توصيف أنزيم Polyphenol oxidase (PPO) المنقى من نبات الخس الشوكي (*Lactuca serriola* L.) Prickly lettuce

Characterization of purified Polyphenol oxidase (PPO) from (*Lactuca serriola* L.) Prickly lettuce

محمد عبد الرزاق الصوفي
مركز بحوث السوق وحماية المستهلك/ جامعة بغداد

Mohammed. A. Al-Soufi
Center for Market Research and Consumer Protection/ University of Baghdad, Iraq

المستخلص

استعمل أنزيم منقى من نبات الخس الشوكي سبق الحصول عليه من دراسة سابقة ، وأظهرت النتائج أن الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم PPO بلغ 6.5 ، وكان الأنزيم ثابتاً في مدى واسع من قيم الاس الهيدروجيني تراوح بين 5.5-8 ، ولوحظ حصول زيادة واضحة في الفعالية الأنزيمية بازدياد درجة حرارة التفاعل حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 35 م ، وبلغت طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الأساس إلى ناتج 39.7194 كيلو جول.مول$^{-1}$ ، في حين كان الأنزيم ثابتا بدرجة حرارة 35م لمدة 10 دقائق ، وفقد الأنزيم المنقى فعاليته بشكل كامل بعد مرور 5 أيام عند الخزن بدرجة حرارة 25م ، بينما فقد ما يقارب (73 ، 16)% من فعاليته الابتدائية بعد مرور 21 يوم على الخزن بدرجة حرارة (4 ، -18) م على التوالي ، ولوحظ وجود ارتباط تساهمي بين الجزء الكربوهيدراتي والبروتيني في الأنزيم المنقى ، واتضح بان الأنزيم المنقى يحوي على 7.2% كربوهيدرات . اظهر استعمال كلا من L-Cystein و Sodium metabisulphite و Dithiothretol بتركيز (1 و 10) ملي مولار نسبة تثبيط عالية للأنزيم المنقى تلاه من حيث التأثير كلا من citric acid و L-Ascorbic acid ثم EDTA و Potassium cyanide ، بينما اظهر Thiourea و Sodium benzoate تأثير تثبيطيا اقل ، وبلغت قيمة ثابت ميكالس (Km) 4.762 ملي مولار بينما كانت السرعة القصوى (Vmax) 0.0588 ملي مولار/دقيقة في حين كانت معامل (Km/Vmax) للأنزيم المنقى 0.01235 دقيقة$^{-1}$ باستعمال Catechol مادة أساس .

Abstract

In this study, purified PPO from Prickly lettuce were obratind from a previous characterization study. The results showed that the optimum pH were 6.5 and the pH stability profile showed that the enzyme were more stable at pH values 5.5-8, the optimum temperature for enzyme activity were 35ºC and the enzyme were stable at 35ºC for 10 min. the activation energy for conversion of substrate to product was 39.7194 Kj/mol, the purified enzyme lost its activity after 5 days of storage at 25ºC, while it lost (73 , 16)% of primary activity after 21 days of storage at 4 and -18ºC respectively, the purified enzyme contains 7.2% carbohydrates. It was noticed that all treated of enzyme with L-Cystein, Sodium metabisulphate and Dithiothretol at 1 and 10 mM revealed high inhibition for the enzyme activity, followed by citric acid, L-Ascorbic acid, EDTA and Potassium cyanide, while both Thiourea and Sodium benzoate showed less inhibitory effect. The Km and Vmax were (4.762 , 0.0588) mM/min respectively, while the coefficient Vmax/Km were 0.01235 min^{-1} for the purified enzyme when used Catechol as a substrate.

المقدمة

يعد أنزيم Polyphenol oxidase أو ما يعرف بـ(PPO; monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine oxygen oxidoreductase, E.C.1.14.18.1) أحد أنواع البروتينات المعدنية نظرا لاحتوائه على أيون النحاس في موقعه الفعال [1] ، فضلا عن كونه بروتينا سكريا [2] ، ويعمل أنزيم PPO على تحفيز نوعين من تفاعلات الأكسدة يتمثل الأول بتحويل الفينولات الأحادية monophenols إلى الفينول المتعدد الثنائي *o*-diphenol بإضافة مجموعة هيدروكسيل hydroxilation ، بينما يتم النوع الثاني من التفاعل بأكسدة المركب الناتج إلى الكينونات المتعددة *o*-quinones مسببا إنتاج اللون المميز لهذه التفاعلات الذي تعتمد شدته على فعالية الأنزيم ومدى توافر الظروف الملائمة لاتمام عمله [3] .

يوجد الأنزيم في العديد من الكائنات الحية ويسبب ضررا وتلفا للمنتجات النباتية والحيوانية أثناء التداول والخزن والتصنيع وفقدانها للقيمة الغذائية نتيجة تفاعلات الاسمرار التي يكون مسؤولا عنها مما ينجم عنه خسائر اقتصادية تنعكس كلفها على المصنع والمستهلك على حد سواء [5,4] ، لذا فقد أجريت دراسات عدة لمعرفة خصائص هذا الأنزيم من اجل تحديد الظروف الملائمة لعمله والعوامل المختلفة التي تؤثر في الحد من فعاليته ، إذ تتحدد هيئة الأنزيم والموقع الفعال بالاس الهيدروجيني لوسط التفاعل مما يؤدي إلى فقدان الأنزيم لفعاليته عند وجوده في محيط ذي اس هيدروجيني متطرف نتيجة حدوث تغيير في المجاميع الفعالة القابلة للتأين [1 , 2] ، في حين يؤدي ازدياد درجة الحرارة إلى حصول تغييرات واضحة في مكونات التفاعل مما تسبب زيادة في فعالية الأنزيم نتيجة لزيادة الطاقة الحركية لجزيئات المواد المتفاعلة ، إلا أن ارتفاع تلك الدرجات الحرارية عن الدرجة المثلى يؤدي إلى حدوث انخفاض في الفعالية بسبب حصول عملية المسخ للجزيئة الأنزيمية [7,6,5,3] ، وتؤدي فترة تعرض الأنزيم لدرجات الحرارة دورا هاما في تحديد قدرة الأنزيم على ثباته الخزني في درجات حرارية مختلفة [1] ، كما ويتأثر أنزيم PPO سلبا بعدد واسع من المواد الكيميائية التي تعتمد قدرتها في التثبيط على شدة تأثيرها في جزيئة الأنزيم والموقع الفعال والعامل المساعد ، إذ تشكل مركبات السلفات أحد هذه المواد التي تعد من المثبطات التنافسية [10,3,9,8] ، كما تؤدي العوامل المعدنية الرابطة دورا هاما في تثبيط الفعالية الأنزيمية من خلال تأثيرها على أيون النحاس الموجود في الموقع الفعال وبالتالي إحداث تغيير في الهيئة الفراغية للأنزيم وإضعاف قدرته في ربط المادة الأساس [1,4,3] ، فضلا عن المركبات المختزلة التي تعمل على تحوير مركبات الكينون ومنعها من المشاركة في تفاعلات المرحلة الثانية من تفاعلات الاسمرار أو ارتباطها مع الأنزيم بشكل مباشر وبالتالي منعه من الاتصال بالمادة الأساس وتحليلها [2,4,3] ، وتمثل المادة الأساس لعمل الأنزيم مصدرا هاما في تحديد مقدار فعاليته اعتمادا على الفته تجاه تلك المواد ، إذ يعمل أنزيم PPO على عدد واسع من مركبات الفينول ، إلا أن الفته العالية تكون تجاه جزيئات الفينول المتعددة الثنائية الصغيرة مثل Catechol ، وعليه فأن قيمة (Km) و (Vmax) لهذا الأنزيم تتباين اعتمادا على مصدر المادة الأساس المستعملة في تقدير الفعالية [1,4,9] ، لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى إجراء توصيف كامل لأنزيم PPO المنقى من نبات الخس الشوكي الذي ينتشر بشكل واسع في العراق وتحديد العوامل المؤثرة في فعاليته نظرا لعدم توافر دراسات سابقة تشير إلى توصيف الأنزيم من نبات الخس الشوكي .

