استخلاص وتقدير فعالية انزيم البيروكسيديز من كالس الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* L. ♦

مرا اسامه الكاتب[1] عبد الله نجم النعيمي

قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة الموصل

ABSTRACT

Peroxidase enzyme was extracted from callus of different explants and immature embryos of Phaseolus vulgaris L. .The maximum activity of enzyme showed in the embryos callus sample.The higher activity of enzyme was in the (4months) age of callus for each of leaves ,roots and embryos and in (6months) for cotyledons callus,the stems callus recorded best activity in (2months)old.Using of ammonium sulphate precipitation result in high enzyme activity in all samples.When the exchange chromatochraphy was used to purifiy stems callus extract,(5)protein apexes observed and (4)of it was active.In the separation of proteins by using the electrofousing techniques, the samples of embryos ,leaves,stems,cotyledons and roots were separated at pH range (5.13-6.14).The minimum activity of enzyme observed at (4day) age for all explants samples,but the maximum activity was in the roots samples at (14day)age

الخلاصة

استخلص انزيم البيروكسيديز من كالس الاجزاء النباتية المختلفة والاجنة غير الناضجة للفاصوليا وقدرت فعالية الانزيم في المستخلصات الخام للعينات المذكورة ،ولوحظت اكبر فعالية للانزيم في عينة كالس الاجنة .اظهر الانزيم اكبر فعالية عند عمر (4شهر)لكل من كالس الاوراق والجذور والاجنة وعند(6شهر)لعينة كالس الفلق وسجل كالس السيقان اكبر ىلفعالية عند عمر (2شهر).وعند الترسيب بكبريتات الامونيوم ارتفعت فعالية الانزيم في جميع العينات .وعند تنقية مستخلص كالس السيقان بوساطة كروماتوكرافيا التبادل الايوني ظهرت (5)قمم بروتينية كانت (4)قمم منها فعالة.بفصل البروتينات عند نقطة التعادل الكهربائي فصلت عينة كالس الاجنة والاوراق والسيقان والفلق والجذور عند مدى pH(5.13–6.14).وظهرت اقل فعالية للانزيم عند عمر (4يوم)لكل عينات البادرة وكانت اكبر فعالية في عينة الجذور عند عمر (14يوم).

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 - 5 أيلول 2007

[1] مستل من اطروحة ماجستير

المقدمة

النباتات عموماً تحتوي على العديد من الانزيمات والمواد الايضية المختلفة،كذلك هو الحال في كالس الفاصوليا.ومن الانزيمات التي لها اهمية في العمليات الحيوية للنبات هو انزيم البيروكسيديز فهو يخلص الخلية من تراكم H_2O_2 السام لها واشارت عدة دراسات الى دور هذا الانزيم في الخلايا النباتية وشخص الـ Peroxidase في الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* اذ كشف عنه في المعلق الخلوي لخلايا الفاصوليا المزروعة(1) وكشف عن الانزيمات المتماثلة الاصل للبيروكسيديز(isoenzymes) في سايتوبلازم خلايا العقد الجذرية للفاصوليا(2) وتم تقدير فعالية الانزيم في بذور الفاصوليا (3).كذلك تم استخلاص هذا الانزيم وتنقيته جزئيا مع دراسة قسم من خواصه(4) وتناولت دراسة اخرى التغيرات الكمية والنوعية للبيروكسيديز خلال انبات بذور الفاصوليا mung (.*Phaseolus aureus* Roxb) وتحت الشد الملحي (5).ودرست فعالية هذا الانزيم في انسجة البادرات ومزارع الكالس للفاصوليا بمقارنة الانماط الوراثية ومراحل التطور(6).

مواد وطرائق العمل

1-تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز في البادرات والكالس

استخدمت مادة guaiacol كمادة اساس لعمل الانزيم في قياس فعالية انزيم البيروكسيديز (7،8،9).اذ اخذت البادرات بعمر(4، 7 ،10 ،14 يوم) وعزلت الاجزاء النباتية(الاوراق ، الفلق،السيقان والجذور)كلاً على حدة واخذت اوزانها الطرية وتحت ظروف تبريد سحقت بهاون حديدي وطاحونة وحولت الى homogenizer واضيف اليها ماء بنسبة 3:1 (V/W) (4 ،10) واجري لها طرد مركزي مبرد(3000دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق)وحضر كذلك كالس الاجزاء المختلفة(الاوراق ،الفلق ،السيقان ،الجذور والاجنة)بالطريقة نفسها واخذ الراشح ليقدر فيه الانزيم وكانت العينات باعمار(2 ،4 ،6 8)شهر.

