Bull. Fac. Agric., Cairo Univ.,52 (2001):61-84.

STORAGE PROTEINS OF OLIVE SEEDS

(Received: 13.4.2000)

By
M. K. Sousow

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria

ABSTRACT

Storage proteins comprise 10-11% of olive seeds by mass. Optimal conditions for the extraction of these storage proteins were defined, particularly the definition of their solubility according to pH conditions.

The amino acid composition of storage proteins in olive seeds was determined. The storage proteins lack the sulfur amino acids cystiene and methionine. Lysine which occurs in a very low concentration, in reverse to proteins of cereals, is present at a normal level in olive storage proteins.

Storage proteins in olive seeds are mostly (85-90%) globulins, soluble at pH 8.5 in the presence of 1M NaCl. These globulins have the characteristics of 11S legumins, particularly in their polypeptide composition and subunits which are polymers of non-glycosylated polypeptides, with varied molecular weights from 10 to 35 KDa and covalently linked together by disulfide bonds.

In addition to these globulins, olive seeds contain an abundant of hydrophobic glycoprotein (GP50) which constitutes of a homopolymer dissociates at pH 8.5 or in the presence of detergent. GP50 comprised about 10% of olive seed proteins. The carbohydrate meioty of GP50 consisted of a polymannoside chain and an other complex [ManXyl$(GlcNAc)_2$].

Key words: *olive seeds, storage proteins.*

البروتينات المختزنة في بذور الزيتون

مواهب خالد السوسو

قسم البساتين – كلية الزراعة – جامعة دمشق – سورية

الملخص

تمثل البروتينات المختزنة 10-11% من وزن بذرة الزيتون, ولقد تمّ تحديد ظروف استخلاص هذه البروتينات بالاعتماد على صفات ذوبانها تبعاً لدرجة حموضة pH وسط الاستخلاص.

يبين تحليل هذه البروتينات من الأحماض الأمينية محتوى من الليسين أعلى بكثير مما في بروتينات التخزين للحبوب, بالمقابل محتوى ضعيف من الأحماض الأمينية الكبريتية مثل السيستيين والمثيونين كما هو الحال في البقوليات.

تتكون بروتينات التخزين لبذور الزيتون أساساً من الجلوبيولين Globulin القابل للذوبان على درجة حموضة pH 8.5 بوجود 1 مولر من كلوريد الصوديوم NaCl . هذه الجلوبيولينات تبدي صفات بروتينات الليجيومين Legumin نموذج 11S من حيث تركيبها متعدد الببتيد polypeptide وتحت الوحدات المؤلفة لها. هذه الأخيرة عبارة عن تجمع لمتعدد ببتيدات غير مرتبطة بأجزاء سكرية وذات وزن جزيئي يتراوح بين 10-35 kDa (كيلودالتون) ومرتبطة فيما بينها بروابط كبريتية disulphide. بالإضافة إلى الليجيومين تحوي بذور الزيتون على جليكوبروتين ذى وزن جزيئي 50 kDa ويمثل حوالي 10% من بروتينات التخزين, ومكون من متعدد polymer لبروتين وحيد, يعتمد ذوبانه حصراً على درجة حموضة وسط الاستخلاص, يتكون الجزء السكري فيه من سلسلة متعددة المانوز وأخرى معقدة تركيبها مانوز-كزيلوز-(ن- أستيل جلوكوزأمين)$_2$ $_2$ ManXyl(GlcNAc)$_2$ على الأقل.

1. مقدمة

لم تعد أهمية البذور في تغذية الإنسان والحيوان بحاجة إلى دليل, ويسعى الإنسان دائماً للبحث عن مصادر جديدة للتغذية. إنّ غزارة المختزنات البروتينية في عددٍ كبيرمن البذور النباتية تكسبها أهمية غذائية كبرى. من هنا حازت دراسة هذه المختزنات على اهتمام الباحثين خلال العقود الأخيرة وتطورت

بشكل واضح. هذا وتحوي البذور النباتية بشكل عام نوعين من البروتينات :
-بروتينات الإعاشة (غير المخزنة) الضرورية للمحافظة على نشاط وفعالية الخلايا الطبيعية.

- بروتينات التخزين (Higgins, 1984) والتي توجد بكميات كبيرة في البذور فقط, وتتراكم فيها خلال مراحل تطورها. إن تواجد هذه البروتينات بهذه الكميات الكبيرة يجعلها مصادر تغذية لاغنى عنها (الآزوت, الكربون) لتطور الجنين خلال الفترة الصغيرة من حياته والتي يكون خلالها غير ذاتي التغذية, في مرحلة الإنبات وفي المراحل الأولى من النمو.

تنحصر أهمية الحبوب والبقوليات بشكل رئيسي في تغذية الإنسان والحيوان في غنى بذورها النسبي بالمركبات الآزوتية حيث تمثل البروتينات في المتوسط 10-15% من الوزن الجاف للحبوب و20 - 25 % من الوزن الجاف للبقوليات (Derbyshire *et al.*, 1976). تشكل مجموع بروتينات بذور هذه المحاصيل أكثر من ثلثي الحصة الآزوتية الغذائية للإنسان (Pernollet, 1985). توجد مجموعة أخرى من النباتات لاتقل أهمية لتغذية الإنسان والحيوان مكونة من المحاصيل الزيتية (نخيل الزيت, الكتان, عباد الشمس, الذرة, فول الصويا ....إلخ). تستخدم هذه المحاصيل خاصة لغناها بالزيت, وينتمي الزيتون لهذه المجموعة.

تعتبر ثمار الزيتون مصدرا هاما جداً للزيت. تركزت أغلب الأبحاث التي جرت حوله حتى اليوم حول تخزين وتركيب هذه الليبيدات, مع العلم أنه بالإضافة لهذه المواد تحتوي بذور الزيتون على نسبة عالية من البروتينات (Heinrich, 1960) فهي غنية تقريباً - كبذور الذرة - بهذه البروتينات. هذا وبغياب أي عمل على بروتينات بذور الزيتون فإنّ النتائج المتحصل عليها ستتم مناقشتها بعلاقتها مع ماتمّ معرفته حول بروتينات التخزين في بذور من أنواع نباتية مختلفة.

2. المواد وطرق العمل

إنّ صنف الزيتون المستخدم خلال هذه الدراسة هو الصنف الفرنسي Tanche من منطقة Drome بفرنسا. هذا وقد استخدم لبّ بذرة الزيتون فقط كمادة للعمل بعد استبعاد غلافها الخشبي. مصدر المواد الكيميائية المستخدمة هو شركة Sigma الفرنسية.

1.2. تقدير محتوى البروتينات في البذور : تم تقدير كمية البروتين الكلي في بذور الزيتون من خلال قياس كمية الآزوت حسب الطريقة Dumas-principe LECO FP428 (Mosse and Baudet, 1983) ثم حسب

محتـــوى هذا البروتين بضرب كمية الآزوت في العامل 6.25 .
أمّا كمية البروتينات الحقيقية المستخلصة فلقد تمّ تقديرها لونياً عند طـــول موجـــة 280 نانومتر وفق طريقة Bradford (1976).

2.2.تركيب البروتينات من الأحماض الأمينية : تمّ ذلك حسب تقنية التحليل المائي باستخدام ((HCl, phenol) حمض ميثـــان ســـلفونيك) والموصـــى بـــها لتحليـــل البروتينات ومن ثـــم التعـــرف علـــى نوعيـــة الأحمـــاض الأمينيـــة بـــالنموذج (derivation PITC = phenylisothiocyanate) PICO- TAG water باستخدام جهاز Waters-HPLC (Kontron, Milan, Italy) علـــى طـــول موجـــة 254 نانومتر (Krishna and Wold, 1997) .