المواد وطرائق العمل

الأنزيم المنقى

اعتمدت هذه الدراسة على انزيم منقى من دراسة سابقة بوساطة خطوات عدة تمثلت بالاستخلاص وفقا للطريقة الموصوفة من قبل [11] ، ثم التركيز بوساطة ملح كبريتات الامونيوم وفقا لما وصفه [5] ، والتنقية باستعمال المبادل الايوني DEAE-Sepharose وفقا للطريقة التي قام بوصفها [12] ، ثم الترشيح الهلامي باستعمال مادة Sephacryl S-200 وفقا لما وصفه [2] ، وجرى التأكد من نقاوة الانزيم باستعمال الطريقة التي وصفها [13] بوساطة تقانة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة (SDS-PAGE) ، وعينت نقطة التعادل الكهربائي باتباع الطريقة التي قام بوصفها [14] ، في حين قدر الوزن الجزيئي باتباع تقنية الترشيح الهلامي بمادة Sephacryl S-200 وفقا للطريقة الموصوفة من قبل [2] .

تقدير الفعالية الأنزيمية

قدرت الفعالية الأنزيمية وفقا للطريقة التي قام بوصفها [15] باستعمال مادة Catecol كمادة أساس وتم استخراج الفعالية الأنزيمية (وحدة /مللتر) وفقا للمعادلة الآتية:

$$\text{PPO activity (unit/ml)} = \frac{\Delta A_{420nm}}{0.001 \times 0.05 \times RM}$$

إذ يمثل:

ΔA_{420nm} = مقدار التغير الحاصل في الامتصاصية .

0.001 = مقدار التغير الحاصل في الامتصاصية على طول موجي مقداره 420 نانومتر في الدقيقة لكل وحدة من أنزيم PPO عند اس هيدروجيني مقداره 7 بدرجة حرارة 25م لحجم مقداره 3 مللتر من مزيج التفاعل .

0.05 = حجم محلول الأنزيم المضاف مللتر .

RM = حجم مزيج التفاعل reaction mixture ذي حجم مقداره 3 مللتر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار والحاوي على 10 ملي مولار من الكاتيكول .

وعرفت وحدة الفعالية الأنزيمية بأنها كمية الأنزيم التي تسبب تغيرا في الامتصاصية بمقدار 0.001 في الدقيقة الواحدة .

تقدير تركيز البروتين

قدر تركيز البروتين وفقا للطريقة الموصوفة من قبل [16] باستعمال ألبومين المصل البقري (BSA) Bovine Serum Albumin لتحضير منحنى البروتين القياسي ، في حين تم الكشف عن البروتين في الأجزاء المنفصلة بالترشيح الهلامي بقراءة الامتصاص على طول موجي مقداره 280 نانومتر .

الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات الإنزيم

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [3] وذلك بتقدير الفعالية الإنزيمية (وحدة/ مللتر) للإنزيم باستعمال محاليل دارئة حاوية على المادة الأساس (الكاتيكول) تمثلت بمحلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني يتراوح بين 4.0-5.5 ومحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6.5 ومحلول Tris-HCl الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 9.0-7.5، في حين عين الاس الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم بحضن 0.05 مللتر من الإنزيم المنقى بتركيز 10 ملغم/مللتر مع 0.73 مللتر من المحاليل الدارئة المحضرة مسبقا بمدى اس هيدروجيني يتراوح بين 4.0-9.0 لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 4م ومن ثم تقدير الفعالية الإنزيمية (وحدة/ مللتر) .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الإنزيم

عينت درجة الحرارة المثلى للفعالية والثبات وفقا لما وصفه [1] بإضافة الأنزيم إلى محلول التفاعل المحضن بعدد من الدرجات الحرارية تراوحت بين (25-75) م ، في حين حددت درجة الثبات الحراري بوضع المحلول الإنزيمي المنقى بتركيز 10 ملغم/ مللتر في أنبوبة اختبار ثم حضنها في حمام مائي لمدة 30 دقيقة بدرجات حرارية تراوحت بين (25-75)م ومن ثم تبريد المحلول الإنزيمي بوساطة الثلج وتقدير الفعالية الإنزيمية (وحدة/مللتر)، وجرى تقديرطاقة التنشيط لتحويل المادة الاساس الى ناتج من خلال رسم لوغاريتم ثابت السرعة الملاحظ Observed reaction rate (Kobs) للتفاعل والمقدر بوساطة انزيم PPO المنقى ، بقياس سرعة التفاعل للانزيم عند درجة حرارة كانت بين (25-75) م تجاه مقلوب درجة الحرارة المطلقة (K) بتطبيق معادلة ارينوس وميل المنحنى المرسوم وفقا لما وصفه [17] .

