جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

تنقية جزئية لأنزيم اللاييز من بنكرياس اناث الاغنام و دراسة التأثير التثبيطي لبعض مستخلصات لحاء شجرة الصفصاف عليه

فاطمة مرهف محمد رشيد

رسالة ماجستير

الكيمياء

بإشراف

الاستاذ

الدكتور عمر يونس محمد العباسي

1445هـ 2023م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية تحضير بعض مستخلصات لحاء شجرة الصفصاف و دراستها لتثبيط انزيم اللاييز المعزول من الفطر *Aspergillus niger* بواسطتها، اظهر المستخلص المائي أعلى نسبة للتثبيط بمقدار 54.35%، بينما كانت أعلى نسب للتثبيط باستخدام مستخلصي الايثانول 70% و خلات الاثيل 62.03% و 80.79% على التوالي، كما درست تأثير الاسبرين على فعالية الانزيم، و لوحظ أن اعلى نسبة للتثبيط كانت بنسبة 98.375%، و عند دراسة نوع التثبيط لكل من المستخلصات باستخدام التركيز الذي اعطى نصف التثبيط تقريبا تبين أن نوع التثبيط للمستخلصين المائي والايثانول 70% هو غير تنافسي إذ انخفضت قيمة Vmax من 2.63 إلى 0.9 وحدة انزيمية، و كانت قيمة Km مستقرة عند 5 ملي مولار باستخدام المستخلص المائي، أما بالنسبة لمستخلص الايثانول 70% فقد انخفضت قيمة Vmax من 4.16 إلى 2.08 وحدة انزيمية بينما قيمة Km مستقرة عند 11.11 ملي مولار، اما عند استخدام مستخلص خلات الاثيل كان نوع التثبيط لاتنافسي، وانخفضت قيمة Vmax من 2.63 إلى 1.03 وحدة انزيمية، و كذلك قيمة Km من 5 إلى 2 ملي مولار . اظهر عقار الاسبرين تثبيطا تنافسيا و كانت قيمة Vmax ثابتة عند 2.63 وحدة انزيمية ، بينما ازدادت قيمة Km من 11.11 إلى 19.6 ملي مولار.

كما تضمنت الدراسة تنقية أنزيم اللاييز جزئياً من بنكرياس اناث الاغنام باستخدام بعض التقنيات الحياتية، إذ وجد ان الفعالية النوعية للأنزيم الخام بلغت 0.019 وحدة انزيمية / ملغم بروتين، و بعد تطبيق عمليتي الترسيب بواسطة كبريتات الامونيوم، و الفرز الغشائي بلغت الفعالية النوعية 0.071 و0.101 وحدة أنزيمية / ملغم بروتين بعدد مرات التنقية 3.737 و 5.316 مرة على التوالي، طبقت بعد ذلك تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية الانزيم و أظهر الفصل وجود قمة واحدة لأنزيم اللاييز، و بفعالية نوعية 2.407 وحدة أنزيمية / ملغم بروتين، و عدد مرات التنقية 272.01 مرة، تم الحصول على حزمة منفردة و نقية عند تطبيق تقنية الهجرة الكهربائية، و تبين أن الوزن الجزيئي التقريبي للمتماثل بحدود 33.88 كيلو دالتون .

دُرس تثبيط انزيم اللايبيز المنقى جزئيا من بنكرياس اناث الاغنام لكل من المستخلصات اعلاه، و تبين أن نوع التثبيط لكل من مستخلصي المائي و الايثانول 70% هو تثبيط غير تنافسي حيث انخفضت قيمة Vmax لكل منهما من 3.33 إلى 2 وحدة انزيمية، و كانت قيمة Km ثابتة عند 5 ملي مولار باستخدام المستخلص المائي، ومن 4 إلى 2.27 وحدة انزيمية بالنسبة لمستخلص الايثانول 70%، وكانت قيمة Km مستقرة عند 11.11 ملي مولار. أما مستخلص خلات الاثيل كان نوع التثبيط لاتنافسي، إذ انخفضت قيمة Vmax من 4.17 إلى 1.14 وحدة انزيمية و كذلك قيمة Km انخفضت من 12.5 إلى 4.35 ملي مولار، اظهر عقار الاسبرين تثبيطاً تنافسياً ولوحظ ان قيمة Vmax ثابتة وهي 2 وحدة انزيمية، بينما زادت قيمة Km من 1.05 إلى 7.7 ملي مولار.