3.2. استخلاص البروتينات المخزنة : بعد طحـــن البـــذور المجمـــدة بـــالآزوت السائـــل (−180°م) تم استخلاص الليبيدات والأصبغة منها بواسطة إتير البترول (60/80) ثمّ الأسيتون بنسبة (1 / 10 : وزن / حجم) خلال ساعة علـــى درجـــة حرارة الغرفة ثم أزيل السائل وكررت هذه العملية عدة مرات ثم جفـــف النـــاتج (طحين). لتحديد الظروف المثلى لاستخلاص البروتينات من بذور الزيتـــون تـــم استخدام 20 مل من محاليل ملحية مختلفـــة التركـــيز (0.2 – 1) مولـــر NaCl وعلى درجات حموضة مختلفة 10 – 3 pH لكـــل 1 جـــم طحيـــن (مســـحوق) وبالتحريك لمدة ساعة كاملة على درجة حرارة الغرفـــة, تـــم الحصـــول علـــى المستخلص البروتينـــي بالطرد المركـــزي centrifugation لمـــدة 20 دقيقـــة (10000 ج) والذي تم عليه تقدير كمية الـــبروتين المســـتخلص علـــى درجـــات حموضة مختلفة.

4.2. فصل البروتينات بواسطة تقنيـــة التفريـــد الكـــهربائي Electrophoresis (SDS- PAGE) : استخدمت التقنية الموصوفة من قبـــل Laemmli (1970) والتي تسمح بفصل الوحدات المكونة للبروتينات حســـب الـــوزن الجزيئـــي لـــها بالمقارنة مع بروتينات قياسية معروفة الوزن الجزيئي .

تمّ لتحضير العينات لهذه التقنية نقع 1جم طحين في 50 مل محلول ثلاثـــي كلوريد حمض الخليك (10% TCA) في الأسيتون + 0.07% بيتاميركابتوإيتانول (ME) لمدة ساعة, بعد فصل المحلول تم غسل الراسب بالأسيتون ثم جفف. أذيب بعد ذلك 1مجم من هذا الراسب بـــ 50 ميكرولتر محلول منظم عينات (Tris- TE HCl 10mM pH 7.5, 2.5% SDS,1mM EDTA, 20% Sucrose) مضافاً إليه صبغة أزرق البروموفينول كمؤشر للجريان مع العينة ثم أخذ المحلول وسخن على درجة حرارة 100 ° م في حمام مائي لمدة 3 دقائـــق حيث أصبـــح جاهـــــزاً

للتحليل. تمّ فصل البروتينات كهربائياً في وجود أو غياب ME 3% ضمن جيـــل متعدد الأكريلاميد 12.5% خلال ساعتين تقريباً على 10 ميلي أمبير أولاً ثـــم 20 ميلي أمبير على درجة حرارة الغرفة, لونَ بعد ذلك الجيل بـــ 0.025% محلـــول أزرق الكوماسين. استخدمت بروتينات قياسيـــة معروفـــة الوزن الجزيئي كشاهد لتقدير الوزن الجزيئي للبروتينات المراد تحليلها وهي :
Phosphorylase B , 94نDa – Serum Bovine Albumin, 67نDa – Ovalbumin, 43kDa – Carbonic Anhydrase, 30kDa – Soybean Trypsin Inhibitor, 20.1kDa - lactalbumin, 14.4 kDa.

5.2. تقنية الـــ Electrophoretic transfer(blotting) : تم نقل البروتينـــات الموزعة على صفيحة جيل الأكريلاميد بتقنية SDS-PAGE إلى غشاء سيليلوزي خـــاص وفق خطة قريبة من تلك التي وضعها Towbin ومساعدوه عام (1979) وذلك في وعاء خاص يحتوي على محلول منظـــم (25mM Tris – 120mM Glycine – 10% methanol – pH 8.5) على 24 فولت لمـــدة ســـاعتين. تمـــتَ مراقبة فعالية النقل بتلوين الغشاء قابل للعكس للغشاء بمحلول أحمر بونصو 0.2 جم/ل ضمن محلول 3% من ثلاثي كلوريد حمض الخليك وذلك لمدة خمس دقائق, ثم يغسل الغشاء عدة مرات بالماء المقطر حتى ظهور البروتينات على الغشاء مما دل على نقلها فعلاً من صفيحة الجيل. أزيل بعد ذلك اللون الأحمر بمحلول منظم (Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM, pH 7.5) مع التحريك الدائم.

6.2. تقنيـــة Affinoblotting مع ConA/ peroxydase :تســـمح هـــذه التقنية بالكشف عن الجليكوبروتينات الحاوية على سكريات مـــن نمـــوذج متعـــدد المانوز باستخدام اللكتين Concanavalin A (Faye and Chrispeels, 1985), هذا وقد نفذت نفس الخطوات المذكورة من قبل هذين العالمين.

7.2. تقنية الكشف المناعي للبروتينات Immunoblotting : تمت هذه التقنيـــة حسب الخطة الموضوعة من قبل Faye *et al.*, (1993).

8.2 كروماتوجرافيا الترشيح filtration على عمود Ultrogel AcA22 : تـــم فصل جزيئات البروتينات على هذا الهلام (Prolabo, France) وفقـــاً لأوزانـــها الجزيئية ضمن المجال 1200 – 100 ن Da وذلك بعـــد توازنـــه مـــع محلـــول استخلاص البروتينات (أ) (100mM Tris-HCl , pH 8.5 + 1M NaCl + 0.07% ME) الحـــاوي على 0.02% أزيد الصوديوم (NaN_3) .

أضيفت العينة على قمة عمود الهلام (115 x1 سم) بتدفق ثابت قـــدره 10 مل/ساعة وتم قياس الامتصاص (الكثافة الضوئية) للمحلول الخارج من العمـــود لكل 1 مل على حده على طول موجة 280 نانومتر ومن ثمّ يتـــم تحليـــل طيـــف الامتصاص لكل قمة حُصل عليها في المنحنى وذلك بين 240 – 310 نـــانومتر. هذا وقد تم تعيير هذا العمود مسبقاً بمزيـــج مـــن البروتينـــات القياسيـــة ذات الأوزان الجزيئية المعروفـــة (3 mg Thyroglobulin, 690 kDa + 3 mg Ferritin, 450 kDa + 8 mg Catalase, 210 kDa + 10 mg Aldolase, 158 kDa) ضمن المحلول (أ) وذلك لتقدير الوزن الجزيئي لبروتينات بذور الزيتون .

9.2 كروماتوجرافيا التآلف Affinity على عمود ConA-sepharose :

استخدم هذا النوع من الكروماتوجرافيا (Prolabo, France) للكشف عـــن وجـــود جليكوبروتينات في بذور الزيتـــون. اســـتخدم لـــهذا الغـــرض عمـــود ConA-sepharose (15 x 1 سم) بعد توازنه مع المحلول (ب) وهو عبارة عن المحلول (أ) مضافاً إليه ($1mM\ CaCl_2 + 1mM\ MgCl_2$). بعد وضع العينة يُغسل العمود جيداً بالمحلول (ب) إذ أن البروتينات التي لاتتآلف مع اللكتين ConA تخرج من الهلام مشكلة القسم FNR (الجزء البروتيني غير المدمص مـــن قبـــل اللكتيـــن) وتستمر عملية غسل الهلام حتى يتم الحصول على كثافة ضوئية معدومـــة علـــى موجة 280 نانومتر. تُحل بعد ذلك الجليكوبروتينات المدمصة على سطوح الهلام باستخدام منافس قوي لها على مواقع الادمصاص , هذا المنافس هو ألفـــا ميتيـــل مانوبيرانوزيد (α-MM) بتركيز 0.5 مولر ضمن المحلول ب مما يعطينا القســـم FR (الجزء البروتيني المدمص من قبل اللكتين) الحاوي على الجليكوبروتينات.

3. النتائج

1.3 استخلاص بروتينات التخزين في بذور الزيتون : تمّ بتقدير كميـــة الآزوت الموجودة في بذور الزيتون تحديد محتوى البروتين الكلي في هذه البـــذور وذلـــك بضرب هذه الكمية في المعامل 6.25. تبين لنا أن بروتينات التخزين تمثل حوالي 10–11% من وزن بذرة الزيتون. هذا وبغياب أعمال مشابهة على بذور الزيتون توجب علينا تحديد الشروط المثلى لاستخلاص هذه البروتينات وذلـــك باســـتخدام تراكيز مختلفة من NaCl (0.2 -1 مولر) وعلى درجات حموضة pH متفاوتة من 3 إلى 10 والنتائج موضحة في الجدول رقم (1) الذي يبين كميـــة البروتينـــات المفصولة حسب درجة حموضة الوسط pH وتركـــيز NaCl المســـتخدم مقـــدرة بالنسبة المئوية من البروتينات الكلية القابلة للذوبان.

