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* واللهانة *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 (Kuruو Aydermir،2003) الهدف من هذه الدراسة

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

هو التحري عن خصائص إنزيم الكاتليز وتقدير الفعالية الأنزيمية في الأصناف المحلية لبذور الفاصوليا والباقلاء والحلبة والحبة السوداء والسلق واللهانة ودراسة بعض خصائص الأنزيم كدرجة الحرارة المثلى والرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات عمل الأنزيم.

المواد وطرائق البحث

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

شـملت تـقدير البـروتين فـي أوراق الفاصـولـيا و البـاقلاء والحلبة و الحـبة السوداء واللهـانة والسـلق 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 في الدراسة :-

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

يحضـر بإذابـة 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) ويحضـر 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).

ويحضـر 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 pHإلـى 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

تـم تقدير الفعـالية الأنـزيمية فـي بذور الفـاصوليا والبـاقلاء والحلبـة والحـبة السـوداء واللهـانة والسـلق حسـب طريـقة العـلواني (2006) وذلـك بسـحق 5 غـرام مـن البـذور مـع محـلول دار ئ فـوسفـات البـوتاسـيوم (0.1مولاري) (7.8) وبـنسبة (1:2وزن/حجم). المستخـلص تـم تـرشيحه مـن خـلال قـماش الشـاش وتـم إجراء الطـرد المـركـزي عـلى سرعـة 1200 دورة / دقيقة لـمدة 30 دقيقـة (Luhova وأخرون ،2003) وتـم تقـدير فعـالية الأنـزيم حسب طـريقة Goth (1991) إذ يؤخـذ 0.2 مـللتر مـن المسـتخلص ويحـضن مـع1 مـللتر مـن المـزيج الحـاوي عـلى بيروكسيدالهيدروجين (65مللي مولر)مـع دار ئ الفـوسفـات (60مللي مولر) (7.4 pH) فيْ25م° لـمدة 4 دقائـق. بعـدها يـتم إيقـاف

عمل الأنزيم بإضافة 1 مل من مولبيدات الأمونيوم (32.4مللي 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 ملتر من المادة الأساس (بيروكسيد الهيدروجين مع المحلول الدارئ) و1 مل من المولبيدات و 0.2 ملتر من العينة.

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

Blank3:- يحتوي على 1 ملتر من المحلول الدار ئ و1 ملتر من المولبيدات و 0.2 ملتر 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 (50مللي مولر) وبأرقام هيدروجينية (5، 6 ،7, 8 , 9 ،10) تم مزج (0.1مللتر) من المحلول الأنزيمي مع 0.99 مللتر من كل من المحلول الدار ئ 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) مللي 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 (50مللي مولر) وبرقم هيدروجيني (7) ومزج (0.1مللتر) من المحلول الأنزيمي مع 0.99 مللتر من كل من المحلول الدار ئ المحضر في أنابيب إختبار ويحضن لمدة ساعة في درجات حرارة (20-80) مْ. يؤخذ (0.2مللتر) من المحلول (المحضر في الخطوة السابقة) لجميع الأنابيب ويضاف له (1) مللتر من (50) مللي مولر من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين (pH=7).ويحضن بدرجة حرارة 25 مْ 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 الدار ئ 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

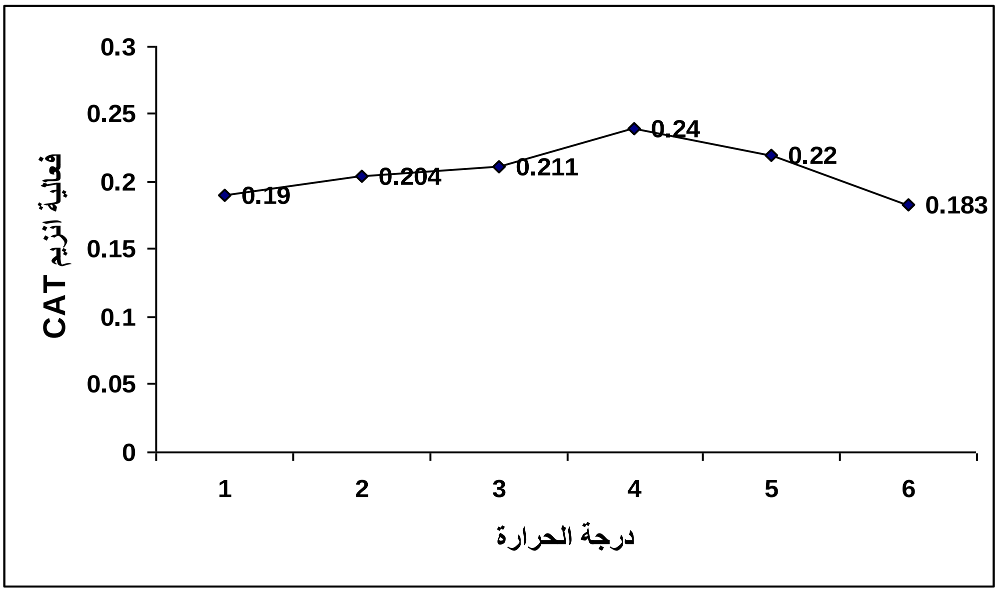
يظهر الجدول(1) إن بذور الحبة السوداء أعطت أكبر فعلية أنزيمية نوعية للكالتيز (CAT) بلغت (0.166) وحدة /ملغم وهذا أثر على محتوى البروتين الكلي عند قياسه حيث وصل إلى

(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.