ايضاً تناولت الدراسة تحضير المركب ايزوبروبايل ساليسليت الذي حضر مختبريا، و شخص بواسطة طيف الاشعة ما تحت الحمراء و الرنين النووي المغناطيسي . درس تثبيط انزيم اللايبيز بواسطة المركب المحضر، و تبين أن أعلى نسبة مئوية للتثبيط بلغت 85%، و عند دراسة نوع التثبيط باستخدام التركيز الذي اعطى نصف التثبيط تقريباً، اظهر المركب تثبيطاً تنافسياً، أذ بقيت قيمة Vmax ثابتة و قيمتها 1.78 وحدة انزيمية، و ازدادت قيمة Km من 2.04 إلى 5.26 ملي مولار .

Abstract

The present study includes preparation of some willow tree bark extracts and the ability of inhibiting the lipase of fungus *Aspergillus niger*. The aqueous extract showed the highest percentage of inhibition 54.35%, while the highest percentages of inhibition using ethanol 70% and ethyl acetate extracts 62.03% and 80.79%, respectively. The aspirin impact on enzyme activity was also investigated, and the greatest percentage of inhibition was found to be 98.375%. Inhibition type for the two extracts, aqueous and ethanol 70%, was found to be noncompetitive when using the concentration that gave half inhibition. Vmax value decreased from 2.63 to 0.9 enzyme unit and Km value remained stable at 5 mM using the aqueous extract. For ethanol 70% extract, Vmax decreased from 4.16 to 2.08 enzyme unit, while Km value was stable at 11.11 mM. The type of inhibition was uncompetitive when ethyl acetate extract was used, and the values of Km and Vmax also decreased from 5 to 2 mM and 2.63 to 1.03 enzyme units, respectively. Aspirin demonstrated competitive inhibition with a stable Vmax value at 2.63 enzyme unit and an increase in Km from 11.11 to 19.6 mM.

The study also involved partial purification of lipase from the ovine pancreas using some biochemical techniques. It was discovered that crude enzyme had a specific activity of 0.019 enzyme units/mg protein. After applying the two processes by ammonium sulphate and dialysis, the specific activity reached 0.071 and 0.101 enzyme unit / mg protein, with purification fold 3.737 and 5.316, respectively. Following that, enzyme was purified using ion exchange chromatography. The purification revealed that one isoenzyme of lipase had been obtained with specific activity 2.407 enzyme unit / mg protein, and it had a purification fold of 126.68, When using the SDS-PAGE electrophoresis, a single clear band was obtained for the isoenzyme, and the molecular weight was discovered to be approximately 33.88 kDa.

Each of the aforementioned extracts was investigated for their ability to inhibit partially purified ovine pancreatic lipase. Using aqueous extract, Vmax value decreased from 3.33 to 2 enzyme unit, and Km value remained stable at 5 mM. Using ethanol 70% extract, Vmax value decreased from 4 to 2.27 enzyme units, and Km value remained stable at

11.11 mM, indicating that the inhibition type for each was noncompetitive.

Ethyl acetate extract displayed uncompetitive inhibition, with decreasing of Vmax and Km values from 4.17 to 1.14 enzyme units and 12.5 to 4.35 mM respectively. Aspirin demonstrated competitive inhibition, and it was noted that Vmax value remained stable at 2 enzyme units, while Km value increased from 1.05 to 7.7 Mm.

The study also involved preparation of the compound isopropyl salicylate, which was prepared in a laboratory, and identified by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The prepared compound was tested for lipase inhibition, and the highest percentage of inhibition was found to be 85%. The compound demonstrated competitive inhibition when inhibition type was examined using the concentration that gave approximately half inhibition, as the value of Vmax remained constant at 1.78 enzyme units and Km increased from 2.04 to 5.26 mM.

university of Mosul

College of Education

for Pure Science

Partial purification of lipase enzyme from bovine pancreas and study the effect of inhibitory of some willow bark extracts on it

Fatimah Murahaf Mohammed Al-Rashadi

M. Sc. Thesis in

Chemistry

Supervised By

Prof.

Dr. Omar Younis Mohammed Al-Abbasy

2023 A.D. 1445 A.H.