

توصيف إنزيم البيروكسيديز من أوراق نبات الكرفس

طارق نواف خليل

مدرس مساعد

قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة والغابات – جامعة الموصل

البريد الإلكتروني: tariq79t@yahoo.com

المستخلص :

تم تنفيذ البحث في مختبرات قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل وتم انجازه عام 2017 بهدف دراسة عزل وتوصيف إنزيم البيروكسيديز من أوراق الكرفس (Celery) بإستخلاصه بالماء المقطر ثم الترسيب بإستخدام تراكيز مختلفة من الأسيتون شملت 1:1 و 1:1,5 و 1:2 (أسيتون : راسح) وكانت النسبة الأفضل 1:1,5 وبحصيلة أنزيمية بلغت 74,3%. درست بعض صفات الإنزيم. بلغت درجة الحرارة المثلى لعمل الإنزيم 40م°. تميز الإنزيم بثبات حراري نسبي إذ احتفظ بكامل فعاليته بعد مرور 60 دقيقة من التحضين بدرجة حرارة 50م° واحتفظ ب 77% من فعاليته بدرجة حرارة 60م°، وبدأت الفعالية الإنزيمية بعد ذلك بالإنخفاض لتنتهي كلياً بعد مرور 60 دقيقة من تحضين الإنزيم بدرجة حرارة 80م°، بلغ الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الإنزيم 6,3 وكان أفضل ثبات له عند قيمة 5,5 بإستخدام محلول السترات الدائري، بلغت طاقة التنشيط لفعالية الإنزيم 3,261 كيلوسعرة.مول⁻¹ ولدنتره الإنزيم 6,131 كيلوسعرة.مول⁻¹. وأظهرت دراسة الثوابت الحركية للإنزيم ان قيمة ثابت ميكليس (K_m) والسرعة القصوى للتفاعل (V_{max}) تعادل 20 ملليمولر و 2 مايكرومول.دقيقة⁻¹، وعلى التوالي باستخدام الكوايالكول كركيزة. الكلمة المفتاحية: بيروكسيديز ، أوراق الكرفس ، توصيف البيروكسيديز

Characterization of celery leaves peroxidase

Tareq Nawaf Khaleel

Lecturer assistant

Food since dep. / college of agriculture and forestry / university of Mosul

Email: tariq79t@yahoo.com

Abstrct:

This research was conducted in food sciences laboratories, college of agricultural and forestry university of mosul and end in 2017 was aimed to isolate and characterization peroxidase enzyme from celery leaves by water extraction followed by precipitation using different concentrations of acetone (1:1 , 1.5:1 , 2:1 acetone : filtrate). The best ratio was found to be 1.5:1 which gave 74,3%.

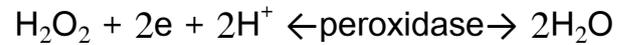
Some of the enzyme properties were studied. Optimum temperature for enzyme activity was 40C. The enzyme was found to be relatively thermostable. It retained all initial activity after 60 minutes of incubation at 50C and 77% at 60C . However, the enzyme had lost all activity upon incubation at 80C for 60 minutes. Optimum pH of

activity was 6.3 . Optimal stability was found at pH 5.5 using citrate buffer. Activation energy for the enzyme activity was 3,261k cal.mol⁻¹, and for enzyme denaturation was 6,131k cal.mol⁻¹. Michaelis constant (Km) and maximum velocity (Vmax) were calculated to be 20 mM and 2 µmol. Min⁻¹, respectively using guaiacol as substrate.

Keyword: peroxidase , celery leaves , characterization

المقدمة :

ينتمي إنزيم البيروكسيداز (EC. 1.11.1.7) إلى الصنف الأول في التصنيف العام للإنزيمات وهي إنزيمات الأكسدة والاختزال. يعمل هذا الإنزيم كمحفز لأكسدة العديد من المركبات المانحة للهيدروجين مثل المركبات الفينولية والأمينات الأروماتية والهيدروكوبونون وغيرها وبوجود بيروكسيد الهيدروجين، إذ ينتقل الهيدروجين من المادة المانحة إلى المادة المستقبلة وحسب التفاعل الآتي:



يتراوح الوزن الجزيئي لهذا الإنزيم بين 30 - 150 كيلودالتون (5 ; 12) ويمتلك مجموعة فعالة تمثل بذرة الحديد أو مجموعة بورفرين والتي لها دور محفز في قدرة الإنزيم على أكسدة بعض المركبات العضوية من خلال نقل الإلكترونات إلى بيروكسيد الهيدروجين (10). تحتوي بعض أصناف البيروكسيدازات على مجموعة كلوكوز مما يعطيها ثباتاً في درجات الحرارة المرتفعة ومقاومة التغير في الرقم الهيدروجيني.

تنتشر البيروكسيدازات بصورة واسعة في النباتات والحيوانات فضلاً عن العديد من الأحياء المجهرية مثل البكتريا والخمائر والأعفان. لهذا الإنزيم أهمية حيوية في النبات من خلال قدرته على تحليل بيروكسيد الهيدروجين الذي يتكون داخل الأنسجة بفعل التحلل التأكسدي للدهون والذي له تأثير سمي على الأغشية الخلوية ونفاذيتها، كذلك له دوراً مهماً كمنظم للنمو في النباتات المتواجد فيها. للبيروكسيدازات دور في تفاعلات الاسمرار الإنزيمية من خلال قدرتها على أكسدة الكلوروفيل والكاروتينويدات والانتوسيانين في المادة الغذائية فضلاً عن قدرته على تحلل الفينولات الثنائية، ويدخل في تخليق اللكنين لجدار الخلية (9 ; 15 ; 39 ; 47). وله دور في استطالة الخلية وفي النظام المناعي وفي تنظيم النظام الهرموني للخلايا وفي ازالة سمية جذور الاوكسجين (4 ; 14 ; 19 ; 32). لهذا الإنزيم دور مهم في التطبيقات التحليلية من خلال دخوله في تركيب المجسات الحيوية وفي تركيب المحاليل اللازمة للتقدير الكمي للكولسترول والكلوكوز وحامض اليوريك (1;38)، فضلاً عن امكانية استخدام الإنزيم في الانتاج الكيميائي للوقود من لب الاخشاب (35) وامكانية استخدام البيروكسيداز المستخلص من فول الصويا في انتاج الكتات اللازمة لتقدير الاجسام المناعية (8)، كذلك يستخدم الإنزيم كعامل مساعد في إنتاج الأثيلين من مركب 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid بوجود بيروكسيد الهيدروجين (41)، ويستخدم الإنزيم المستخلص من الفجل الحار (Horseradish) وفي تخليق المركبات العطرية وفي معالجة مياه الفضلات التي

تحتوي على المركبات الفينولية والأمينات العطرية (22 ; 29 ; 49) وفي تحسين نوعية الوقود من خلال قدرته على هدم اللكتين فيه (26)، كما يدخل في تركيب المحاليل اللازمة لتقدير الأجسام المناعية وفي تقنية ELISA بسبب قدرته على تحفيز تغيير المواد اللونية (Chromogenic) وبتركيز منخفض وثباتية جيدة بوجود بيروكسيد الهيدروجين (20). وبالرغم من الفوائد العديدة لهذا الإنزيم فإن له بعض السلبيات اذ يسبب تلون العديد من المواد الغذائية باللون البني مثل بعض أنواع الفواكه والخضراوات والروبيان وغيرها من خلال مشاركته في تفاعلات الاسمرار الإنزيمية (18).