تأثير الخزن في فعالية الانزيم:

جرت متابعة يومية للفعالية الانزيمية المتبقية لانزيم PPO المنقى بتركيز 10ملغم/مللتر المذاب في محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 6.0 بعد خزنه بدرجات حرارة مختلفة بلغت (-18، 4، 25)م ولمدة 21 يوما وفقا لما وصفه [1] .

الكشف عن وجود الكربوهيدرات

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [18] للكشف عن وجود ارتباط تساهمي بين الجزء الكربوهيدراتي والبروتيني في الانزيم بأستعمال الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 وفقا لما وصفه [2] مع استبدال مادة الترشيح الهلامي Sephadex G-150 بمادة Sephacryl S-200 وذلك بامرار المستخلص الأنزيمي المنقى ذي تركيز 10 ملغم/ مللتر على عمود ذي أبعاد مقدارها 60x1.5 سم ، وجمعت الأجزاء المنفصلة باستعمال محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.3 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7 بواقع 3 مللتر/جزء وبسرعة جريان بلغت 18 مللتر/ساعة ، وجرى التحري عن وجود الكربوهيدرات بقراءة الامتصاص الضوئي

على طول موجي مقداره 490 نانومتر، في حين تم الكشف عن البروتين بقراءة الامتصاص الضوئي على طول موجي مقدارها 280 نانومتر .

تقدير المحتوى الكربوهيدراتي

استعملت طريقة (الفينول-حامض الكبريتيك) التي وصفها [19] لتقدير تركيز الكربوهيدرات الكلي في الانزيم المنقى، وبعد عمل المنحنى القياسي لتراكيز معلومة من الكلوكوز تتراوح بين(10-80) مايكروغرام/مللتر ، استخرجت معادلة الخط المستقيم وحسبت نسبة الكربوهيدرات وفقاً للمعادلة الاتية :

$$X = \frac{Y - 0.028}{0.0091}$$

تأثير بعض المواد في فعالية الأنزيم

استعملت مواد عدة شملت كلا من (citric acid و L-Ascorbic acid و EDTA و Thiourea و 2-Mercaptoethanol و Potassium cyanide و Sodium metabisulphate و L-Cystein و Dithiothretol و Sodium benzoate) لتحديد تأثيرها في فعالية الأنزيم المنقى وفقا للطريقة التي قام بوصفها [10] وذلك بحضن 0.04 مللتر من الأنزيم بتركيز 10ملغم/ مللتر مع 0.14 مللتر من محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 8 و0.140 مللتر من محاليل المواد المحضرة بتركيز(0.1 و 0.5 و 1) ملي مولار بدرجة حرارة 5م لمدة 5 دقائق ومن ثم تقدير الفعالية الأنزيمية، واستخرجت نسبة التثبيط (%) بوساطة المعادلات الآتية:

$$\text{الفعالية المتبقية (\%)} = \frac{\text{فعالية الأنزيم المعامل (وحدة/مللتر)}}{\text{فعالية الأنزيم غير المعامل (وحدة/مللتر)}} \times 100$$

نسبة التثبيط (%) = 100 – الفعالية المتبقة (%)

الخصائص الحركية

حددت قيمة Km و Vmax وفقا للطريقة الموصوفة من قبل [12] وذلك بتحضير 3 مللتر من مزيج تفاعل مكون من 2.646 مللتر من محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.025 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره (7 و 0.150) مللتر من الكاتيكول المحضر بتراكيز تراوحت بين (1-10) ملي مولار و 0.21 مللتر من محلول الأنزيم المنقى بتركيز 10 ملغم/مللتر ، وتم استخراج القيم وفقا لمعادلة ميكالس منتن .

النتائج والمناقشة

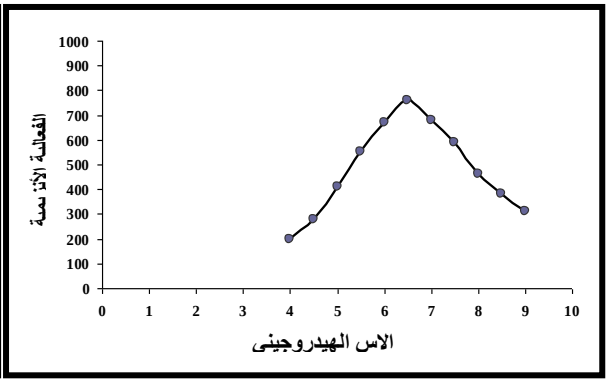
تحديد الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات الأنزيم:

يظهر شكل (1) أن الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم PPO بلغ 6.5 ، بينما شهدت الفعالية الأنزيمية عند قيم الاس الهيدروجيني المتطرفة (4 ، 9) انخفاضا بلغت نسبته (74 ، 59)% على التوالي ، ويلاحظ من شكل (2) أن الأنزيم كان ثابتاً في مدى واسع من قيم الاس الهيدروجيني تراوح بين 5.5-8 إلا انه فقد (58 ، 34)% من فعاليته الأصلية عند قيم الآس الهيدروجيني المتطرفة 4 و 9 على التوالي .

