جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

فصل وتنقية انزيم اللايبيز من نبات جوز البقان ودراسة خصائصه والفته تجاه بعض مستخلصات قشر الرمان ومركب ٤،١- ثنائي اسيتوكسي بنزين

خديجة سهيل يونس عباس

رسالة ماجستير

الكيمياء

بإشراف

الاستاذ المساعد

الدكتور عمر يونس محمد العباسي

المدرس

الدكتور عمر عبدالله صالح

١٤٤٣هـ

٢٠٢١م

الخلاصة

تمتلك أنزيمات اللايبيز القدرة على تحليل الدهون وتحويلها إلى أحماض دهنية والكليسيرول في الأوساط البينية، مما جعلها أكثر استخداما في التطبيقات الصناعية المختلفة. وقد جاء هذا البحث جنبًا إلى جنب مع التطورات الحديثة التي تم إجراؤها مسبقا في العديد من المجالات المتعلقة بتنقية وإنتاج هذه الانزيمات لاستخدامها في الصناعات المختلفة. تضمنت الدراسة الحالية تنقية أنزيم اللايبيز جزئياً من لب جوز البقان باستخدام بعض التقنيات الحياتية. حيث وجد ان الفعالية النوعية للأنزيم الخام بلغت (0.153) وحدة انزيمية/ ملغم بروتين. وبعد تطبيق عملية الترسيب بوساطة كبريتات الامونيوم والفرز الغشائي بلغت الفعالية النوعية (1.047 و1.66) وحدة أنزيمية/ملغم بروتين وعدد مرات التنقية (7.2 و10.84) مرة ، وبنسبة أسترجاع للفعالية (79.2% و27.3%) على التوالي. بعد تطبيق تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني CM–Cellulose، أظهرت النتائج النهائية وجود حزمتين لأنزيم اللايبيز، وكانت الفعالية النوعية للحزمة الاولى (2.66) وحدة أنزيمية/ ملغم بروتين، وعدد مرات التنقية له (17.38) مرة بينما كانت الفعالية النوعية للحزمة الثانية (1.7) وحدة أنزيمية/ ملغم بروتين وعدد مرات التنقية (11.11) مرة. وفي دراسة توصيف الانزيم المنقى جزيئاً ظهر أن فعالية متماثلي أنزيم اللايبيز كانت في اقصاها عند الرقم الهيدروجيني الأمثل 8 و6 على التوالي، في حين أن درجة الحرارة المُثلى لمتماثلي الأنزيم كانت 40 و50 درجة مئوية على التوالي. تم الحصول على حزمة منفردة واضحة ونقية لكل من المتماثلين عند تطبيق تقنية الهجرة الكهربائية وتبين ومن خلال استخدام بعض البروتينات القياسية ان الوزن الجزيئي التقريبي للمتماثلين كان بحدود 42 كيلو دالتون.

تناولت الدراسة تحضير المركب 4,1– ثنائي اسيتوكسي بنزين الذي حضر من خلال تفاعل مركب الهيدروكوينون مع أنهيدريد حامض الخليك، وقد تم تشخيص المركب ثنائي الاستر من خلال قياس كروماتوكرافيا الغاز– مطياف الكتلة(GC–Mass) –Chromatography mass spectrometry وقياس طيف الرنين النووي المغناطيسي Nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR).

بعد ذلك درست ايضًا امكانية تثبيط انزيم اللايبيز بفعل مادة 1،4- ثنائي أسيتوكسي بنزين وتبين ان أعلى نسبة مئوية لتثبيط الأنزيم بلغت 38.3% عند تركيز 6 مولاري . وعند دراسة نوع التثبيط باستخدام هذا التركيز، اظهر المركب اعلاه تثبيطا تنافسيا لانزيم اللايبيز، أذ ازدادت قيمة ثابت ميكايليس – منتن Km من 0.013 إلى 2.857 مولاري، وبقيت السرعة القصوى Vmax ثابتة وقيمتها 0.25 وحدة انزيمية/ مللتر/ دقيقة وتم حساب ثابت التثبيط Kiوكانت قيمته 0.0319 مولاري. كما أظهرت مستخلصات قشور الرمان بالكلوروفورم والايثيل اسيتيت تأثيرا تنشيطيا على انزيم اللايبيز، اذ عند تركيز 0.2 ملغم/ مللتر كانت اعلى نسبة مئوية للتنشيط 107.09% اماعند التركيز 0.4 ملغم/ مللتر مولار فقد لوحظت اقل نسبة مئوية للتنشيط 100.61% هذه بالنسبة للمستخلص الكلوروفورم، اما بالنسبة لتأثير مستخلص الإيثيل اسيتيت على فعالية الانزيم فقد بلغت اعلى نسبة مئوية للتنشيط 122.96% عند التركيز 0.6 ملغم/ مللتر وأقل نسبة مئوية للتنشيط 101.66% عند التركيز 0.8 ملغم/ مللتر.

