

استخلاص إنزيم البيروكسيداز من بذور بعض النباتات العائدة للعائلات النباتية النجيلية والبقولية والباذنجانية ودراسة خواصه الكيموحيوية من المصدر المنتخب

عبد الحكيم دحام*
كلية الزراعة-جامعة الأنبار

غازي منعم عزيز
كلية العلوم-جامعة بغداد

خالد فاروق الراوي
كلية العلوم-جامعة الأنبار

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف استخلاص إنزيم البيروكسيداز من بذور عشرة أنواع من النباتات التابعة إلى ثلاث عائلات هي: البقولية (العدس والماش والفسق) والباذنجانية (الفلل الحار والفلل البارد والذاتورا والباذنجان البري) والنجيلية (الهرطمان والدخن اللؤلؤي والدخن بروسو) وتم توصيف الإنزيم وتحديد خواصه البيولوجية، كان مستخلص بذور الدخن بروسو باستخدام دارئ الفوسفات بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7 قد أعطى أعلى فعالية نوعية بلغت 3.35 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ مقارنة بالبذور الأخرى، وعند تحديد الظروف المثلى للاستخلاص سجل داري خلات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6 أفضل محلول استخلاص لإنزيم البيروكسيداز من بين ثلاثة أنواع من المحاليل الدائرية بمدى رقم هيدروجيني 4.5-9 بتركيزين 0.1 و0.2 مولار إذ بلغت الفعالية النوعية 8.06 وحدة. ملغم بروتين⁻¹، سجلت نسبة الاستخلاص 1: 4 (وزن: حجم) أقصى فعالية نوعية بلغت 5.98 وحدة. ملغم بروتين⁻¹، كما بينت النتائج إن الزمن الأمثل للاستخلاص كان 30 دقيقة بفعالية نوعية قدرها 7.11 وحدة. ملغم بروتين⁻¹. استعملت طريقة الترسيب (التركيز) بكبريتات الأمونيوم بنسب إشباع متدرجة من 30% إلى 90% ولوحظ إن أعلى فعالية نوعية كانت عند نسبة الإشباع 80% إذ بلغت 11.29 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ بعدد مرات تنقية 1.66 وحصيلة إنزيمية 70%.

Extraction of Peroxidase from Seeds of Some Plants belonging to Gramineae, Fabaceae and Solanaceae Families and Study of Biochemical Characteristics from the Selected Source

Khalid F. Al-Rawi
Coll. of Sci- Univ. of Anbar

Gazi M. Aziz
Coll. of Sci-Univ. of Baghdad

Abdulahkem D. Hussien*
Coll. of Agri.- Univ. of Anbar

Abstract

This study was conducted in order to extract peroxidase from seeds of 10 plants belonging to 3 families; Fabaceae (Mung bean, Lentils and Peanut), Solanaceae (Chili pepper, Bell pepper, Datura and wild eggplant), Poaceae (Oat, pearl millet and proso millet). the enzyme was qualified and its kinetic constants were assessed. Extract prepared from proso millet seeds using phosphate buffer 0.1M at pH7 contained the highest specific activity 3.35 U. mg.protein⁻¹ as compared with seeds of other plants. In

* البحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الثالث

determination of optimum condition of enzyme extraction, three kinds of buffer solutions at two concentrations 0.1 and 0.2M within pH range 4.5-9 were used. Sodium acetate at pH 6 at 0.1M concentration gave the best results for enzyme extraction with specific activity of 8.06 U. mg.protein⁻¹. The ratios of 1:4 recorded the best specific activity 5.98 U. mg.protein⁻¹. Results showed that the optimum period of extraction was 30 min. with specific activity of 7.11 U. mg.protein⁻¹. Precipitation with saturated solution of ammonium sulfate (30-90%) was used. the highest specific activity was noticed in saturation percent 80% and was 11.29 U. mg.protein⁻¹ with purification fold of 1.66 and enzymatic yield of 70%.

المقدمة

تعد النباتات البذرية القليلة الأكثر تطوراً في مملكة النبات وتستخدم البذور للتكاثر وتحتوي على مركبات حيوية يمكن الاستفادة منها في جوانب تطبيقية مختلفة، وتعد العديد من أنواع البذور مصادر هامة لاستخلاص طيف واسع من تلك المركبات، والإنزيمات إحدى أهم هذه المركبات. يعد البيروكسيديز 1.11.1.7 من الإنزيمات الهامة في الأنظمة الحيوية في الكائنات الحية الهوائية وهو أحد إنزيمات الأكسدة والاختزال الذي يحفز تحويل بيروكسيد الهيدروجين إلى الماء مخلصاً خلايا الكائن الحي من أضراره إذ إن بقاء بيروكسيد الهيدروجين في الخلايا يعني إمكانية مهاجمة المركبات الحيوية داخل الخلية وتعطيل العديد من الفعاليات الحيوية فيها كونه مصدراً للجذور الحرة، وتتميز بعض أنواع النباتات بارتفاع فعالية إنزيم البيروكسيديز فيها مما يجعلها مصادر جيدة لاستخلاص هذا الإنزيم (30، 14). وتتباين المصادر النباتية في محتواها من إنزيم البيروكسيديز كما يتباين النبات الواحد في محتوى البيروكسيديز في الأجزاء المكونة له. من جانب آخر يتباين الجزء النباتي نفسه في محتواه من البيروكسيديز حسب عمر النبات، لذلك فإن من عوامل نجاح استخلاص إنزيم البيروكسيديز حسن اختيار المصدر النباتي والجزء المطلوب من النبات والعمر (27).

