الترقيم الدولي ٨٦٩٠ ـ ١٩٩١ ISSN 1991- 8690

Website: http://jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq

تنقية لايبيز البنكرياس الكبدي لسرطان البحر *Portunus pelagicus*

روضة محمود العلي صباح مالك حبيب الشطي

*عمار ياسر جاسم السراجي

قسم علوم الاغذية- كلية الزراعة-جامعة البصرة *قسم الفقريات البحرية- مركز علوم البحار-جامعة البصرة

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إلى استخلاص إنزيم اللايبيز (EC 3.1.1.3) من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر وتنقيته، إذ جمعت عينات من سرطان البحر Crab من مناطق الصيد التابعة لمدينة الفاو في محافظة البصرة وعزل منها البنكرياس الكبدي.استخلص الإنزيم بالمحلول الدارئ Tris – HCl بتركيز ٠,٠٢ مولاري برقم هيدروجيني ٨ الحاوي على ٠,١ مولاري كلوريد الصوديوم NaCl, وأجريت معاملة حرارية للمستخلص الخام عند درجة حرارة ٦٠ م لمدة ١٠ دقائق ومرر المستخلص بالمبادل الأيوني (DEAE – Sephadex A-50), بعدها ركز المحتوى البروتيني للمستخلص الإنزيمي الخام باستعمال كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع تراوحت بين ٣٠ – ٧٠ % ثم أكملت خطوات التنقية بإجراء عملية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود هلام السيفادكس Sephadex G-100 ، فكانت الحصيلة الإنزيمية ١٢,٧٣ % وعدد مرات التنقية ٢١٥,١٤ مرة كما بلغت الفعالية النوعية ٣٣٩٥ وحدة/ملغم بروتين. واختبرت نقاوة الإنزيم عن وجود حزمة بروتينية واحدة للإنزيم عند الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بغياب المواد الماسخة للبروتين.

المقدمة

إن الإنزيمات محفزات بروتينية للتفاعلات الحياتية, تعمل بتخصص عالي على جزئ (مادة أساس substrate) معين أو على صنف من الجزيئات المعينة. وتحتوي الخلية الحية الواحدة على ما يقارب ١٠٠٠ من الإنزيمات المختلفة وهذا ما يجعلها تعمل بكفاءة كآلة كيميائية معقدة, والإنزيمات تشبه المحفزات غير العضوية في كونها لا تستنفذ ولا تتغير بعد تحفيزها للتفاعل المعين وهي تخفض طاقة التنشيط لذلك التفاعل (آل فليح, ١٩٨٦).توصف الاستريزات Esterases بأنها إنزيمات التحلل الدهني وذات صلة وثيقة بمختلف الكائنات الحية. تعود الاستريزات الى مجموعة الإنزيمات hydrolases

*جزء من رسالة ماجستير للباحث الأول

التي تعمل على كسر الآصرة الكيميائية بوجود جزيئة ماء, وهي مهمة جداً لكونها من العوامل الحيوية الضرورية الواسعة الانتشار والتي تدخل ضمن الوظائف الحيوية للكائنات الحية (Bornscheuer, 2002).

إن اللايبيزات (3.1.1.3) Carboxylic ester hydrolases هي إنزيمات تعمل على الأواصر الاسترية في الأسيل كليسرول acylglycerole محررة إياها أحماض دهنية وكلسيرول (Gupta *et al*., 2004).

تعد اللايبيزات واحدة من أهم الإنزيمات الواسعة الانتشار في الطبيعة إذ وجدت في الحيوانات والنباتات الراقية والأحياء المجهرية (Veeraragavan *et al*., 1990). وقد درست اللايبيزات في الكائنات الحية المختلفة, اذ وجدت فعالية اللايبيزات في كثير من الأنسجة النباتية, وخاصة تلك التي تحتوي على نسبة عالية من الكليسيريدات الثلاثية Triglyceride Pahoja *et al*. (2001) وفي الحيوانات (Bacha *et al*., 2005) والحشرات Arrese *et al*. (2006) والاحياء البحرية Cherif *et al*. (2007) والأحياء المجهرية Yong *et al*. (2008).

