عزل ودراسة خواص انزيم البيروكسيديز من نبات اللهانة المحلي

(Brassica oleracea Var. capitate L.)

ليلاس فرحان بديوي علي

قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: / /٢٠٠٧ ، تاريخ القبول: / / ٢٠٠٧)

الملخص

تضمن البحث عزل انزيم البيروكسيديز من نبات اللهانة المحلي(*Brassica oleracea Var. capitate L.*) من خلال الاستخلاص بالماء المقطر وباستخدام التقنيات الحياتيه المختلفه حيث تبين عنداستخدام تقنية الترشيح الهلامي على همود الفصل الحاوي على الهلام Sephadex G-75 احتواء محلول الراسب البروتيني الناتج من الترسيب بكبريتات الامونيوم على حزمتين بروتينيتين وتبين ان الحزمه الاولى تمتلك فعاليه نوعية عاليه لأنزيم البيروكسيديز وبنقاوه بلغت (24) مرة في حين تمتلك الحزمة البروتينيه الثانيه فعالية نوعيه منخفضة .

فضلاً عن ذلك تم تحديد الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم البيركسيديز المنقى جزئياً (الحزمة البروتينيه الاولى) بأستخدام تقنية الترشيح الهلامي وكان بمدى (40000+2000) دالتون .بعد ذلك حددت الظروف المثلى لعمل الانزيم المنقى جزئيا وبينت النتائج ان الانزيم يعمل في المحلول المنظم Sodium phosphate بتركيز (100) ملي مولار عند اس هيدرجيني امثل (7.0) ودرجة حرارة مثلى (50)مئوية وتركيز امثل (20) ملي مولار لمادة الـ Guaiacol كمادة اساس وبأستخدام رسم لاينو يفربيرك البياني وجد ان السرعه القصوى التي يعمل بها الانزيم تساوي (0.4) مايكرومول / مليلتر/ دقيقة من المحلول البروتيني وقيمة ثابت ميكيلس ومنتن (11.0-11.5) ملي مولار.واشارت النتائج الى انخفاض فعالية الانزيم بصورة تدريجيه الىو%5536%عند خزن الانزيم لمدة 28يوم

في درجتي حرارة (4مئوية) و(30-35مئوية) .

المقدمة

تحفز البيروكسيديزات EC1.11.1.7 تفاعل الاكسده لمختلف المواد الكيمياوية (1) حيث تحفز تفاعل الاكسده لمختلف المواد المانحة للاليكترون مع بيروكسيد الهيدرجين وحسب التفاعل التالي:-

$$H2O2 + 2e + 2H \underset{}{\overset{\text{peroxidase}}{\rightleftarrows}} 2H2O \qquad (2)$$

لأنزيم البيروكسيديز اهميه حيوية كبيره بسبب دوره في تكسير او تحليل بيروكسيد الهيدروجين الذي يتكون داخلياً في الانسجة والمتولد خلال التحلل التأكسدي للدهون والدي له تاثير سمي على الاغشية ونفاديتها(3) واضافة لدوره في حماية الانظمة الحية من تراكم(H2O2) فانه يدخل في اكسدة واحدة من اكبر السلاسل في العطاء والتي تتضمن معظم البدائل كالاسكوربيت والكوينون وسيانيد الحديدوز (4)كما ان البيروكسيديزات في النباتات فضلا عن ازالتها لسمية (H2O2) فانها تكون دات تاثير مباشر في نمو الخلايا النباتية وتمايزها نتيجة لمشاركتها في التخليق الحياتي للكنين والاثيلين واكسدة (IAA) (Indole-3-acetic acid) والمحافظة على سلامة جدار الخلية وتكوين جسور (O- D iphenyl ومقاومة الامراض (5) ،ولانزيم البيروكسيديز استخدامات واسعة في تفاعلات الاكسدة والاختزال حيث يستخدم كعنصر مهم في الكواشف في التشخيصات الطبية والتجارب المختبرية وايضا توجد العديد من التطبيقات الاخرى مثلا تخليق العديد من المركبات الاروماتية وازالة بيروكسيد الهيدروجين من المواد الغذائية والمخلفات الصناعية (6) وتستعمل البيروكسيديزات ايضا دليلا لعملية القصر الحراري في الاغذية النباتية او لمعألجات حرارية اخرى (7)،(8)، (9).