جدول (1): كمية البروتينات المفصولة حسب درجة حموضة الوسط pH وتركيز NaCl المستخدمين مقدرة بالنسبة المئوية من البروتينات الكلية القابلة للذوبان.

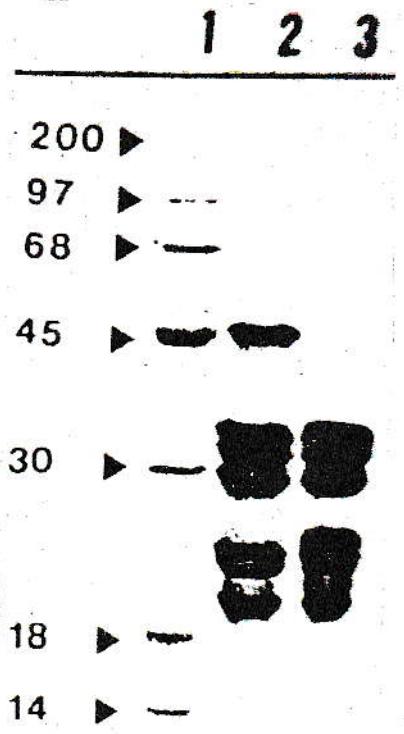
NaCl / pH	0.2 مولر	0.3 مولر	0.4 مولر	0.5 مولر	0.6 مولر	0.7 مولر	0.8 مولر	0.9 مولر	1مولر
3	5%	10%	12%	13%	16%	20%	20%	23%	25%
4	3%	6%	8%	10%	10%	12%	15%	16%	18%
5	4%	7%	9%	11%	12%	13%	16%	17%	18%
6	6%	10%	12%	18%	20%	26%	28%	30%	32%
7	20%	25%	30%	40%	45%	55%	60%	63%	65%
8	30%	42%	50%	60%	70%	75%	85%	93%	95%
9	35%	50%	60%	70%	75%	85%	90%	98%	100%
10	35%	52%	61%	72%	77%	85%	90%	99%	100%

جدول (2): تركيب بروتينات التخزين في بذور الزيتون من الأحماض الأمينية.

الحمض الأميني	ميلي مول/جم	الحمض الأميني	ميلي مول/جم
برولين	0.14	الأسبارتيك	0.31
تيروزين	0.09	الجلوتاميك	0.49
فالين	0.14	سيرين	0.20
ألانين	0.23	جليسين	0.26
إيزوليوسين	0.12	هيستيدين	0.11
ليوسين	0.22	أرجنين	0.18
سيستئين	0.00	ليسين	0.13
فينايل ألانين	0.11	ثريونين	0.13

لاحظنا بتقدير كمية البروتين المفصولة عند مختلف المحاليل الملحية المستخدمة تزايداً طردياً في كمية البروتينات المستخلصة مع زيادة تركيز وسط الاستخلاص من ملح كلوريد الصوديوم (حتى 1 مولر) مهما كانت درجة حموضة هذا الوسط. هذا وباستخدام محلول 1 مولر من كلوريد الصوديوم لوحظ أن أقل نسبة بروتين مفصولة كانت عند pH4.5 (15%فقط من البروتينات الكلية) وأنّ فعالية الاستخلاص تزداد كلما ابتعدنا عن هذه الدرجة من الحموضة,إذ بلغت نسبة الاستخلاص 65% – 60 من البروتينات الكلية في الأوساط المتعادلة pH7 في حين وصلت هذه الكمية أقصاها (100%) عند الأوساط القلوية pH 8.5 – 9 وانطلاقاً من هذه الدرجة من الحموضة يلاحظ استقرار نسبي في كمية البروتينات المستخلصة.

تميل من ناحية أخرى البروتينات المستخلصة في الوسط المتعادل pH7 إلى التجمع مع بعضها البعض ثمّ الترسب إلى أن تصبح غير قابلة للذوبان مع مرور الوقت في حين أنها تكون مستقرة نسبياً عند درجة حموضة pH 8.5, وخاصة مع إضافة كمية ضئيلة 0.07 % من مركابتوإيتانول (ME), هذا ويعود تفسير هذه الظاهرة لأسباب متعددة (Sousow, 1992) .



الشكل (1) : تحليل بروتينات التزين لبذور الزيتون بطريقة التفريد الكهربائي (SDS-PAGE) والمستخلصة في وسط متعادل pH 7 (العمود 3) وحموضة pH 8.5 (العمود 2). العمود 1 يمثل بروتينات قياسية ذات أوزان جزيئية معروفة.

لوحظ بتحليل المستخلصين البروتينيين على درجات حموضة 7 و8.5 بتقنية SDS-PAGE (الشكل-1) تواجد متعدد ببتيد ذو وزن جزيئي تقريباً 49.2 kDa بصورة واضحة في المستخلص ذي الحموضة 8.5 (العمود-2) وغيابه التام في المستخلص ذي الحموضة 7 (العمود-3) . يُمثل متعدد الببتيد هذا حوالي 10% من البروتينات المستخلصة عند درجة حموضة 8.5 . لوحظ في هذه الأثناء وجود متعددي ببتيد 20 و 25 كيلودالتون فقط في مستخلص الوسط المتعادل. وهكذا تبين لنا بأن أفضل الشروط لاستخلاص بروتينات بذور الزيتون تكون باستخدام محلول (أ) (10 mM Tris-HCl, pH 8.5 + 1M NaCl + 0.07 % ME) ويُسمى المستخلص البروتيني المتحصل عليه وفق هذه الشروط بالمستخلص البروتيني الأساسي BP.

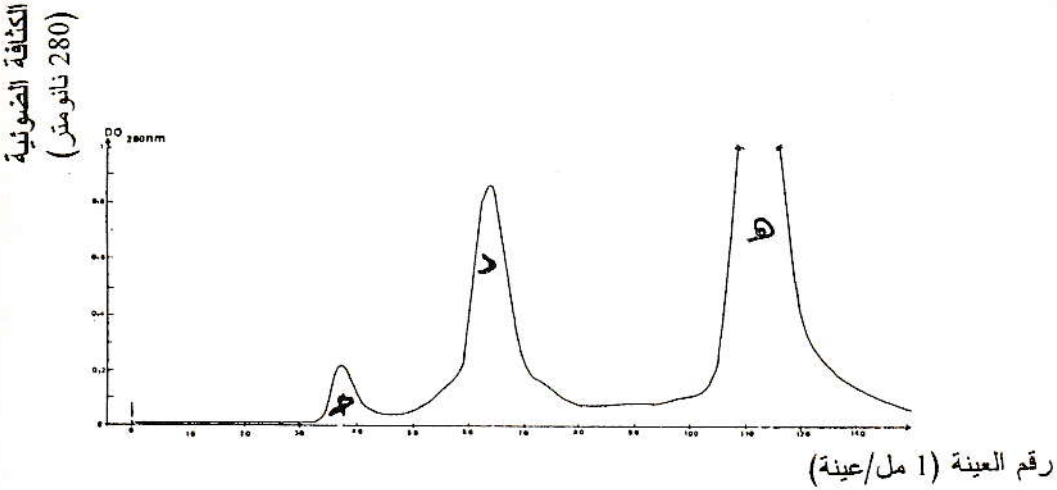
أجرينا من ناحية أخرى تحليلاً لبروتينات التخزين في بذور الزيتون لمعرفة تركيبها من الأحماض الأمينية (الجدول رقم 2) إذ لوحظ محتوى عالي جداً من حمض الجلوتاميك, حمض الأسبارتيك وأرجنين. كان وجود الليوسين والجليسين بشكل ملحوظ. بالإضافة إلى ذلك يبين هذا التركيب وجود أغلب الأحماض الأمينية الضرورية (AAI) : ليوسين, إيزوليوسين, ليسين, فينايل ألانين, ثريونين وفالين وذلك بنسب مختلفة وكان المثيونين غائبا عن هذا التركيب.