بسبب الأهمية الصناعية والتطبيقية للإنزيم المذكور فقد هدفت الدراسة الحالية إلى عزل وتوصيف إنزيم البيروكسيداز من أوراق نبات الكرفس كمصدر متوفر ورخيص على مدار السنة.

مواد وطرائق العمل :

تحضير المستخلص الإنزيمي: تم مزج 50 غم من أوراق الكرفس الطرية مع 100 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ (0,05 مولاري ورقم هيدروجيني 7) بوساطة خلاط كهربائي لحين الحصول على معلق متجانس مع تجنب ارتفاع درجة حرارة المزيج للحفاظ على الإنزيم. رشح المزيج باستخدام ورق ترشيح رقم 1 تلاه طرد مركزي بسرعة 3000 ج مع التبريد لمدة 10 دقائق. تم ترسيب الإنزيم من الراشح (المستخلص الخلوي) باستخدام الأسيتون بنسبة 1,5 : 1 (أسيتون : راشح). ترك المزيج في حمام ثلجي لمدة ساعة بعدها فصل الراشح عن الراشح بعملية الطرد المركزي (10000 ج) مع التبريد لمدة 10 دقائق. أخذ الراشح المحتوي على الإنزيم وأذيب في 10 مل من المحلول الدارئ السابق الذكر وتم تقدير الفعالية الإنزيمية فيه ثم حفظ في الثلاجة لحين استخدامه في عمليات التوصيف.

تقدير الفعالية الإنزيمية: قدرت الفعالية الإنزيمية حسب الطريقة التي ذكرها 25 وهي طريقة لونية تعتمد على أكسدة الإنزيم لمادة الركيزة والتي هي عبارة عن مزيج من بيروكسيد الهيدروجين والكواياكول في محلول الفوسفات السترات الدارئ (0,1 مولر ورقم هيدروجيني 6,3) اجري التفاعل باضافة 0,1 مل محلول انزيمي إلى مزيج محلول الركيزة المتكون من 0,5 مل كواياكول 0,5 مل بيروكسيد الهيدروجين حضان المزيج في حمام مائي بدرجة حرارة 40°م لمدة 3 دقائق. قدر التغير في الإمتصاص الضوئي باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) على طول موجي 436 نانوميتر. تعرف الوحدة الإنزيمية بانها كمية الإنزيم التي تنتج مايكرومول واحد من ال Tetraguaiacal في الدقيقة الواحدة وفي الظروف المثالية.

تأثير نسبة الأسيتون المستخدم في ترسيب الإنزيم: لغرض تحديد النسبة المثلى من الأسيتون المستخدم لترسيب الإنزيم تم استخدام ثلاث نسب وهي 1:1 و 1:1,5 و 1:2 (أسيتون : راشح). أذيب الراشح الناتج من كل عملية ترسيب في 10 مل من محلول الفوسفات السترات الدارئ وتم قياس الفعالية الإنزيمية لكل محلول إنزيمي.

تقدير درجة الحرارة المثلى للإنزيم: تمت دراسة تأثير درجة الحرارة في فعالية البيروكسيديز وذلك بتقدير الفعالية الإنزيمية في درجات حرارية مختلفة شملت 25 و 30 و 35 و 40 و 45 و 50 و 55 و 60 و 65 و 70 و 75 و 80°.

تقدير الثبات الحراري للإنزيم: لتقدير مقاومة وثبات الإنزيم تجاه درجات الحرارة المرتفعة حضن المحلول الإنزيمي لوحده في حمام مائي وعلى درجات حرارة مختلفة (30 ، 40 ، 50 ، 60 ، 70 ، 80°) لمدة 60 دقيقة مع تقدير الفعالية الإنزيمية كل 15 دقيقة وحسبت النسبة المئوية للفعالية الإنزيمية المتبقية.

تقدير طاقة التنشيط: قدرت طاقة التنشيط لتحويل الركيزة إلى نواتج Transformation, Ea بقياس ثابت سرعة التفاعل الملاحظ (Observed reaction constant, Kobs) على مدى من درجات الحرارة تراوحت بين 25 - 40° وكذلك طاقة مسخ الإنزيم (Denaturation, Ea) بقياس ثابت سرعة التفاعل الملاحظ على مدى درجات حرارة تراوحت بين 40 - 70° بنفس الأسلوب الوارد في تقدير فعالية الإنزيم ورسمت العلاقة بين مقلوب درجة الحرارة المطلقة (K^{-1}) مقابل لوغاريتم (Kobs) ومنها تم حساب طاقة التنشيط وفقاً لمعادلة أرينيوس (Arrhenius equation) (11).

$$\text{Log} \frac{K_2}{K_1} = \frac{V_2}{V_1} = \frac{E}{2.303R} \times \frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1}$$

إذ أن:

K = ثابت سرعة التفاعل

V = سرعة التفاعل

E = طاقة التنشيط

R = ثابت الغاز = 1,98 سعرة.مول⁻¹.درجة⁻¹

T = درجة الحرارة المطلقة

تقدير الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم: تم تقدير الفعالية الإنزيمية باستخدام قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (5,7 ، 6 ، 6,3 ، 6,6 ، 6,9 ، 7,2 ، 7,5 ، 7,8 ، 8,1) باستخدام محلول الفوسفات السترات الدائري بدرجة حرارة 40°.

تقدير الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم: حضن الإنزيم في محلول فوسفات السترات الدائري بقيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4 ، 4,5 ، 5 ، 5,5 ، 6 ، 6,5 ، 7) لمدة ساعة وبدرجة حرارة 25° عدل الرقم الهيدروجيني إلى الرقم الأمثل للفعالية و قدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية.

تقدير الثوابت الحركية: قدرت الفعالية الإنزيمية باستخدام تراكيز مختلفة من مادة الركيزة (كواياكول) شملت 5 و 10 و 15 و 20 و 25 و 30 و 35 و 40 و 45 و 50 مايكرومولر في محلول الفوسفات السترات الدائري (0,1 مولاري ورقم هيدروجيني 6,3) ثم حسبت قيم ثابت ميكليس (K_m) والسرعة القصوى (V_{max}) باستخدام منحني لاينويفر - بيرك.