تناولت الكثير من البحوث دراسات تطبيقية لإنزيم البيروكسيديز في عدة مجالات مثل الزراعة، الصناعة، الصيدلة والطب وغيرها. ففي مجال الزراعة ذكرت دراسة (23) إمكانية استخدام إنزيم البيروكسيديز في تقليل سمية المبيدات الزراعية، وفي المجال الصناعي ادخل في صناعة الورق عاملاً مزيلاً للألوان (16)، وأشارت بعض الدراسات إلى استخدام إنزيم البيروكسيديز في عمليات معالجة المياه الحارة على المركبات الفينولية في المياه في مصانع تصفية الزيوت والبلاستيك والحديد والنسيج (5)، كما استخدم في إزالة البيروكسيد عند تصنيع عدة أنواع من المركبات الأروماتية والغذائية (29). واستخدم البيروكسيديز في بعض التحاليل السريرية، كما في تقدير حامض اليوريك والكلوكوز والكوليسترول (13). وقع الاختيار على البذور مصدراً لاستخلاص الإنزيم لرخص ثمن معظمها وتوفرها في الأسواق على مدار السنة وقابلية حفظها التي تمتد لمدة طويلة.

تعتمد عملية فصل الإنزيم على تمايز الذوبان في محاليل مختلفة للإنزيم موضوع الدراسة وللبروتينات الأخرى المتنوعة والموجودة كملوثات، وتبدأ الخطوة الأولى بهرس النسيج الذي يحتوي على الإنزيم ثم النبذ المركزي

لإزالة المواد غير الذائبة وفي بعض الحالات فإن المعاملة القصيرة بدرجة حرارة تصل إلى 50°م للمحلول الغروي الناتج تؤدي إلى تخثر البروتينات غير المرغوب فيها والقابلة للتغير بالحرارة مما يؤدي إلى تركيز الإنزيم (4). تعد خطوة تركيز المستخلصات الإنزيمية الخطوة الأولى من التنقية للتخلص من أكبر كمية ممكنة من الماء، وتتم خطوة التركيز بوسائل منها الترسيب باستخدام المذيبات العضوية مثل الأسيتون والأملاح اللاعضوية مثل كبريتات الأمونيوم التي ترسب البروتينات من محاليلها بظاهرة التملح الخارجي (Salting out) (21). نظرا للأهمية الكبيرة لإنزيم البيروكسيداز في عدة مجالات صناعية أجريت الدراسة الحالية باستخدام بذور عدد من العائلات النباتية المتوفرة في الأسواق المحلية والمتمثلة بالبقولية والباذنجانية والنجيلية. هدفت الدراسة الى اختيار أفضل المصادر إنتاجاً للبيروكسيداز وتحديد الظروف المثلى لعملية الاستخلاص للمصدر المنتخب وتنقية البيروكسيداز منه باستخدام تقنية الترسيب باستعمال كبريتات الأمونيوم.

المواد وطرائق العمل

جمعت بذور النباتات المبينة في الجدول 1 من الأسواق المحلية 2013 وتم تنظيفها من الأتربة والأجزاء المتبقية من النبات وخزنت في حافظات محكمة لحين استخدامها. استخدمت مواد ذات نقاوة عالية في البحث متمثلة بفوسفات البوتاسيوم أحادية وثنائية الهيدروجين وكبريتات الأمونيوم وصبغة كوماسي الزرقاء G250 من شركة ميرك Merck والكوايكل وبيروكسيد الهيدروجين من Fluka وخلات الصوديوم وترس-حامض الهيدروكلوريك وحامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم من BDH والبومين مصل الأبقار من Sigma، وحضرت في المختبر بالتراكيز المطلوبة المشار إليها في طريقة العمل.

جدول 1 أسماء بذور النباتات والعائلات العائدة لها التي تم دراستها

ت	اسم النبات	الاسم العلمي	العائلة	ت	اسم النبات	الاسم العلمي	العائلة
1	فلفل حار	<i>Capsicom annuum</i>	الباذنجانية	6	عدس	<i>Lens culinaris</i>	البقولية
2	فلفل بارد	<i>Capsicom annuum</i>	الباذنجانية	7	فستق الحقل	<i>Arachis hypogaea L.</i>	البقولية
3	داتورا	<i>Datura stramonium L.</i>	الباذنجانية	8	هرطمان	<i>Avena sativa L.</i>	النجيلية
4	باننجان بري	<i>Solanum elaeagnifolium</i>	الباذنجانية	9	الدخن اللؤلؤي	<i>Pennisetum glaucum</i>	النجيلية
5	ماش	<i>Vigna radiata</i>	البقولية	10	دخن بروسو	<i>Panicum miliaceum</i>	النجيلية

أضيف محلول دارئ الفوسفات (0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7) الى البذور بنسبة 1: 5 (وزن: حجم) وسحقت باستخدام الخلاط الكهربائي لتمزيق الأنسجة الخلوية مع إيقاف الخلط بين فترة وأخرى لتجنب ارتفاع الحرارة بسبب عملية الخلط ثم نقلت إلى دورق ووضع النموذج في حمام ثلجي لمدة ساعة مع التحريك المستمر، فصل النموذج باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4°م وبسرعة 10000 دورة. دقيقة⁻¹ ولمدة 15 دقيقة لفصل الجسيمات ومخلفات الأنسجة والحصول على مستخلص صاف (9)، رشح المحلول وحفظ الراشح في الثلاجة لحين الاستخدام. أعيدت الخطوات أعلاه باستخدام الماء المقطر بدلاً من الدارئ. لغرض تحديد أفضل البذور

المدرسة محتوى من إنزيم البيروكسيداز تم حساب الفعالية النوعية للإنزيم المستخلص من بذور النباتات قيد الدراسة وذلك بحساب فعالية الإنزيم ونسبة البروتين.

قدرت فعالية البيروكسيداز تبعاً إلى طريقة ويتيكر. براند، حضر محلول المادة الفعالة بمزج نسبة واحدة من كل من الكوايكل 0.05 مولار وداري خلات الصوديوم 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 5.5 ومحلول بيروكسيد الهيدروجين 0.02 مولار مع 7 نسب من الماء المقطر 7:1:1:1، وضع 3 مل من المحلول في خلية جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer وتم اعتباره محلول كفق النموذج Blank وسجلت القراءة عند طول موجي 470 نانومتر (33). أضيف 0.1 مل من مستخلص الإنزيم إلى محلول المادة الفعالة في الخلية ومزج سريعاً بصورة جيدة كل 30 ثانية لمدة ثلاثة دقائق، رسمت العلاقة بين الامتصاصية والزمن ومنها حسب مقدار الميل Slope وطبقت العلاقة التالية لإيجاد فعالية الإنزيم لكل مستخلص (2).