2.3. تحديد الوزن الجزيئي لبروتينات الزيتون في الحالة الطبيعية (native) :

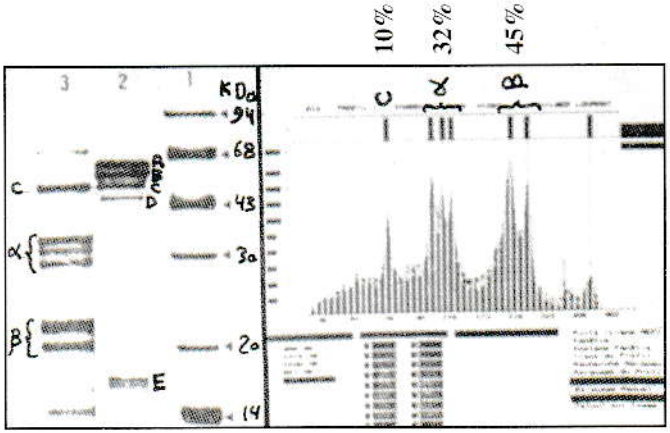
بإضافة المستخلص البروتيني الأساسي BP إلى عمود الكروماتوجرافيا Ultrogel AcA22 الموازن سابقاً مع محلول الاستخلاص (أ) حصلنا على منحنى التجربة (الشكل-2) والذي يتصف بوجود ثلاث قمم جـ, د, هـ تتناسب مع قيم الامتصاص (الكثافة الضوئية) على موجة 280 نانومتر.

يحتوي الجزء جـ من المنحنى على مواد وزنها الجزيئي يتجاوز حدود إمكانية الفصل لهذا النوع من الهلام, يتمثل هذا الجزء بقليل من البروتينات المنحلة والتي تشكل معقدات مع الأحماض النووية. نسبة الامتصاص الضوئي على طول موجتين 260 / 280 كانت أكبر من الواحد لهذا الجزء وتحليل طيف الامتصاص الخاص به بين 240 و 310 نانومتر يُبدي قيمة عظمى على طول موجة 264 نانومتر.

يُمثل الجزء د بشكل كبير بروتينات الزيتون المستخلصة وتحليل طيف الامتصاص الخاص به يُبدي قيمة عظمى على طول موجة 280 نانومتر ونسبة 280/260 أقل من الواحد, أما الجزء هـ فيظهر قمة عالية في المنحنى وهو مكون أساساً من مركبات فينولية ومواد صبغية. وبتحليل هذه الأجزاء بـ SDS-PAGE تأكد تواجد جميع البروتينات المستخلصة في الجزء د , إذن هذا النوع من الكروماتوجرافيا لايسمح بفصل المركبات البروتينية المختلفة.



الشكل (2) : منحنى تجربة الكروماتوجرافيا على هلام Ultrogel AcA22 (العمود 1 x115 سم) لبروتينات التخزين في بذور الزيتون.



(A) **(B)**

الشكل (3) : فصل البروتينات المخزنة لبذور الزيتون بطريقة التفريد الكهربائي.
(A) تحليل هذه البروتينات بغياب (العمود 2) أو بحضور (العمود 3) العامل المرجع ME , العمود 1 يمثل الأوزان الجزيئية لبروتينات قياسية معروفة.
(B) التحليل الكمي لمتعددات الببتيد الموزعة في العمود 3 بمساعدة جهاز المساحة (قياس الكثافة)Densitometer مقدراً بالنسبة المئوية من الكتلة الكلية لهذه البروتينات.

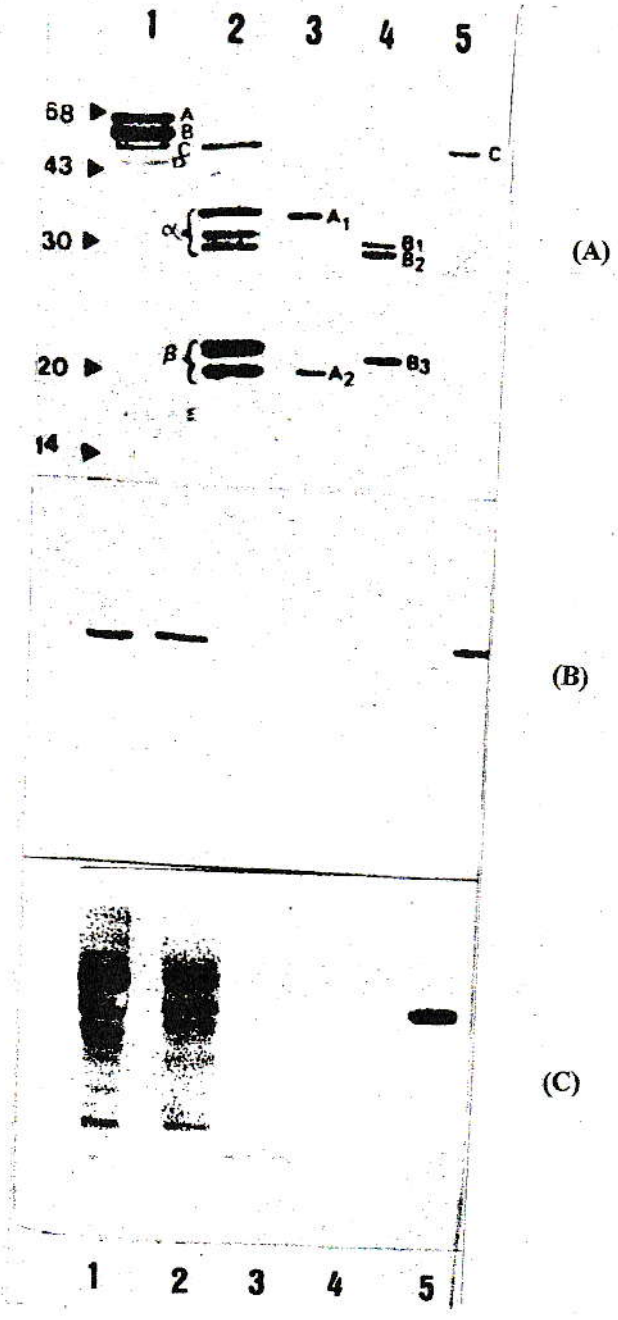
قدّر الوزن الجزيئي لبروتينات التخزين في بذور الزيتون (الجزء د) بالحالة الطبيعية بـ 320 – 340 KDa بالاعتماد على البروتينات القياسية المستخدمة لهذا الأمر.

3.3 التحليل الكهربائي لبروتينات التخزين في بذور الزيتون :كانت تقنيات الفصل بالتفريد الكهربائي وماتزال واحدة من وسائل دراسة بروتينات التخزين في البذور. تسمح هذه التقنيات بتحديد الميزات الفيزيكيميائية لبروتينات التخزين وطريقة ارتباط مكوناتها متعددة الببتيد.

بتحليل بروتينات بذور الزيتون بتقنية SDS-PAGE في حالة غياب العامل المرجع ME رأينا أن هذه البروتينات تتألف من 3 مجموعات (وحدات) رئيسية A, B, C أوزانها الجزيئية هي 49-50 KDa , 53-56 , 58-60 على التوالي. ومجموعتين بروتينيتين أخرتين أقل أهمية D, E وزنهما الجزيئي 16-18 , 45 KDa بالتوالي ظهرتا أيضاً (الشكل 3A عمود 2) . أما بوجود العامل المرجع فنلاحظ الغياب التام للمجموعتين A و B وكذلك D و E لتظهر مجموعة متعددات ببتيدية يمكن تقسيمها إلى تحت مجموعتين β , α تختلفان بوزنهما الجزيئي الذي يبلغ وسطياً 33 KDa و 22 KDa بالتوالي, كما يظهر لدينا بضع متعددات ببتيدية ذات وزن جزيئي منخفض أقل من 15 KDa ضمن هذه الظروف من التحليل (العمود 2). تبدي في هذه الأثناء المجموعة C وزناً جزيئياً واحداً بغياب أو بحضور ME.