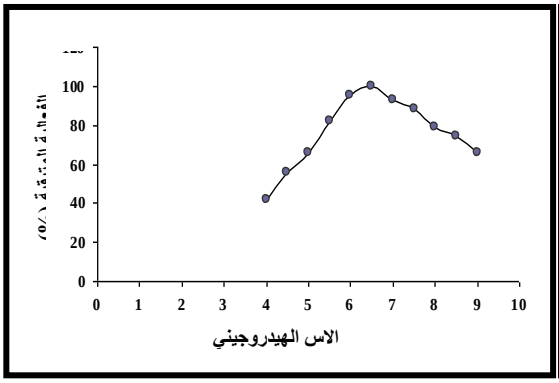
جاءت هذه النتائج مشابهة لما توصل إليه [3] من أن الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم المنقى من فاكهة البشملة بلغ 6.5 باستعمال 4-methyl catecol مادة أساس ، وشهد الأنزيم انخفاضا واضحا عند قيم اس هيدروجيني اقل من 4.5 و أعلى من 8.5 ، وكان الأنزيم المنقى ثابتا في مدى اس هيدروجيني تراوح بين (6.5-8.5) وحافظ على 80% من فعاليته الأصلية إلا انه كان غير ثابت في اس هيدروجيني تحت 4 وفوق 9.5 ، وما أشار إليه [1] من أن قيمة الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم المنقى من النعناع بلغت 7 باستعمال Catechol مادة أساس والذي بين بان العديد من الأبحاث أشارت إلى أن أقصى فعالية لأنزيم PPO المنقى من مصادر عدة تتراوح بين 4-7 ، وعند تحديد الاس الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم لوحظ احتفاظ الأنزيم بـ95% من فعاليته الأصلية عند اس هيدروجيني تراوح بين (6- 7) وعند اس هيدروجيني مقداره (4 ، 5) انخفضت الفعالية المتبقية لتصل إلى (47 ، 59)% على التوالي ، وبينما وصلت إلى 33% عند اس هيدروجيني مقداره 9 ، في حين ذكر [2] أن الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم المنقى من بذور زهرة الشمس بلغ 7.9 باعتماد Gallic acid مادة أساس ، بينما كان الأنزيم ثابتا بعد 20 ساعة من الحضن بمحاليل دارئة ذات قيم اس هيدروجيني تراوحت بين (2-11) بدرجة حرارة 4م ، وبقي الأنزيم محافظا على كامل

فعاليته عند اس هيدروجيني تراوحت قيمته بين (4.8-7.9) ، إلا انه بدا بالانخفاض بعد هاتين القيمتين بشكل واضح وتدريجي .

يلاحظ مما سبق أن قيم الاس الهيدروجيني للفعالية والثبات تختلف باختلاف مصدر الأنزيم والمادة الأساس المستعملة في تقدير الفعالية الأنزيمية [3] ، فقد أشار [20] إلى أن قيمة الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم المنقى من الباقلاء بلغت 6.5 للأنزيم المنقى من الباقلاء ، في حين كانت 7 للأنزيم المنقى من أوراق التبغ [5] ، بينما أشار [4] إلى أن الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم المنقى من السفرجل كان 8 باستعمال Catecol مادة أساس ، ويعزى السبب في انخفاض الفعالية الأنزيمية عند قيم الاس الهيدروجيني المتطرفة إلى حدوث تغييرات واضحة في هيئة الأنزيم أو الموقع الفعال مما يؤدي بموجبها إلى فقدان الفعالية الأنزيمية نتيجة فقدان الشكل الثنائي والثلاثي ، إذ يؤثر التغيير في قيم الاس الهيدروجيني على المجاميع الفعالة القابلة للتأين والموجودة في جزيئة الأنزيم أو على الحالة الايونية للمادة الأساس [7] .



شكل (1): تأثير الاس الهيدروجيني في فعالية أنزيم PPO المنقى من نبات الخس الشوكي



شكل (2): تاثير الاس الهيدروجيني في ثبات أنزيم PPO المنقى من نبات الخس الشوكي

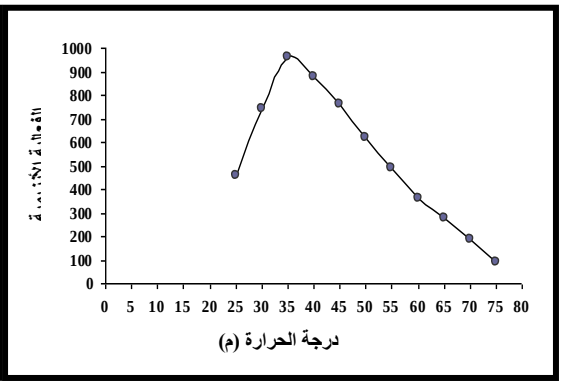
تأثير درجة الحرارة في فعالية وثبات الأنزيم وتحديد طاقة التنشيط:

يشير شكل (3) إلى حصول زيادة واضحة في الفعالية الأنزيمية بازدياد درجة حرارة التفاعل حتى بلغت أقصاها عند درجة حرارة 35م ثم انخفضت الفعالية بشكل تدريجي حتى بلغت حوالي 11% من فعالية الأنزيم القصوى عند درجة حرارة 75 م ، ويلاحظ من شكل (4) أن طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الأساس إلى ناتج بلغت 39.7194 كيلو جول.مول$^{-1}$ ، في حين يبين شكل (5) أن الأنزيم كان ثابتا بدرجة حرارة 35م لمدة 10 دقائق ، إلا أن فعاليته بدأت بالتناقص مع ازدياد درجة الحرارة، إذ فقد الأنزيم (8 ، 17 ، 24 ، 41 ، 56 ، 76 ، 96)% من فعاليته الابتدائية عند درجة حرارة(40 ، 45 ، 50، 55 ، 60 ، 65 ،70) م على التوالي .

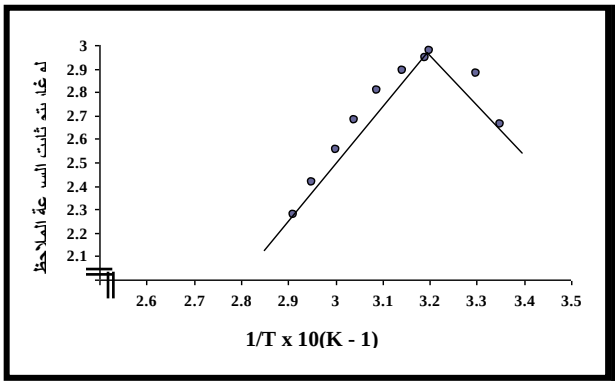
يؤدي ازدياد درجات الحرارة إلى حصول تغييرات واضحة في مكونات التفاعل التي تضم كل من الأنزيم والمادة الأساس مما يؤدي إلى حصول زيادة مستمرة في فعالية الأنزيم بسبب زيادة فرصة حدوث التصادمات نتيجة زيادة الطاقة الحركية لجزيئات المواد المتفاعلة بفعل تأثير درجات الحرارة إلا أن ازدياد درجة الحرارة عن الدرجة الحرارية المثلى للتفاعل تؤدي إلى حدوث انخفاض في الفعالية الأنزيمية بسبب تأثيرها بشكل سلبي في مكونات التفاعل [7] .