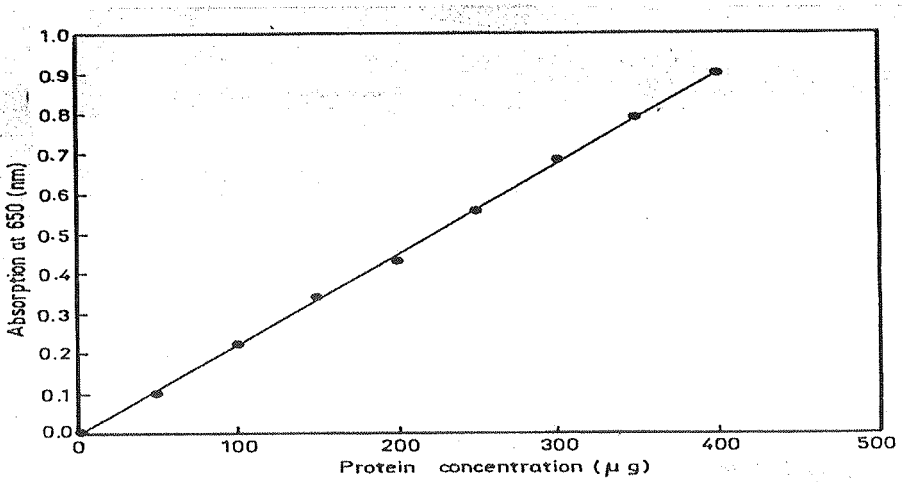
2-تقدير كمية البروتين في عينات انزيم البيروكسيديز

اتبعت طريقة فولن المحورة(11) لتقدير كمية بروتين كل عينة وتم اسقاط الامتصاصية التابعة لها على المنحني القياسي للبروتين(الشكل 1).

3-تنقية الانزيم

A.3 الترسيب بكبريتات الامونيوم

تعد هذه العملية اول مراحل التنقية التي يتم خلالها ترسيب البروتينات الموجودة في المستخلص اعتماداً على درجة تشبع المحلول(12).



الشكل ١: المنحنى القياسي للبروتين

B.3 الفرز الغشائي (الديلزة)

استخدم محلول بيكاربونات الامونيوم بتركيز(M 0.1)لاجراء عملية الديلزة للراسب الناتج بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم في الفقرةA.3 (13) ثم قيس كل من فعالية الانزيم وكمية البروتين لكل عينة.

C.3 تقنية كروماتوكرافيا التبادل الايوني

هي عملية فصل للمركبات المتباينة في نوع ودرجة شحنها التي تحملها وذلك على سطح مادة فصل غير قابلة للذوبان تمتلك شحنة معينة لها قابلية التجاذب مع شحنات معاكسة لها موجودة في الوسط المحيط بها(13).استعمل في هذا البحث الراتنج الايوني داي اثيل امينواثيل-سليلوز Di Ethyl Amino Ethyl-Cellulose ويرمز له (DEAE-Cellulose) من نوع مادة الفصل الايوني السالبة الشحنة الضعيفة Anion exchang weak واستعمل عمود فصل بحجم (250مل) طوله (35سم) وقطره(1.5اسم) وغسل العمود الحاوي DEAE-Cellulose بمحلول منظم HCl- Tris [(hydroxymethyl) aminomethane=Tris] pH (8.0) ذي مولارية(M0.01) ويراعى ابقاء طبقة من هذا المحلول بسمك (0.5سم) فوق الراتنج الايوني للحفاظ عليه من الجفاف، ثم وضعت عينة الانزيم بعد الديلزة في عمود الفصل ونظم معدل الجريان بحيث جمع (0.5مل)بالدقيقة الواحدة ثم قدرت الفعالية الانزيمية لكل جزء وقدر البروتين بقياسه عند الطول الموجي(280نانوميتر)ثم جفدت العينات.

