مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد (11) العدد (3) للعام 2006

استخلاص إنزيم اليوريز وتصنيعه محليا من بذور فول الصويا لغرض استخدامه في تحليل يوريا الدم

إعداد
الدكتور راشد جدي عبد الله
دكتوراه اختصاصي بالكيمياء الحياتية
السريرية الهرمونات

ملخص البحث

تناول هذا البحث واحدا من المواضيع العلمية والاقتصادية المهمة وهو عملية استخلاص إنزيم اليوريوز من بذور فول الصويا (Soybean) والتي نجحت زراعتها على نطاق واسع في العراق وخاصة في محافظتنا واسط (وتحديدا في منطقة الدلمج ومنطقة الدجيلي) وهدفت هذه الدراسة لاستخدامه في قياس نسبة يوريا الدم والإدرار لدى الإنسان ولان العراق يعتمد على إنزيم اليوريز المستورد والمستخلص من الفاصولياء (Jackbean) ونظرا للحاجة الدائمة لهذا الإنزيم في كافة مختبرات التحليلات المرضية في العراق فقد تم استخلاص هذا الإنزيم وفق خطوات علمية وجعله في عدة (kit) مختبرية سدت حاجة عموم العراق من الإنزيم حيث تم الحصول على فول الصويا من أسواقنا المحلية وقمنا بتنظيفها جيدا من الشوائب والمواد الغريبة وتم تنقيعها 15 دقيقة لغرض التخلص من القشور من ثم جففناها بدرجة ْ25م ولمدة 24 ساعة ثم طحنت بمطحنة كهربائية (مع مراعاتنا لدرجة الحرارة) وتم نخلها بمنخل قطر فتحاته 425ملم ولغرض التخلص من الزيت استخدمنا اسيتون 99% وبواقع 4 أربعة اجزاء أسيتون إلى جزء واحد من المسحوق واستخدمنا جهاز الخلاط المغناطيسي بدرجة حرارة المختبر للمزج ودرجة الحرارة كانت 21 – 25 ولمدة 15 دقيقة ، فصلنا الراسب عن الأسيتون والزيت الذائب بطريقة الطرد المركزي المبرد وبعدها جففنا الراسب الحاوي على الإنزيم وتم طحنه ومن ثم تنعيمه بواسطة هاون زجاجي وتمت تعبئته في قناني صغيرة ذات أغطية محكمة وحفظناه في مكان بارد وجاف لاستخدامه .

استخدمنا طريقة نسلر (Nessler) في قياس يوريا الدم لاستخلاص أسوياء ومرضى واستخدمنا أوزان تصاعدية حيث كانت 10 ، 20 ، 30 ، 40 ، 50 ، 60 ، 70 وتم تكرار هذه الأوزان التصاعدية مقارنة لإنزيم اليوريز المستورد ، تم إرسال النموذج إلى قسم السيطرة النوعية في مختبر الصحة العامة التابع لوزارة الصحة وكانت النتيجة مفرحة بصلاحية المسحوق المحضر من قبلنا للاستخدام ومساواته للإنزيم المستورد بعد مقارنته بالمسحوق العالمي المستورد (وهذا الكلام موثق في البحث) تم إرسال نموذج آخر إلى مختبر الطاقة الذرية لغرض التحليل الكروماتوغرافي ومقارنة هذا النموذج المحضر من قبلنا بالنموذج العالمي المستورد وجاءت النتيجة مبشرة (بأن كلا الإنزيمين المحضر محليا

المستورد كانا متشابهين تقريبا في شكل وترتيب السلاسل الببتيدية كما هو موضح في البحث في شكل 1 و 2) ، (حصل هذا البحث على تكريم من وزارة الصحة) . تم تجهيز العراق من هذه المادة لسد احتياجاته وذلك اثر توقيعنا اتفاقية تجهيز مع الشركة العامة لتسويق الأدوية والمستلزمات الطبية وزارة الصحة في عام 1994 . استخدم هذا المسحوق في عموم مختبرات العراق وجميع مختبرات محافظة واسط ولم ترد أي أخطاء أو شكوى من وزارة الصحة لحد ألان .

