التحري عن أنزيم الكاتليز في بذور بعض النباتات ودراسة خصائصه .

أسيل كاظم الأنباري سعاد خيري عبد الوهاب

*قسم علوم الحياة – كلية التربية الرازي - جامعة ديالى .

الخلاصة

تم التحري عن أنزيم الكاتليز في بذور الفاصوليا *Phaseolus vulgari* والباقلاء *Vicia faba L.* والحلبة *Trigonella* والحبة السوداء *Nigella sativas* والالهانة *Brassia oleracca* والسلق *Beta vulgaris* وتم تقدير الفعالية الأنزيمية حيث أظهرت الحبة السوداء أعلى فعالية نوعية بلغت (1.66) وحدة/ملغم وتمت دراسة محتوى الأوراق من البروتين الكلي الذي تفوقت في أعلى محتوى بلغ (1.422) ملغم /مللتر بالنسبة لنبات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris*، كما تم اختبار الدرجة الحرارية المثلى لفعالية وثبات الأنزيم والرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات عمل الأنزيم في بذور الحبة السوداء *Nigella sativa L.* .

إذ أظهرت الدراسة النتائج التالية كانت درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم (50 م°) بلغت عندها فعالية (0.240) وحدة/مللتر وأظهر الأنزيم ثباتاً عند حضنه لمدة (30 دقيقة) في درجة الحرارة(50م°) وصل (0.358) وحدة / مللتر، أما الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية قد بلغ (0.318) u/ml عند pH (8)وأبدى الأنزيم ثباتاً عند نفس الرقم الهيدروجيني وصل إلى (0.601) وحدة / مللتر.

المقدمة

تكمن الوظيفة الأساسية لأنزيم الكاتليز في النبات هو حماية الأنسجة من التأثيرات السمية لبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)كما يعمل على إزالة الالكترونات التي تقود إلى إنتاج (O_2) (Abassi وأخرون،1998) .

يتواجد الكاتليز في جميع الكائنات الهوائية التنفس وفي الخلايا التي تحتوي سايتوكروم وهو من أوائل الأنزيمات التي تمت دراستها وتنقيتها حيث تمت دراسة البكتيريا والطيور وكبد الحيوانات وكذلك كبد الإنسان وتمت تنقيته وبكميات كبيرة وذلك لأهميته الحيوية كما كان للنبات جزء من دراسة الأنزيم وتنقيته ومن النباتات التي درس فيها فعالية الكاتليز هي السبانغ وثمار التفاح الأصفر واللهانة (Percy ، 1984) .

تعتبر الأنزيمات حساسة تجاه درجة الحرارة حيث يقترن التغير في درجة الحرارة المتطرفة بالتغير في تركيب البروتين الأولي والثانوي والشكل الفعال مما يؤدي لمسخ البروتين Denaturationكما يؤثر الرقم الهيدروجيني في طبيعة الأنزيم وإن قيم الرقم الهيدروجيني المتطرفة لعمل الأنزيم تؤدي إلى انخفاض فعاليته وثباته وعلى العموم فإن كل من درجة الحرارة المثلى والرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الأنزيم يعتمد على مصدر الأنزيم (Kuru وAydermir،2003) الهدف من هذه الدراسة

تاريخ استلام البحث 10 / 6 / 2010 .
تاريخ قبول النشر 21 / 6 / 2011 .

هـو التـحري عـن خصائص إنـزيم الكـاتليز وتقدير الفعـالية الأنـزيمية فـي الأصنـاف المحـلية لبذور الفـاصوليا والبـاقلاء والحلبة والحـبة السوداء والسـاق واللهـانة ودراسة بعـض خصـائص الأنـزيم كـدرجة الحرارة المثـلى والرقـم الهيدروجيني الأمـثل لفعـالية وثبات عـمل الأنـزيم.