D.3 فصل البروتينات عند نقطة التعادل الكهربائي

يعتمد في فصل البروتينات على اتها تمتلك مجموعات ذات شحنات اما موجبة اوسالبة تختلف بحسب الدالة الحامضية(pH)للوسط المحيط وان صافي الشحنات يمثل مجموع الشحنات الموجبة والسالبة على سطح البروتين فعند وضعها في مجال كهربائي سوف تتجه الى القطب المعاكس لها بالشحنة (14 ،15، 16) واستخدمت هذه الطريقة لفصل مكونات انزيم البيروكسيديز.

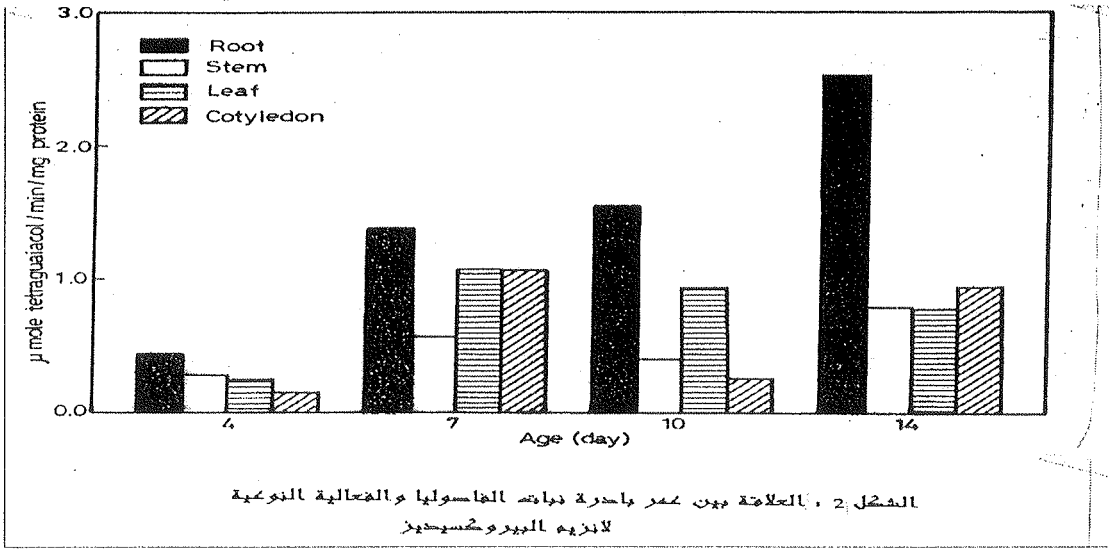
من اجل تشخيص نقطة التعادل الكهربائي Isoelectric Point والدالة الحامضية للبروتين (pH) اذ تم اعادة تعليق المادة المجفدة بكمية قليلة من الماء المقطر ثم استخدمت الصفائح الرقيقة لهلام أكريل امايد المتعدد (Thin layer polyacrylamid gels) وهي ذات تدرج pH (3.5-9.5) وتم الفصل عند معدل تيار كهربائي بمقدار (40 ملي امبير) بحيث لاتزيد المقاومة عن (500 ملي فولت) وعند (10 ْم) لمدة (40 دقيقة) بعدها نقلت صفيحة الهلام الى الحاوية المخصصة لها واضيف اليها محلول التثبيت لمدة (1-1.5 ساعة) وذلك لترسيب البروتين وازالة الامفولين ثم ازيل المحلول المثبت وغمر الهلام في محلول الصبغ لمدة ساعة واحدة وبدرجة حرارة الغرفة بعدها ازيلت الصبغة الزائدة باستخدام محلول ازالة الصبغة ولمدة (48 ساعة) تقريباً مع تبديل المحلول بين فترة واخرى .