المقدمة

يعد إنزيم اليوريز من الإنزيمات المحللة Hydrolytic إذ يعمل على تحليل اليوريا إلى امونيا وثاني اوكسيد الكاربون[1] . يحدث التفاعل الإنزيمي بدرجة حرارة 37°م ، واس هيدروجيني 6.4 – 6.9 [2] يستخدم هذا الإنزيم في قياس يوريا الدم في الحالات المرضية والسوية ، وقد أجريت محاولات عديدة من قبل الباحثين لغرض استخلاص هذا الإنزيم وقد توجت هذه المحاولات بالنجاح (Summer 1962) [3] في استخلاص إنزيم لأول مرة على شكل بلورات من بذور الفاصولياء (Jack beans).

كما وجد (85chaney) [4] بأن حبوب البطيخ الأحمر (الرقي) تحتوي أيضا على هذا الإنزيم .

إن العراق يعتمد اعتمادا كليا على استيراد إنزيم اليوريز المستخدم في قياس يوريا الدم بالطريقة الإنزيمية والمستخلص من قبل الشركات من الفاصولياء (Jack beans) ونظرا للحاجة الدائمة لهذا الإنزيم في دراستنا هذه نقوم باستخلاص هذا الإنزيم من بذور الصويا (Soybean) لكونها من المحاصيل المتوفرة والتي نجحت زراعتها في القطر وكذلك إيجاد عدة جديدة محورة لعملية قياس اليوريا في الدم ، ومن هنا تأتي أهمية هذا المشروع من الناحية التطبيقية حيث انه سيمكننا من تحضير عدة (kit) قياس يوريا الدم بالطريقة الإنزيمية محليا دون الاعتماد على استيراد الإنزيم وهو المادة المهمة في هذا الاختبار .

المواد وطريقة العمل :

تم الحصول على بذور فول الصويا من الأسواق المحلية وأخذنا منها 100غرام وقد أجرينا عليها الاستخلاص الآتية :

أولا – استخلاص الإنزيم الخام : وقد شملت هذه الطريقة ما يلي :

1. قمنا بتنظيف البذور من الشوائب والمواد الغريبة .
2. تم تنقيع البذور في الماء لمدة 15 دقيقة لغرض التخلص من القشور وهذه العملية لا تتسبب بفقدان كمية من الانزيم .
3. جففنا البذور المزالة منها القشور بدرجة حرارة 25°م لمدة 24 ساعة .
4. تم تكسير البذور باستخدام هاون حديدي ثم طحنت باستخدام مطحنة كهربائية حيث اجريت عملية الطحن بشكل متقطع لغرض عدم ارتفاع درجة حرارة النموذج المطحون لانه من المعروف بان الانزيمات بشكل عام تتلف عند تعرضها لدرجة الحرارة العالية وان درجة 55 – 60°م تعمل على تحطيم الانزيمات[5] .
5. تم نخل النوذج المطحون باستخدام منخل قطر فتحاته 425 مايكون وبهذه العملية تم التخلص بصورة كاملة من الالياف والحصول على مسحوق ناعم جدا .

---

[1] - Varley , H . (1996) , Practical clinical Biochemistry 7th edition p 456 – 457 .
[2] - Patton , C.J,S.R., anal chem. 1997 49 : 464 – 469 .
[3] - Richterich, R, : clinical ehemisty . S. kargen Bascl . 1996
[4] - Chaney , A. L. and marbach A.L.clin . chem. . 1985 ; 8 : 130 .
[5] - Albert L. Lehninger Biochemistry 4th edition 1996 p 196 – 197 .