النتائج والمناقشة :

ترسيب الإنزيم: أجريت عملية ترسيب إنزيم البيروكسيديز من راشح مستخلص أوراق الكرفس باستخدام تراكيز مختلفة من الأسيتون البارد شملت 1:1 و 1:1,5 و 1:2 (أسيتون: راشح)، وأظهرت النتائج الموضحة في الجدول (1) تفوق استخلاص الإنزيم باستخدام نسبة 1:1,5 والتي أعطت أفضل كفاءة ترسيب بحصيلة 74,3% بالمقارنة مع النسب الأخرى (1:1 و 1:2) والتي كانت كفاءة ترسيبها 53,8 و 52,9% وعلى التوالي، ولوحظ انه باستخدام الأسيتون بنسبة 1:2 ظهر رواسب بيضاء صعبة الذوبان وقد يعزى ذلك إلى دنثرة جزء من الإنزيم وبالتالي إنخفاض نسبة الترسيب أو قد يعود إلى ترسيب بروتينات أخرى (17). وقد يعزى الاختلاف في كفاءة الترسيب باختلاف المركبات المستخدمة إلى الاختلاف في القوة الأيونية والقطبية والتركيز لتلك المركبات إذ يعد الأسيتون من المركبات ذات الفعالية العالية في ترسيب المركبات البروتينية من محاليلها ولكن بتراكيز معينة (7).

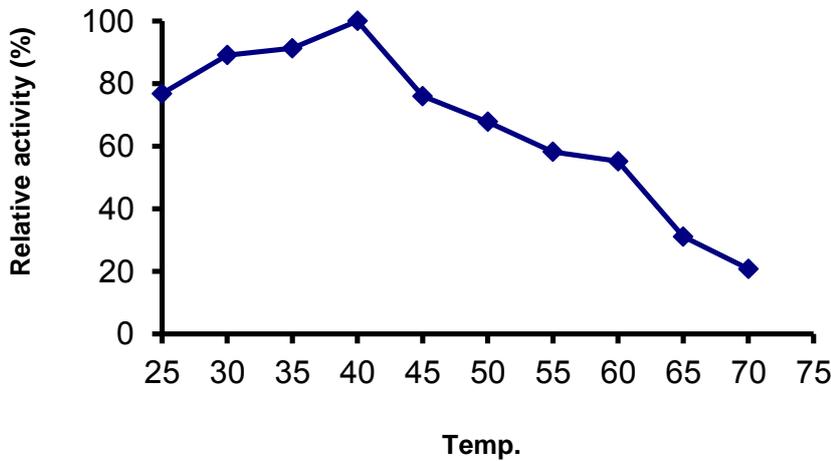
جدول رقم 1: كفاءة ترسيب إنزيم البيروكسيديز من راشح مستخلص أوراق الكرفس باستخدام تراكيز مختلفة من الاسيتون

الحصيلة (%)	الفعالية الكلية (وحدة. مل ⁻¹)	الفعالية الإنزيمية (وحدة . مل ⁻¹)	الحجم (مل)	نسبة الأسيتون إلى الراشح
100	105	2,1	50	المستخلص الخام
53,8	56,5	5,65	10	1:1
74,3	78	7,8	10	1:1,5
52,9	55,5	5,55	10	1:2

وجاءت نتائج الدراسة الحالية متباينة بالمقارنة مع نتائج دراسات سابقة اذ حصل 51 على أفضل نسبة ترسيب (260 وحدة.مل⁻¹) للبيروكسيديز المنقى من الفجل الأبيض (*Raphanus Sativus L. Var. Cicil*) بنسبة 1:2 (أسيتون:راشح) باستخدام الأسيتون البارد بينما انخفضت كفاءة الترسيب بإنخفاض نسبة الأسيتون إلى 1:1 لتصل الفعالية إلى 98 وحدة.مل⁻¹، وكذلك كانت غير متقاربة مع ماتوصل اليه 30 عند استخلاصهم للإنزيم

من أوراق شجرة الديزل (*Copaifera langsdorffii*) باستخدام الأستون بفعالية إنزيمية 41,580 وحدة.مل⁻¹. بينما استخدم 3 كبريتات الامونيوم لترسيب الإنزيم من اللهانة وحصل على 2,3 وحدة إنزيمية.مل⁻¹، بينما بلغت الفعالية الإنزيمية 8,55 وحدة.مل⁻¹ عند استخدام محلول كبريتات الامونيوم بتركيز 60%. ولكنها انخفضت لتصل إلى 6,85 وحدة.مل⁻¹ باستخدام محلول CM sephadexion عند استخلاص البيروكسيديز من الجرجير (34).

تأثير درجة الحرارة في الفعالية الإنزيمية: لتحديد درجة الحرارة المثلى لعمل البيروكسيديز قيد الدراسة تم قياس الفعالية الإنزيمية بدرجات حرارية تراوحت بين 25-70°م. أظهرت النتائج المبينة في الشكل (1) تناسب الفعالية الإنزيمية طردياً مع ارتفاع درجة الحرارة حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 40°م ثم بدأت بالإنخفاض باستمرار رفع درجة الحرارة عن هذه الدرجة لتصل إلى 20,8% عند درجة حرارة 70°م، يعزى هذا السلوك في التفاعلات الإنزيمية إلى زيادة الطاقة الحركية لكل من الإنزيم والركيزة بارتفاع درجة حرارة التفاعل مما يؤدي إلى زيادة فرصة حدوث التصادمات بين جزيئاتها، وعند تجاوز درجة الحرارة حد معين يبدأ كسر العديد من الأواصر المسؤولة عن تركيب جزيئة الإنزيم مؤدياً إلى حدوث مسخ (Denaturation) وبالتالي فقدان الفعالية الإنزيمية (50).

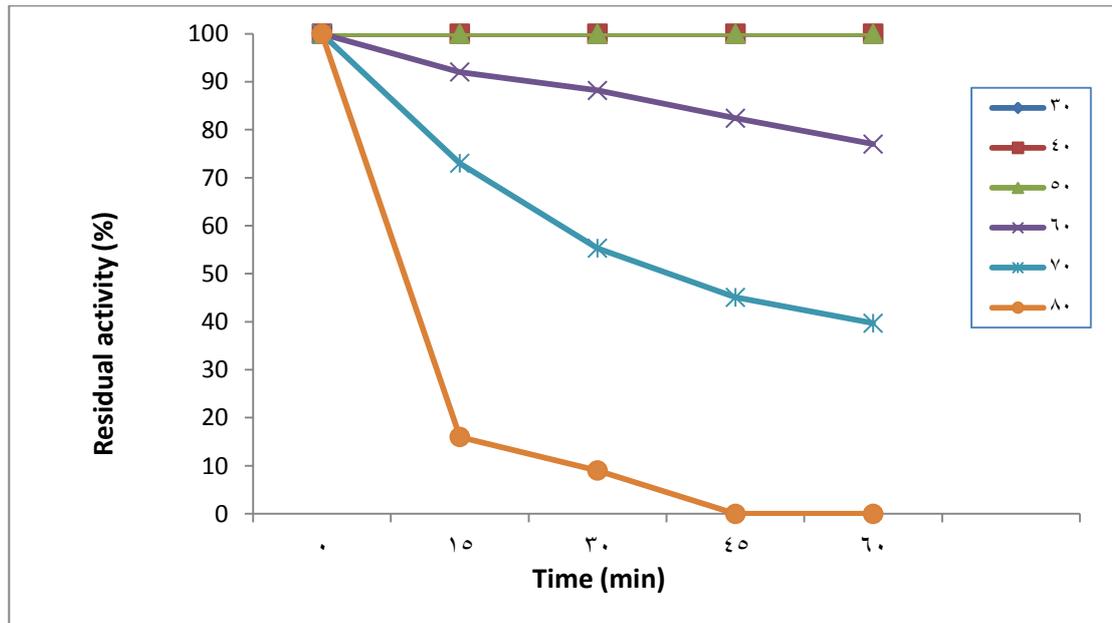


الشكل 1: درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البيروكسيديز

وجاءت النتائج مطابقة لما توصل اليه 28 والذين تمكنوا من عزل الإنزيم من الكركم (Fingerroot)، وكذلك كانت النتيجة مطابقة لما توصل اليه 6 في دراستهم لتوصيف البيروكسيديز من نبات اللهانة (الملفوف)، وكذلك متطابقة مع ما تم الوصول اليه من قبل 45 في دراستهم لتوصيف الإنزيم المعزول من فاكهة التفاح (*Mallus pumilus*)، وكذلك للإنزيم المستخلص من اليقطين (16) والتي بلغت 40°م، وكانت النتيجة الحالية مقارنة لما تم التوصل اليه من قبل 52 في دراستهم لتقدير درجة الحرارة المثلى لعمل البيروكسيديز المستخلص