تباينت القيم المسجلة لدرجة الحرارة المثلى للفعالية والثبات الأنزيمي اعتمادا على مدى نقاوته والمصدر المنقى منه ، إذ بين [4] أن درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم المنقى من السفرجل بلغت 40م عند اس هيدروجيني مقداره 8 باستعمال الـCatechol مادة أساس ، وفقد الأنزيم حوالي 20% من فعاليته الأصلية بدرجة حرارة 60م وحوالي 65% من فعاليته بدرجة حرارة 70م لمدة 30 دقيقة ، وذكر [5] أن درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم المنقى من أوراق التبغ بلغت 40 م ، وأشار [10] إلى أن درجة الحرارة المثلى للفعالية كانت 55م في حين كانت درجة حرارة الثبات 35م للأنزيم المنقى من الروبيان ، إذ أشار إلى أن الزيادة في الفعالية كانت بحوالي 20% لكل 10 درجة مئوية حتى الوصول إلى قمة الفعالية وبعدها يبدأ الانخفاض بشكل ملاحظ بسبب حدوث مسخ للأنزيم ، ووجد [2] أن درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم المنقى جزئيا من بذور زهرة الشمس بلغت 45م ، وكانت قيمة طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الأساس إلى ناتج قد بلغت 52.8 كيلو جول/مول واظهر الأنزيم ثباتا لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 45م ، وعند حضنه بدرجة حرارة 65 م لمدة 20 دقيقة فقد الأنزيم حوالي

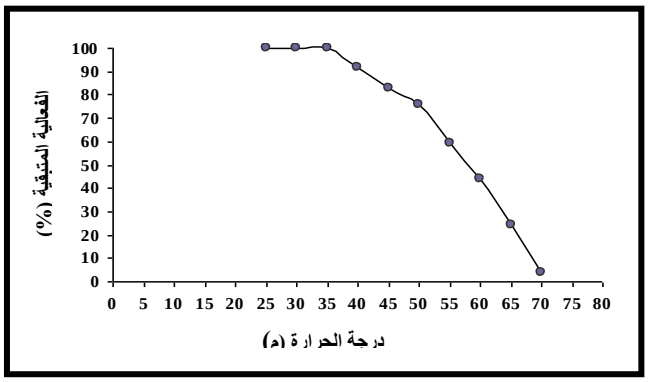
40% من فعاليته الأصلية ، إلا انه فقد 50% من فعاليته بعد مرور 15 دقيقة على الحضن بدرجة حرارة 80م ، في حين فقد الأنزيم فعاليته بشكل تام بعد مرور 10 دقائق على الحضن بدرجة حرارة 100م ، بينما توصل [5] إلى أن درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم المنقى من ثمار البشملة كانت 35م ، وعند دراسة الثبات الحراري لاحظ بان الأنزيم كان ثابتا لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 35م إلا انه فقد 60% من فعاليته عند حضنه بدرجة حرارة 65م لمدة 30 دقيقة ، في حين فقد الأنزيم 80% من فعاليته بعد مرور 10 دقائق على الحضن بدرجة حرارة 80م ، في حين أوضح [1] أن درجة الحرارة المثلى للأنزيم المنقى من النعناع كانت 30م باستعمال الـCatechol مادة أساس ، وكان الأنزيم ثابتا في درجات الحرارة المنخفضة إلا انه غير ذلك في درجات الحرارة العالية ، حيث لم يؤثر التسخين بدرجة حرارة 30م لمدة 30 دقيقة على فعالية الأنزيم بينما سبب رفع درجة الحرارة حدوث انخفاض واضح في الفعالية الأنزيمية ، إذ أثرت درجات الحرارة (40-60) م لمدة 30 دقيقة على فعالية الأنزيم بشكل سلبي مسببة انخفاضا مقداره (17 ،52) % من الفعالية الأصلية ، في حين فقد الأنزيم 50% من فعاليته الأصلية عند تعرضه لدرجة حرارة مقدارها(70 ،80) م لمدة (6.5 ،1.5) دقيقة على التوالي .



شكل (3): تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيم PPO المنقى من نبات الخس الشوكي



شكل (4): منحنى أرينوس لتقدير طاقة التنشيط لأنزيم PPO المنقى من نبات الخس الشوكي



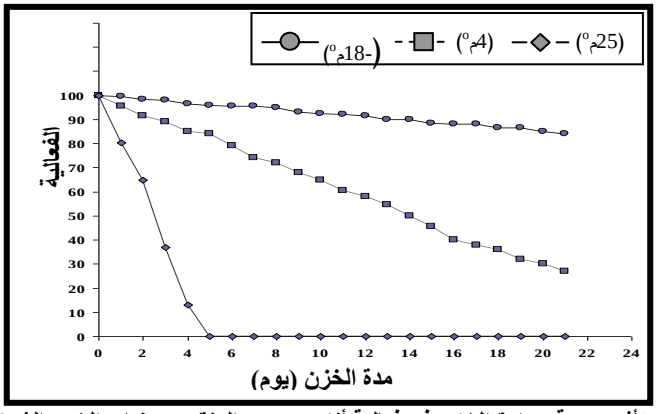
شكل (5): تأثير درجة الحرارة في ثبات انزيم PPO المنقى من نبات الخس الشوكي دقائق10م لمدة 25-70بدرجات حرارة

تأثير درجة حر

يلاحظ من شكل (6) ان الانزيم المنقى فقد فعاليته بشكل تام بعد مرور 5 ايام على الخزن بدرجة حرارة 25م ، في حين فقد ما يقارب من 73% من فعاليته الابتدائية بعد مرور 21 يوم على الخزن بدرجة حرارة 4م ، إلا انه احتفظ بـ84% من فعاليته الابتدائية بعد مرور 21 يوم على الخزن بدرجة حرارة التجميد -18 م .