النتائج والمناقشة

1- تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز في المستخلص الخام لاجزاء بادرة الفاصوليا

توضح نتائج (الشكل 2) فعاليات متباينة لانزيم البيروكسيديز زللاعمار المختلفة لاجزاء البادرة (الجذور ، السيقان ، الاوراق والفلق) . ان اكبر فعالية لانزيم مستخلص الجذور كانت عند عمر (14 يوم) اذ بلغت (2.53) مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين ، وتظهر كذلك علاقة طردية بين عمر الجذور وفعالية الانزيم . اما فيما يخص مستخلص السيقان فان فعالية الانزيم كانت متباينة مع ازدياد عمر الجزء النباتي مع انه اكبر فعالية للانزيم كانت ايضا عند عمر (14 يوم) وسجلت (0.79)في حين كانت اكبر فعالية (1.07) عند عمر (7 يوم) وذلك لمستخلص الاوراق وبعد هذا العمر انخفضت الفعالية مع زيادة عمر الاوراق ، وسجل انزيم مستخلص الفلق النتائج نفسها لمستخلص الاوراق من حيث اكبر فعالية له لكن كان هناك تذبذب يقيم الفعالية مع زيادة عمر الفلق فقد انخفضت الفعالية عند عمر (10 يوم) وعادت للارتفاع عند (14 يوم) . عموما يمكن ملاحظة ان اقل فعالية للانزيم ظهرت لجميع العينات عند عمر (4 يوم)، وان اكبر فعالية لانزيم مستخلصي الاوراق والفلق كانت عند عمر (7 يوم)، اما افضل فعالية لانزيم مستخلصي السيقان والجذور ظهرت عند (14 يوم) . قد يعزى

سبب تباين فعالية انزيم البيروكسيديز في الاجزاء المختلفة للبادرة الى ان هذا الانزيم يظهر خصوصية النسيج او العضو النباتي (12، 17، 18). ان انزيمات البيروكسيديز في النبات الواحد تتباين كما ونوعا عند المقارنة بين الاعضاء المختلفة وفي الحقيقة يكون

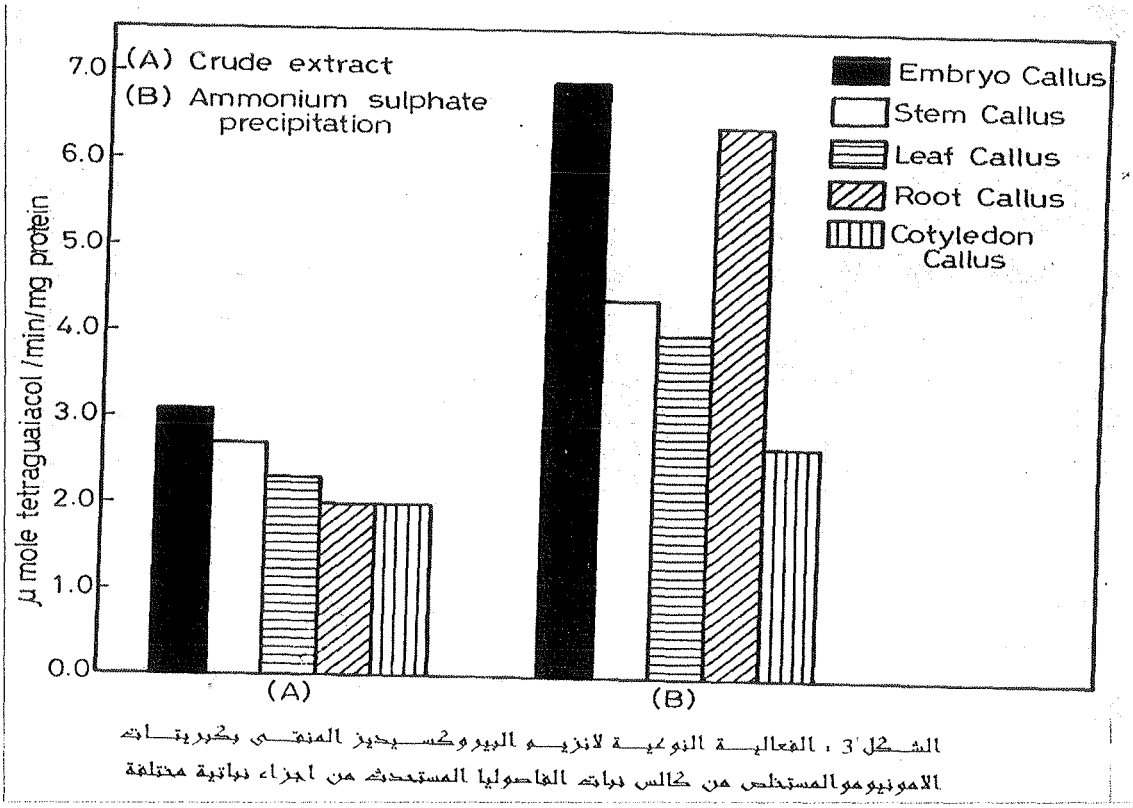


الشكل 2 : العلاقة بين عمر بادرة نبات الهاسوليا والفعالية النوعية لانزيم البيروكسيديز