6. تم التخلص من الزيت في المسحوق باستخدام الاسيتون 99% بواقع اربعة اجزاء اسيتون الى جزء واحد(4 : 1) مسحوق وقد كان الاستخلاص بطريقة الغمر المتحرك حيث استخدم لهذا الغرض جهاز الخلاط المغناطيسي وتمت هذه العملية بدرجة حرارة المختبر التي كانت تتراوح من 21 – 25 م ولمدة 15 دقيقة ثم تم فصل الراسب عن والزيت الذائب بطريقة الطرد المركزي المبرد ، بعدها تم تجفيف الراسب الحاوي على الانزيم لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 21 – 25°م .
7. تم طحن الراسب المجفف في الفقرة اعلاه في الهاون الزجاجي لغرض تنعيمه بعدها حفظ هذا المسحوق في قناني صغيرة ذات اغطية محكمة وحفظ في مكان بارد وجاف لحين الاستخدام حيث استخدم هذا المسحوق كمصدر للانزيم في اجراء التحليل الخاص بتقدير يوريا لدم بالطريقة الانزيمية .
8. لغرض تقدير فاعلية هذا الانزيم من قياس يوريا الدم فقد استخدمنا طريقة نسلر (Nessler)[6] في قياس يوريا الدم لاشخاص اسوياء ومرضى فقد استخدمنا اوزان تصاعدية من هذا المسحوق الحاوي على الانزيم بشكله الخام حيث كانت 10 و 20 و 30 و 40 و 50 و 60 و70 ملغم وتم تكرار هذه الاوزان التصاعدية لانزيم اليوريز المستورد ، بعد ان تخلصنا من الالياف والدهون ونسبة من البروتين والمواد الذائبة ولغرض التخلص من الرطوبة تم تجفيفه (كما اشرنا) حصلنا كمية موزونة تقدر (45)غرام من مسحوق انزيم اليوريا الخام من اصل (100)غرام من بذور فول الصويا .
9. تم تحضير عدة قياس ليوريا الدم بطريقة محورة عن شركة بريطانية وهي (BDH Limited poole BH124NN England) والطريقة المحورية هي كما يلي :

1. تم اخذ ثلاث انابيب نظيفة احدها للنموذج المراد فحصه والثاني لمحلول القياس والثالث للمحلول الكفيء ، مقارنة بثلاث انابيب مماثلة يستخدم فيها انزيم اليوريز المستورد من الشركة اعلاه .
2. اضفنا3.5 مل من لماء المقطر لجميع الانابيب .
3. اضفنا 0.1 مل من المصل او الدم المراد فحصه الى انبوبي النموذج و 0.1مل من المحلول القياسي لانبوبي المحلول والقياسي و 0.1مل من الماء المقطر لانبوبي الكفيء .
4. اضفنا الى جميع الانابيب كمية تقدر (10 – 20) ملغم من اليوريز المحلي المحضر من بذور فول الصويا لطريقتنا في حين اضفنا نفس الكمية ولكن من اليوريز المستورد لانابيب المقارنة (ويتم ذلك بملعقة صغيرة جدا معدة لهذا الغرض يعتمد الوزن فيها على طريقة الكيل من الانزيم) .
5. تم حضن جميع الانابيب في حما مائي بدرجة 37°م لمدة 20 دقيقة .
6. اضفنا 0.3 مل من 10% محلول تنكستات الصوديوم وبعد رج الانابيب جيدا اضفنا 0.3مل من $\frac{2}{3}$ N حامض الكبريتيك وقمنا برج الانبوبة مرة اخرى وتركنا الانابيب لمدة 15 دقيقة لترسيب البروتينات وضعناها في جهاز الطرد المركزي لمدة عشرة دقائق 3000دورة/دقيقة.
7. نقلنا 1 مل من المحلول العلوي الرائق الى انبوبة اختبار نظيفة واضفنا اليها 1.5 من ماء مقطر ثم اضفنا 1مل من كاشف نسلر وتمت القراءة بعد الاضافة مباشرة في جهاز المطياف الضوئي Sepctrophotometer 21 عند الموجة 450ملي مايكرون
8. حسبنا النتيجة كالاتي

$$\text{يوريا الدم ملغم/100مل} = \frac{\text{قراءة النموذج – قراء الكفي}}{\text{قراءة القياسي – قراءة الكفي}} \times 100$$

علما ان الرقم 100 مأخوذ من التركيز الموجود في المحلول القياسي والحدود الطبيعية لهذه الطريقة هي 14 – 44 ملغم يوريا / 100مل مصل الدم

---

[6] - Young . D. S. pestaner , L.C.and Gibbermann , V. clin chem. 1995 ; 26 : ID .

10. تم ارسال نموذج الى قسم السيطرة النوعية في مختبر الصحة المركزي العام في بغداد لغرض بيان صلاحيته واستخدامه في مختبرات العراق ومقارنته بالانزيم المستورد وذلك بموجب كتاب صادر من المستشفى ذي العدد 4446 في 1992/10/10
11. تم ارسال نموذج اخر الى مختبر الطاقة الذرية لغرض التحليل الكروماتوغرافي (وكانت مقارنة هذا النموذج المحضر من قبلنا بالنموذج المستورد) ، وتجدر الاشارة الى ان الوصول الى مختبرات الطاقة الذرية في ذلك الوقت يتطلب جهدا شاقا وكانت صعبة للغاية .