أجريت معظم الدراسات على اللايبيز المعزول من البنكرياس أو العصارة البنكرياسية لتشخيص دور الإنزيم في تحلل الكليسريدات الثلاثية, وتجرى عملية التحفيز لادمصاص الإنزيم على الطور البيني الكاره للماء لجسيمات المادة الخاضعة. تحدث عملية ادمصاص الإنزيم بوجود جزئيات مساعدة تعرف مساعدات اللايبيز Colipase وهي عبارة عن بروتين صغير, ربما تشكل مساعدات اللايبيز Colipase في الجسم الحي معقدات كيميائية مع اللايبيز بحيث تعمل على رسو الإنزيم في الطور البيني وبهذا يسرع الفعالية التحفيزية, متحررة بذلك الأحماض الدهنية كمصدر خزني رئيسي للطاقة في الحيوانات وفي النباتات التي تنتج الزيوت (الجلبي وآخرون, ١٩٨٥).

طرائق العمل

جمع العينات

جمع ما يقارب ٢٥ غم من البنكرياس الكبدي من ٢٠ نموذجاً من سرطان البحر Crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) المصطادة من الشواطئ الساحلية البحرية في الفاو المطلة على الخليج العربي بعد وضعها في حاوية ملئت بالثلج لحين وصولها إلى المختبر, بعدها نظفت العينات بالماء البارد النظيف, ثم شرحت بأدوات التشريح بعد رفع الدرع الخارجي للسرطان, وأزيلت بعض الطبقات الدهنية منها بعد إجراء تشريح كامل للقناة الهضمية لسرطان البحر وعزلت الأجزاء المطلوبة (البنكرياس الكبدي) واستبعد الباقي, ثم حفظت العينات بالتجميد عند درجة حرارة -١٥ _ -١٨ م قبل الشروع بالدراسة, أجريت كل عمليات الاستخلاص والتنقية عند درجة حرارة ٥ م.

تقدير فعالية اللايبيز

قدرت فعالية اللايبيز بمتابعة تحرير الأحماض الدهنية من خلال التحلل المائي لمستحلب زيت الزيتون بفعل اللايبيز حسب الطريقة الموصوفة من قبل Macedo *et al*. (1997) والتي ذكرها Prazeres *et al*. (2006).

المحاليل المستعملة

- **محلول المستحلب**

حضر المستحلب من مادة الصمغ العربي gum Arabic بتركيز ٧ %, بإذابة ٧ غم منه وإضافتها إلى ٥٠ مل من الماء المقطر وذوبت بشكل جيد على المحرك المغناطيسي إلى حد التجانس بعدها أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر, واخذ منه ٧٥ مل وأضيف إليه ٢٥ مل من المادة الخاضعة زيت الزيتون Olive oil ومزج الخليط بواسطة الخلاط الكهربائي من نوع

Moulinex فرنسي المنشأ لمدة دقيقتين حتى الوصول إلى مستحلب متجانس.

- **دارئ Tris - HCl** بتركيز ٠,٠٢ مولاري وبرقم هيدروجيني ٨ و ٠,١ مولاري NaCl.
- **محلول كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ بتركيز ٠,١١ مولاري.**
- **محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز ٠,٠٥ مولاري.**

تقدير الفعالية الإنزيمية

وضع ٥ مل من محلول المستحلب في دورق سعة ١٠٠ مل وأضيف إليه ٤ مل من المحلول الدارئ بعدها أضيف ١ مل من المحلول ثم أضيف ١ مل من المستخلص الإنزيمي وحضن المزيج لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٤٠ م في حاضنة هزازة بسرعة ١٠٠ دورة / دقيقة, ثم أوقف التفاعل بعد انتهاء مدة الحضن بإضافة ١٥ مل من مزيج أسيتون – ايثانول بنسبة (١ : ١), بعدها أضيف ٢ – ٣ قطرات من كاشف الفينولفثالين وأجريت عملية التسحيح باستعمال محلول. حضر محلول السيطرة (Blank) بإتباع نفس الخطوات أعلاه من دون إضافة المستخلص الإنزيمي. وقدرت الفعالية الإنزيمية حسب معادلة Peled and Krenz (1981) المذكورة من قبل Degerli and Akpinar (2002)

$$U/ml = \frac{(Vs - Vb) \times 0.05 \times 10^3 \times D \times 10}{T}$$

U/m : الفعالية الإنزيمية وحدة / مل.

Vs : حجم القاعدة المستهلكة في العينة.

Vb : حجم القاعدة المستهلكة في محلول السيطرة Blank.

٠,٠٥ : التركيز المولاري للقاعدة NaOH.