التباين واضحا جدا عند مقارنة المجموعة الجذرية بالخضرية في النبات الواحد الامر الذي لايظهر عند مقارنة جزء نباتي واحد في نوعين مختلفين وليس بعيداً ان تعكس هذه الاختلافات الاشكال المختلفة للتطور او تصنيع العضيات مثل البلاستيدات الخضراء والبلاستيدات الخازنة وغيرها والتي تتوزع على نحو غير منتظم في النبات(17).واشارت دراسة قياس فعالية الانزيم في بذور *Phaseolus vulgaris* عند انباتها على مدى(5، 50، 80يوم) بان الفعالية تكون قليلة وتزداد لتصل اعلى مستوى عند(50يوم) ثم تنخفض بعمر(80يوم) وقد عزي الانخفاض الملاحظ الى وجود انزيمات Protease(3). فضلا عن انه للبيروكسيديز اهميته في تنظيم النموالتمايز وان التغير في فعالية الانزيم المماثل وتركيبه صفة خاصة لمراحل التطور وخصوصية العضو النباتي وعدد الانزيمات المتماثلة للبيروكسيديز يزداد مع زيادة العمر خصوصاً فيما يتعلق بالفلق وعند قياس الانزيم بالجذور والاوراق فقد سجلت الجذور اعلى فعالية للانزيم(17)، وهذا ما يتفق مع الدراسة الحالية. واشارت دراسة على نبات التبغ الى ان لمرحلة نمو النبات وموقع الجزء النباتي تاثيراً كبيراً على فعالية الانزيم وربط ذلك بكمية الفينولات الكلية المتكونة واختلافها بحسب الجزء النباتي(18).

2- تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز في المستخلص الخام لكالس الفاصوليا

تبين نتائج(الشكل 3-A) ان اكبر فعالية للانزيم كانت في عينة كالس الاجنة وبلغت (3.1) ما يكروموول/دقيقة/ملغم بروتين يليها عينة كالس السيقان ثم كالس الاوراق وفي المرتبة الاخيرة اظهر كل من كالس الجذور والفلق فعالية متماثلة بلغت (2.0) لكل منهما.ولقد استخدم الماء المقطر بنسبة3:1(v/w) لعمل المستخلصات الخام لانه يعمل على اذابة معظم المواد البروتينية(19).