النتائج :

لقد أظهرت نتائج الاستخلاص بانه يمكننا الحصول على (40 – 45) غم من مسحوق انزيم اليوريز الخام من كل (100)غم من بذور فول الصويا وقد وجدنا بأن كمية قليلة من هذا الانزيم الخام تقدر بـ(10 – 20) ملغم تكفي لقياس يوريا الدم بطريقة نسلر .

ان نتيجة السيطرة النوعية بصلاحية مسحوق انزيم اليوريز لعمل المختبري ادت الى نجاح هذه الدراسة عندما اتصلت بنا دائرة الامور الفنية في وزارة الصحة قسم المختبرات وأبلغتنا بالنتيجة التي تم رفعها الى وزير الصحة السابق بالمذكرة المرقمة 1661 في 24/ / 1993 وادت بالنتيجة حصول البحث على تكريم خاص من وزير الصحة العراقي وهذا دليل موثق بالكتاب الوزاري المرقم 154124 في 1993/9/1 .

لقد اوضحت نتائج التحليل الكروماتوغرافي (High – performaceliquid chromatography) بأن كلا الانزيمين الخام المحضر محليا والمستورد كانا متشابهين تقريبا في شكل وترتيب السلاسل الببتيدية كما هو في شكل (1)و(2) وتوضح لنا الصورة (1)و(2) توزيع بلورات الانزيم في كلا المسحوقين المحضر محليا والمستورد والحاوية على الانزيم على هيئة بلورات .

تم تجهيز المختبرات العراقية في جميع المستشفيات (الاهلية والحكومية) في وزارة الصحة ومؤسسة المعاهد الفنية من هذه المادة وبناءاً على العقد لموقع بيننا وبي الشركة العامة لتسويق الأدوية والستلزمات الطبية / وزارة الصحة ومنذ عام 1994 وهذا الدليل موثق بكتابي الشركة العامة لتسويق الادوية والمستلزمات الطبية 24790 في 1994/10/22 و 15493 في 1994/10/31 .

تم تصنيع هذه المادة محليا وبعبوات تكفي الى 50 فحص او 100 فحص ، تم استخدام هذه العدة والانزيم في عموم مختبرات التحليلات المرضية في العراق وجميع مختبرات واسط وبنجاح ولم ترد الينا اية شكوى او اخطاء من وزارة الصحة ولحد الان .

المنـاقشـــــــة :

لقد أظهرت نتائج هذا البحث بأنه يمكن الحصول على 45غم من المسحوق الخام الحاوي على الانزيم من كل 100غم من بذور فول الصويا (بعد طريقة الاستخلاص التي تم ذكرها) "وتجدر الاشارة بنا الى ان الرقم 45غم المستخلص هو غير ثابت في كل عملية استخلاص لهذا الانزيم تستخدم لهذا الغرض" لكن يمكننا القول بأنه يمكن الحصول على 40 – 45 غرام من كل 100 غرام من بذور فول الصويا جافة خالية من الرطوبة والالياف والدهون ونسبة من البروتين .