لقد قدرت الأوزان الجزيئية للمتعددات الببتيدية الخاصة بتحت المجموعتين α و β فكانت بالنسبة لمتعددات الببتيد في المجموعة α 30.9 – 32.9 – 35.5 KDa ولمتعددات الببتيد في المجموعة β 21.6 KDa – 23 – 23.5 . بالإضافة إلى ذلك وبمساعدة جهاز مقياس الكثافة (UILBER- Densitometer LOURMAT) تبين أن تحت المجموعة α تشكل 32% من المكونات متعددة الببتيد الإجمالية لبروتينات الزيتون في حين أن تحت مجموعة β تشكل 45% من هذه المكونات. أما فيما يتعلق بالمجموعة C (49.2 KDa) فهي تمثل حوالي 10% من الكتلة الكلية لهذه البروتينات (الشكل 3B).

حاولنا من ناحية أخرى أن نبين طرق ونموذج الارتباط بين مختلف متعددات الببتيد المعنية, تمّ ذلك بفصل المجموعات A, B, C بواسطة SDS-PAGE بغياب ME (الشكل 4A – عمود 1) وبعد التلوين بأزرق الكوماسين تمّ اقتطاع هذه المجموعات من صفيحة الهلام بمساعدة شفرة خاصة تمّ نقعها مُسبقاً بمحلول العينات TE , بعد ذلك سخنَت كل مجموعة على حده ضمن المحلول (TE+10 mM ME)على درجة حرارة 100° م لمدة 5 دقائق, ثم وضعت هذه القطع ضمن تجاويف متباعدة لصفيحة هلام أخرى وخضعت لعملية فصل



الشكل (4) : (A) التفريد الكهربائي لبروتينات التخزين في بذور الزيتون بغياب (العمود 1) أو بحضور (العمود 2) العامل المرجع ME . بعد التلوين بـــأزرق الكوماســين اقتُطِعــت المجموعات البروتينية الرئيسية A, B, C من العينة غير المرجَعة وعُرِّضت لمرحلة ثانيــة من التحليل (العمود 3 = A + ME)،(العمود 4 = B + ME)، (العمود 5 = C + ME). تــم بعد فصل البروتينات نقلها إلى غشاء ســيليولوزي (blot) ومعالجتــه بتقنيــة الـــ Affinoblotting مع ConA / بيروكسيداز(الجزء B) أو بتقنيــة الـــ Immunoblotting بمساعدة المضادات الخاصة بالسلاسل السكرية المعقدة (الجزء C).

أخرى بواسطة SDS-PAGE. تظهر في الشكل 4A والعمود 3, 4 و 5 متعددات الببتيد المتحررة بعد إرجاع الجسور الكبريتية في المجموعات البروتينية الرئيسية A, B, C بواسطة الـ ME. نلاحظ في العمود 3 أن المجموعة A انشقت إلى متعددي ببتيد A1(35.5 KDa) , A2 (21.5 KDa) أما المجموعة B فأعطت متعددي ببتيد رئيسيين B2 (30.9 KDa) و B3 (23.5 KDa) وآخر أقل أهمية B1 (32.9 KDa) بعد المعالجة بـ ME (العمود 4). وعلى العكس من ذلك فالمجموعة C لم تنشق وحافظت على وزنها الجزئيي 49.2 KDa بغياب أو بحضور العامل المرجع (العمود 5) .

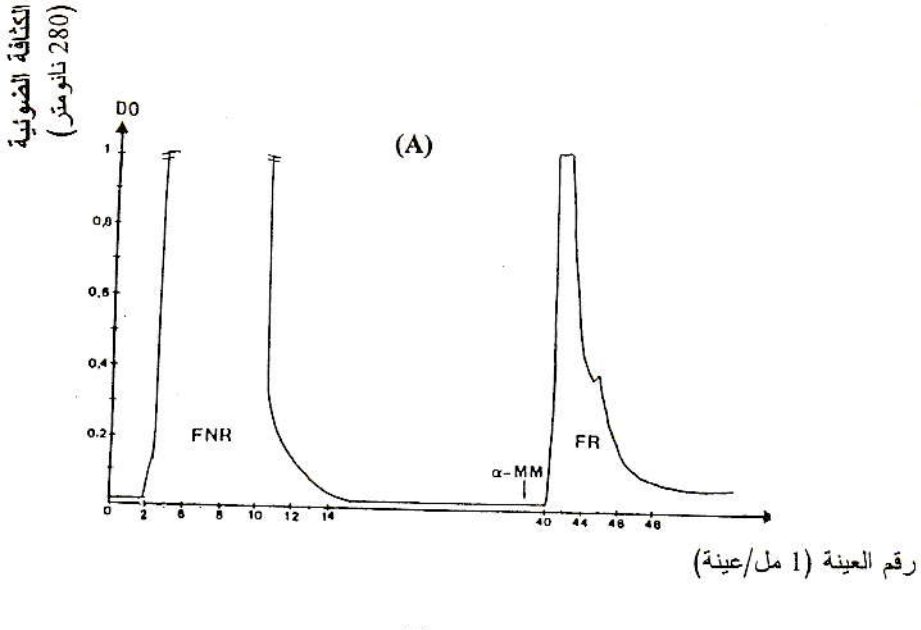
مما سبق يمكن أن نخلص إلى أن كلٍ من المجموعتين A و B تنتج من ارتباط متعددي ببتيد على الأقل, واحد من تحت المجموعة α والآخر من تحت المجموعة β بواسطة روابط كبريتية تتحطم بوجود العامل المرجع, فهما إذن مجموعات متعددة الوحدة في حين أن المجموعة C وحيدة الوحدة.

4.3 الكشف عن جليكوبروتينات في بذور الزيتون : لقد كشف العالم Pusztai (1965) لأول مرة وجود الجليكوبروتينات في النبات وخاصة بذور الفاصوليا *Phaseolus vulgaris*. بدورنا حاولنا الكشف عن وجودها في بذور الزيتون باستخدام كروماتوجرافيا التآلف على ليكتين ثابت أولاً ثم باستخدام تقنية الـ Affinoblotting .

لقد استخدمنا الليكتين ConA لهذه الغاية إذ يتمتع بمقدرة كبيرة على ربط متعدد السكر (المانوز) سواء كان حراً أم مرتبطاً بالجليكوبروتينات نتج باستخدام الكروماتوجرافيا على عمود ConA المنحنى الموضح في الشكل 5A والذي يبين قمتين رئيسيتين : الأولى FNR تحتوي على البروتينات غير المرتبطة بالليكتين والتي تشمل أغلب البروتينات المنحلة في بذور الزيتون والثانية FR تمثل البروتينات المرتبطة بعمود الـ ConA والتي تم ترحيلها من العمود بمساعدة منافس سكري على هذا الليكتين ConA وهو ألفا ميثيل مانوبيرانوزيد (α -MM) تركيز 0.5 مولر , يمثل هذا الجزء حوالي 12-13% من البروتينات الكلية الخاضعة للتجربة.

يبين التحليل بـ SDS-PAGE لهذه الأجزاء (الشكل 5B) وجود متعدد ببتيد واحد كثيف ذي وزن جزيئي 49.2 KDa في الجزء FR وببتيداتٍ أخرى أقل أهمية بكثيرتواجدت ضمن هذا الجزء أيضاً.

باستخدام تقنية الـ Affinoblotting يصبح الجزء السكري للجليكوبروتينات المثبتة على الغشاء السيليلوزي سهل البلوغ بالنسبة لليكتين. تعتبر هذه التقنية سريعة وفعالة وذات اختصاصية عالية وليست عرضة لبعض



الشكل (5) : (A) فصل بروتينات الزيتون بواسطة كروماتوجرافيا التألف على عمود من لكتين ConA- Sepharose , FNR = الجزء البروتيني غير المدمص من قبل اللكتين, FR = الجزء البروتيني المدمص من قبل اللكتين, BP = المستخلص البروتيني الأساسي.

(B) تحليل الأجزاء البروتينية المختلفة الناتجة بعد عملية الفصل الكروماتوجرافي بتقنية التفريد الكهربائي.