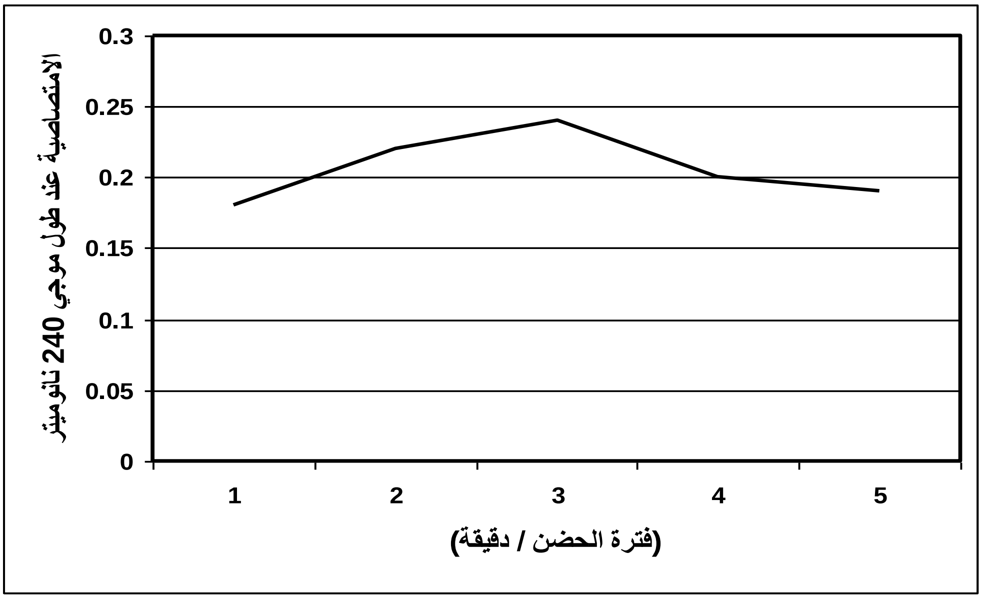
المستخلص الخام	الفعاليةالنوعية وحدة/ملغم بروتيني	البروتين (ملغم /مللتر)	الفعالية الكلية (وحدة / ملغم)
Phasedus vulgaris	0.142	1.422	0.202
Vicia faba	0.137	1.131	0.155
Trigonella	0.161	0.791	0.128
Nigelal sativas	0.166	1.168	0.194
Beta vulgaris	0.132	1.358	0.180
Brassia oleracca	0.131	1.239	0.163

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.



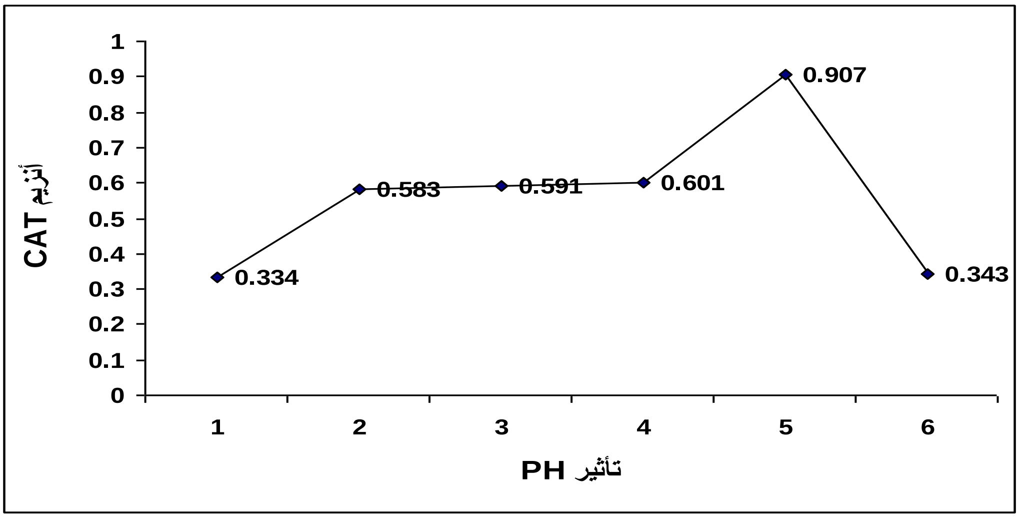
شكل 1. تأثير درجة الحرارة في فعاية أنزيم CAT في مستخلص بذور الحبة السوداء .