10^3 : عامل ثابت (تحويل إلى مايكرومول).

١٠: الحجم الكلي لخليط التفاعل.

D: التخفيف. **T**: زمن التفاعل

تعرف الوحدة الإنزيمية للايبيز:- بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحرير واحد مايكرومول من الحامض الدهني خلال دقيقة واحدة في المليلتر الواحد.
واحتسبت الفعالية النوعية وفق المعادلة الاتية:

$$\text{الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)} = \frac{\text{فعالية الإنزيم (وحدة/مل)}}{\text{تركيز البروتين (ملغم/مل)}}$$

تقدير تركيز البروتين

استعملت الطريقة الموصوفة من قبل Lowry *et al.* (1951) باستعمال كاشف فولن في تقدير تركيز البروتين في المراحل المختلفة من الدراسة معتمداً على المنحنى القياسي لألبومين المصل البقري Bovine Serum Albumin (BSA).

اتبعت طريقة Cherif *et al.* (2007) لاستخلاص اللايبيز من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر بعد تقطيع العينات وسحقها بواسطة الهاون الخزفي ثم مزجت بنسبة ١ : ٤ (وزن : حجم) بالمحلول الدارئ Tris – HCl بتركيز ٠,٠٢ مولاري برقم هيدروجيني ٨ الحاوي على ٠,١ مولاري كلوريد الصوديوم NaCl, بواسطة محرك مغناطيسي Magnetic stirrer المجهز من شركة Heidolph الألمانية لمدة ١٥ دقيقة وترك الخليط لمدة ٦٠ دقيقة عند درجة حرارة ٥ م لغرض التنقيع, بعدها نبذ الخليط مركزياً بجهاز النبذ المركزي المجهز من شركة Janetzki – T24 الألمانية بسرعة ١٥٠٠٠ xg لمدة ٣٠ دقيقة ثم قشطت الطبقة الدهنية المتكونة في أعلى الأنابيب. فصل الراشح Supernatant ثم رشح بورق الترشيح Whatman No.1 للتخلص من الأجزاء الدهنية والقطع اللحمية غير المرغوبة, ثم أخذ الراشح وحضن في الحمام المائي عند درجة حرارة ٦٠ م لمدة ١٠ دقائق,

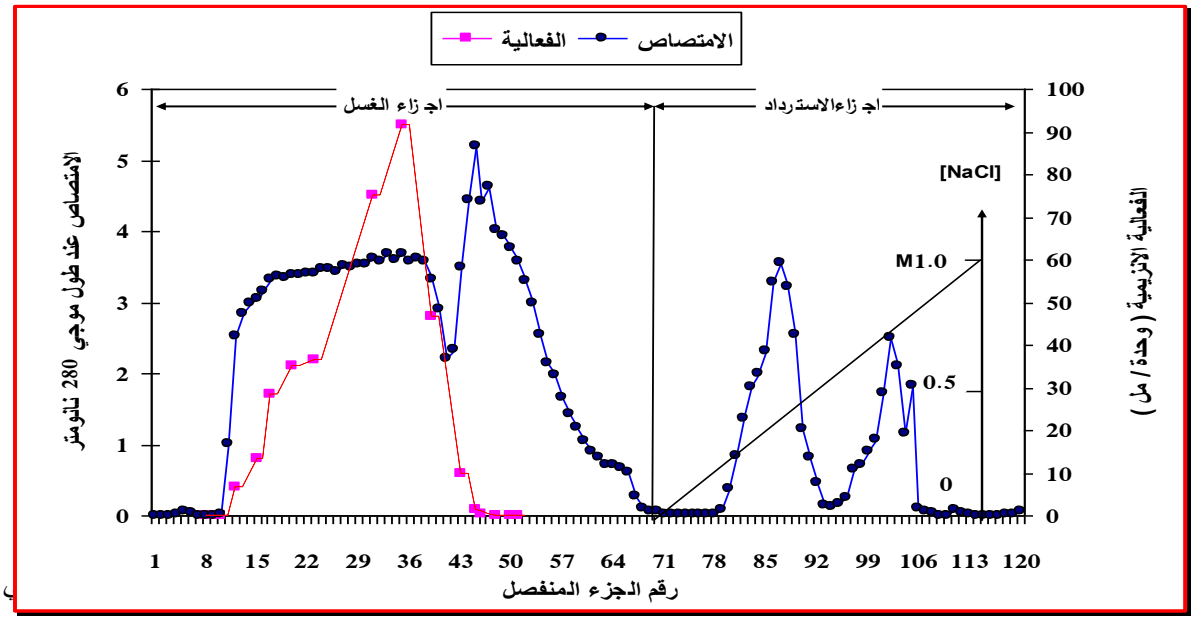
ونقل المستخلص بعد انتهاء مدة الحضن إلى حمام ثلجي بشكل مباشر, ونبذ المستخلص مركزياً بسرعة 15000 xg لمدة ٣٠ دقيقة للتخلص من اكبر كمية من البروتينات الممسوخة والأجزاء غير المرغوبة الأخرى, اخذ الراشح Supernatant , ومرر الإنزيم الناتج من الخطوة السابقة على عمود المبادل الأيوني DEAE – Sephadex A-50, وأجريت خطوات الغسل بمحلول الموازنة الدارئ Tris – HCl بتركيز ٠,٠٢ مولاري برقم هيدروجيني ٨ الحاوي على ٠,١ مولاري كلوريد الصوديوم NaCl, بسرعة جريان ٤٥ مل/ساعة بواقع ٥ مل/أنبوب.