من نبات الخس والتي كانت 45م°، وكانت درجة الحرارة المثلى لعمل الإنزيم قيد الدراسة أقل من درجة الحرارة المثلى لعمل الإنزيم المنقى من فاكهة ليتشي (70م°) (33) لكنها كانت أعلى منها للإنزيم الذي تم استخلاصه من نبات اللبلاب (*Gongronema latifolium*) والتي بلغت 30م°(23)، ويمكن تفسير تلك الاختلافات في درجة الحرارة المثلى لعمل الإنزيم إلى تباين مصدر الإنزيم ونوعه علاوة على ذلك فإن درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم ليست صفة ثابتة ومميزة للإنزيم وذلك لاعتمادها على ظروف التجربة، من العوامل التي تؤثر في درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيمات هي مدة التفاعل حيث إن إطالة مدة تعريض الإنزيم لدرجات الحرارة المرتفعة سيؤدي إلى انخفاض درجة الحرارة المثلى الظاهرية (Apparent Optimum temperature) بسبب زيادة سرعة مسخ الإنزيم (Denaturation) نتيجة لتعرضه لدرجات الحرارة العالية (13).

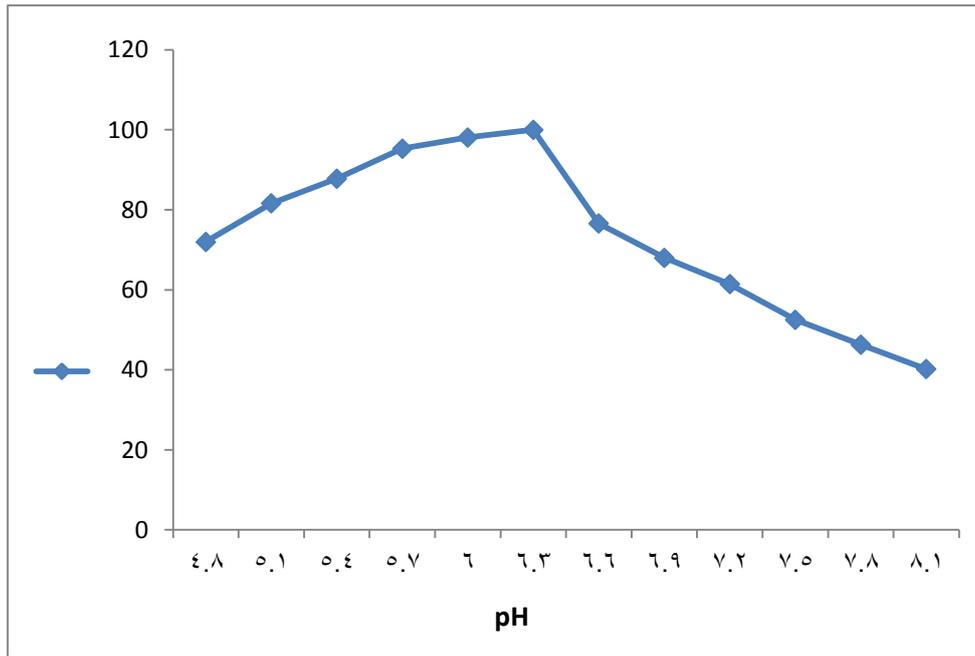
تأثير درجة الحرارة في ثبات الإنزيم: أظهرت نتائج حضن الإنزيم قيد الدراسة في درجات حرارة تراوحت بين 30-80م° والموضحة في الشكل 2 احتفاظ الإنزيم بكامل فعاليته بعد مرور 60 دقيقة من تحضينه بدرجة حرارة 50م°، أما عند رفع درجة الحرارة إلى 60م° فقد احتفظ الإنزيم بـ 92 و 88,2 و 82,4 و 77% بعد تحضينه مدة 15 و 30 و 45 و 60 دقيقة، وعلى التوالي، وفي درجة حرارة 70م° لوحظ احتفاظ الإنزيم بـ 73 و 55,3 و 45,1 و 39,7% من فعاليته الأصلية بعد تحضينه للفترات المذكورة وعلى التوالي. وباستخدام درجة الحرارة 80م° انخفض ثبات الإنزيم كثيراً إذ لوحظ احتفاظ الإنزيم بـ 16 و 9% فقط من فعاليته بعد مرور 15 و 30 دقيقة من التحضين في هذه الدرجة الحرارية، وعلى التوالي، بينما تلاشت الفعالية الإنزيمية كلياً بعد مرور 45 دقيقة من التحضين في هذه الدرجة الحرارية. ويعزى السبب في انخفاض الفعالية الإنزيمية إلى تأثير الإنزيمات بارتفاع درجة الحرارة وتغير طبيعتها البروتينية ودنترتها مما يؤثر في المواقع الفعالة للإنزيم وقدرتها على الارتباط بالركيزة، وعادة ما يكون هذا التأثير لاعكسياً (Irreversible). تحتوي معظم إنزيمات البيروكسيديز النباتية على جزء سكري وبنسبة قد تصل إلى 25%. وهذا يعتبر احد الاسباب الرئيسية لارتفاع الثبات الحراري لهذه الإنزيمات إذ أن جزيئة السكر توفر الحماية لبعض البروتينات من الدنترة (40 ; 23). جاءت نتائج الدراسة الحالية متباينة مع ما تم الحصول عليه في بعض الدراسات السابقة. إذ وجد 37 ان البيروكسيديز المستخلص من نبات Umbo قد احتفظ بـ 95% من فعاليته بعد 8 دقائق من تحضينه بدرجة حرارة 70م°، كما لوحظ احتفاظ الإنزيم المستخلص من البروكلي بـ 50% من فعاليته بعد تحضينه 17 دقيقة بدرجة حرارة 65م° (48)، اما بيروكسيديز الجزر فكان منخفض الثبات الحراري إذ لوحظ فقدانه 70% من فعاليته بعد 10 دقائق من التحضين في 60م° (46) بينما احتفظ الإنزيم المنقى من الكركم (Fingerroot) بـ 47 و 34% من فعاليته بعد تحضينه مدة 3 ساعات بدرجة حرارة 50 و 60م° وعلى التوالي (28)، كما انخفضت فعالية الإنزيم المستخلص من فاكهة ليتشي إلى 58,8 و 67,6% من فعاليته بعد تحضينه 120 دقيقة في درجة حرارة 70 و 80م°، وعلى التوالي (33).