الفعالية الإنزيمية (وحدة. ملتر⁻¹) = (الحجم الكلي للمحلول \ حجم المستخلص × عرض الخلية × الامتصاصية المولارية) × الميل
تم تقدير تركيز البروتين بموجب طريقة برادفورد وذلك بتحضير المنحني القياسي من البومين المصل البقري BSA باستعمال عدة تراكيز بالتخفيف من المحلول الخزين ، إذ تم سحب 100 مايكرو لتر من محاليل البومين المصل البقري المحضرة إلى أنابيب اختبار جديدة وأضيف لكل واحد منها 400 مليلتر من الداري ترس- حامض الهيدروكلوريك وأضيف للمزيج 2.5 مليلتر من صبغة الكوماسي الزرقاء G250 ومزجت بهدوء ، حفظت المحاليل في الظلام لمدة ربع ساعة بدرجة حرارة المختبر بعدها قيست الامتصاصية للمحاليل بطول موجي 595 نانومتر باستخدام محلول الكفاء (المحضر بمزج 500 مايكرو لتر من الداري و 2.5 مل لتر من الصبغة) ، رسم منحني القياس بين تركيز البروتين والامتصاصية ومنه حددت كمية البروتين في النماذج قيد الدراسة (7). قدرت الفعالية النوعية لإنزيم البيروكسيداز في المستخلصات من العلاقة الآتية:

$$\text{الفعالية النوعية (وحدة. ملغم بروتين}^{-1}\text{)} = \text{الفعالية الإنزيمية (وحدة. مل}^{-1}\text{)} \times \text{تركيز البروتين (ملغم. مل}^{-1}\text{)}$$

حدد الرقم الهيدروجيني والتركيز الأمثل لمحلول الاستخلاص باستعمال محاليل استخلاص مختلفة في استخلاص الإنزيم من النسيج النباتي شملت خلات الصوديوم برقم هيدروجيني 4.5 – 6 وفوسفات البوتاسيوم برقم هيدروجيني 6.5 – 7.5 وترس-حامض الهيدروكلوريك برقم هيدروجيني 8 – 9 وبتريزين هما 0.1 و 0.2 مولار، حسب الفعالية النوعية لإنزيم البيروكسيداز لاختيار محلول الاستخلاص الملائم للإنزيم من النسيج النباتي. استخلص إنزيم البيروكسيداز من بذور الدخن بروسو باستعمال دارئ الخلات بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6 بتطبيق نسب استخلاص متنوعة من (البذور: محلول الاستخلاص) شملت 1:1 لغاية 10:1، قيست الفعالية الإنزيمية في المستخلصات الخام الناتجة وحسبت الفعالية النوعية للإنزيم لتحديد أفضل نسبة لاستخلاص الإنزيم.

اختبرت أوقات مختلفة 0.5 و 1 و 1.5 و 2 و 2.5 و 3 ساعات لاستخلاص إنزيم البيروكسيداز من بذور الدخن باستعمال دارئ الخلات بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6 و قدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين في

المستخلص الخام للإنزيم وحسبت الفعالية النوعية لتحديد أفضل وقت لاستخلاص الإنزيم. أضيفت كبريتات الأمونيوم إلى كمية من المستخلص الإنزيمي للوصول إلى نسب إشباع مختلفة (30%، 40%، 50%، 60%، 70%، 80%، 90%) لتحديد نسبة الإشباع الأمثل من كبريتات الأمونيوم اللازمة لترسيب الإنزيم، حيث أضيفت كبريتات الأمونيوم تدريجياً إلى المستخلص في حمام ثلجي مع التحريك المستمر لمدة ساعة ثم نبذ مركزياً بسرعة 800 دورة. دقيقة⁻¹ لمدة 20 دقيقة بدرجة 4°م، أهمل الراشح وأذيب الراسب بكمية محددة من دارئ الخلات (0,1 مولار ورقم هيدروجيني 6) وقدرت فعالية إنزيم البيروكسيداز ونسبة البروتين لتحديد نسبة الإشباع المثلى لترسيب أو تركيز الإنزيم (21).

النتائج والمناقشة

استخلاص البيروكسيداز من بذور النبات

قدرت فعالية إنزيم البيروكسيداز ونسبة البروتين الذائب في مستخلصات بذور العينات قيد الدراسة وحسبت الفعالية النوعية لها لتحديد المصدر الأغزر إنتاجاً لإنزيم البيروكسيداز تمهيداً لاستخدام المصدر المنتخب في التجارب اللاحقة. بينت النتائج (الجدولان 2 و 3) إن استخدام دارئ الفوسفات كمحلول استخلاص كان أفضل مقارنة بالماء في جميع البذور قيد الدراسة باستثناء الباذنجان البري والهرطمان فقد أعطى الباذنجان البري فعالية نوعية للبيروكسيداز 0.0041 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ أعلى مما في حالة استخدام الماء عند استخلاص الإنزيم مقارنة بدارئ الفوسفات الذي أعطى فعالية نوعية 0.0026 وحدة. ملغم بروتين⁻¹، أما في بذور الهرطمان فكانت الفعالية النوعية 0.233 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ عند الاستخلاص بالماء وهي أعلى مما في حالة الاستخلاص بدارئ الفوسفات 0.123 وحدة. ملغم بروتين⁻¹.

لوحظ كذلك وجود تقارب كبير بين نتائج استخلاص بذور العدس في حالة الاستخلاص بالماء ودارئ الفوسفات والتي أعطت فعالية نوعية متقاربة 0.05 و 0.042 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ على التوالي، وكانت فعالية إنزيم البيروكسيداز متقاربة نوعاً ما عند استخلاص الإنزيم من بذور الفلفل البارد فقد كانت 0.004 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ عند الاستخلاص بالماء و 0.0054 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ عند الاستخلاص بدارئ الفوسفات 0.1 مولار برقم هيدروجيني 7، يعزى التباين في النتائج إلى مصدر الإنزيم وطبيعته الوراثية وقوة ارتباطه بالنبات وكفاءة محلول الاستخلاص على إزالة الإنزيم من النسيج النباتي (20).