الملابسات المرتبطة بالادمصاص غير الإختصاصي والملاحظ في حالة كروماتوجرافيا التآلف أحياناً. تمت هذه التجربة على غشاء سيليولوزي لصفيحة هلام SDS-PAGE مماثلة لتلك المبينة في الشكل 4A يبين الشكل 4B أن أي من متعددات الببتيد المكونة للمجموعات البروتينية A, B لبذور الزيتون لم يتفاعل مع الـ ConA(العمود 3 و 4) في حين أن متعدد الببتيد ذي الوزن الجزيئي 49.2 KDa قد تفاعل إيجابياً وبصورة اختصاصية مع هذا الليكتين وذلك قبل (عمود 1) وبعد الإرجاع بـ ME (عمود 2 و 5) . هذا التفاعل كما ذكرنا اختصاصي لأنه لم يظهر أي تفاعل لمتعدد الببتيد هذا مع الليكتين عندما عولج غشاء سيليولوزي مماثل بنفس الطريقة ولكن بوجود مثبط منافس لـ ConA وهو α -MM.

هذا وللكشف عن وجود جليكوبروتينات من نموذج آخر في بذور الزيتون استخدمنا طريقة مناعية قابلة للتطبيق منذ أوجد الباحثين (Faye and Chrispeels, 1988 ; Lauriere *et al.*, 1989 ; Faye *et al.*, 1993) مضادات حيوية متخصصة ضد السلاسل السكرية المعقدة والتي تحمل سكر كزيلوز مرتبط بالرابطة الجليكوزيدية β 1 - 2. تمت هذه الطريقة بمساعدة المضادات المذكورة على غشاء سيليولوزي (الشكل 4C) مطابق للهلام المبين في الشكل 4A .تظهر النتائج مدى التعرف الواضح على متعدد الببتيد 49.2 KDa (المجموعة C) من قبل هذه المضادات وذلك بغياب (العمود 1) أو بحضور (العمود 2 و 5) العامل المرجع. تم التعرف على جليكوبروتينات أخرى أقل كثافة في المستخلص البروتيني الكلي لبذور الزيتون بغياب (العمود 1) أو بحضور (العمود 2) ME. بالمقابل فإن أي متعدد ببتيد من تحت الوحدات المكونة للمجموعات الرئيسية A , B لم يتم التعرف عليه من قبل هذه المضادات (عمود 3 و 4).

هذا والتركيب الواجب تواجده لمثل هذا الكشف المناعي بمساعدة هذه المضادات بالتحديد قد تم تحديده من قبل الباحثين المذكورين أعلاه, مما يمكننا من استنتاج أن السلسلة السكرية المرتبطة بمتعدد الببتيد 49.2 KDa تحوي على الأقل التركيب : مانوز-كزيلوز-(ن أستيل جلوكوزأمين)$_2$ Man-Xyl(GlcNac)$_2$.

كشفت النتائج المبينة في الشكل 4B-C عن وجود جليكوبروتين (بنسبة كبيرة) في بذور الزيتون وزنه الجزيئي 49.2 KDa دعوناه GP50. وهكذا فإن GP50 يحمل سلسلة سكرية مكونة على الأقل من نوعين من متعدد السكر : الأول من نموذج متعدد المانوز في حين أن الثاني معقد ويحمل بقايا سكرية كزيلوز مرتبطة بالرابطة β 1-2. يمثل هذا الجليكوبروتين حوالي 10% من بروتينات التخزين في بذور الزيتون (كما سبق ذكره).

4.المناقشة

كما ذكرنا سابقاً ونظراً لغياب أعمال مماثلة على بروتينات بذور الزيتون سنناقش النتائج المبينة أعلاه بعلاقتها مع ماتم معرفته على بروتينات التخزين لبذور من أنواع نباتية مختلفة.

تتميز بروتينات التخزين غالباً بأنها صعبة الاستخلاص لذا استخدمت محاليل ملحية في وسط قلوي أو أضيفت عوامل محطمة للروابط الكبريتية غير متأينة لمحلول الاستخلاص وذلك لتسهيل عملية الاستخلاص هذه (Derbyshire *et al.*, 1976). تمثل البروتينات القابلة للاستخلاص حوالي 10-11% من الكتلة الكلية لبذرة الزيتون, تشابه هذه النسبة تلك المتواجدة في بذور البقوليات (Derbyshire *et al.*, 1976) . تتكون هذه البروتينات المستخلصة بمحاليل ملحية بشكل أساسي من الجلوبيولينات الذائبة في وسط قلوي pH = 8.5 بوجود 1 مولر من كلوريد الصوديوم NaCl, جزء كبير من هذه الجلوبيولينات تُظهر ميزات الليجيومينات Legumines من النموذج 11S. بالإضافة إلى ذلك يشكل جليكوبروتين وفير وزنه الجزيئي 49.2 KDa (GP50) حوالي 10% من البروتينات الكلية لبذور الزيتون, وبغياب العامل الجليكوبروتين بشكل وثيق على درجة حموضة وسط الاستخلاص.

إن فصل بروتينات التخزين في الزيتون , حسب درجة الـ pH , تختلف عن تلك التي تخص أغلب البذور النباتية والتي تنحصر بين 6.5 و 7.5 (Duranti *et al.*, 1981) وتتشابه مع تلك الخاصة ببروتينات بذور القطن (Dure and Chlan, 1981) فول الصويا (Coates *et al* ., 1985). كما أنها تقارب استخلاص بروتينات بذور عباد الشمس (Canella, 1978). هذه البروتينات قليلة الذوبان في وسط متعادل pH 7 ووسط حمضي وتبدي درجة ذوبان مثلى في أوساط قلوية pH 8.5 . يبين تحليل تركيب بروتينات التخزين في بذور الزيتون من الأحماض الأمينية محتوى عالي من حمض الجلوتاميك, حمض أسبارتيك والأرجينين، إذ تشكل هذه الأحماض حوالي 34% من الاحماض الأمينية الكلية لهذه البروتينات. من ناحية أخرى يبين هذا التحليل أيضاً محتويات عالية من الليوسين والجليسين ووجود عدة أحماض أمينية ضرورية: ليسين, إيزوليسين, ثريونين, فالين وفنايل ألانين. هنا لابدّ من التذكير بأن بروتينات التخزين من نموذج 11S بشكل عام ومهما كان مصدرها تتصف بوجود نسب عالية نوعاً ما من الأسباراجين, الجلوتامين, والأرجينين أو البرولين (Higgins, 1984). تضفي هذه الميزة المشتركة لبروتينات التخزين من هذا النموذج عليها دور تخزين

للآزوت (Derbyshire *et al.*, 1976). هذا وتعتبر بروتينات التخزين في البقوليات فقيرة ببعض الأحماض الأمينية مثل السيستئين, المثيونين والتربتوفان (Higgins, 1984). يبين تحليل بروتينات بذور الزيتون أيضاً فقرها بهذه الأحماض: مثيونين, سيستئين, هيستيدين وتيروزين. وخلاصة وعلى الرغم من الفقر الشديد بالأحماض الأمينية الكبريتية فإننا نستطيع اعتبار بروتينات بذور الزيتون متزنة بشكل جيد بمحتواها من الأحماض الأمينية, خاصة وأنها تحوي على الليسين بنسبٍ أعلى مما هو عليه في الحبوب.

تُظهر البروتينات الادخارية وبالتحديد الجلوبيولينات من نموذج 11S لبذور نباتية مختلفة وزناً جزيئياً مرتفعاً نوعاً ما من 400 kDa – 300 (Derbyshire *et al.*, 1976) والذي يعكس تركيبها ذي التحت وحدات. قدر الوزن الجزيئي لبروتينات بذور الزيتون بـ 340 kDa – 320 بواسطة كروماتوجرافيا الترشيح Ultrogel AcA22 .