المواد وطرائق البحث

تـم جمـع نمـاذج لأوراق وبذور الفـاصوليا *Phaseolus vulgaris L.* والبـاقلاء *Vicia faba L.* والحـلبة *Trigonella L.* والحـبة السوداء *Nigella sativa* واللهـانة *Brassia oleracca* والسـاق *Beta vulgaris* مـن السـوق المحـلي وشـخصت فـي المعـشب التـابع لقـسم عـلوم الحـياة /كلـية العـلوم /جـامعـة بـابل .

شـملت تـقدير البـروتين فـي أوراق الفاصـولـيا و البـاقلاء والحلبة و الحـبة السوداء واللهـانة والسـاق والتـحري عـن أنـزيم الكـاتليز فـي بـذور هـذه النـباتات وتـقدير أفضـل فعـالية أنـزيمية واختبار الثبـات والفعـالية لـدرجة الحرارة المـثلى والرقـم الهيدروجيني الأمـثل لعـمل الأنـزيم فـي بذور الحـبة السـوداء وبـواقـع ثلاث مـكررات .

المحاليل المستخدمة فـي الدراسة :-

1- دارئ الفـوسفـات (60مللي مولر) (7.4 pH)

يحضـر بإذابة 5.2 غـم مـن فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K_2HPO_4 فـي كـمية مـن المـاء المقـطر ويكـمل الى(500مللتر) فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين (Na_2HPO_4) ويحـضر بإذابـة 1.87غـم فـي(500مللتر) مـاء مقـطر ويتم مزج المحلول الأول مع الثـاني بنسبة 9:1 بعـد تعديل الرقم الهيدروجيني إلـى (4.7) .

2- دارئ الفوسفـات (50 مللي مولر) ((7.0 pH).

ويحـضـر بإذابـة 8.74غـم فـي لـتر مـن المـاء.

3- دارئ فـوسفـات البـوتاسـيوم(0.1مولاري) (7.8).

يحضـر بإذابـة 8.7غـم مـن H_2PO_4فـي كـمية مـن المـاء المقطـر ثـم يعـدل pH إلـى 7.8 (بـواسطة NaOH) (1مولاري)ثـم يكـمل إلـى(500 مللتر) .

4- دارئ فـوسفـات الصـوديوم (50مللي مولر) (7.0pH).

ويحضـر بإذابـة 3.55غـم فـي(500 مللتر).

5- دارئ الخـلات (50مللي مولر) (5.4pH).

6- دارئ التـرس القـاعـدي (50مللي مولر) (10.9pH)

7- بيروكسيد الهيدروجين (65مللي مولر) .

وتحضـر بإضـافة 1.105 ويكـمل إلـى(500مللتر).

8- بيروكسيد الهيدروجين (50مللي مولر) .

وذلـك يتـحضر(0.17 مللتر) فـي(500 مللتر)

9- مـولبيدات الأمونيوم (32.4مللي مولر)

وتحضـر بإذابـة 6.4 غـم فـي (500 مللتر)

10- الألبـومين

ويحضـر بتركيز (0.2 ، 0.4، 0.6 ، 0.8، 1، 1.2 ، 1.4،1.6 ، 1.8،2)

تقدير الفعالية الأنزيمية

تم تقدير الفعالية الأنزيمية في بذور الفاصوليا والباقلاء والحلبة والحبة السوداء واللهانة والسلق حسب طريقة العلواني (2006) وذلك بسحق 5 غرام من البذور مع محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم (0.1مولاري) (7.8) وبنسبة (1:2وزن/حجم). المستخلص تم ترشيحه من خلال قماش الشاش وتم إجراء الطرد المركزي على سرعة 1200 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة (Luhova وأخرون ،2003) وتم تقدير فعالية الأنزيم حسب طريقة Goth (1991) إذ يؤخذ 0.2 مللتر من المستخلص ويحضن مع1 مللتر من المزيج الحاوي على بيروكسيدالهيدروجين (65ملي مولر)مع دارئ الفوسفات (60ملي مولر) (7.4 pH) في25م° لمدة 4 دقائق. بعدها يتم إيقاف عمل الأنزيم بإضافة 1 مل من مولبيدات الأمونيوم (32.4ملي مولر)وتؤخذ القراءات لتقدير فعالية الأنزيم عند الطول الموجي(405 نانوميتر) ويتم تقدير الفعالية حسب المعادلة الآتية

$$\text{Catalase activity} = (\text{Sample} - \text{Blank1} \div \text{Blank2} - \text{Blank3}) \times 271$$