استخدم الماء كمحلول لاستخلاص إنزيم البيروكسيداز في الكثير من الدراسات منها دراسة كاندرشيخان (8) عند استخلاص إنزيم البيروكسيداز من الدخن اللؤلؤي ودراسة فينسنزو (31) على ألياف نبات شجرة الآمبو *Phytolacca dioica* L. وفي دراسات أخرى استخدمت المحاليل الدائرية في الاستخلاص برقم هيدروجيني متعادل 7 pH أو قريب من نقطة التعادل بتركيز مختلفة فقد استخدم دارئ الفوسفات بتركيز 10 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7 في استخلاص البيروكسيداز من الدخن اللؤلؤي (28) وبتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6 عند

استخلاصه من فاكهة البابايا *Carica papaya L.* (3)، في حين استخدم دارئ ترس حامض الهيدروكلوريك برقم هيدروجيني 6.8 وتركيز 0.01 مولار في عملية الاستخلاص من الدخن الأصبعي (Finger millet) *Eleusine coracana* (22).

جدول 2 الفعالية النوعية للبيروكسيد في مستخلصات البذور باستخدام الماء كمحلول استخلاص

ت	العائلة	النبات	الفعالية الإنزيمية وحدة. مل ⁻¹	الفعالية النوعية وحدة. ملغم ⁻¹	الفعالية الإنزيمية وحدة. غم بذور ⁻¹
1	البقولية	عدس	0.76	0.05	2.432
		ماش	0.0022	0.0001	0.0057
		فستق	0.0036	0.0017	0.0097
2	الباذنجانية	فلفل حار	0.026	0.0005	0.068
		فلفل بارد	0.24	0.004	0.6
		داتورا	0.0427	0.0006	0.094
		الباذنجان البري	0.300	0.0041	0.72
3	النجيلية	هرطمان	3.67	0.233	8.808
		دخن لؤلؤي	1.40	0.32	2.508
		دخن بروسو	1.88	0.68	4.7

جدول 3 الفعالية النوعية للبيروكسيد في مستخلصات البذور باستخدام محلول الاستخلاص دارئ الفوسفات بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7

ت	العائلة	النبات	الفعالية الإنزيمية وحدة. مل ⁻¹	الفعالية النوعية وحدة. ملغم ⁻¹	الفعالية الإنزيمية وحدة. غم بذور ⁻¹
1	البقولية	عدس	0.72	0.042	1.96
		ماش	0.1453	0.0045	0.392
		فستق	0.158	0.006	0.458
2	الباذنجانية	فلفل حار	0.34	0.0048	0.748
		فلفل بارد	0.36	0.0054	0.864
		داتورا	0.082	0.0012	0.164
		الباذنجان البري	0.175	0.0026	0.455
3	النجيلية	هرطمان	2.05	0.123	5.822
		دخن لؤلؤي	8.19	1.16	21.294
		دخن بروسو	11.42	3.35	33.118

أظهرت النتائج إن مستخلص بذور الدخن بروسو باستخدام دارئ الفوسفات كمحلول استخلاص هو الأغزر إنتاجاً للبيروكسيد مقارنة ببقية أنواع مستخلصات البذور للنباتات الأخرى فقد أعطى فعالية نوعية قدرها 3.35 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ كما بينت النتائج ان مستخلصات بذور الدخن اللؤلؤي تمتلك هي الأخرى نسب جيدة من البيروكسيد فقد أعطت بذور الدخن اللؤلؤي فعالية نوعية 1.16 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ في مستخلص الفوسفات

أما بقية العينات فقد كانت النتائج فيها ضعيفة من ناحية الفعالية النوعية مع أفضلية لبذور الهرطمان على باقي العينات.

يتضح من خلال النتائج ان بذور العائلة النجيلية تمتلك فعالية انزيمية ونوعية اعلى من بذور العائلتين البقولية والباذنجانية، وكانت الفعالية النوعية لمستخلصات بذور الداتورا والباذنجان البري قليلة مقارنة بباقي المستخلصات مع احتواءها على نسبة عالية من البروتين وهذا يعود الى كون هذين النباتين من ضمن النباتات الطبية التي تحتوي على تنوع عال من البروتينات والمواد الفعالة التي يؤثر وجودها على فعالية البيروكسيدز وطريقة استخلاصه بشكل كبير (6).

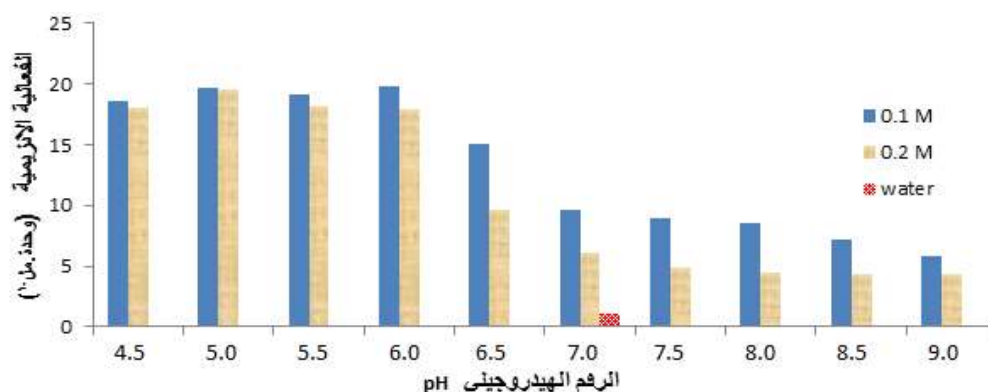
اختيار المذيب الأمثل للاستخلاص

استخدم الماء وثلاثة محاليل دائرية مختلفة الأرقام الهيدروجينية هي دارى خلات الصوديوم 4.5، 5، 5.5 و 6 ودارى فوسفات البوتاسيوم 6.5، 7 و 7.5 ودارى ترس حامض الهيدروكلوريك 8، 8.5 و 9 بتركيزين مختلفين 0.1 و 0.2 مولار لاختيار أفضل محلول لاستخلاص لإنزيم البيروكسيدز من المصدر المنتخب (بذور الدخن بروسو). بينت النتائج (الشكلان 1 و 2) وجود اختلاف في الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية للإنزيم اعتماداً على التغير في الرقم الهيدروجيني للوسط فضلاً عن نوع محلول الاستخلاص المستخدم وتركيزه، وأعطى دارى خلات الصوديوم ذو التركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6 أفضل النتائج لاستخلاص الإنزيم إذ بلغت الفعالية النوعية 8.06 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ تلاه نفس الدارى بالتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 5.5 والذي أعطى فعالية نوعية 7.81 وحدة. ملغم بروتين⁻¹،