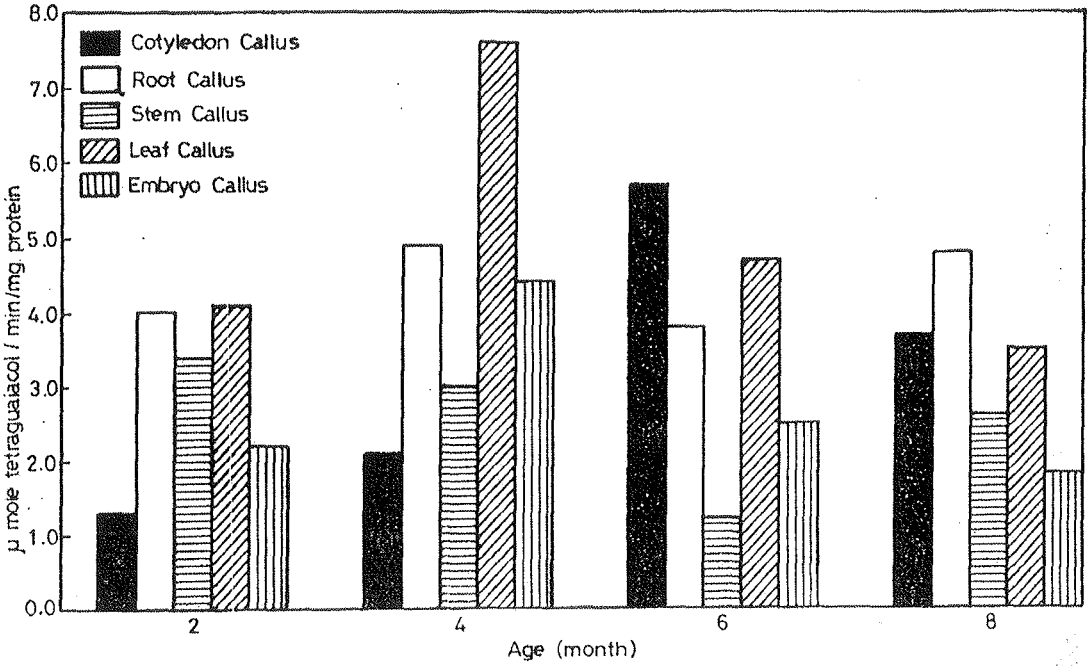


الشكل 3 : الفعالية النوعية لانزيم البيروكسيديز المنقى بطريقتان الامونيوموالمستخلص من كالس نبات الفاصوليا المستحدث من اجزاء نباتية مختلفة

3- دراسة العلاقة بين عمر الكالس وفعالية انزيم البيروكسيديز

اختبرت فعالية الانزيم في المستخلصات الخام لعينات الكالس وعند اعمار مختلفة(2، 4، 6، 8 شهر) ولوحظ من النتائج (الشكل 4) تاثير عمر الكالس على فعالية الانزيم ،حيث ظهرت علاقة منتظمة الى حد ما بين عمر الكالس وفعالية الانزيم في مستخلصات كالس الفلق ،الاوراق والاجنة ،فقد ازدادت فعالية الانزيم بزيادة عمر الكالس الى ان تصل الى اقصى حد عند عمر معين وبعد ذلك تبدا الفعالية بالانخفاض مع زيادة عمر الكالس واظهر الانزيم اكبر فعالية عندما بلغ عمر الكالس(4 شهر) لكل من كالس الاوراق وكالس الاجنة اذ بلغت (7.6 ، 4.4)مايكروموول/دقيقة/ملغم بروتين على التوالي وعند(6 شهر) فيما يخص كالس الفلق (5.7) في حين كانت نتائج كالس الجذور والسيقان متذبذبة مع زيادة عمر الكالس.

قد يعزى هذا التباين في قيم فعالية الانزيم بين عينات الكالس المختلفة الى الاختلاف في نوع النسيج الذي اشتقت منه خلايا الكالس (أي مصدر الـ Explant) ونشاط ذلك الجزء النباتي وقدرته على انتاج الخلايا في الوسط الغذائي الزرعي المستخدم في هذه العملية فقد ذكر في دراسات متعددة ان الانزيم يمكن ان يظهر خصوصية النسيج او العضو(20، 17، 18) وقد جرت دراسات عديدة لانزيم البيروكسيديز في انواع الكالس المشتق من نباتات مختلفة منها دراسته في مزارع كالس فول الصويا(21)، وكالس فستق الحقل والفاصوليا(1).



الشكل 4: العلاقة بين عمر كالس الفاصوليا المستحدث من اجزاء نباتية مختلفة والفعالية النوعية لانزيم البيروكسيديز