تسبب العديد من العوامل المتداخلة تحديد قدرة الأنزيم على الثبات خلال مدة الخزن ، إذ تعد درجة الحرارة والقوة الايونية للمحاليل الدارئة المستعملة في خزن الأنزيم ويكون لها دور كبير في ثبات الأنزيم تحت ظروف الخزن بسبب حاجة الشكل الفعال لجزيئة الأنزيم إلى قوة ايونية محددة تضمن بقاءه بشكل ملائم لاتمام عملية الربط والتحليل ، فقد بين [1] أن خزن الأنزيم المنقى من النعناع لمدة 21 يوما بدرجة حرارة 25م باس هيدروجيني مقداره 7 أدى إلى فقدان الأنزيم فعاليته بشكل كامل بعد مرور 4 أيام ، وفي درجة حرارة خزن مقدارها 4م فقد الأنزيم 20% من فعاليته خلال أول 5 أيام ، بينما فقد اكثر من 80% من فعاليته بعد مرور 12 يوما ، بينما كان الأنزيم المخزون بدرجة حرارة -15م

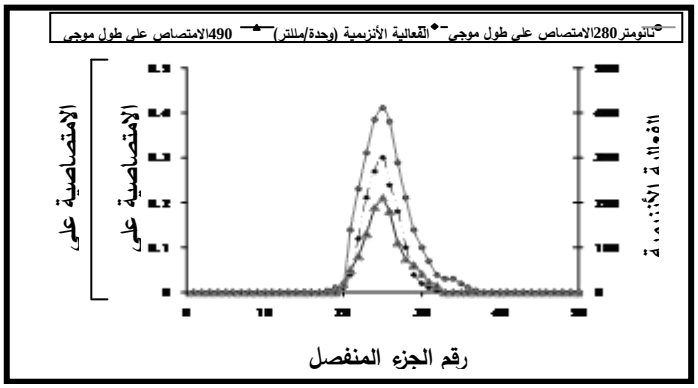
اكثر ثباتا ، إذ فقد ما مقداره 10% من فعاليته الابتدائية بعد 6 أيام ، بينما فقد فعاليته بشكل كامل بعد انقضاء 21 يوما على الخزن .



شكل (6): تأثير درجة حرارة الخزن في فعالية أنزيم PPO المنقى من نبات الخس الشوكي بدرجات حرارة -18، 4، 25م لمدة 7 أيام

دراسة محتوى الكربوهيدرات

يوضح شكل (7) وجود ارتباط تساهمي بين الجزء الكربوهيدراتي والبروتيني في الأنزيم المنقى باستعمال عمود الترشيح الهلامي Sephacryl (S-200) وذلك من خلال ظهور تطابق تام بين قمة البروتين على طول موجي مقداره 280 نانومتر والفعالية الأنزيمية على طول موجي مقداره 420 نانومتر وقمة الكربوهيدرات على طول موجي مقداره 490 نانومتر بالرغم من استعمال محلول دارئ ذي قوة ايونية عالية ، إذ لو لم يكن الارتباط تساهمي لانفك الجزء الكربوهيدراتي وظهر في قمة تختلف عن قمة البروتين والفعالية [18] ، وعند تقدير الكربوهيدرات بطريقة الفينول–حامض الكبريتيك اتضح بان الأنزيم المنقى يحوي على 7.2% كربوهيدرات ، وقد أشار [2] إلى أن نسبة الكربوهيدرات بلغت 6.7% للأنزيم المنقى من بذور زهرة الشمس عند تقديرها بطريقة الفينول حامض الكبريتيك .



شكل (7): الكشف عن وجود ارتباط تساهمي بين الانزيم والكاربوهيدرات بأستعمال تنقية الترشيح الهلامي بوساطة عمود Sephacryl S-200 ذي ابعاد 60x1.5 سم وبسرعة جريان مقدارها 18 مللتر/ساعة وبواقع 3 مللتر/جزء، وجرت الموازنة والاسترداد باستعمال محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.3 مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 7

بين جدول (1) تاثير بعض المواد في فعالية انزيم PPO المنقى ، إذ لوحظ تباين تاثير تلك المواد بشكل واضح ، فقد اظهر استعمال كلا من L-Cystein و Sodium metabisulphate و Dithiothretol بتركيز 1 ملي مولار نسبة تثبيط مقدارها (97 ، 98 ، 92)% على التوالي ، بينما لوحظ أن الفعالية الأنزيمية ثبطت بنسبة 100% عند استعمال تركيز 10 ملي مولار من هذه المواد، وعند استعمال كلا من و Ctric acid و L-Ascorbic acid بتركيز 1 ملي مولار كانت نسبة التثبيط (78 ، 75)% على التوالي ، في حين ازدادت نسبة التثبيط عند زيادة التركيز إلى 10 ملي مولار لتبلغ (96 ، 93)% على التوالي ، كما كان لاستعمال كلا من و EDTA و Potassium cyanide بتركيز 1 ملي مولار دورا في تثبيط الأنزيم ، إذ بلغت نسبة التثبيط (59 ، 41)% على التوالي، بينما كانت نسبة التثبيط عند استعمال تركيز مقداره 10 ملي مولار (86 ، 87)% على التوالي ، بينما اظهر استعمال كلا من Thiourea و Sodium benzoate بتركيز 1 ملي مولار تثبيطا بلغت نسبته (35 ، 37)% على التوالي ، في حين كانت نسبة التثبيط عند تركيز 10 ملي مولار (84 ، 16)% على التوالي .

جدول (1): تأثير المواد المثبطة بتراكيز 1 و 10 ملي مولار في فعالية أنزيم PPO المنقى من نبات الخس الشوكي

المواد المثبطة	التركيز (ملي مولار)	نسبة التثبيط (%)
أنزيم غير معامل	-	0
citric acid	1	78
	10	96
L-Ascorbic acid	1	75
	10	93
EDTA	1	59
	10	86
Thiourea	1	35
	10	84
2-Mercaptoethanol	1	29
	10	72
Potassium cyanide	1	41
	10	87
Sodium metabisulphate	1	98
	10	100
L-Cystein	1	97
	10	100
Dithiothretol	1	92
	10	100
Sodium benzoate	1	37
	10	61