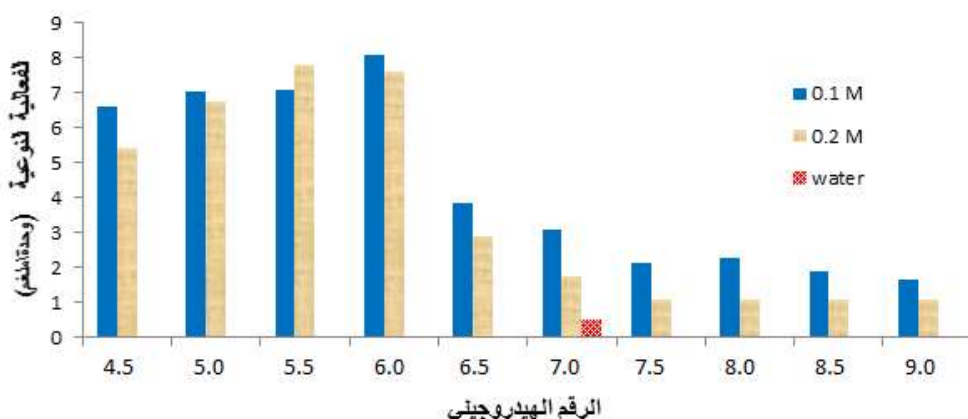
ولوحظ إن نسب الفعالية النوعية عند الاستخلاص بالأوساط الحامضية القريبة من نقطة التعادل كانت على العموم أفضل من الاستخلاص في الأوساط المعتدلة والقاعدية، يعود السبب في تباين هذه النتائج إلى إمكانية هذه المحاليل على إزالة الارتباطات بين الإنزيم والمركبات الخلوية الأخرى، فقابلية ذوبان الإنزيم في المحلول تعتمد على تركيبه الكيميائي وعلى الرقم الهيدروجيني حيث تقل قابلية الذوبان كثيراً عند نقطة التعادل كما إن موقع الإنزيم المراد فصله وهيئته داخل الخلايا إن كان حراً أو مرتبطاً بأجزاء أخرى يؤثر على ذوبانيته أيضاً (31)، وفي الأرقام الهيدروجينية عند أقل من 4 فإن انخفاض الفعالية النوعية يعزى إلى تحرر مجموعة الهيم من السلسلة البولي ببتيدية للإنزيم التي تسبب انخفاض الفعالية الإنزيمية، وفي رقم هيدروجيني أعلى من 9 كان سبب انخفاض الفعالية حدوث ارتباطات بين المجاميع الفينولية والقاعدة (11) وإن استخدام التركيزات العالية من الدارى المستخدم في الاستخلاص يؤثر سلباً في فعالية الإنزيم بسبب وجود وفرة من المجاميع الأيونية التي تعقد العمل التشيطي للإنزيم (15).

سجل استخدام الماء المقطر كمحلول لاستخلاص الإنزيم نتائج ضعيفة فقد كانت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية في أدنى مستوياتها 1.14 وحدة. مللتر⁻¹ و 0.52 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ على التوالي مقارنة بنتائج المحاليل الأخرى المستخدمة للاستخلاص في هذه الدراسة كما يظهر في الشكلين 1 و 2، ويعزى ذلك إلى عدم احتواء الماء

المقتر على القوة الأيونية من الأملاح أو وجودها بنسب طفيفة جداً والتي تؤدي دوراً أساسياً في عملية الاستخلاص من خلايا النبات (34).



شكل 1 الفعالية الإنزيمية لإنزيم البيروكسيداز في مستخلصات الدخن بروسو باستخدام الماء ومحاليل دائرة مختلفة الرقم الهيدروجيني بالتركيزين 0.1 و 0.2 مولار



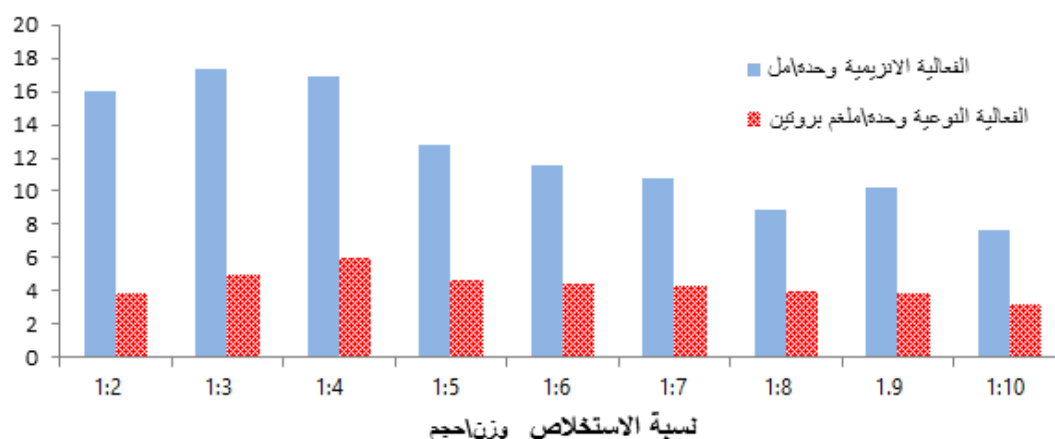
شكل 2 الفعالية النوعية لإنزيم البيروكسيداز في مستخلصات الدخن بروسو بنسبة 5:1 باستخدام الماء ومحاليل دائرة مختلفة الرقم الهيدروجيني بالتركيزين 0.1 و 0.2 مولار

درس تأثير استخلاص البيروكسيداز من أنسجة فاكهة *Spondias dulcis* باستخدام داري فوسفات الصوديوم ضمن المدى للرقم الهيدروجيني 3-9 وأشارت الدراسة إلى إن أفضل رقم هيدروجيني للاستخلاص هو 6.5 باستخدام الكوايكل كمادة أساس وأفضل تركيز للداري هو 0.2 مولار عند دراسة ثلاثة تركيزات 0.1 و 0.05 و 0.2 مولار (10). عند استخلاص البيروكسيداز من ثمرة الطماطم باستخدام داري الخللات بتركيز 0.1 مولار في مدى رقم هيدروجيني 4.5-9 كان أفضل رقم هيدروجيني للاستخلاص هو 5.5 (1)، أشارت دراسة أخرى على نبات الخبز إن لأفضل رقم هيدروجيني للاستخلاص هو 5 من داري خللات الصوديوم بتركيز 0.2 مولار (2).