تمت متابعة الامتصاص للأجزاء المفصولة الناتجة من مرحلة الغسل Washing عند طول موجي ٢٨٠ نانومتر, وبعد وصول الامتصاص إلى الخط الصفري (Base line)والذي يعد مؤشراً واضحاً على أنتهاء مرحلة الغسل. استردت الأجزاء المرتبطة بسطح المبادل الأيوني السالب بنفس محلول الغسل بوساطة التدرج الملحي الخطي NaCl بتركيز (٠ – ١) مولاري، وتمت متابعة الامتصاص للأجزاء المفصولة من العمود خلال عملية الاسترداد عند طول موجي ٢٨٠ نانومتر, وقدرت الفعالية الإنزيمية لكل الأجزاء المفصولة.جمعت الأجزاء القريبة من قمة منحنى الفعالية وقدرت الفعالية الإنزيمية لها والحجم وتركيز البروتين. رسمت العلاقة الخطية بين رقم الجزء المنفصل والأجزاءالمفصولة الناتجة من مرحلتي الغسل Wash والاسترداد Elute, تجاه كل من الفعالية الإنزيمية (وحدة / مل) وقراءة البروتين عند طول موجي مقداره 280 نانومتر. ركز الإنزيم المتحصل عليه من الأجزاء الفعالة من خطوة التنقية السابقة باستعمال بلورات كبريتات الأمونيوم الصلبة لتحديد نسب الإشباع المثلى لتركيز المستخلص الإنزيمي, بإضافة أوزان متتالية من كبريتات الأمونيوم بنسب إشباع متتالية تراوحت بين ٣٠ – ٧٠ % إلى المحلول الرائق مع التحريك على محرك مغناطيسي لمدة ٦٠ دقيقة عند درجة حرارة ٥ م, اجري نبذ مركزي بعد كل عملية إضافة بسرعة ١٠٠٠٠ xg لمدة ٣٠ دقيقة. وبعد الوصول إلى الخطوة التي يكون فيها الراشح خالياً من الفعالية الإنزيمية , أهمل الراشح وجمعت الرواسب الناتجة من كل خطوة لغرض التخلص من بقايا كبريتات الأمونيوم والمواد غير الذائبة , مزج الراسب المتحصل عليه مع ١٥ مل من المحلول الدارئ Tris – HCl بتركيز ٠,٠٢ مولاري و ٠,١ مولاري كلوريد الصوديوم NaCl برقم هيدروجيني ٨, وتم ديلزة المستخلص الإنزيمي مقابل الماء المقطر باستعمال أنابيب التنافذ الغشائي ذات MwCO لا يتجاوز ١٢٠٠٠ – ١٤٠٠٠ دالتون وعند درجة حرارة 5 م لمدة ٢٤ ساعة مع استبدال الماء كل ٦ ساعات , ثم اخذ المحلول الناتج وقدر له الحجم وتركيز البروتين.مرر المستخلص الإنزيمي المركز الناتج من خطوة التنقية السابقة على عمود الفصل سيفادكس G-100. وأجريت عملية الاسترداد بالمحلول الدارئ نفسه, وجمعت الأجزاء المتدفقة من العمود في أنابيب اختبار بمعدل ٥ مل/أنبوب وبسرعة جريان ٣٠ مل/ساعة. قرأ الامتصاص لكل جزء من الأجزاء المفصولة عند طول موجي ٢٨٠ نانومتر, وقيست فعالية الإنزيم في القمم المفصولة بعد رسم العلاقة بين عدد الأجزاء المنفصلة مقابل الامتصاص عند ٢٨٠ نانومتر, جمعت الأجزاء القريبة من القمة الحاوية على فعالية اللايبيز ثم قدر له الحجم وتركيز البروتين والفعالية الإنزيمية. أجريت بعدها عملية الديلزة بأنابيب التنافذ الغشائي ضد الماء المقطر لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة 5 م مع استبدال الماء كل ٦ ساعات وركز بعدها الإنزيم باستعمال جهاز Freeze dryer المجهز من شركة Hetosicc الدانماركية. حددت نقاوة الانزيم حسب تقنية الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير ماسخة Poly acrylamide gel electrophoresis