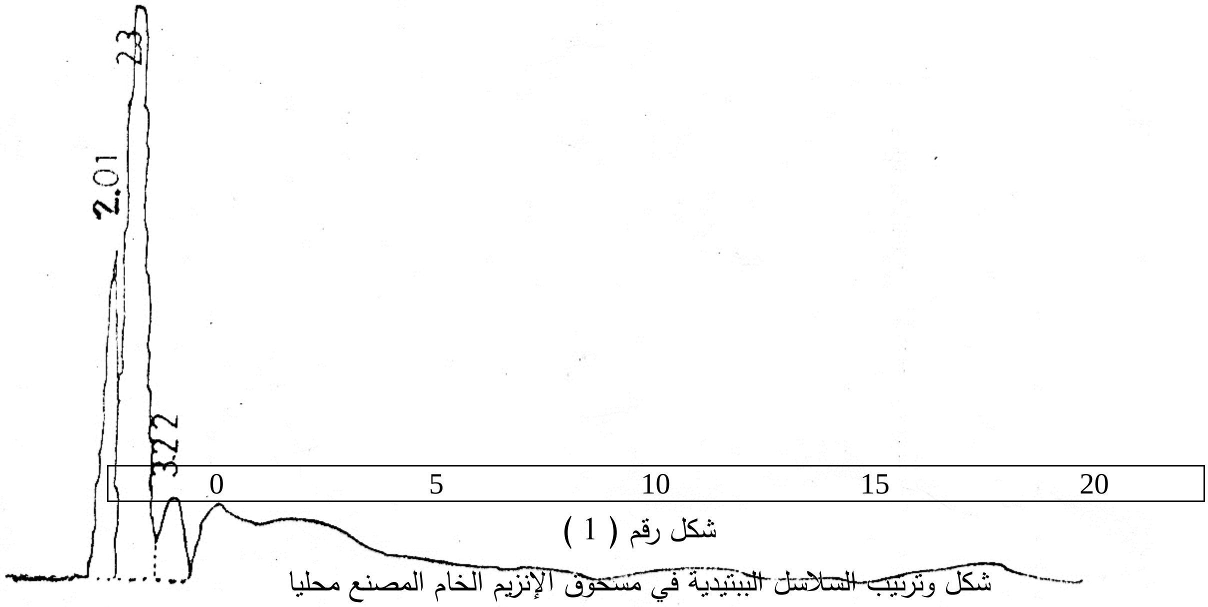
ان استخدام الانزيم على هيئة مسحوق خام يكفي لانجاز الاختبار بصورة تامة وان وجود المواد الاخرى من المسحوق مثل المواد الكاربوهيدراتية لاتؤثر على سير الاختبار[7].

لقد تبين من خلال التحليل الكروماتوغرافي لمسحوق الانزيم المحضر من بذور فول الصويا بأنه يتشابه تقريبا في شكل وترتيب السلاسل الببتيدية مع الانزيم المستورد كما هو موضح في الشكل (1)و(2) وهذا يشير الى وجود الانزيم بصورة كافية في المسحوق الخام والتي تكفي لانجاز الاختبار .

كما اوضحت لنا صور (1)و(2) توزيع الانيم في المسحوق الخام المحضر ن بذور فول الصويا مع مسحوق الانزيم المستورد وهذا يؤكد وجود الانزيم في المسحوق المحضر بهذه الطريقة بكمية كافية وتم ارسال نموذج بموجب كتاب مستشفى الزهراء 446 في 1992/11/10 وكتاب وزارة الصحة العراقية المرقم 40031 في 1992/10/25 الى قسم السيطرة النوعية المركزية في العراق (مختبر الصحة العامة) وبعد ان اجرت السيطرة النوعية التقييم لهذا المسحوق مقارنة باليوريز المستورد جاءت النتائج مبشرة بصلاحيته للاستخدام في المختبرات وذلك بضوء مذكرة مديرية قسم المختبرات في دائرة الامور الفنية في وارة لصحة المرقمة 661 في 1993/24 ، حصل هذا البحث على تكريم وزير الصحة بموجب الامر الوزاري 154124 في 1993/9/1 .