حيث إن

Blank1:-يحتوي على 1 مللتر من المادة الأساس (بيروكسيد الهيدروجين مع المحلول الدارئ) و1 مل من المولبيدات و 0.2 مللتر من العينة.

Blank2:- :-يحتوي على 1 مللتر من المادة الأساس (بيروكسيد الهيدروجين مع المحلول الدارئ) و1 مل من المولبيدات و 0.2 مللتر من المحلول الدارئ.

Blank3:- يحتوي على 1 مللتر من المحلول الدارئ و1 مللتر من المولبيدات و 0.2 مللتر من المحلول الدارئ.

تقدير محتوى البروتين

تم تقدير محتوى الأوراق من البروتين حسب طريقة محمد وعبد الله (1996).

قياس الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم

حضر دارئ الفوسفات بتركيز(50ملي مولر) وبأرقام هيدروجينية (5, 6 ,7, 8 , 9 , 10) تم مزج (0.1مللتر) من المحلول الأنزيمي مع 0.99 مللتر من كل من المحلول الدارئ المحضر في أنابيب اختبار ويحضن لمدة ساعة في درجة حرارة 25م° يؤخذ(0.2مللتر) من المحلول (المحضر في الخطوة السابقة) لجميع الأنابيب ويضاف له (1) مللترمن (50) ملي مولر من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين (pH=7). ويحضن بدرجة حرارة 25م° ثم يقاس بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي (240 نانوميتر).

قياس درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم

حضر دارئ الفوسفات بتركيز (50ملي مولر) وبرقم هيدروجيني (7) ومزج (0.1مللتر) من المحلول الأنزيمي مع 0.99 مللتر من كل من المحلول الدارئ المحضر في أنابيب إختبار ويحضن لمدة ساعة في درجات حرارة (20-80) م. يؤخذ (0.2مللتر) من المحلول (المحضر في الخطوة السابقة) لجميع الأنابيب ويضاف له (1) مللتر من (50) ملي مولر من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين (pH=7).ويحضن بدرجة حرارة 25 م لإيقاف عمل الأنزيم ثم يقاس بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي(Aebi،1984).

قياس الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم

تم حضن المحلول الأنزيمي مع كل من المحلول الدارئ السابق بنسبة 1:1 ولمدة 30 دقيقة ثم تقاس الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 240نانوميتر (Aebi،1984).

قياس درجة الحرارة المثلى لثبات الأنزيم

تم مزج (0.1مللتر) من المحلول الأنزيمي مع 0.99 مللتر من كل من المحلول الدارئ الفوسفات بتركيز (50مللي مولر) وpH (7) المحضر في أنابيب اختبار ويحضن في درجة حرارة(50 م°) وبمدة (10-70) دقيقة. يؤخذ (0.2مللتر)من المحلول (المحضر في الخطوة السابقة) لجمع الأنابيب ويضاف له (1) مللتر من (50) مللي مولر من فوسفاتا الصوديوم أحادية الهيدروجين و (10) مللي مولر من بيروكسيد الهيدروجين (pH=7). ويحضن بدرجة حرارة 25 م° لإيقاف عمل الأنزيم ثم يقاس بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 240نانوميتر .