under non denaturating conditions وفق ما وصفه Blackshear (1984) مع بعض التحويرات.

النتائج والمناقشة

تم الحصول على المستخلص الخام من البنكرياس الكبدي لسرطان البحر باستعمال المحلول الدارئ Tris – HCl بتركيز ٠,٠٢ مولاري والحاوي على كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز ٠,١ مولاري برقم هيدروجيني ٨ بفعالية نوعية مقدارها ١٥,٧٨ وحدة/ملغم بروتين (جدول ١), تجدر الاشارة الى ان المحلول الدارئ قد استعمل بتراكيز مختلفة. وأجريت المعاملة الحرارية على المستخلص الخام بهدف التخلص من اكبر كمية من البروتينات والحصول على محاليل ذات تركيز عالي من الإنزيم. إذ أجريت هذه المعاملة كخطوة أولى على المستخلص الخام, إذ بلغت الفعالية النوعية ١٠٣,٧١ وحدة / ملغم بروتين وبحصيلة إنزيمية مقدارها ٦٢,٧١ %, في حين بلغت عدد مرات التنقية ٦,٥٧ مرة (جدول ١), وأجريت تقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني السالب DEAE-Sephadex A-50 كخطوة ثانية في تنقية اللايبيز الناتج من خطوة المعاملة الحرارية السابقة, وبين الشكل (١) ظهور قمتان بروتينية احتوت على قمة واحدة للفعالية في مرحلة الغسل مما دل على خروج الإنزيم وبعض البروتينات ذات الشحنة الموجبة نتيجة حصول تنافر للشحنات فيما بينها وبين المبادل, بينما لوحظ ظهور قمتان بروتينية في مرحلة الاسترداد Elution , مما دل على ارتباط البروتينات الأخرى ذات الشحنة السالبة نتيجة حصول تجاذب فيما بينها وبين مادة المبادل والتي اعتمدت شدته على محصلة كثافة الشحنة التي تمتلكها هذه البروتينات.