الشكل 2: تأثير درجة الحرارة في ثبات إنزيم البيروكسيديز

تأثير الرقم الهيدروجيني في الفعالية الإنزيمية: قدرت الفعالية الإنزيمية لإنزيم البيروكسيديز قيد الدراسة بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين 4,8 - 8,1 وقد أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (3) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الإنزيم كان 6,3. وقد عمل الإنزيم وبكفاءة عالية بمدى واسع من الرقم الهيدروجيني تراوح بين 4,8 - 7,5 وبفعالية نسبية بلغت 72 و 52,5%. وعلى التوالي. بينما شهدت الفعالية الإنزيمية إنخفاضاً تدريجياً عند ارتفاع الرقم الهيدروجيني لتصل الفعالية النسبية إلى 40,2% عند الرقم الهيدروجيني 8,1 ويعزى السبب في ذلك إلى حدوث تغيرات في هيئة وتآين الإنزيم والركيزة فضلاً عن معقد الركيزة والإنزيم (Enzyme – substrate complex) (50).

لمعظم انواع البيروكسيديزات رقم هيدروجيني امثل ضمن المدى الحامضي وذلك يعود لطبيعة تواجد الإنزيم داخل الخلية، (37). قد يعود سبب التباين في قيم الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيمات ومن مصادرها المختلفة إلى اختلاف الأحماض الامينية الداخلة في تركيب الإنزيم وخاصة الموقع الفعال فضلاً عن الاختلافات في التراكيب الثانوية والثالثية والرابعة لجزيئة الإنزيم، وعادةً ما تكون الإنزيمات التي يمكن أن تكون ذات فعالية جيدة في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني مفضلة للاستخدام في تطبيقات الصناعات الغذائية.

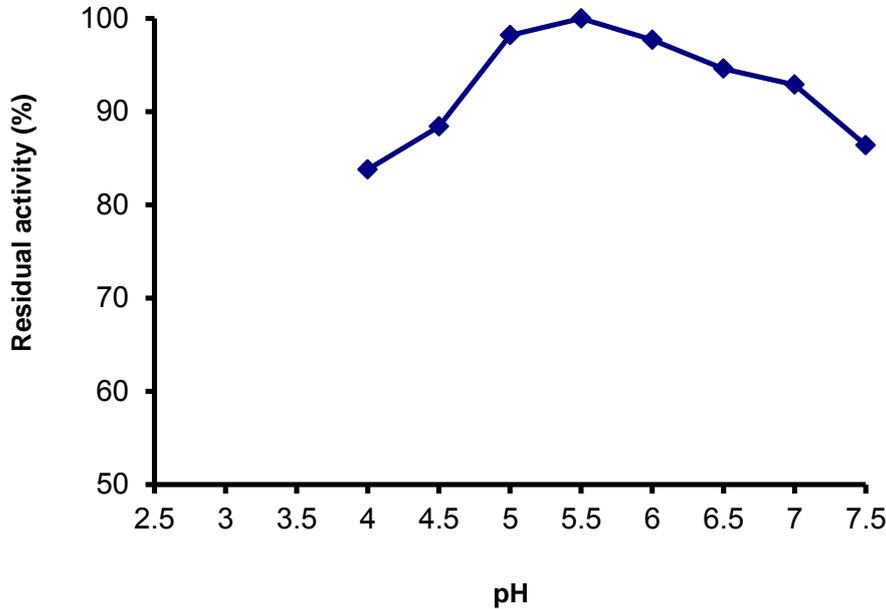


شكل 3: تأثير الرقم الهيدروجيني في الفعالية الإنزيمية

جاءت نتائج الدراسة الحالية متقاربة مع ما تم الحصول عليه من قبل 33 في دراستهم لتوصيف البيروكسيداز من فاكهة ليتشي إذ كان الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الإنزيم 6,5 وكذلك كانت النتيجة للبيروكسيداز المستخلص من الثوم (*Allium sativum*) بينما كانت اعلى بقليل عن الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الإنزيم المستخلص من البطاطا الحلوة (*Ipomoea batatas*) والتي كانت 6 (31). وكذلك كان يعادل 6 للإنزيم المستخلص من كل من الكركم و اليقطين (28 ، 16). بينما كانت النتائج قيد الدراسة أقل مما تم الحصول عليه من قبل 23 والذين وجدوا ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الإنزيم المستخلص نبات اللبلاب (*Gongronema latifolium*) كان يعادل 7.

تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيم: تمت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني على ثبات إنزيم البيروكسيداز قيد الدراسة بتحصينه في قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني تراوحت بين 4 - 7,5 وأظهرت النتائج المبينة في الشكل (4) أن الإنزيم كان ثابتاً وبصورة جيدة ضمن هذا المدى وبفعالية نسبية تتراوح بين 83,8 و 86,4%، وعلى التوالي، وكان الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم يعادل 5,5 وبعدها أخذت الفعالية الإنزيمية بالإنخفاض النسبي لتصل إلى 86,4% من الفعالية الأصلية بعد مرور ساعة من تحضين الإنزيم في وسط ذي رقم هيدروجيني 7,5 ، وقد يعزى هذا الإنخفاض إلى تأثير الرقم الهيدروجيني في إحداث تغيرات لاعكسية في التركيب الثانوي والثالثي لجزيئة الإنزيم وتغيير هيئة الموقع الفعال. يعد ثبات الإنزيم تجاه الرقم الهيدروجيني من

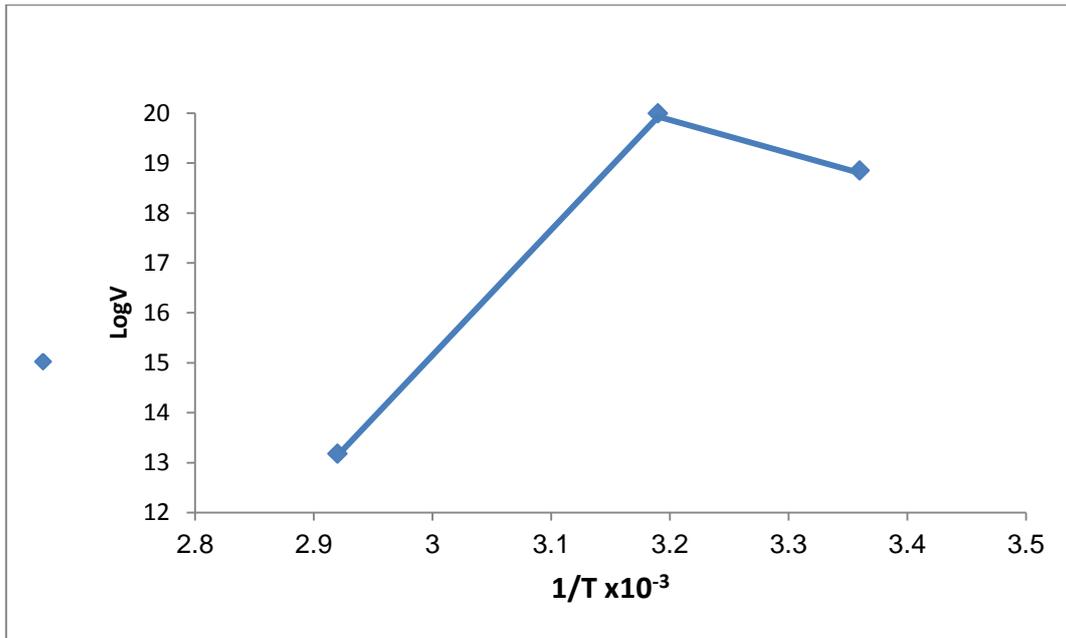
المعايير المهمة التي تؤخذ بنظر الاعتبار لتحديد ظروف تنقية واستخلاص وخرن وعمل الإنزيم ويتأثر بعدة عوامل منها نوع ومصدر الإنزيم (42).