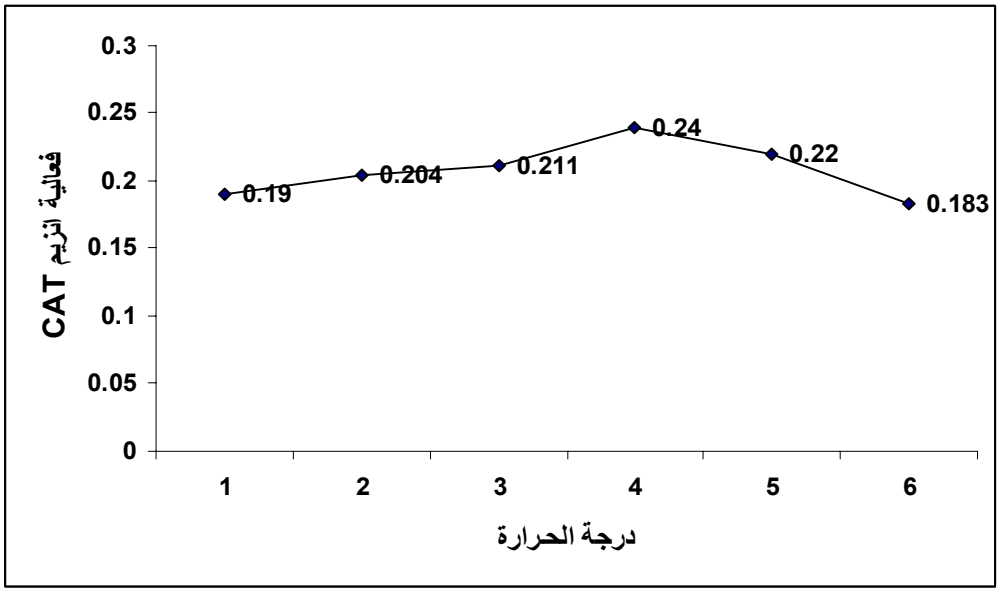
النتائج والمناقشة

يظهر الجدول(1) إن بذور الحبة السوداء أعطت أكبر فعلية أنزيمية نوعية للكالتيز (CAT) بلغت (0.166) وحدة /ملغم وهذا أثر على محتوى البروتين الكلي عند قياسه حيث وصل إلى (1.168) ملغم /مللتر ويعود ذلك إلى قدرة إنزيم Catalase على تحطيم الجذور الحرة مما يوفر للنبات فرصة أكبر في النمو والتطور

جدول1.الفعالية الأنزيمية لـ Catalase ومحتوى الأوراق من البروتين.

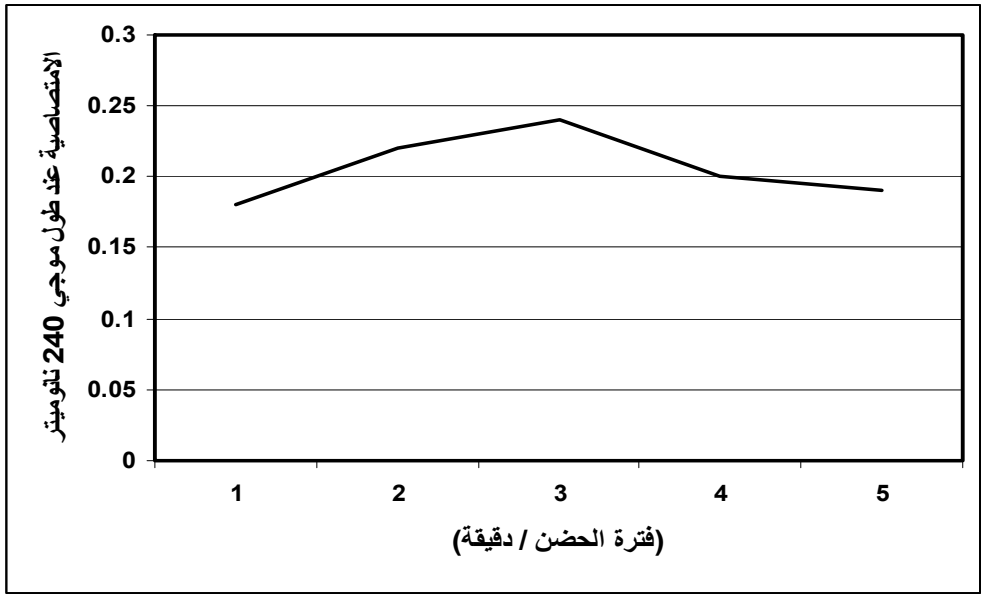
المستخلص الخام	الفعاليةالنوعية وحدة/ملغم بروتيني	البروتين (ملغم /مللتر)	الفعالية الكلية (وحدة / ملغم)
Phasedus vulgaris	0.142	1.422	0.202
Vicia faba	0.137	1.131	0.155
Trigonella	0.161	0.791	0.128
Nigelal sativas	0.166	1.168	0.194
Beta vulgaris	0.132	1.358	0.180
Brassia oleracca	0.131	1.239	0.163