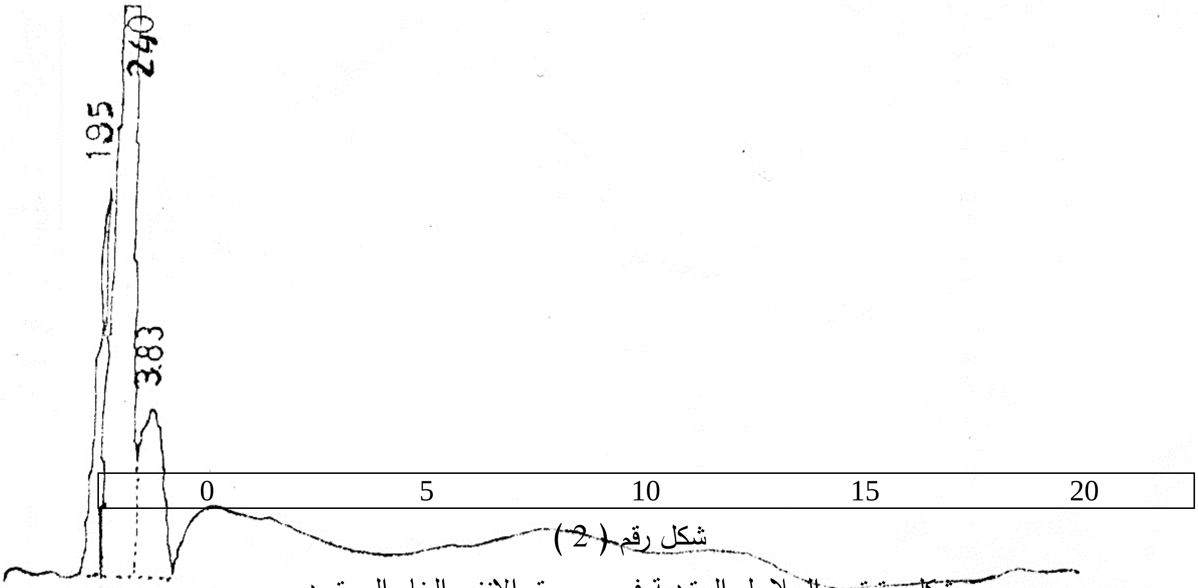
[7] - Yenson . M Tipsial . ve klinik kimya sulhi Garan matbaasi Variseri koil st Istanbul 1995 ure Tayini P 634 – 638 .

ان تحضير عدة للاختبار تحوي على انزيم اليوريز ومرسبات البروتين كانت ناجحة مختبريا حيث يمكن استخدام (K.T) تكفي لانجاز (50) فحص وعدة تكفي لانجاز (100) فحص
وأعقبه بعد عام توقيع اتفاقية لتجهيز الشركة العامة لتسويق الادوية والمستلزمات الطبية / وزارة الصحة حيث تم سد حاجة عموم المختبرات في العراق من هذا السحوق الانزيم .



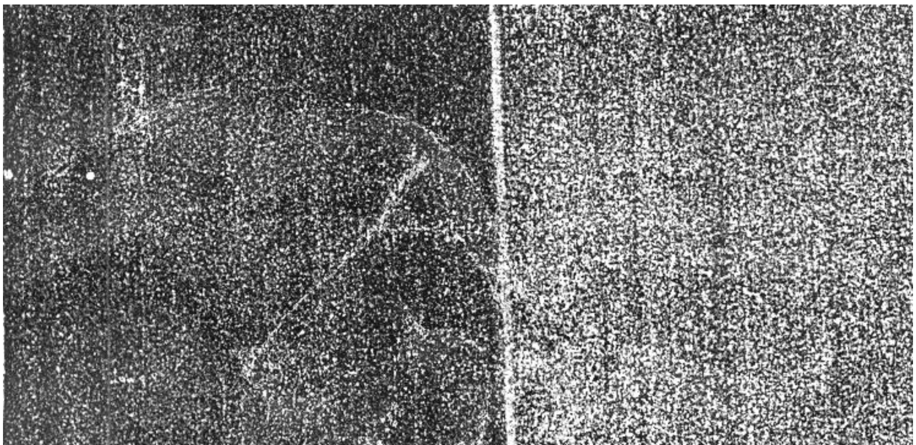
شكل رقم (1)

شكل وترتيب السلاسل الببتيدية في مسحوق الإنزيم الخام المصنع محليا



شكل رقم (2)