إن فصل بروتينات بذور الزيتون بواسطة الـ SDS-PAGE بوجود العامل المذيب SDS وبغياب العامل المرجع ME سمح لنا بفصل 3 مجموعات بروتينية أساسية A, B, C والتي تنحصر أوزانها الجزيئية بين 50 و 60 KDa. عندما تتعرض هذه المجموعات لعملية فصلٍ أخرى بـ SDS-PAGE بوجود ME فإنها تنقسم باستثناء المجموعة C, إلى متعددي ببتيد أو ثلاثة, وهذا يسمح بتحديد طبيعة الروابط بين متعددات الببتيد هذه بأنها روابط ثنائية الكبريت. وحسب الوصف والنموذج الذي اقترحه Nielson عام 1984 والذي ينطبق على البروتينات المخزنة في البقوليات (Derbyshire *et al.*, 1976) فإنه يمكن اعتبار هذه المجموعات التي تنقسم في الشروط المرجعة كتحت وحدات . كما أن اندماج وترابط متعددات الببتيد بواسطة الروابط الكبريتية اعتبرت خاصية مشتركة للبروتينات المخزنة للبذور (Higgins, 1984). هذه الطريقة من الإرتباط ذُكرت سابقاً في البقوليات (Derbyshire *et al.*,1976), القرعيات (Hara *et al.*,1976&1978) والفول السوداني (Dlouha *et al.*, 1963).

بعد الارجاع بـ ME أظهر تحليل بروتينات الزيتون نموذجين من التجمع بين متعددات الببتيد. الأول يخص خمسة أو ستة من متعددات الببتيد مرتبطة فيما بينها بصورة تحت وحدات بروابط كبريتية (المجموعتين A و B) وتكون جلوبيولينات 11S في بذور الزيتون. يتوافق النموذج الثاني مع أحادي التجمع (متعدد وحدة واحدة) , هذه الوحدة عبارة عن متعدد ببتيد سكري ذي وزن جزيئي 49.2 KDa (GP50) . لاترتبط هذه الوحدات من GP50 مع بعضها البعض بروابط كبريتية.

تتألف من ناحية أخرى تحت الوحدات المكونة لبروتينات الادخار 11S بشكل عام من متعددات ببتيد (α) ذات خواص حمضية ووزن جزيئي مرتفع ومن

متعـددات ببتيـد (β) ذات خـــــــواص قاعديـــــة ووزن جزيئـي أقـل (Derbyshire *et al.*, 1976 ; Walburg and Larkins, 1983) لقـد اعتـبر الباحثون أن كـل تحت وحدة مكـونـة لجلوبولين 11S تتـــألف مـن تـزاوج متعددي ببتيد واحـد من المجموعة (α) والآخر من المجموعـة (β) بواسطـة جسـور كبريتية (Derbyshire *et al.*, 1976). استخدم هـذا الوصف بصـورة كلاسيكية منذ أعمال Moreira ومساعدوه عام (1979)على جلوبولين فول الصويا (glycinine) .وجد بالنسبـة لبروتينات بذور الزيتون أن كلٍ من تحت الوحدات Aو B تكون من متعدد ببتيد من المجموعة (α) وآخر من المجموعة (β).

تُظهر جلوبيوليينات من النموذج 11S من مصادر نباتية مختلفة تشابهاً في الوزن الجزيئي على مستوى تحت الوحدات ومتعددات الببتيد المكونة لها. يكـون الوزن الجزيئي لتحت الوحدات هذه حوالي 60 kDa وللمكونات متعددة الببتيد من (kDa 37–27) بالنسبة للمجموعة (α) ومن kDa 24-20 بالنسبة للمجموعة (β) (Derbyshire *et al.*, 1976) تواجـــدت هذه الميزات على مســـتوى تحـت الوحدات لجلوبيوليينات بذور الزيتون, ولكنها أظهرت نوعاً من عدم التجانس فـي الوزن الجزيئي لمتعددات ببتيد المجموعة (α) (kDa 36 - 30) أكبر مـن ذلـك المنسوب لمتعدده ببتيدات المجموعة (β) (kDa 23.5 – 21.5) . يبـدو أن هـذه السمة مشتركة بين بروتينات التخزين من النمـوذج 11S (Derbyshire *et al.*, 1976 ; Walburg and Larkins, 1983).

يشير تحليل التوزيع البروتيني لبذور الزيتون بواسطة جهاز تقدير المساحة densitometer إلى أن متعددات ببتيد المجموعة (β) 45% أكثر تواجداً من تلك التابعة للمجموعة (α) 32% . هذا يشير إلى أن جلوبوليينات بذورالزيتون مكونـة مـن متعددات الببتيد القاعدية بكمية أكبر وأكثر أهميـة مـن تلـك الحامضيـة. لوحظت هذه الظاهرة أيضاً في بروتينات التخزين لبذور عباد الشمـس, اليقطيـن (Hara *et al.*, 1976) وفي بقولياتٍ مختلفة (Derbyshire *et al.*, 1976).

أظهرت أبحاث عدة أن خاصية التزاوج بين متعددات الببتيد الحامضية والقاعديـة في بروتينات التخزين تعود للأصل المشترك لمتعددات الببتيد هذه (Croy *et al.*, 1982 ; Walburg and Larkins, 1983). تصنع على الأغلب متعددي الببتيد α و β المشكلين لتحت وحدة واحدة من مُولِد متعدد ببتيدي واحد, ذي وزن جزيئي مرتفع تجري عليه تحولات عدة بالانشطار الأنزيمي (البروتياز).

وخلاصة تُظهر البروتينات المختزنة لبذور الزيتون تركيباً متبايناً , فـهي لاتتكون فقط من واحد أو عدة جلوبولينات من نموذج 11S ولكـن أيضـاً مـن مكـرر متجانس لمتعدد ببتيد سكري من 49.2 kDa وهو مادعوناه بـــ GP50. هذا الجليكوبروتين GP50 يمثل حوالي 10% من بروتينات التخزين فـي بذور الزيتون , وهو لا يتجزأ بوجود عامـــل مرجع إذ يمتلك نفـس الوزن الجزيئي

49.2 kDa بوجود أو بغياب هذا العامل. وتعتمد درجة ذوبانه بشكل وثيق على درجة حموضة وسط الاستخلاص. يجب أن يكون هذا الوسط قاعدياً بصورة إجبارية pH8.5 . كما أن هذا الجليكوبروتين يذوب في وسط قلوي خفيف ولكن بشرط وجود عامل مذيب مثل SDS. تسمح هذه الميزات من خاصية الذوبان بالاقتراح بأن هذا البروتين هو عبارة عن جلوبولين مرتبط بقوة إلى مكونات غير بروتينية في بذور الزيتون , يُفسر مثل هذا الارتباط ويبرر الذوبان الضعيف في وسط متعادل أو خفيف القلوية بغياب SDS . لقد تم الكشف عن سلوكيات مشابهة في بروتينات بذور عباد الشمس (Gheyasuddine *et al.*, 1970) .

هذا وقد حاولنا وصف السلسلة أو السلاسل متعددة السكرات المرتبطة بـ GP50 وتبين لنا أن هذا الجليكوبروتين مرتبط بسلسلة سكرية متعددة المانوز وذلك بفضل التفاعل الإيجابي بينه وبين الليكتين ConA بطريقة الكروماتوجرافيا والـ Affinoblotting. الجدير بالذكر هنا أن هذا النوع من السلاسل واسع الانتشار في العالم النباتي أي في الجليكوبروتينات النباتية لدرجة أنه اعتقد لفترة طويلة أن النباتات لاتمتلك نظاماً أنزيمياً خاصاً لتصنيع السلاسل السكريةمن النموذج المعقد. نعلم تماماً وجود سلاسل سكرية معقدة ذات التركيب (مانوز)3-كزيلوز-فركتوز- (ن أستيل جلوكوزأمين)$_2$ $Man3XylFuc(GlcNAc)_2$ مرتبطة بالجليكوبروتينات النباتية. لوحظ من خلال تجاربنا تفاعل GP50 مع المضادات الحيوية المتخصصة ضد هذه السلاسل الحاوية على سكر كزيلوز المرتبطة برابطة جليكوزيدية β 1-2 . هذا وقد برهن الباحثون Lauriere *et al.*, (1989) وكذلك Faye *et al.*, (1993) أن التركيب الضروري تواجده للتفاعل مع المضادات المذكورة هو $ManXyl(GlcNAc)_2$ على الأقل. بالتالي فإن السلسلة السكرية المعقدة المرتبطة بـ GP50 تمتلك على الأقل التركيب الأنف الذكر المُصادف عند أغلب السلاسل السكرية المعقدة عند الجليكوبروتينات النباتية (Faye and Chrispeels, 1988). وهكذا كما هي حالة الفيتوهيماأجلوتينين phytohemagglutinine في الفاصوليا (Faye and Chrispeels, 1988) فإن نتائجنا بينت أن الـ GP50 يحتوي على الأقل سلسلتين متعددتي السكر, الأولى متعددة المانوز والثانية ذات نموذج معقد.