تحديد النسبة المثلى للاستخلاص

اختير داري خللات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6 بوصفه المحلول الأمثل لاستخلاص إنزيم البيروكسيداز من الدخن بفعالية نوعية عالية، أضيف الداري إلى بذور الدخن بنسب مختلفة تراوحت بين 1:1

10:1- (وزن نسيج نباتي: حجم محلول داري) ويزمن استخلاص لمدة ساعة واحدة لتحديد النسبة الأمثل للاستخلاص، أوضحت النتائج المحصل عليها زيادة تدريجية في الفعالية النوعية للبيروكسيد حتى بلغت أقصى حد عند النسبة 4:1 (وزن: حجم) بفعالية نوعية 5.98 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ ثم تناقصت تدريجياً بعد هذه النسبة لتصبح الفعالية النوعية في أدنى مستوى لها عند النسبة 1:10 وزن: حجم (الشكل 3). ولوحظ أيضاً إن نسبة البروتين كانت عالية عند نسبتي الاستخلاص 2:1 و 3:1 لتصبح ثابتة تقريباً بعدها عند النسب الأخرى، أما الفعالية الإنزيمية فإنها انخفضت تدريجياً مع زيادة حجم الداري.



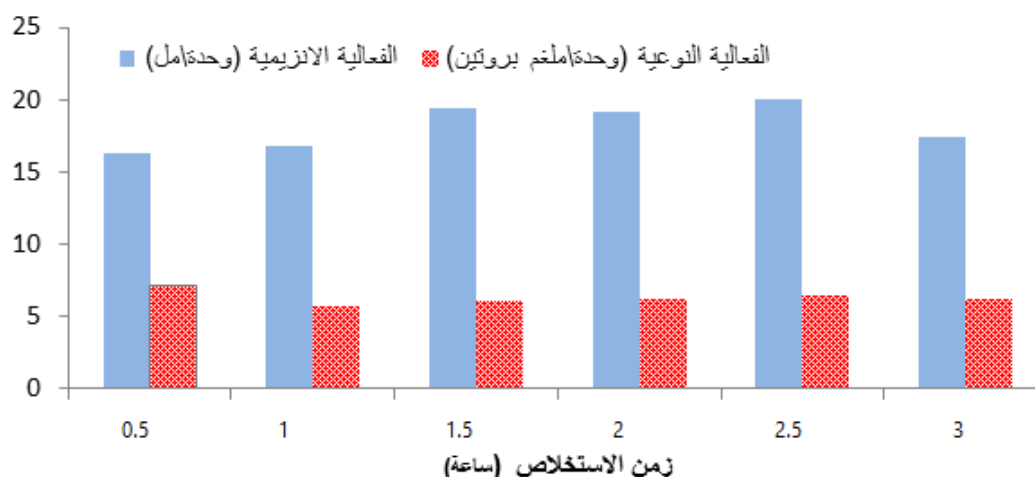
شكل 3 تأثير نسب الاستخلاص المختلفة في استخلاص إنزيم البيروكسيد من بذور الدخن باستعمال داري الخلطات بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6

تطابقت نتائج نسبة الاستخلاص 4:1 مع دراسة فنسنزو (32) عند استخلاص البيروكسيد من نبات الهليون *Asparagus acutifolius* L. باستخدام داري فوسفات الصوديوم بتركيز 5 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.2، في حين كانت نسبة الاستخلاص 2:1 عند استخلاص البيروكسيد من الدخن اللؤلؤي pearl millet باستخدام الماء كمنظف (8)؛ وسجلت أفضل نسبة استخلاص بمقدار 8:1 باستخدام داري الخلطات بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 5 عند استخلاص البيروكسيد من الخبز *Malva neglecta* (2). يعزى الاختلاف في نسب الاستخلاص إلى طبيعة وكمية البيروكسيد المستخلص وإن زيادة محلول الاستخلاص قد يؤدي إلى انخفاض الفعالية النوعية نتيجة انخفاض الفعالية الإنزيمية الناتجة عن انخفاض سرعة تكوين (الإنزيم - مادة التفاعل) (17).

تحديد الزمن الأمثل للاستخلاص

قدرت الفعالية النوعية للبيروكسيد في مستخلص داري الخلطات ذو التركيز 0.1 مولار الناتج بعد فترات زمنية مختلفة 0.5 – 3 ساعة من الاستخلاص بدرجة حرارة 40°م لتحديد الزمن الأمثل للاستخلاص وقد بينت النتائج إن الزمن الأمثل للاستخلاص هو 30 دقيقة بفعالية نوعية قدرها 7.11 وحدة. ملغم⁻¹ (الشكل 4)، ازدادت الفعالية الإنزيمية للبيروكسيد بمرور الزمن لغاية 2.5 ساعة وبدأت بالانخفاض بعد ذلك، إن زيادة فترة الاستخلاص

بثبوت المؤثرات الأخرى (درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والتركيز) تؤدي إلى زيادة تحلل البروتينات وتعتمد درجة التحلل على الثباتية الحرارية للبروتين (26). يعد تحديد الفترة المثلى للاستخلاص مهما نظراً لاختلاف قابلية استخلاص الإنزيم من مصدر لآخر بسبب تنوع المواد المتواجدة في المصدر والمتداخلة مع الإنزيم وإن التخلص من الدهون بصورة أساسية يؤدي إلى الحصول على مستخلص بروتيني جيد ذي ثباتية عالية تجاه التحلل وإن وجود المعقد بروتين-دهن سيزيد من تحلل البروتين (24).



