.



شكل (6): تعيين حجم الفراغ (Vo) للدكستران الأزرق وحجم الاسترداد (Ve) للبروتينات القياسية IgY وLactoferin وOvalbumin وLysozyme وLipase.



شكل (7): المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لأنزيم اللايبيز المنقى جزئيا بتقنية الترشيح الهلامي بمادة Sephacryl S-200 بوجود IgY وLactoferin وOvalbumin وLysozyme كبروتينات قياسية.