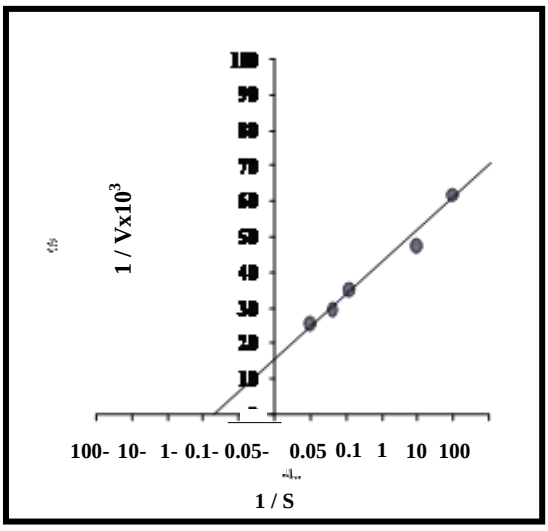
تعتمد قدرة المواد المثبطة على شدة تأثيرها في الجزئية الأنزيمية بشكل عام والموقع الفعال والعامل المساعد بشكل خاص فضلا عن تأثيرها في وسط التفاعل والمادة الأساس التي يعمل عليها الأنزيم ، وان التركيز المستعمل من هذه المثبطات يحدد شدة تأثيرها في خفض الفعالية الأنزيمية ، فقد أشار [8] إلى أن الأنزيم المنقى من جذور الموز ثبط بشكل قوي عند معاملته بـ Dithiothretol وSodium metbisulphate ، وبين [9] إن لمركبات Sodium diethyl dithiocarbamate و Sodium metabisulphate تأثيرا مثبطا قويا لفعالية الأنزيم المنقى من أوراق وسيقان نبات الحلتيت على التوالي ، وكلا هذين المثبطين يعدان من أنواع المثبطات التنافسية التي تنافس المادة الأساس على الارتباط بالموقع الفعال للجزيئة الأنزيمية وبالتالي من نشاط الأنزيم ، وذكر [3] انه استعمل أربع مثبطات تضمنت L-Cystein بتركيز 20-30 مايكرو مولار و Sodium azide بتركيز 10-50 ملي مولار و Benzoic acid بتركيز 3-5 ملي مولار و Sodium metbisulphate بتركيز 0.01-0.1 ملي مولار، وقد تم تثبيط الأنزيم بشكل كامل بوساطة الـ L-Cystein تلاه من ناحية التأثير لكل من Sodium metbisulphate و Benzoic acid و Sodium azide على التوالي ، ويعود تأثير كل من L-Cystein و Sodium metbisulphate إلى مجموعة الثايول التي تمتلكها هذه المركبات وهذا ما أكده [6] ، ولاحظ [4] أن كل من Sodium bisulphite و Ascorbic acid و L-Cystein و Potassium cyanide أدت إلى تثبيط الأنزيم المنقى من السفرجل بنسبة (100 ، 99 ، 98 ،52)% على التوالي عند استعمالها بتركيز 2 ملي مولار، وعند زيادة التركيز إلى 20 ملي مولار بلغت نسبة التثبيط (100، 100 ، 100 ، 98)% على التوالي ، وأكد [10] أن استعمال Sodium metabisulphate بتركيز 10 ملغم/مللتر أدى إلى تثبيط 30% من فعالية الأنزيم المنقى من سمك القريدس، في حين أدى استعمال نفس المادة بتركيز (80 ، 100) ملغم/مللتر إلى إحداث تثبيط كامل للفعالية الأنزيمية، ويعود السبب في قدرة مركبات Sulphite على التثبيط إلى آليات عدة من خلال اتحادها بشكل غير عكسي مع الكينون مسببا منع عملية البلمرة الخاصة بتكوين مركبات الصبغة ، كما يعمل على إحداث تحوير في شكل الجزيئة الأنزيمية، أو انه يعمل على اختزال الكينون، وعند استعماله للـSodium benzoate وجد أن نسبة التثبيط بلغت 70% باستعمال 0.1 غم/لتر ، فيما أشار [1] إلى أن استعمال Sodium metabisulphate أدى إلى تثبيط كبير في فعالية الأنزيم المنقى من النعناع

نتيجة فعله عاملا مختزلا للـ*o*-benzoquinones ، بينما كان لكل من Sodium diethyl dithiocarbamate و Potassium cyanide و Dithioerythritol تأثيرا مهما في تثبيط فعالية الأنزيم نتيجة ارتباطهم مع أيون النحاس الموجود في الموقع الفعال فضلا عن إمكانية تفاعل المركب الأول والثاني مع الـQuinone وتأثيره سلبا في الفعالية الأنزيمية ، وكان لـ Ascorbic acid دورا هاما في اختزال الكينون الابتدائي المتكون بفعل الأنزيم و إعادته مرة اخرى للشكل الأصلي Diphenol وبذلك يدور التفاعل في حلقة مفرغة قبل وصوله إلى المرحلة الثانية التي تؤدي إلى إنتاج اللون البني ، بينما لاحظ [2] أن مركبات الـThiiol مثل Dithiothreitol (DTT) بتركيز 0.05 ملي مولار والـCystein بتركيز 0.1 ملي مولار و 2-Mercaptoehanol بتركيز 0.05 ملي مولار و Sodium metabisulphate بتركيز 0.1 ملي مولار أعطت نسب تثبيط مقدارها (36 ،61.8 ، 69.1 ، 42.4)% للأنزيم المنقى من بذور زهرة الشمس ، إذ تعمل مجموعة السلفهيدريل الموجودة في هذه المركبات على تحوير مركبات الكينون وبذلك تمنعها من المشاركة في تفاعلات المرحلة الثانية من تفاعلات الاسمرار ، كما يمكن أن تتفاعل مجموعة السلفهيدريل بشكل مباشر مع الأنزيم وبذلك تمنع اتصاله بالمادة الأساس وتحليلها .

يعود تأثير هذه المثبطات إلى قدرتها في إحداث تغيرات في الجزيئة الأنزيمية ، إذ يعمل Potassium cyanide على التداخل مع العامل المساعد لعمل الأنزيم (النحاس) ويؤدي إلى ربطه وبالتالي منع الأنزيم من تحليل المادة الأساس ، بينما يكون للـ Ascorbic acid دورا هاما في عملية الأكسدة عن طريق تغييره مجموعة الأمين في القرب Close proximity للموقع الفعال في الأنزيم من خلال تفاعل تدهور ستريكر Strecker degradation الذي يعمل على تحويل مجموعة الأمين إلى مجموعة الدهايد وبالتالي يعيق عمل الأنزيم في تحليل المادة الأساس ، بينما يكون لكل من Sodim bisulphate و L-Cystein تداخل وتفاعل مباشر مع مجموعة السلفهيدريل مع اختزال *o* –quinone ، ويعد الـL-Cystein أحد الأحماض الأمينية الأساسية الطبيعية لذا فهو غير سام ويستعمل في صناعة الأغذية كما في Ascorbic acid ، لذلك فانه يمكن استعماله بشكل آمن لمنع نشاط هذا الأنزيم والحد من الاسمرار الذي يسببه في منتجات الأغذية [4] .