شكل 4 تأثير الفترات الزمنية المختلفة (0.5 - 3) ساعة لاستخلاص إنزيم البيروكسيديز من بذور الدخن بروسو باستعمال دارئ الخلات بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6 ونسبة استخلاص 1: 4 (وزن/احجم)

وجد شهریار (26) عند دراسة تأثير زمن الاستخلاص في فعالية إنزيم البيروكسيديز في الكمثرى *Pyrus communis* إن الزمن الأمثل للاستخلاص يتغير بتغير درجة الحرارة فقد كان 60 دقيقة بدرجة 30°م وتتناقص الفترة لتبلغ 20 دقيقة عندما تكون الحرارة 45°م، واستخدم زمن استخلاص 15 دقيقة عند استخلاص البيروكسيديز من مصادر خضرية متنوعة (17)، في حين كان زمن الاستخلاص 12 ساعة بدرجة 4°م عند استخلاص البيروكسيديز من أعشاب الهليون *Asparagus acutifolius* L. (32).

الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم

استعملت كبريتات الأمونيوم بنسب متدرجة (30-90%) للوصول الى نسبة الإشباع الأمثل لتركيز البيروكسيديز الناتج من الاستخلاص بتحويله الى الشكل غير الذائب بوصفها الخطوة الأولى لتنقية الإنزيم ولوحظ ان الفعالية النوعية قد ازدادت تدريجياً لتصل لأعلى مستوى عند نسبة 80% من التشبع بالكبريتات حيث بلغت 11.29 وحدة. ملغم بروتين⁻¹ بعدد مرات تنقية 1.66 مرة وحصوله أنزيمية 71 % (جدول 4). تعد كبريتات الأمونيوم من أكثر المواد المستخدمة في ترسيب الإنزيمات وذلك لكونها رخيصة الثمن ولا تؤثر بالرقم الهيدروجيني للمحلول وذات قابلية ذوبان عالية في الماء ولا تؤثر في تركيب الإنزيم (18). يؤثر وجود البروتينات والمركبات الأخرى في المستخلص على التركيز الأمثل من الكبريتات اللازمة لعملية الترسيب (12)، وإن التركيز الأمثل من كبريتات الأمونيوم المستخدم لترسيب الإنزيم له علاقة بعدد وتوزيع الشحنات والمجاميع غير الأيونية والكارهة للماء

على سطح جزيئة الإنزيم فضلا عن حجم الإنزيم وشكله، تحدث آلية الترسيب بظاهرة تعرف بالتمليح الخارجي (Salting out) وذلك بميل جزيئات الإنزيم للتجمع مع بعضها البعض بفعل الملح الذي يعمل على سحب الطبقة المتميأة المحيطة بجزيئة الإنزيم مما يؤدي الى تعادل الشحنات الموجودة على سطح البروتين وخفض ذوبانيته ومن ثم ترسيبه (25).

تطابقت نتائج نسبة الترسيب بكبريتات الأمونيوم مع دراسة (21) عند استخلاص البيروكسيداز من البطاطا الحلوة Sweet Potato حيث بلغت نسبة التشبع 80% أما عدد مرات التنقية فكانت 1.9 مرة، وتختلف نسبة الترسيب بالكبريتات باختلاف نوع المصدر فقد استخدمت نسبة الترسيب 90% في دراسة تنقية البيروكسيداز من الدخن اللؤلؤي وكانت عدد مرات التنقية 1.2 مرة (28). وجدت لاليدا (19) إن أفضل نسبة تشبع لترسيب الإنزيم من نبات الزنجبيل Fingerroot هي 40% بعدد مرات تنقية بلغ 2.71 مرة، أما في نبات الخبز فكانت أفضل نسبة للترسيب 70% بعدد مرات تنقية 2.1 مرة (2). يتضح من النتائج ان بذور العائلة النجيلية تمتلك فعالية انزيمية ونوعية اعلى من بذور العائلتين البقولية والبادنجانية، وكانت الفعالية النوعية لمستخلصات بذور الداتورا والبادنجان البري قليلة مقارنة بباقي المستخلصات مع احتواءها على نسبة عالية من البروتين وهذا قد يعود الى كون هذين النباتين من ضمن النباتات الطبية التي تحتوي على تنوع عال من البروتينات والمواد الفعالة التي يؤثر وجودها على فعالية البيروكسيداز وطريقة استخلاصه بشكل كبير (6).

جدول 4 الفعالية النوعية وعدد مرات التنقية والحصيلة لإنزيم البيروكسيداز المستخلص من بذور الدخن بروسو باستخدام نسب إشباع مختلفة من كبريتات الأمونيوم

نسبة الترسيب %	الفعالية النوعية وحدة. ملغم ⁻¹	عدد مرات التنقية	الحصيلة %	نسبة الترسيب %	الفعالية النوعية وحدة. ملغم ⁻¹	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
المستخلص الخام	6.79	1	100	60	10.75	1.58	74.3
30	7.04	0.93	74.4	70	10.3	1.52	73.6
40	6.32	1.04	76.2	80	11.29	1.66	71.0
50	8.15	1.2	75.3	90	9.93	1.46	55.5

المصادر

- 1- سعود، أسماء محمد، 2009. استخلاص إنزيم البيروكسيداز الذائب من ثمرة الطماطة المحلية. *Lycopersicon esculentum* L وتنقيته جزئياً. 2009، المجلة العراقية للعلوم، 50، 175-181.

- 2- Al-badri R. H., 2009. Extraction, Partial Purification and Characterization of Peroxidase from *Malva neglecta*. Thesis, Biotechnology Department, College of Science, University of Baghdad.
- 3- Bari L.; P. Hassan; N. Absar; S. Khatun and M. Hossain, 2013. Purification and Characterization of Peroxidase from Anthracnose Disease Infected Papaya (*Carica papaya* L.). *Bangladesh J Med Biochem*. Vol. 6(2), P: 49-57.