الشكل 4: تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيم

وكان الإنزيم قيد الدراسة أكثر مقاومة نسبياً للتغير في الرقم الهيدروجيني من النتيجة التي توصل إليها 28 إذ احتفظ الإنزيم المستخلص من الكركم بـ 45% من فعاليته بعد مرور 3 ساعات من تحضينه في وسط ذي رقم هيدروجيني 3، كما فقد البيروكسيدز المستخلص من فاكهة ليتشي 91,9% من فعاليته بعد مرور 45 دقيقة من تحضينه في رقم هيدروجيني 2,5 (33).

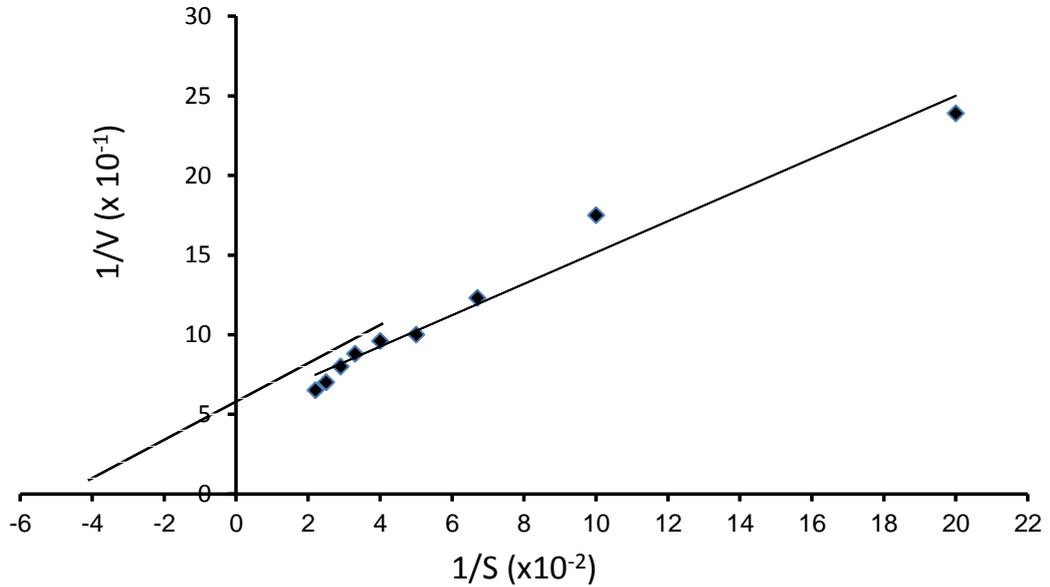
طاقة التنشيط: تم حساب طاقة التنشيط باستخدام معادلة آرينيوس بعد رسم العلاقة بين لوغاريتم سرعة التفاعل ومقلوب درجة الحرارة المطلقة وكما موضح في الشكل (5) فقد بلغت قيمة طاقة التنشيط 3,261 كيلو سعرة. مول⁻¹ (تعادل 13,644 كيلو جول.مول⁻¹) وتعد هذه القيمة أقل من المدى الاعتيادي لقيم طاقة التنشيط لمعظم التفاعلات الإنزيمية والذي يتراوح بين 6-18 كيلو سعرة.مول⁻¹ تعادل (25,104 - 75,312 كيلوجول.مول⁻¹) (50). وكانت طاقة التنشيط لدنترة الإنزيم تعادل 6,131 كيلوسعرة.مول⁻¹ (تعادل 25,652 كيلوجول.مول⁻¹).



شكل 5: منحني ارينيوس لتقدير طاقة التنشيط لإنزيم البيروكسيديز المعزول من الكرفاس

وتعد القيم الواطئة لطاقة التنشيط مؤشراً على الكفاءة التحفيزية العالية للإنزيم في تحويل الركيزة إلى ناتج وبذلك يكون التفاعل أسرع وفقاً لدور الإنزيمات بوصفها محفزات لخفض طاقة التنشيط. ويمكن الإستنتاج بان الإنزيم قيد الدراسة اكثر كفاءة تحفيزية في تحويل الركيزة (الكوايكول) إلى ناتج بالمقارنة مع ما توصل اليه 35 في دراستهم لتقدير طاقة التنشيط للبيروكسيديز المعزول من فاكهة لالنكي (*Citrus reticulata var. kinnow*) والتي تعادل 110,06 كيلوجول.مول⁻¹ وكذلك كان اكثر كفاءة من إنزيم البيروكسيديز المعزول من القرنابيط (109,73 كيلوجول.مول⁻¹) (24)، كذلك أظهرت النتائج أن طاقة التنشيط للإنزيم قيد الدراسة أقل منها للإنزيم المعزول من الزعرور (94,65 كيلوجول.مول⁻¹) (53)، وبلغت للإنزيم المعزول من الخباز 14 كيلوسعة.مول⁻¹ (2)، كما بلغت 16 كيلوسعة.مول⁻¹ للبيروكسيديز المعزول من بذور الرز (36) و 10,3 كيلو سرعة.مول⁻¹ للإنزيم المستخلص من فاكهة البابايا (44).

تقدير الثوابت الحركية لإنزيم البيروكسيديز: استخدمت طريقة لاينوفير- بيرك لرسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتراكيز مختلفة من مادة الكوايكول بوصفها مادة الركيزة لتعيين قيمة ثابت ميكليس (Michaelis constant, K_m) والسرعة القصوى (V_{max})، وكما موضح في الشكل (6) فقد بلغت قيمة السرعة القصوى 2 مايكرومول.دقيقة⁻¹ وقيمة ثابت ميكليس 20 ملي مول.لتر⁻¹ على أساس أن الوزن الجزيئي للكوايكول يعادل 124,14 غم.مول⁻¹. وتعد قيمة ثابت ميكليس من المعايير التي تحدد كفاءة عمل الإنزيم تجاه الركيزة إذ أن إنخفاض هذه القيمة يعد دليلاً على ارتفاع الألفة بين الإنزيم والركيزة.