كما يبين الشكل (1) أن الفعالية الأنزيمية تزداد بزيادة درجة حرارة الحضن حتى وصلت أقصاها (0.240) وحدة /مللتر بدرجة حرارة عند50م° ويعود سبب زيادة سرعة التفاعل مع ارتفاع درجة حرارة الحضن إلى زيادة الطاقة الحركية لجزيئات الأنزيم (الكرخي ،2002) ثم بدأت بالانخفاض وقد يعود ذلك إلى دور الحرارة في تغيير الشكل الفعال للبروتين إلى الشكل الغير فعال بسبب مسخ الأنزيمات.



شكـل 1. تـأثير درجة الحـرارة فـي فعـالية أنـزيم CAT في مستخلص بذور الحبة السوداء .

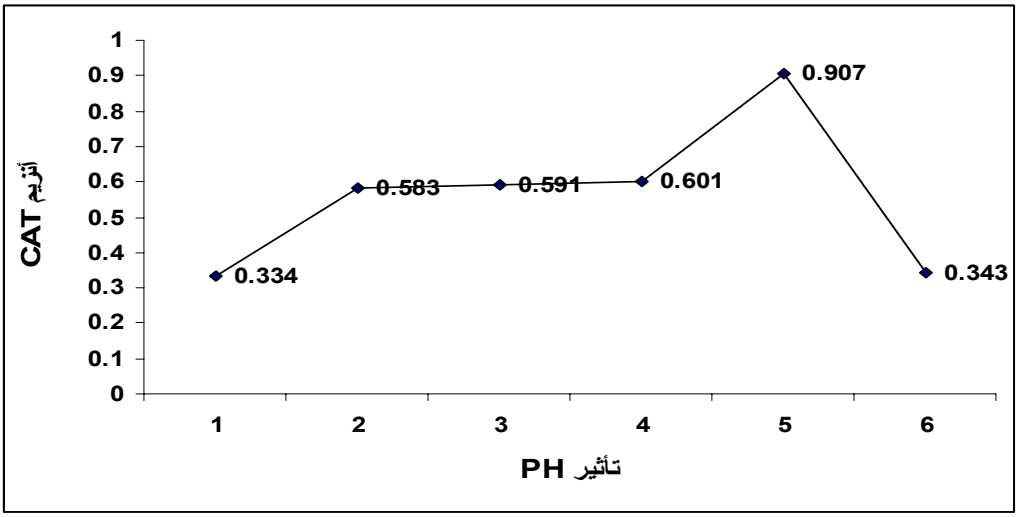
كـما يظـهر مـن الشـكل (1) بأن الأنـزيم احتفظ بكامل فعاليته (0.240) وحدة / مللتر عـند حضـنه بدرجة حرارة 50 م° ولـمدة 30 دقيقة ثـم بدأ بالانخفـاض لأن فترة الحضن وارتفاع درجة الحرارة يعـمل عـلى تحطيم الأواصـر التي تعطي الثبات للتـركيب الثـلاثي للبروتين بسبب عـمليات المسخ الغـير عكسية الـتي تـؤدي للتغـيرات التـساهـمية وغـير التـساهـمية مـثل إعادة تـرتيب سلسلة البروتين (Chri وChaplin،2004)



شكـل 2. تأثـير فترة الحضـن بدرجة 25 م° فـي ثبات الأنـزيم لنبات الحبة السوداء.