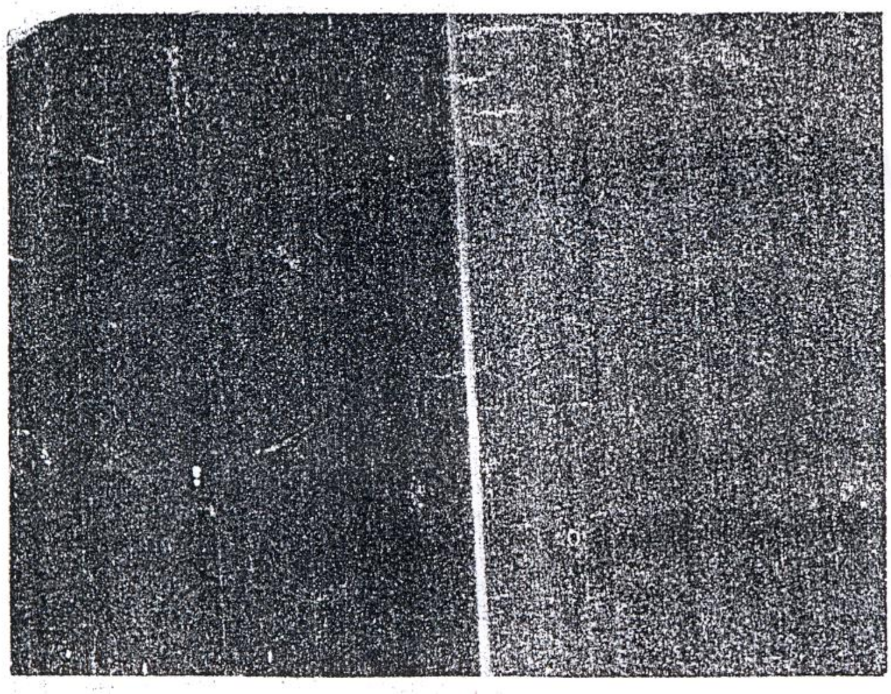
شكل وترتيب السلاسل الببتيدية في مسحوق الإنزيم الخام المستورد



نموذج (1) × 500

صورة رقم (1)

توضح توزيع بلورات اليوريز في المسحوق الخام المحضر محليا من بذور فول صويا



نموذج (2) × 500

توضح

Abstract

This study tackled on of the important scientific & economic topics whic is the process of extracting the urease enzyme from the soybean seeds whic is grown widely in Iraq particulary in wassit goverment (mainly in Al Dalmaj & Al Dujaili areas) its also aimed at using this enzyme in measuring the rates of blood urea and urine urea of human beings . Since Iraq depends on urease enzyme which is imported and extracted from (Jackbean) and due to the permanent need of it in all labs of biochemical analysis in Iraq , So this enzyme had been extracted according to scientific procedure and made in lab kit which satisfied the need of the whole country

1. The soybean was taken from local market .
2. It was cleaned well from imperfeetions and extraneous substances .
3. Soaked for 15 minutes to get rid of husks .
4. Dried under 25 c for 24 hours .
5. grinded by an electrical grinder (whic care the temperature) .

6. Seived out by a sieve of holes with 425 mm diameter .
7. Acetone 99% was used to get rid of the oil in the amount of 4 part acetone to 1 part powder .
8. Magnetic blender was used in lab temperature to mix under 21 – 25 c for 15 minutes .
9. The residue was separated from the acetone and the dissolved oil by the cooled centrifugation .
10. The residue whic contained the enzyme was drid grinded saftenes by a glass mortar and then packed in small bottles with sccure caps 11 kept in a cool dry place for use the method of nessler was used in measuring the blood urea to extract healthy & patients ascending weights were used it was 10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 ,70 .

These ascending weights were repeated comparing the imported ureas enzyme the sample was sent to the department in the general lab of public helth affiliated to ministry of health and the result come to be bright with the validity of prepared powder by the researcher it was equal to the imported enzyme when compared to it (this was documented in the study) . Another sample was sent to the atomic power lab for the result imported world sample that both enzymes , the locally prepared and the imported one were nearly similar in form and order of peptid series as shown in figure 1 and fiqur 2 (this study was supplied with thin material to meet its needs by signing an agreement with the General directorate of drugs and medical Appliances in the ministry of health in 1994) .

This powder was used all over labs of the country and the labs of wassit goverment with out reporting about any error or complaints from the ministry of health still now

Reference

1. Varley , H . (1996) , Practical clinical Biochemistry 7th edition p 456 – 457 .
2. Patton , C.J,S.R., anal chem. 1997 49 : 464 – 469 .
3. Richterich, R, : clinical ehemisty . S. kargen Bascl . 1996
4. Chaney , A. L. and marbach A.L.clin . chem. . 1985 ; 8 : 130 .
5. Albert L. Lehninger Biochemistry 4th edition 1996 p 196 – 197 .
6. Young . D. S. pestaner , L.C.and Gibbermann , V. clin chem. 1995 ; 26 : ID .
7. Yenson . M Tipsial . ve klinik kimya sulhi Garan matbaasi Variseri koil st Istanbul 1995 ure Tayini P 634 – 638 .