5. خاتمة

يتراكم في بذور الزيتون كميات كبيرة من المختزنات على شكل لييدات وبروتينات وذلك، أثناء تطورها. هذا وإن دراسة البروتينات المختزنة , خلال العقدين الماضيين , فرضت نفسها كمرحلة مبدئية للدخول إلى الأبحاث المتعلقة بتحسين قيمهم الغذائية.

بعد تحديد الشروط المثالية لاستخلاص بروتينات التخزين في بذور الزيتون وكذلك ميزات ذوبانها حسب درجة حموضة الوسط, تركزت أبحاثنا على تحديد المكونات الببتيدية المختلفة لهذه البروتينات بواسطة SDS-PAGE ومن ثم الكشف عن الجليكوبروتينات الموجودة فيها. تبين أن هذه البروتينات تمثل – 10 11% من وزن بذرة الزيتون وتمتلك محتوى من الليسين أكبر بكثير من بروتينات عباد الشمس والحبوب, بالمقابل تحوي قليلاً من الأحماض الأمينيه الكبريتية.

إن دراسة البروتينات المختزنة في بذور الزيتون *Olea europea* سمحت بالتحقق من التركيب المتعدد الوحدة لها إذ بينت أبحاثنا وجود نموذجين من المكونات المتعددة الببتيد : 1) تحت وحدتين A و B مكونة جلوبولين واحد أو أكثر وتتألف من متعددات ببتيد غير سكرية وزنها الجزيئي يتراوح بين 30 و 36 KDa ومتعددات ببتيد أخرى من 21.5 إلى 23.5 KDa مرتبطين مع بعضهم البعض بجسور كبريتية . 2) متعدد ببتيد سكري GP50 مشكل من مكرر لوحدة واحدة يتفكك بوجود SDS في شروط غير مرجعة ويُمثل حوالي 10% من بروتينات التخزين في بذور الزيتون, تعتمد درجة ذوبانه بشكل وثيق على درجة حموضة الوسط. إن تركيب A و B يُعتبر ميزة خاصة بتحت الوحدات المكونة للجلوبيولينات 11S لعدد كبير من البذور النباتية. تبدي متعددات الببتيد المكونة لتحت الوحدات هذه تبايناً واضحاً وكبيراً على مستوى أوزانها الجزيئية . يُعتبر هذا التباين أيضاً سمة مشتركة للبروتينات 11S وأصلها الوراثي الواحد مقبول بشكل عام.

هذا وقد بحثنا عن ماهية متعددات السكر المرتبطة به باستخدام تقنيات التحليل على غشاء سيليلوزي ، لكتينات ومضادات حيوية , مما سمح لنا بالكشف عن طبيعة هذا الجزء السكري بأنه مكون من سلسلة متعددة المانوز وأخرى معقدة تركيبها $ManXyl(GlcNAc)_2$ على الأقل.

PAGE : Poly Acrylamide Gel Electrophoresis - SDS : Sodium Dodecyl Sulfate - ME : β- Mercaptoethanol - TCA : Tri Chloroacetic Acid - KDa : Kilodalton

6.REFERENCES

Bradford M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72 : 248-254.

Canella M., (1978). Whipping properties of sunflower protein dispersions. Lebensmittel Wissenchaft und Technologie, 11 : 259-263.

Coates J.B., Medeiros J.S., Thanh V.H. and Nielseni C. (1985). Characterization of the subunits of β-conglycinin (soybean). Arch. Biochem. Biophys., 243 : 184-194.

Croy R. D., Lycett G.W., Gatehouse J.A., Yarwood J.N. and Boulter D.(1982). Cloning and analysis of cDNAs encoding plant storage protein precursor. Nature, 295 : 76-79.

Derbyshire E. , Wright D. J. and Boulter D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry, 15 : 3-24.

Dlouha V., Kell B. and Sorm F. (1963). On protein: separation of the two polypeptide chains of s-sulphoedestin. Collect. Czech. Chem. Commun., 28 : 2969-2976.

Duranti M., Restani P., Poniatowska M. and Cerletti P. (1981). The seed globulins of *Lupinus*. Phytochemistry. 20 : 2071-2075.

Dure L., and Chlan C. (1981). Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. Plant Physiol., 68 : 180-186.

Faye L., and Chrispeels M.J. (1985). Characterization of N-linked oligosaccharides by affinoblotting with concavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidase. Anal. Biochem., 149: 218-224.

Faye L., and Chrispeels M.J. (1988). Common antigenic determinants in the glycoprotein of plants, molluscs and insects. Glycoconjugate J. 5 : 245-256.

Faye L., Gomorod V., Fitchette-Laine A-C. and Chrispeels M. J. (1993). Affinity purification of antibodies specific for Asn-Linked glycans containing 1-3 fucose or 1-2 xylose. Anal. Biochem. 109 : 104-108.

Gheyasuddine S., Cater C.M. and Mattil K.F. (1970). Effect of several variables on the extractibility of sunflower seed proteins. J. Food Sci., 35 : 453-456.

Hara I., Wada K., Wakabayashi S. and Matsubara H.(1976). Pumpkin (*Cucurbita sp.*) seed globulin. I. Purification, characterization and subunit structure. Plant Cell. Physiol. 17 : 799-814.

Hara I., Ohmiya M. and Matsubara H. (1978). Pumpkin (*Cucurbita sp.*) seed globulin. III. Comparaison of subunit structures among seed globulins of various cucurbita species and characterization of peptide components. Plant Cell. Physiol.19 : 237-243.

Heinrich S. (1960). Contribution a l'etude de l'amandon d'olive. These de Doctorat, Fac. De pharmacie, Univ. de Nancy.

Higgins T.J.V. (1984). Synthesis and regulation of major proteins in seeds. Annu. Rev. Plant Physiol., 35 : 191-221.

Krishna R. G. and Wold F. (1997). In protein structure. A practical approach. (ed. T. E. Creighton), P. 91. IRL press, New York, Tokyo.

Laemmli T. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685.

Lauriere M., Lauriere C., Chrispeels M.J., Johnson K.D. and Strum A. (1989). Characterization of a xylose-specific antiserum that reacts with the complex asparagine-linked glycans of extracellular and vacuolar glycoproteins. Plant Physiol., 90 : 1182-1188.

Moreira M.A., Hermodson M.A., Larkins B.A. and Nielsen N.C. (1979). Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. J. Biol. Chem., 254 : 9921-9926.

Mosse J. and Baudet J. (1983). Crude protein content and amino acid composition of seeds : variability and correlation. In plant Proteins for human food. Eds., Bodwell and Petit. P. 21-41. Nijhoff/ Drjunk Publishers. The Hague.

Nielson N.C. (1984). The chemistry of legume storage proteins. Philos. Trans. R. Soc. London, B304 : 287-296.

Pernollet J.C. (1985). Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seed. Physiol. Veg., 23 : 45-59.

Pusztai A. (1965). A study on the glucosamine containing constituents of the seed of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Biochem. J., 94 : 604-610.

Sousow M.K. (1992). Contribution a l'etude des proteines de reserve de l'amande d'olive (*Olea europea*). These de Doctorat, Univ. de Rouen, France.

Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some application. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 4350-4354.

Walburg G. and Larkins B.A. (1983). Oat seed globulin. Subunit characterization and demonstration of its synthesis as a precursor. Plant Physiol., 72 : 162-165.