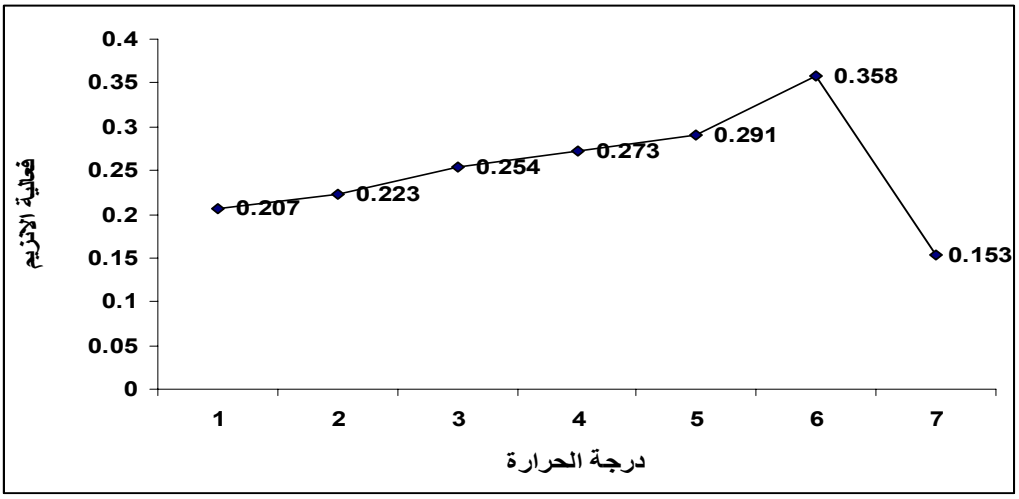
اظهر الأنزيـم أعـلى فعـالية عـند الـرقم الهيدروجيني (8) بلغـت (0.318) وحدة / مللتر وهـذا جلي فـي الشـكل (3) ثـم يـلاحظ إنخـفاض فعـاليته بسبب مسخ جـزيئة البـروتين ويعـود تـأثير الرقـم الهـيدروجيني لوسط التـفـاعـل فـي إرتـباط المـادة الأساس

بالأنـزيـم والحـالة الأيونـية لمخـلفات الأحـماض الأمـينية الـتي تشتـرك فـي الفعـل الحفـزي للأنـزيم وتأتي مـادة التفـاعـل فضلا عـن تأثيره فـي قـابلية الأنـزيم عـلى تحويل معـقد الأنـزيم مـادة التـفاعـل إلـى (Chesworth وأخرون ،1998) وإتفقـت هـذه النتـيجة مـع Yoruk وأخرون (2005) و Gholamhosian وأخرون (2006) .



شكـل 3 . تأثير الـرقم الهـيدروجيني فـي فعـالية أنـزيم CAT لبذور الحبة السوداء.

يظـهر الشـكل (4) إن الرقـم الهيدروجيني الأمثـل لثـبات الإنـزيم CAT فـي بذور الحـبة السوداء كـان pH (8) حيث بلغـت الفعـلية النـوعـية (0.601) وحدة / مللتر ويلاحظ إن فعـالية الأنزيم عـند الأرقـام الهـيدروجينية القـاعـدية والحـامضية المتطرفـة تـميزت بالإنخفـاض وهـذا يعـود إلـى التغـيرات التي تـحدث فـي عـدد الشحنـات عـلى كـل مـن جزيئة الأنـزيم والمـادة الأساس ومـن تؤدي إلـى تغـير قـابلية المجـاميع الموجودة عـلى سطح مـادة التفاعـل مـع بعـضها بواسطة الأواصـر الأيونية والهيدروجينية (الخفاجي ،2007)



شكـل4. تـأثير pH فـي ثبـات أنـزيم CAT في نبات الحبة السوداء.