شكل 6: منحنى لاينويفر - بيرك لتقدير الثوابت الحركية لإنزيم البيروكسيديز المعزول من الكرفس

لوحظ تباين النتائج في الدراسة الحالية بالمقارنة مع الدراسات السابقة بسبب تأثير عدة عوامل منها طبيعة ونوع الركيزة ونوع التفاعل الذي يحفز الإنزيم واختلاف مصدر الإنزيم وظروف التجربة مثل الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والقوة الأيونية للمحلول الدارى. جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع ماتم الحصول عليه من قبل 21 في دراسته لتقدير قيمة ثابت ميكليس للبيروكسيديز المستخلص من فاكهة كارمبولا (قلنباق ، الشجرة النجمية) (20,28ملي مولر) بينما كانت قيمة السرعة القصوى (V_{max}) 8,210 وحدة.دقيقة⁻¹ باستخدام الكوايالكول كمادة خاضعة للإنزيم بينما لاحظ إنخفاض قيمة K_m وارتفاع قيمة V_{max} لتصل إلى 12,75ملي مولر و 11,635 وحدة.دقيقة⁻¹، وعلى التوالي عند استخدام بيروكسيد الهيدروجين كركيزة، كما تباينت نتائج الدراسة الحالية مع ما تم التوصل اليه في بعض الدراسات السابقة اذ كان الإنزيم قيد الدراسة اكثر الفة تجاه المادة الخاضعة من الإنزيم المستخلص من نبات الجرجير والتي كانت قيمة K_m 375,74 ملي مولر وقيمة V_{max} 0,314 مايكرومول.لتر⁻¹.دقيقة باستخدام الكوايالكول كمادة خاضعة (34) في دراستهم باستخدام انواع مختلفة من الركائز منها ABTS اذ بلغت قيم K_m و V_{max} 2631,56 ملي مولر و 5,376 مايكرومول.لتر.دقيقة⁻¹

وباستخدام Pyrogallol (510,14 ملي مولر و 0,89 مايكرومول.لتر⁻¹.دقيقة) وباستخدام 4-methyl cathecol (1535,65 ملي مولر و 3,65 مايكرومول.لتر⁻¹.دقيقة) وباستخدام الهيدروكوينون كانت قيم K_m و V_{max} تعادل 65,19 ملي مولر و 0,303 مايكرومول.لتر⁻¹.دقيقة، وعلى التوالي. وأظهرت النتائج ان الإنزيم قيد الدراسة اكثر الفة من البيروكسيديز المستخلص من الزعرور والتي كانت قيمة ثابت ميكيلس له تعادل 153 ملي مول.لتر⁻¹ وباستخدام الكواياكول كركيزة (53) بينما كان الإنزيم قيد البحث اقل الفة تجاه المادة الخاضعة لما توصل اليه 37 في دراستهم لتوصيف إنزيم البيروكسيديز من نبات Umbu والتي كانت قيمة K_m تعادل 6,83 ملي مولر باستخدام الكواياكول كركيزة لكنها ارتفعت لتصل إلى 22,25 ملي مولر باستخدام المثيل كاتيول كركيزة، بينما بلغت قيم K_m و V_{max} 1,8 ملي مولر و 20 وحدة.مل⁻¹، وعلى التوالي باستخدام بيروكسيد الهيدروجين كركيزة للإنزيم المستخلص من اللباب (23).

References :

1. **Agostini, E.; Hernandez-Ruiz, J.; Arnao, M. B.; Milrand, S. R.; Tigier, H. A. and Acosta, M. (2002)** A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kit,” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 35, no. 1, pp. 1-7.
2. **Al-badri R. H. (2012)** Extraction, Partial Purification and Characterization of Peroxidase from *Malva neglecta*, Academic Press college of sciences universty of alnahreen October.
3. **Ali, L. F. (2008)** Isolation and study of peroxidase properties from local Cabbage (*Brassica, Oleracea Var. capitata L.*).
4. **Almagro, L.; Gomez Ros, LV.; Belchi-Navarro, S. B. R.; Ros Barcelo, A. and Pedreno, M. (2009)** Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 60: 377 – 390.
5. **Bakalovic, N.; Passardi, F.; Ioannidis, V.; Cosio, C.; Penel, C.; Falquet, L. and Dunand, C. (2006)** A class III plant peroxidase database. *Phytochemistry* 67: 534–539.
6. **Belcarz, A.; Ginalska, G.; Kowalewska, B. and Kulesza, P. (2008)** Spring cabbage peroxidase - potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis,” *Phytochemistry*, vol. 69, no. 3, pp. 627-636.
7. **Bender, J. P.; Mazutti M. A.; Di Luccio M. And Treichel H. (2008)** Extraction of Inulinase Obtained by Solid State Fermentation of Sugarcane Bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, *Appl. Biochem. Biotechnol*, 149: 195–203.
8. **Berlina, A. N.; Zherdev, A. V.; Dzantiev, B. B.; and Sakharov, I. Y. (2007)** Use of soybean peroxidase for the enzyme immunoassay of sulfameth-

oxipyridazine in milk,” *Applied Biochem Microbiol.*, vol.43, no. 5, pp. 550-555.

9. **Cai, C.; Xu, C.; Li, X.; Ferguson, I. and Chen, K. (2006)** Accumulation of lignin in relation to change in activities of lignification enzymes in loquat fruit flesh after harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 40: 163–169.
10. **Carvalho, A. S. L.; Melo, E. P. E.; Ferreira, B. S.; Neves-Petersen, M. T.; Peterson, S. T. and Aires-Barros, M. R. (2003)** Heme and pH-dependent stability of an anionic horseradish peroxidase,” *Biochemistry and Biophysics*, vol. 415, no. 2, pp. 257-267.
11. **Copeland, R. A. (1996)** *Enzymes: A Practical introduction to structure mechanism and data analysis*. P: 167, 175-178, Wiley-Vch, Inc. New York.
12. **Cosio, C. and Dunand, C. (2008)** Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot.* 60:391-408.
13. **Dalaly, B. K. and Rikaby, K. (1988)** *Food chemistry second edition*, directors of books home university of Mosul.
14. **De Gara, L. (2004)** Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants *Phytochemistry Reviews* .3(1-2): 195-205.
15. **Fagerstedt, K.V.; Kukkola, E.M.; Koistinen, V.T.; Takahashi, J. and Marjamaa, K. (2010)** Cell Wall Lignin is Polymerised by Class III Secretable Plant Peroxidases in Norwa Spruce .*J. Integative Plant Biology*.52(2):186-194.
16. **Fatima, A.; Husain, Q. and Khan, R. H. (2007)** A peroxidase from bitter gourd (*Momordica charantia*) with enhanced stability against organic solvent and detergent: A comparison with horseradish peroxidase,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol.47, no. 1, pp. 66-71.
17. **Gill, P. K.; Manhas, R. K. and Singh, P. (2005)** *Bioresource Technology*, 97, 894–902.
18. **Gonzalez-Barrio, R.; Salmenkallio-Marttila, M.; Tomas-Barberan, F.A.; Cantos, E. and Espin J.C. (2005)** Etiology of UV-C-induced browning in var. Superior white table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5990–5996.
19. **Gutierrez, J.; Lopez N.M.J.; Gomez-Ros L.V.; Novo U. E.; Esteban-Carrasco, A.; Diaz, J.; Sottomayor, M.; Cuello, J. and Ros-Barcelo, A. (2009)** Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Planta* 230:767-778.
20. **Hamid, M. and Rehman, K. U. (2009)** Potential applications of peroxidase, *Food Chemistry*, vol. 115, no. 1, pp. 1177-1186.
21. **Holschuh, H. J.; and de Dourado T. (2000)** Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