linear salt gradient بمعدل جريان ٤٥ مل/ساعة

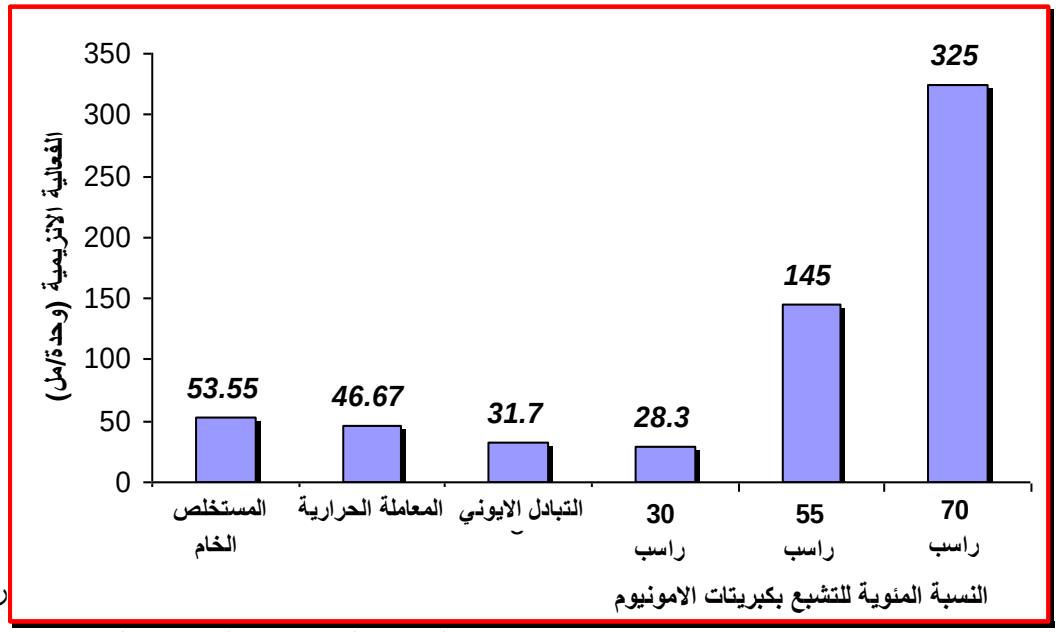
شكل (١) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية لايبيز البنكرياس الكبدي لسرطان البحر, باستعمال عمود التبادل الأيوني السالب DEAE-Sephadex A-50, بإبعاد (١,٥ × ٤٥) سم المعاير بالمحلول الدارئ Tris-HCl (٠,٢ مولاري, ٠,١ مولاري كلوريد الصوديوم, الرقم الهيدروجيني ٨) بمعدل جريان٤٥ مل/ساعة بواقع ٥ مل/أنبوب.

الفعالية النوعية للجزء الإنزيمي المستحصل عليه من

مرحلة الغسل ١١٣,٢١ وحدة/ ملغم بروتين وحصيلة إنزيمية مقدارها ٤٤,٥٨ % وعدد مرات التنقية ٧,١٧ (جدول ١).

اظهر الشكل (٢) خطوة الترسيب التدريجي للإنزيم باستعمال نسب إشباع متدرجة من ملح كبريتات الأمونيوم فكانت ٢٠ – ٩٠ % , إذ لوحظ حدوث ارتفاع واضح بشكل تدريجي للفعالية النوعية للإنزيم في الراسب الناتج لغاية نسب إشباع ٧٠ % وقد أعطت هذه الخطوة فعالية نوعية مقدارها ١٢٨٨,٢٦ وحدة/ملغم بروتين وحصيلة إنزيمية بلغت ١٢٤,٣ % بعدد مرات تنقية مقدارها ٨١,٦٣ مرة عند استعمال نسب إشباع تراوحت بين ٣٠ – ٧٠ % (جدول ١). إن الارتفاع في الفعالية والمحصلة الإنزيمية (%) في هذه الخطوة قد يعزى ذلك إلى دور أملاح كبريتات الامونيوم التنشيطي على فعالية اللاييز.