المصـادر

العـلواني، بشير عـبد الـحمزة محمـد. 2006. اسباب ظـاهرة التعـمير بدلالة فرضـية التـأكسد مـن خلال تـكوين الجـذور العرضية فـي عقل نبات الماش *Phseolus aurus Roxb* .اطروحة دكتـوراه .كـليةالعـلوم .جـامعـة بـابل.

الخفـاجي ،محمـد عـبدالله جـبر.2007. تنقـية وتـوصيف وتقييد أنـزيم اليوريز مـن بذور نـبات الحنـظل *Citrullus colocynthis*. اطـروحة دكـتوراة . كـلية العـلوم .جـامعـة بغـداد.

الكـرخي ، لـيلى عـثمان .2002 .إستـخلاص وتنقـية وتـوصيف أنـزيـم اليوريزمـن بذورالحـنطة ودراسة تأثـير بعـض المثبطات. رسالة مـاجستير. كلـية العـلوم للبنات جـامعـة بغـداد .

محـمد،عـبد العـظيم كـاظم ولـيلى نـجم عـبد الله . 1996. فسلجـة النـبات العـملي. وزارة التعـليم العـالي والبـحث العـلمي . جـامعـة بابل.

Abassi, N.A., M.Kushad and Endress.1998. Active oxygen scavengfing enzyme activities in developing and fruits. *Sientia Horticult urac* .74:183 -194.

Aebi, H .1984.(Catalase)in Methods in enzymology. Academic press. .Orlando. 121-126(ED).

Aydermir, T. and K. Kuru .2003. Purification and partial characterization of catalase from chicken erythrocytes and effect of various inhibitors on enzyme activity.*Turk.J. Chem*. (27): 85 -97.

Chaplin, M. and Chri .2004. Enzyme technology .h./www.sbu.ae.

Chesworth , J., M., Stuchbury.and J. R Scaife.1998. An. Introduction to Agricaltural biochemistry. Chapman &Hall. London.

Gholamhoseinian , A. N. Ghaemi and F. Rahimi..2006. Partial Puification and properties of catalase from *Bssia oleracea L. Asian J. of Plant Sciences*. 5 (5): 827-831.

Goth , L.1991. A simple method for determination of serum catalase and revision of reference range. Clin chim Acta 196:143-152.

Luhova , L., D. Hederova and P.Pec.2003. Activities amino oxidase , peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum L.* under different light conditions. Plant soil Environment. 49(4):151-157.

Percy, M. E.1984. Catalase an old enzyme with anew role? *Can. J. Cell. Biol*. 62:1006–1014.

Yoruk ,I. H. Demir ,K. Ekici, and. Savran.2005. Purification &properties of catalase from Van apple (Golden Delicious). *Pakistan. J. of Nutrition.* 4(1): 8–10.

EXAMINATION OF CATALASE ENZYME IN SEEDS SOME PLANTS AND SOME CHARACTERS OF IT.

A. K. AL-Anbari **S. K. Abd AL-Waha**

***Dept. of Biology - Al-Razi Education College - Diyala university.**

ABSTRACT

The study deals with the investigation of CAT enzyme in *Phasedus vulgaris, Vicia faba, Trigonella,Nigella saliva Brassia oleracca* and *Beta vulgaris* is seeds. The enzyme activity was evaluated. It was found that *Nigella saliva* showed the highest enzyme activity (1.66) U/mg. The leaves content of total protein was studied, it showed the highest content (1.422) ml/mg for the *Phaseodus vulgaris* plant. It was selected as Thormal degree for a high level and the stability of the enzyme with the hydrogynic *number* which depends on the seeds of the black pills *(Nigella satvia*). This study showed the coming results and the temperature for the activitation of the enzyme (50C°) and it's reactivity is (0.240) u/ml, so the enzyme showed such an obuious stability for (30 min) in (50C°) /and reached (0.348) u/ml /. According to the hydrogenic number and it's power. Reaction reached (0.318) u/ml at (PH=8). So, the enzyme showed the same stability at the hydrogenic number so, it reached in to(0.601) /u/m/.