وقد تم تشخيص بعض المركبات الفينولية الموجودة في مستخلصات قشر الرمان باستعمال تقنية كروموتوغرافيا السائل- عالي الأداء (HPLC) High performance liquid chromatography. ظهرت من خلالها عدة حزم تعود إلى كروموتوكرامات المركبات الفينولية (حامض الكاليك وحامض الكلورجينيك وحامض التانيك وبارا-حامض الكوماريك وكيرسيتين) بتراكيز وأوقات احتجاز خاصة بكل مركب .

Abstract

The lipase enzymes have the ability to break down fats and convert them into fatty acids and glycerol in the inteface media, which made them more widely used in various industrial applications. This research came along with recent developments that were previously made in many areas related to the purification and production of these enzymes for use in various industries.

The present study included partial purification of lipase from pecan nut karnel using some biochemical techniques. It is noted from the results that the specific activity of the crude enzyme reached (0.153) enzymatic units/mg of protein. After applying the sedimentation process by ammonium sulfate and dialysis, the specific activity reached (1.047 and 1.66) enzymatic units/mg protein and the purification fold was (7.2 and 10.84), with a recovery rate of (79.2% and 27.3%), respectively compared to crude enzyme. After applying the ion exchange chromatography technique using the CM-Cellulose ion exchanger, the final results showed the presence of two peaks of lipase. The specific activity of peak I was 2.66 enzymatic units / mg protein, and the purification fold was 17.38, while the specific activity of peak II was 1.7 enzyme units / mg protein and purification fold 11.11 compared to crude enzyme. In the study of characterization of the partially purified enzyme, it appeared that the activity of the lipase isoenzymes were maximum at the optimum pH 8 and 6, respectively, while the optimum temperature were 40 and 50 C, respectively. A clear and pure single band was obtained for each of the isoenzyme when applying the electrophoresis technique and it was found through the use of some standard proteins that the approximate molecular weight of both was about 42 kDa.

The study dealt with the preparation of 1,4-diacetoxybenzene, which was prepared by reacting hydroquinone with acetic anhydride. The diester

compound was diagnosed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and ^{1}H NMR spectrometry. After that, the possibility of inhibiting the lipase was also studied by using 1,4-diacetoxybenzene, and it was found that the highest percentage of enzyme inhibition was 38.3% at a concentration of 6 mM. When studying the type of inhibition using this concentration, the above compound showed a competitive inhibition of the lipase, as the value of the Michaelis-Menten constant (Km) increased from 0.013 to 2.857 mM, and the maximum Velocity (Vmax) remained constant and its value was 0.25 enzymatic units / ml / min. The inhibition constant was calculated, and its value was Ki 0.0319 mM.

Pomegranate peel extracts with chloroform and ethyl acetate also showed an activating effect on lipase, where at a concentration of 0.2 mg/ml the highest percentage of activation was 107.09%, but at a concentration of 0.4 mg/ml, the lowest percentage of activation was observed 100.61% for the chloroform extract, as for the effect of the ethyl acetate extract on enzyme activity, the highest percentage of activation was 122.96% at concentration of 0.6 mg/ml, and the lowest percentage of activation was 101.66% at concentration of 0.8 mg/ml.

Also, some phenolic compounds present in the extracts of pomegranate peel were identified using high-performance liquid chromatography (HPLC) technique.Through it, several packages appeared that belong to the chromatograms of the standard phenolic compounds (calic acid, chlorogenic acid, tannic acid, para-coumaric acid and quercetin) with concentrations and retention times specific to each compound.

University of Mosul
College of Education
For pure Sciences

Isolation and purification of lipase from pecan nut plant and study of its characteristics and affinity toward some pomegranate peel extracts and 1,4-diacetoxybenzene compound

Khadeeja Suhail Younis Al-Abbas

M. Sc. Thesis in

Chemistry

Supervised by

Assist. Prof.
Dr. Omar Younis Mohammed Al-Abbasy

Lec.
Dr. Omar Abdullah Salih

2021AD **1443AH**