22. **Husain, M. and Husain, Q. (2008)** Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes A review Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 38:1-42.
23. **Joy, O. and Eze, S. O.O. (2015)** Partial Purification and Characterization of Peroxidase Extracted from *Gongronema latifolium* American-Eurasian Journal of Scientific Research 10 (4): 221-227.
24. **Kalsoom, U.; Bhatti, H. N.; Bhatti I. A. and Asgher M. (2010)** Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of peroxidase from cauliflower, Asian J. Chem. 22: 7883-7890.
25. **Kharatmol, P. P. and Pandit, A. B. (2012)** Extraction Partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves.
26. **Kumar, P.; Kamle, M.; Singh, J. and Rao, D.P. (2008)** Isolation and characterization of peroxidase from the leaves of *Ricinus communis* .J. Biotechnology and Biochemistry.
27. **Kuzaniak, E. and Sklodowska, M. (2005)** Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. Planta 222:192-200.
28. **Lalida P. S.; Kijjanapanich, P. And Phutrakul, S. (2015)** Characterization of Partially Purified Peroxidase from Fingerroot (*Boesenbergia Rotunda* (L.) Mansf.) *Journal of Medical and Bioengineering Vol. 4, No. 3.*
29. **Liu, W.; Kumar, J.; Tripathy, S.; Senecal, K. J. and Samuelson, L. (1999)** Enzymatically synthesized conducting polyaniline,” *Journal of American Chemical Society*, vol. 121, no.1, pp. 71-78.
30. **Maciel, H. P.; Gouvea, C. M.; Toyama, M.; Smolka, M.; Marangoni, S. and Pastore, G. M. (2007)** extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves, *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 5, 1067-1071.
31. **Mamounata, D.; Oumou, H. K.; Nafissetou, O.; Romaric, G. B.; Imael, H. N. B. and Mamoudou, H. D. (2011)** Comparison of peroxidase activity from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* grown in Burkina Faso. African Journal of Biochemistry Research, 5 124-128.
32. **Mika, A.; Minibayeva, F.; Beckett, R. and Lüthje, S. (2004)** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry .Reviews* .3(1-2):173-193.
33. **Mizobutsi, G. P.; Finger, F. L.; Ribeiro, R. A.; Puschmann, R.; Neves, L. L. and Mota, W. F. (2010)** Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, v.67, n.2, p.213-217.

34. **Nadaroglu, H.; Celebi, N.; Demir, N. and Demir, Y. (2013)** Purification and characterisation of a plant peroxidase from rocket (*Eruca vesicaria* sbsp. Sativa) (Mill.) (syn. *E. sativa*) and effects of some chemicals on peroxidase activity *in vitro*. Vol. 8(21), pp. 2520-2528.
35. **Nouren, S.; Bhatti, H. N.; Bhatti I. A. and Asgher M. (2013)** Kinetic and thermal characterazation of peroxidase from peels of *citrus reticulata* var kinnow The Journal of Animal & Plant Sciences, 23(2): Page: 430-435 ISSN: 1018-7081.
36. **Padigila, A.; Medda, R. and Cruciani, E. (1995)** Fractionation and Characterization of two form of peroxidase from *Oryza sativa*. *Preparative Biochemistry*. 25(1&2): 11-19.
37. **Pinto, M. S. T.; Ribeiro, J. M.; de Araújo, F. P.; de Melo, N. F. and Fernandes, K. V. S. (2015)** Purification and characterization of a peroxidase present in xilopodium exsudates of umbu plants (*Spondias tuberosa* A.) Vol. 14(21), pp. 1838 – 1845.
38. **Regalado, C.; García-Almendárez, B. E. and Duarte-Vázquez, M. A. (2004)** Biotechnology applications of peroxidases, *Phytochemistry Reviews*, vol.3, no.1, pp.243-256.
39. **Robinson, D.S.; Eskin, N.A.M. (eds) (1991)** Oxidative Enzymes in Foods. New York, Elsevier: 217–273.
40. **Ros-Barceló, A. and Pomar, F. (2002)** Plant peroxidases: versatile catalysts in the synthesis of bioactive natural products. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 27:735-792.
41. **Saeidian, S. and Ghasemifar, E. (2013)** Effect of temperature on guaiacol Peroxidase of *Pyrus communis* ISSN: 2300-9675, Vol. 5, pp 46-51.
42. **Segel, I. H. (1976)** Biochemical calculation, 2nd edition, John Wiley and Sons. New York.
43. **Shahriar, S. and Elham, G. (2013)** Effect of temperature on guaiacol Peroxidase of *Pyrus communis*. *Int. Lett. Nat. Sci.* 5: 46-51.
44. **Silva and Valdir (1990)** Soluble and Bound peroxidase from papaya fruit. *Phytochemistry*. 29(4): 1051-1056.
45. **Singh, J.; Dubey, A.; Diwakar, S. K.; Rawat, S. K.; Batra, N. and Joshi, A. (2010)** Biochemical Characterization of Peroxidases from the Fruits of *Mallus pumilus* (ISSN: 2141-5153) Vol. 1(4) pp.050-058.
46. **Suha, O.A.; Babiker, E.M. and Babiker, E.E. (2013)** Thermostability at different pH levels of peroxidase extracted from four vegetables. *Int. Food Res. J.* 20(2):715-719.
47. **Sukalovic, V.H.T.; Veljovic-Jovanović S.; Dragisic Maksimovic, J.; Maksimovic, V. and Pajić, Z. (2010)** Characterisation of phenol oxidase and peroxidase from maize silk. *Plant Biology*. 12(3):406-413.

48. **Thongsook, T. and Barrett, D. (2005)** Purification and partial characterization of broccoli (Brassica Var. Italica) peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* 53(8):3206-14.
49. **Ward, G.; Hardar, Y. and Dosoretz, C. G. (2001)** Inactivation of lignin peroxidase during oxidation of the highly reactive substrate ferulic acid,” *Enzyme Microbiology Technology*, vol. 29, no. 1, pp. 34-41.
50. **Whitaker, J. R. (1972)** Principle of enzymology for food science. Marcel Dekker, Inc., New York.
51. **Yazdi, M. T.; Khaleghparast, S. and Nayebpour, S. M. (1998)** Purification and partial characterization of Peroxidase from *Cultivated Raphanus Sativus L. var. cicil, mjiri*, Vol. 12, No.3, 273-277.
52. **Yihong, H. ; Juan, W. ; Ping L. and Yiwei, M. (2012)** Purification and partial characterization of peroxidase from lettuce stems. *African Journal of Biotechnology*, 11: 2752-2756.
53. **Zhang, X. and Shao, X. (2015)** Characterisation of Polyphenol Oxidase and Peroxidase and the Role in Browning of Loquat Fruit *Czech J. Food Sci.*, 33, (2): 109-117.