الثوابت الحركية لأنزيم PPO

يشير الشكل 8 إلى أن قيمة ثابت ميكالس (Km) بلغت 4.762 ملي مولار بينما كانت السرعة القصوى (Vmax)0.0588 ملي مولار/دقيقة للأنزيم المنقى باستعمال Catechol مادة أساس ، في حين كانت معامل (Km/Vmax) لأنزيم PPO المنقى 0.01235 دقيقة$^{-1}$.



شكل (8): تعيين الثوابت الحركية بطريقة لاينويفر-بيرك لأنزيم PPO المنقى من نبات الخس الشوكي باستعمال Catechol مادة أساس بتراكيز تراوحت بين 0.05-100 ملي مولار

تمثل قيمة Km و Vmax أحد الأدلة المهمة لمعرفة مدى آلفة الأنزيم تجاه المادة الأساس وكذلك فان لمعامل Km/Vmax دورا هاما في تحديد آلفة الأنزيمات وتخصصها تجاه أنواع عدة من المادة الأساس ، إذ أشار [9

إلى أن قيمة Km و Vmax للأنزيم المنقى من أوراق نبات الحلتيت بلغت 2.34 ملي مولار و 8541 وحدة/مللتر باستعمال Catechol مادة أساس ، بينما كانت تلك القيم للأنـزيم المنقى مـن الساق 2.89 ملـي مولار و 5308 وحدة/مللتر على التوالي باستعمال Epicatechin (-) مـادة أساس ، في حين بين [12] أن الأنزيم المنقى من ثمار القهوة أعطى قيمة Km مقدارها 0.14 ملي مولار باستعمال Chlorogenic acid في حين بلغت 1.36 ملي مولار باستعمال Catechol مادة أساس ، بينما بلغت 6.16 ملي مولار باستعمال Pyrogallic acid مادة أساس ، وذكـر [3] أن قيمة Km و Vmax لـلأنزيم المنقى من ثمار البشملة بلغت 5.7 ملي مولار و 88.0 مايكرو مولار على التوالي باستعمال Catechol مادة أساس ، في حين كانت قيمة $Vmax/Km.min^{-1}$ $0.0154\ min^{-1}$، وتوصل [4] إلى أن قيمة Km للأنزيم المنقى من السفرجل بلغت 4.54 ملي مولار باستعمال Catechol مادة أساس بينما بلغت (7.35 ، 17.8) ملي مولار باستعمال كل من Pyrogallol و L-DOPA على التوالي، في حين كانت قيمة Vmax (3125، 1674 ، 1110) وحدة/ملغم بروتين على التوالي ، وبين [1] أن قيمة Km و Vmax للأنزيم المنقى من النعناع بلغت 6.25 ملي مولار و 15047 وحدة دولية/ملغم/دقيقة باستعمال Catechol مادة أساس ، وأشار [5] أن قيمة Km للأنزيم المنقى من أوراق التبغ بلغت 6.8 ملي مولار باستعمال Catechol مادة أساس ، في حين ذكر [2] أن قيمة Km للأنزيم المنقى من بذور زهرة الشمس بلغت 1.11 ملي مولار باستعمال Gallic acid مادة أساس .

يلاحظ أن أنزيم PPO يعمل على تحليل مركبات الفينول الأحادية والثنائية ، إلا أن الفته العالية لربط المادة الأساس تكون تجاه جزيئات الفينول المتعددة الثنائية الصغيرة مثل Catechol و 4-Methl catechol و L-DOPA بينما تكون الفته تجاه جزيئات الفينول المتعددة الثنائية الأكبر قليلة مثل Epicatechin و DHPPA [2;4;12;9].

المصادر

1. Kavrayan, D. and Aydemir, T. (2001). Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). Food Chemistry. 74: 147-154.
2. Raymond, J.; Rakariytham, N. and Azanza, J. (1993). Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. Phytochemistry. 34(4): 927-931.
3. Dincer, B.; Colak, A.; Aytin, N.; Kadioglu, A and Guner, S. (2002). Characterization of polyphenoloxidase from medlar frutis (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). Food Chemistry. 77:1-7.
4. Yagar, H. and Sagiroglu, A. (2002). Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. Turk. J. Chem. 26: 97-103.
5. Shi, C.; Dai, Y.; Xia, B.; Xu, X.; Xie, Y. and Liu, Q. (2001). The purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. Plant Molecular Biology Reporter. 19: 381a–381h.
6. Yang, C. P.; Fuita, S.; Ashrafuzzaman, M. D.; Nakamura, N. and Hayashi, N. (2000). Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 48: 2732-2735.
7. Whitaker, J. R. (1991). Ezymes In Analytical Chemistry. In: Fox, P. F. Food Enzymology. Elsevier Applied Science. New York. 287-308.
8. Wuyts, N.; De Waele, Dirk. And Swennen, R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. Plant Physiology and Biochemistry. 44(5-6): 308-314.
9. Erat, M.; Halis Sakiroglu, H. and Kufrevioglu, O. I. (2005). Purification and characterization of polyphenol oxidase from Ferula sp. Food Chemistry. 95(3): 503-508.

10. Montero, P.; Avalos, A. and Perez-Mateos. (2001) Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressur treatment. Food Chemistry. 75: 317-324.

11. Mazzafera, M. and Robinson, S. P. (2000). Characterization of polyphenol oxidase in coffee. Phytochemistry. 55: 285-296.

12. Goulart, P. D. F. P.; Alves, J. D.; Magalhaes, M. M.; Lima, L. C. D. O. and Meyer, L. E. (2003). Purification of polyphenoloxidase from coffee fruits. Food Chemistry. 83: 7-11.

13. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-285.

14. Wrigley, C. W. (1971). Electrofocusing. In: Methods in Enzymology. Vol. 22 (eds: W. B. Jokoby). Academic press, New York.

15. Coseteng, M. Y. and Lee, C. Y. (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relatio to degree of browning. Journal of Food Science. 52: 985.

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

17. Segel, I. H. (1975). Enzyme Kinetics, Behavior Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Systems. Wiley Interscience, New York.

18. Al-Bakir, A. Y. and Whitaker, J. R. (1978). Purification and chracterization of invertase from dates (*Phoenix dactylifera* L.var Zahdi). J. Food Biochem. 2: 133-160.

19. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamiton, J. K.; Robers, P. A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 228(3): 350-356.

20. Paul, B. and Gowda, L. R. (2000). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). Journal of Agriculture and Food Chemistry. 48: 3839-3846.