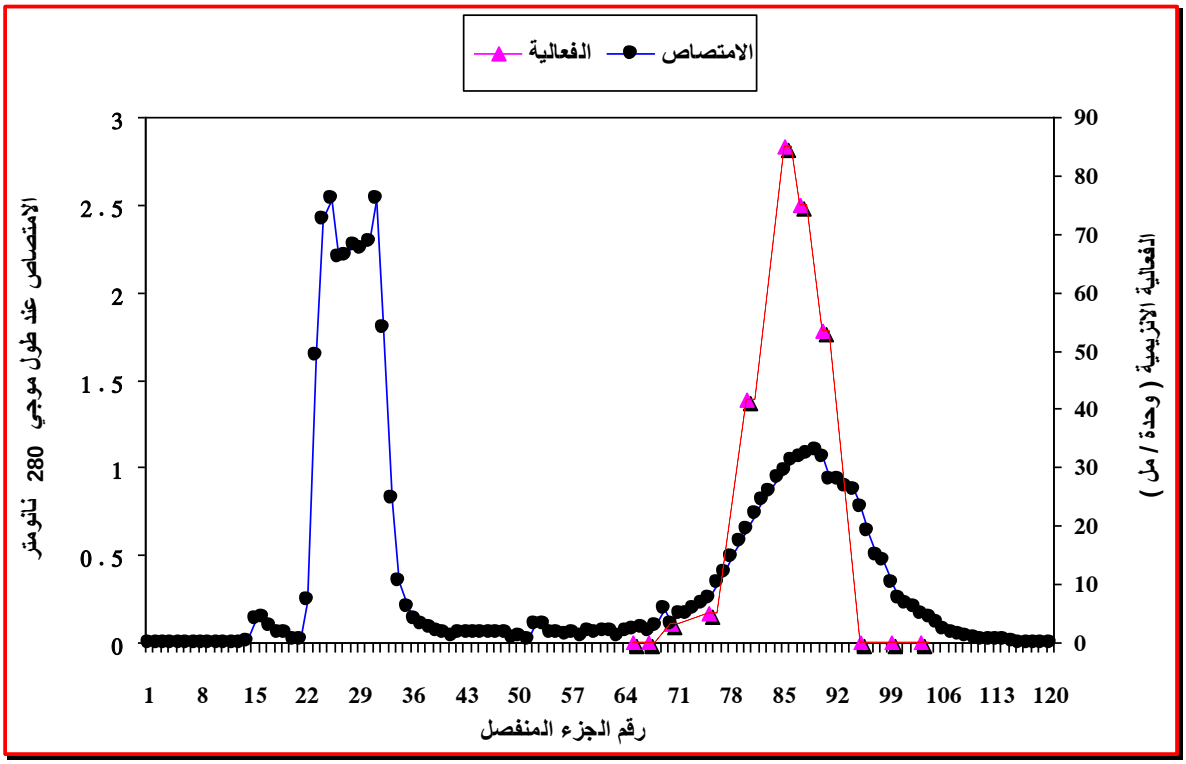
تعد خطوة التركيز احد الخطوات المهمة في عمليات التنقية نظراً لما تمتاز به من صفات ايجابية من ناحية تقليص الحجم وزيادة كفاءة التنقية والتخلص من اكبر قدر ممكن من الماء والبروتينات الأخرى (دلالي, ١٩٨٣). إن شيوع استعمال كبريتات الأمونيوم في ترسيب البروتينات يعود بالدرجة الرئيسة إلى ذائبيتها العالية وانعدام أو قلة تأثيرها في تركيب الإنزيم علاوة على توفرها ورخص ثمنها (Volesky and Luong, 1985).



شكل (٢) الفعالية الإنزيمية للاييز المركز بواسطة كبريتات الأمونيوم بنسب إشباع تراوحت بين (٣٠ – ٧٠ %).

راسة بخطوة
زيم الناتج من
م).
يمية للأجزاء
المستردة الناتجة من عملية الفصل أن فعالية الإنزيم انحصرت بالأنابيب من (٦٨ – ٩٥) وحققت هذه الخطوة فعالية نوعية مقدارها ٣٣٩٥ وحدة/ملغم بروتين بحصيلة إنزيمية بلغت ١٢,٧٣ % كما ارتفعت عدد مرات التنقية

اثر هذه الخطوة إلى ٢١٥,١٤ مرة, بعد تركيز قمة الفعالية الى ٣٠ مل (جدول ١).



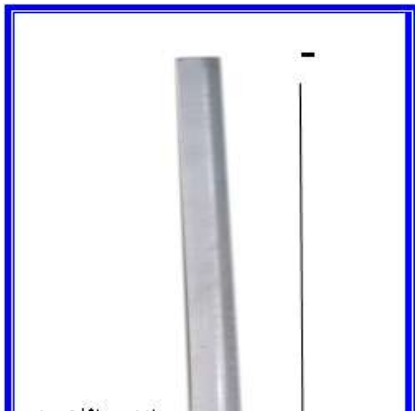
شكل (٣) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية لايبيز البنكرياس الكبدي لسرطان البحر, باستعمال عمود هلام السيفادكس Sephadex G-100, بابعاد (٢,٨ × ٨٥) سم تمت الموازنة والاسترداد بمحلول الدارئ Tris-HCl (٠,٢ مولاري, ٠,١ مولاري كلوريد الصوديوم, رقم هيدروجيني ٨) بمعدل جريان ٣٠ مل/ساعة بواقع ٥ مل/أنبوب.

ـ تنقية لايبيز البنكرياس الكبدي لسرطان البحر.

البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	البروتين الكلي (ملغم)	الحصيلة (%)	عدد مرات التنقية
٣,٣٨٠	١٥,٧٨	٦٣٩٩,٦	٤٠٥,٦٠	١٠٠	١
٠,٤٥٠	١٠٣,٧١	٤٠١٣,٦	٣٨,٧٠	٦٢,٧١	٦,٥٧
٠,٢٨٠	١١٣,٢١	٢٨٥٣,٠	٢٥,٢٠	٤٤,٥٨	٧,١٧
٠,٢٤٧	١٢٨٨,٢٦	٧٩٥٥,٠	٦,١٧	١٢٤,٣٠	٨١,٦٣
٠,٠٠٨	٣٣٩٥,٠٠	٨١٤,٨	٠,٢٤	١٢,٧٣	٢١٥,١٤

ـياب ... قيـد ... كما ... وهذا ... تنقيـة ... ـزيم ... اليـة ... ـنات

التي يحملها البروتين بالدرجة الرئيسة وعلى شحنه وحجمه بالدرجة الثانية ويتحرك البروتين في رقم هيدروجيني ثابت فـي مجـال كهربـائي بـين القطبـين السـالب والموجـب (Blackshear, 1984).



المصادر

الجلبي , قصي عبد القادر ؛ عبد , بيداء حازم ؛ سليم , خولة يـونس (١٩٨٥). مقدمة في الكيمياء الحياتية للبيدات, مطابع جامعة الموصل , جامعة الموصل. (ترجمة)

آل فليح , خولة احمد (١٩٨٦). مدخل الى الكيمياء الحياتية, دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل.

دلالـي ، باسل كامل (١٩٨٣). فهم الإنزيمات, مطابع جامعة الموصل ، جامعة الموصل. (ترجمة)

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. ***The Journal of Biological Chemistry,*** 193 (1): 265 – 275.

Macedo, G. A.; Park, Y. K. And Pastore, G. M. (1997). Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Geotrichum* sp. ***Brazilian Journal of Microbiology,*** 39: 687-692, 1997

Pahoja, V. M.; Dahot, M. U. and Sethar, M. A. (2001). Characteristic properties of lipase from crude extract of *Caesalpinia bonducella* L. seeds**.** ***Journal of Biological Sciences***, 1(8): 775 – 778.

Peled, N. and Krenz, M. (1981). A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol. ***Analytical Biochemistry,*** 112: 219 – 222.

Prazeres, J. N. D.; Cruz, J. A. B. and Pastore, G. M. (2006). Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. ***Brazilian Journal of Microbiology,*** 37: 505 – 509.

Veeraragavan, K.; Colpitts, T. and Gibbs, B. F. (1990). Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. ***Biochimica et Biophysica Acta*** **,** 1044(1): 26 – 33.

Volesky, B. and Luong, J. H. T. (1985). Microbial enzymes: production, purification and isolation. ***Critical Reviews in Biotechnology,*** 2(104): 119 – 146**.**

Yong, y.; Bai, Y. X.; Li, Y. F.; Lin, L.; Cui, Y. J. and Xia, C. G. (2008). Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. ***Process Biochemistry,*** 43: 1179 – 1185.

Arrese, E. L.; Patel, R. T. and Soulages, J. L. (2006). The main triglyceride-lipase from the insect fat body is an active phospholipase A1: identification and characterization**.** ***Journal of Lipid Research,*** 47**:** 2656 – 2667.

Bacha, A. B.; Gargouri, Y.; Ali, Y. B.; Miled, N.; Reinbolt, J. and Mejdoub, H. (2005). Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase.***Enzyme and Microbial Technology***, 37: 309 – 317.

Blackshear, L. J. (1984). Systems to polyacrylamid gel electrophresis ***In*****:** Methods in Enzymology, Jakoby W. B. (Ed.), Academic Press. Inc. Harcourt Brace.Javonovich Publishers, 104: 237 – 256.

Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis.***FEMS Microbiology Reviews,*** 26: 73–81.

Cherif, S.; Fendri, A.; Miled, N.; Trabelsi, H.; Mejdoub, H. and Gargouri, Y. (2007). Crab digestive lipase acting at high temperature:purification and biochemical characterization.. ***Biochimie,*** 89: 1012 – 1018.

Degerli, N. and Akpinar, M. A. (2002). Partial purification of intestinal triglyceride lipase from *Cyprinion macrostomus* (Heckel, 1843) and effect of pH on enzyme activity. ***Turkish Journal of Biology***, 26(3): 133 – 143

Gupta, R.; Gupta, N. and Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 64: 763–781.

PURIFICATION OF LIPASE FROM HEPATOPANCREAS OF CRAB *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758)

Raodah M. Al-Ali Sabah M. H. AL-Shatty

*Amar Y. J. Al-Sraji

Food Science and Biotechnology Department - College of Agriculture - Basrah University