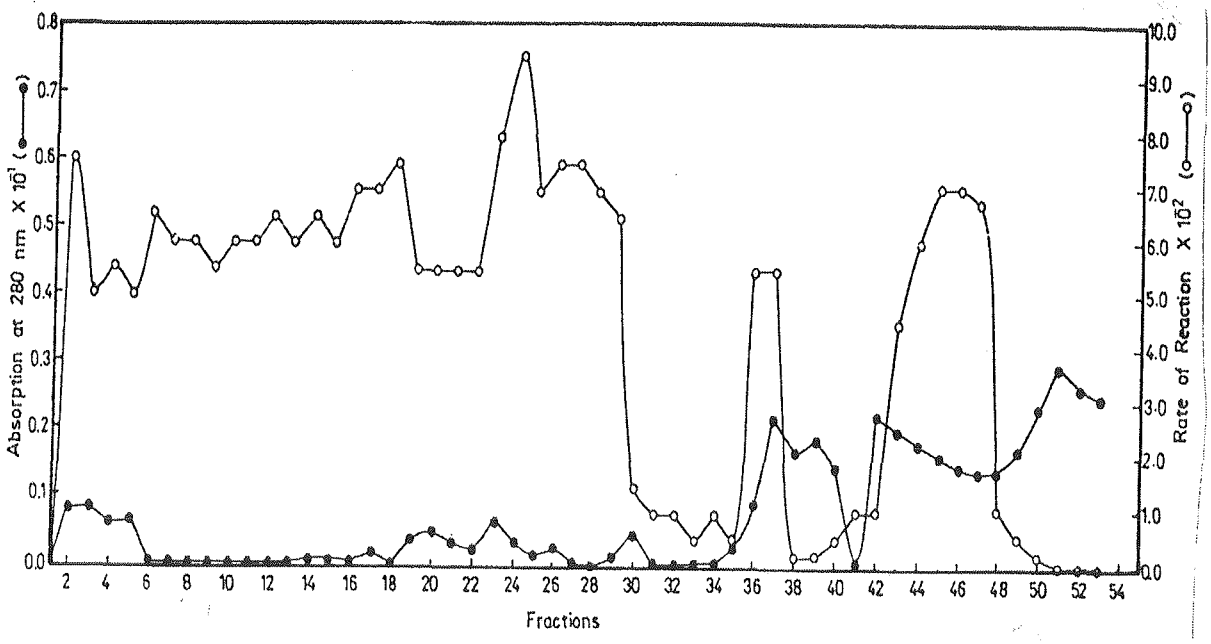
4- التنقية الجزئية لانزيم البيروكسيديز بوساطة كبريتات الامونيوم

بينت النتائج في (الشكلB-3) زيادة فعالية الانزيم في جميع المستخلصات مقارنة بالمستخلصات الخام للعينات نفسها، كما ظهرت زيادة متساوية في فعالية الانزيم لمستخلصي كالس السيقان والاوراق (1.7) مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين لكل منهما.فقد برهنت نتائج احدى الدراسات ان الجزء المرسب عند نسبة تشبع(35-90%) قد اظهر تنقية اكبر ثلاث مرات مقارنة بالمستخلص الخام للمحلول المنظم في مستخلص بذور الفاصوليا وبنسبة استرجاع [34](8)، بينما في الدراسة الحالية (الجدول 1) فان الفعالية النوعية بعد الترسيب

بكبريتات الامونيوم كانت اكبر بحوالي مرتين عما وجد في المستخلص الخام وبنسبة استرجاع[36.415].

5-تنقية الانزيم بوساطة كروماتوكرافيا التبادل الايوني

يتضح من (الشكل 5) ظهور(5) قمم بروتينية(عند طول موجي 280نانوميتر) وتكون اربعة قمم منها ذات فعالية واضحة للانزيم ،اذ سجلت فعالية النوعية (مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين) عند كل قمة بروتينية وكما هو موضح في نتائج(الجدول 1). ان تعدد القمم الفعالة يشير الى امتلاك الانزيم لاكثر من مناظر انزيمي واحد في مستخلص الكالس(الجدول 1)، فقد ظهرت ثلاث قمم فعالة لانزيم البيروكسيديز في كالس فول الصويا(4) وفي انزيم كالس السيقان ظهرت قمة واحدة فعالة من ثلاث قمم بروتينية(22).



الشكل 5 : تنقية انزيم البيروكسيديز بوساطة تقنية كروماتوكرافيا التبادل الايوني باستخدام DEAE-Cellulose

6-فصل البروتينات عند نقطة التعادل الكهربائي لانزيم البيروكسيديز

يبين (الشكل6) الحزم البروتينية للانزيم وتم فصل حزمتيpIV+pI المنقاة عند pH 5.13 و 6.14 وفصلت عينة كالس الاجنة وكالس الاوراق وكالس السيقان وكالس الفلق بحزمة واحدة عند pH (5.48-6.14) في حين ان عينة كالس الجذور اظهرت حزمتين منفصلتين عند pH (5.15 و 5.81). هناك دراسات استخدمت هذه التقنية لبيروكسيديز اوراق فول الصويا الذي اظهر نقطة تعادل كهربائي (3.7)(22) وبيروكسيديز بذور فول الصويا كان له نقطة تعادل عند (4.1) (23).