- 4- Battistuzzi G.; M. Donofrio; L. Loschi and M. Sola, 2001. Isolation and characterization of two peroxidases from *Cucumis sativus*. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. (388), P: 100-112.
- 5- Bodalo A.; J. L. Gomez; E. Gomez; A. M. Hidalgo; M. Gomez and A. M. Yelo, 2006. "Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor," Desalination.195, 51.
- 6- Boyd J. W.; D. S. Murray and R. J. Tyrl, 1984. Silverleaf nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, origin, distribution, and relation to man. Economic Botany, 38, 210-216.
- 7- Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. Vol. (72), P: 248-254.
- 8- Chandrasekhar; S. N. Raj; G. Manjunath; S. Deepak and H. S. Shetty 2010. Seed treatment with aqueous extract of *Viscum album* induces resistance to pearl millet downy mildew pathogen, Journal of Plant Interactions, Vol. 5(4), P: 283-291.
- 9- Cooper T. G., 1977. Tools of Biochemistry. University of Pitts-brough, New York, Chechester, Brisbane, Singapore. P: 50-54.
- 10- Dayse P. B.; C. R. Ingrid; M. C. Lucia; G. O. Enrique; E. B. Márcio and C. F. Lúcio 2010. Peroxidase activity in *Spondias dulcis*. Acta. Scientiarum. Technology. Vol. (32), n.4, P: 341-345.
- 11- Deepa S. S. and C. Arumughan, 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. Phytochemistry Vol. (61), P: 503–511.
- 12- Englard S. and S. Seifter, 1990. Precipitation techniques. Methods Enzymology. Vol. (182), P: 285-300.
- 13- Fatima A.; Q. Husain and K. R. Hasan, 2007. A peroxidase from bitter melon (*Momordica charantia*) with organic solvent and detergent: A comparison enhanced stability against with horseradish peroxidase. J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 47-66.
- 14- Flohe L. and F. Ursini, 2008. Peroxidase: a term of many meanings. Antioxid. Redox. Signal 10, 1485–1490.
- 15- Hausman T. U.; R. Helger and W. Gross, 1967. Clin. Chem. Acta. (15), P: 241.
- 16- Hernández J.A.; E. Olmos; F. J. Corpas; F. Sevilla and L. A. Río 1995. Salt induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. Plant Sci. 105, 151–167.
- 17- Khalil-ur-Rehman M. Y.; M. A. Sheikh; M. Arshad, 1999. Extraction and Evaluation of Peroxidase from Vegetable Sources. International Journal of Agriculture and Biology, Vol. (3), P: 170-173.
- 18- Kornberg A., 1990. Why purify enzymes. In. Methods in Enzymology (ed. Deutscher M.P.). Vol. (182), P: 1-5. Academic Press. New York.
- 19- Lalida P. S.; K. Pairoje and P. Suree, 2015. Characterization of Partially Purified Peroxidase from Fingerroot (*Boesenbergia Rotunda* L. Mansf.). Journal of Medical and Bioengineering Vol. 4(3), P: 215-222.

- 20- Lange P. H.; J. L. Millan; T. Stigbrand; R.L. Vessella; E. Ruoslahti and W. H. Fishman 1982. Placental alkaline phosphatase as a tumor marker for seminoma. *Cancer Res.* Vol. 42(8), P: 3244-3247.
- 21- Mamounata D.; N. A. Brice; D. Crépin; D. Soumaïla and H. D. Mamoudou, 2014. Purification and Characterization of Sweet Potato (*Ipomoea Batatas*) Peroxidase. *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol. 22(2), P: 3419-3432.
- 22- Manikandan A. and M. Sathiyabama, 2014. Foliar Application of Salicylic Acid Stimulates Flowering and Induce Defense Related Proteins in Finger Millet Plants. *Universal Journal of Plant Science*, Vol. 2(1), P: 14-18.
- 23- Mougin C.; C. Laugero; M. Asther; J. Dubroca; P. Frasse and M. Asther, 1994. Biotransformation of the Herbicide Atrazine by the White Rot fungus *Phanerochaete tectrys* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. (60), P: 705-708.
- 24- Nilsang S.; S. Lertsiri; M. Suphantharika and A. Assavanig, 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, Vol. (70), P: 571-578.
- 25- Schlitte H., 1997. Product Enrichment. In: Schmauder, H. (ed). *Method in Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd.
- 26- Shahriar S. and G. Elham, 2013. Effect of temperature on guaiacol Peroxidase of *Pyrus com.* *International Letters of Natural Sciences*, Vol. (5), P: 46-51.
- 27- Shazia K.; Z. Q. Muhammad; I. Abida; N. Zahid; S. Amina and I. Muhammad, 2012. Production and purification of horseradish peroxidase in Pakistan. *Int. J. the Phys. Sci.* 7, 2706-2712.
- 28- Shivakumar P. D. and S. S. Huntrike, 2009. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. (94), P: 119-126.
- 29- Srinivas N.D.; K. R. Rashmi; K. S. Raghavarao, 1999. Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration. *Process Biochem.* Vol. (35), P: 43.
- 30- Staehelin C.M.; R.B. Mellor; A. Weiemken and T. Boller, 1992. Chitinase and peroxidase in effective (fix+) and ineffective (fix-) soybean nodules. *Planta*, 187, 295-300.
- 31- Vincenzo G.; C. Giovanna; T. Rachele; M. Livia; P. Augusto and A. Di Maro, 2011. Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). *BMB reports*. Vol. 44 (1), P: 64-69.
- 32- Vincenzo G.; C. Maria; C. Angela; C. M. Maria; P. Augusto; L. Nicola; S. Valeria and D. Antimo, 2014. Purification and Characterization of Novel Cationic Peroxidases from *Asparagus acutifolius* L. with Biotechnological Applications. *Mol. Biotechnology*. Vol. (56), P: 738-746.
- 33- Whitaker J. R. and R.A. Bernhard, 1972. Experiments for an introduction to enzymology. The whiber press, Davis, Calif.
- 34- William W. W. and S. Gavin, 2009. Protein Purification. *Current Analytical Chemistry*, Vol. (5), No. 2, P: 1-21.