كما يظهر من الشكل (1) بأن الأنزيم احتفظ بكامل فعاليته (0.240) وحدة / مللتر عند حضنه بدرجة حرارة 50 م° ولمدة 30 دقيقة ثم بدأ بالانخفاض لأن فترة الحضن وارتفاع درجة الحرارة يعمل على تحطيم الأواصر التي تعطي الثبات للتركيب الثلاثي للبروتين بسبب عمليات المسخ الغير عكسية التي تؤدي للتغيرات التساهمية وغير التساهمية مثل إعادة ترتيب سلسلة البروتين (Chri وChaplin،2004)



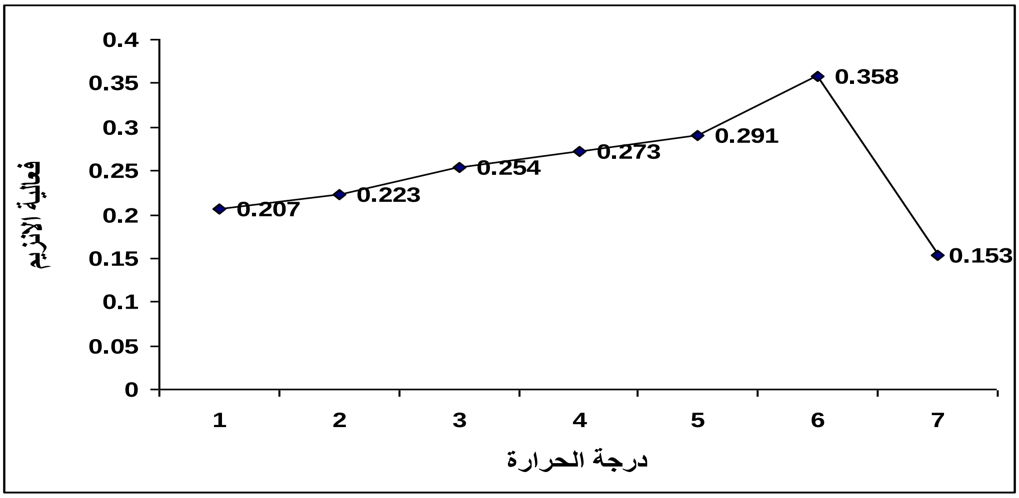
شكل 2. تأثير فترة الحضن بدرجة 25 م° في ثبات الأنزيم لنبات الحبة السوداء.

اظهر الأنزيم أعلى فعالية عند الرقم الهيدروجيني (8) بلغت (0.318) وحدة / مللتر وهذا جلي في الشكل (3) ثم يلاحظ إنخفاض فعايته بسبب مسخ جزيئة البروتين ويعود تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في إرتباط المادة الأساس بالأنزيم والحالة الأيونية لمخلفات الأحماض الأمينية التي تشترك في الفعل الحفزي للأنزيم وتأتي مادة التفاعل فضلا 歆 عن تأثيره في قابلية الأنزيم على تحويل معقد الأنزيم مادة التفاعل إلى (Chesworth وأخرون ،1998) وإتفقت هذه النتيجة مع Yoruk وأخرون (2005) و Gholamhosian وأخرون (2006) .



شكل 3 . تأثير الرقم الهيدروجيني في فعاية أنزيم CAT لبذور الحبة السوداء.

يظهر الشكل (4) إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم CAT في بذور الحبة السوداء كان pH (8) حيث بلغت الفعلية النوعية (0.601) وحدة / مللتر ويلاحظ إن فعالية الأنزيم عند الأرقام الهيدروجينية القاعدية والحامضية المتطرفة تميزت بالإنخفاض وهذا يعود إلى التغيرات التي تحدث في عدد الشحنات على كل من جزيئة الأنزيم والمادة الأساس ومن تؤدي إلى تغير قابلية المجاميع الموجودة على سطح مادة التفاعل مع بعضها بواسطة الأواصر الأيونية والهيدروجينية (الخفاجي ،2007)



شكل4. تأثير pH في ثبات أنزيم CAT في نبات الحبة السوداء.

المصادر

العلواني، بشير عبد الحمزة محمد. 2006. اسباب ظاهرة التعمير بدلالة فرضية التأكسد من خلال تكوين الجذور العرضية في عقل نبات الماش *Phseolus aurus Roxb*. اطروحة دكتوراه .كليةالعلوم .جامعة بابل.

الخفاجي ،محمد عبدالله جبو.2007. تنقية وتوصيف وتقييد أنزيم اليوريز من بذور نبات الحنظل *Citrullus colocynthis*. اطروحة دكتوراة . كلية العلوم .جامعة بغداد.

الكرخي ، ليلى عثمان .2002 .إستخلاص وتنقية وتوصيف أنزيم اليوريزمن بذورالحنطة ودراسة تأثير بعض المثبطات. رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات جامعة بغداد .

محمد،عبد العظيم كاظم وليلى نجم عبد الله . 1996. فسلجة النبات العملي. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة 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/.