الشكل 6 : مخطط يوضح الحزم البروتينية المفصولة من البروتين الكلي لمستخلص انزيم البيروكسيديز .

الانزيم	العينة	9.5 8.78 8.12 7.46 6.80 6.14 5.48 4.82 4.16 3.5
البيروكسيديز	PIV+PI كالس الاجنة كالس الاوراق كالس الفلق كالس السيقان كالس الجذور	

PIV , PI : القمم البروينية الاولى + الرابعة الناتجة من تقنية كروماتوكرافيا التبادل الايوني.

الجدول 1 : خطوات تنقية انزيم البيروكسيديز المستخلص من كالس سيقان نبات الفاصوليا .

Fractions	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (Unit) U	Specific activity U/mg protein	Folds of purification	Yeild %
Crude	19.5	45.104	121.992	2.750	1.000	100.000
Ammonium sulphate precipitation	7.5	10.125	44.423	4.387	1.622	36.415
Ion exchange -chromato graphy P1	5.0	0.040	2.660	66.500	24.587	2.180
P2	5.0	0.020	3.370	168.500	62.299	2.762
P3	5.0	0.080	1.950	24.375	9.012	1.598
P4	5.0	0.078	2.485	31.859	11.779	2.036

المصادر

1-Van Huystee, R. B.;Malko, M. and Wen, K.,Can.,J. Bot., 1435 , 72, (1994).

2-Becana, M.;Paris, F. J.;Sandalio, L. M. and Rio, L. A.,Plant Physiol,1292,90 (4), (1989).

3-Kermasha, S.;Alli,I. and Metche,M., Harricot See.J.Food Sci.,1755,53,(1988).

4-Kermasha, S. and Metche, M.,Harricot. J. Food. Sci.,252,53,(1988).

5-Sheoran, I. S. and Garg, O. P.,Physiol. Plant.,150,46,(1979).

6-Del-Grosso, E.; Grazia, S. and Maraldi, A.C.,Environ. Exp. Bot.,394,27(4),(1987).

7-Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Methods of Enzymology, II, Academic Press Inc., U.S.A.,(1955).

8-Kim, Y.H. and Yoo, J.Y., Enzyme Microb. Technol., 535, 18,(1996).

9-Kim, Y.H.;Kim, J.H. and Yoo, J.Y.,J. of Fermentation and Bioengineering,400,83,(1997).

10- محمود،صبا زكي. اطروحة ماجستير، قسم الكيمياء. كلية العلـوم.جامعـة الموصـل .(1990)

11-Schactterle, G.R. and Pollack, R.L., Anal. Biochem., 655, 51,(1973).

12-Robyte, J.F. and White, B.J.,Biochemical Techniques, Theory and Practice,(1st.ed.),Brooks/ Cole, California,(1987).

13-Plummer, D.T., An Introduction to Partical Biochemistry (3rded.),pub. Mc. Graw-Hill Book Company, U.K.,(1978).

14-Schindler, J.; Potuzrikova, B. and Aldova, E.J., Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 216,36,(1992).

15-Tabouret, M.; Pycke, J.D.E.; Dubary, G., J. Gen. Microbiol., 753,138, (1992).

16-Tsakalidou, E.; Mano-Lopoulu,E.; Kabaraki,E.;Zoidou, E. ; Pot , B. ; Kersters, K. and Klawt-Zopoulos, G., Syst. Appl. Microbiol. , 448 , 17 ,(1994).

17-Sigel,B.Z. and Galston,A.W., Plant Physiol.,226,42,(1966).

18-Tso,T.,Physiology and Biochemistry of Tobacco Plant,D.H. and R., V.S.A.,(1972).

19-الكاتب،مرا اسامه وعبدالله نجم النعيمي.مجلة التربية والعلم.العدد 45: 25-37(2000)

20-Racusen, D. and Foote,M., Can. J. Bot., 1638,44,(1966).

21-De Forchetti,S.M. and Tigier,H.A., Physiol. Plant,358,59,(1983).

22-Diehin,S.H.; Burkhart,W. and Graham,J.S., Biochem. Biophys. Res. Commun.,934,195(2),(1993).

23-Gillikin,J.W. and Graham,J.S., Plant Physiol.,220,96,(1991).