توجد البيروكسيديزات في النباتات الراقية والحيوانات فضلا عن وجودها في الاحياء المجهرية (7) واول الدراسات الناجحة لعزل وتنقية الانزيم كانت في عام (1917- 1924) من قبل الباحثين (Willstaer & Stoll) والباحثين (Willstatter & Pollinger) (10) (11) وقد عزل الانزيم بعد ذلك وبنقاوه عالية من نبات فجل الخيل من قبل الباحثين (Keilin & Hartree)(12)وتم بلورة الانزيم ودراسة الخواص الكيميائية والفيزيائية وتقدير الوزن الجزيئي من قبل الباحث (13) كما عزلت عدة متماثلات للانزيم (Isozymes) من نبات فجل الخيل حيث تم عزل سبعة متماثلات للانزيم من قبل الباحث (Shannon)(14) وعلى الرغم من احتواء نبات فجل الخيل على تركيز عالي من الانزيم تم عزل الانزيم من العديد من النباتات حيث تم عزل ا ثنا عشر متماثل للانزيم من الطماطه(15) ومن اوراق الشاي (16) ومن احد اصناف التبوغ تم عزل اربعة متماثلات على شكل مجموعتين متماثلان يتجهان نحو القطب الموجب والاخران نحوالقطب السالب (17) كما عزل الانزيم من الفول السوداني (18) ومن القرنبيط تم عزل ثلاثة متماثلات باستخدام الكروماتوغرفيا الكارهة للماء (19) كما عزل الانزيم من فول الصويا واظهرت الدراسة باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية (PAGE) وجود ثلاثة متماثلات سالبة للانزيم (20) ومن البزاليا الخضراء تم تنقية ثلاثة متماثلات باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الايوني (9) وعزل الانزيم من المنكا (8) ومن جذع نبات الاناناس تم عزل اثنا عشر متماثل(21) وعزل الانزيم من الخوخ (22) والشلغم الابيض (23) وتمكن الباحث (24)من عزل الانزيم عن طريق الزراعة المائية لنباتي اللوبيا والذرة للجزر ،كما اجريت عدة دراسات لعزل البيروكسيدات الذائبة والمرتبطة من الانسجة النباتية حيث تم عزل البيروكسيد الذائب والمرتبط من درنة البطاطا وتم تحديدالصفات لكيموحياتية لكلا الصيغتين واجراء التنقية لهما باستخدام اعمدة الكروماتوغرافيا الحاوية على (SephadexG-75) و(Sepharose-6B) (25) وتمكن ،كما استطاع الباحثان (6)عزل انزيم البيروكسيديز وبفعالية عالية عن طريق

زراعة خلايا الجدور الشعرية الباحث (26) من عزل البيروكسيدات الذائبة والمرتبطة من العنب ،وعزلت البيروكسيدات الذائبة والمرتبطة من ثمرة البابايا وتم تحديد الوزن الجزئي لكلاالصيغتين (27)كما عزل الانزيم من مصادر غير نباتية حيث عزل من الخميرة (28) ومن السوائل المتقيحة لكريات الدم البيضاء لمرضى مصابين بأبيضاض الدم (لوكيميا) (29) ومن الحليب (30) ويهدف البحث الحالي الى استخدام نبات اللهانه المحلي كمصدر لعزل الانزيم محليا ودراسة خواصه لغرض استخدامه في العبوة القياسية في عملية تقدير كلوكوز الدم بالطريقة الانزيمية .

المواد المستعملة وطرائق العمل

1-تحضير المستخلص الرائق

تم اخذ (500) غرام من نبات اللهانة المحلي ثم قطعت الى قطع صغيرة ومزجت بالماء المقطر بنسبة (V:W 3:1) ثم سحق المزيج بألة الثرم لمدة (10) دقيقة مع التبريد بعد ذلك حرك المزيج بواسطة المحرك مع مراعاة التبريد بأستخدام حمام ثلجي ثم رشح المزيج خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد لمدة (10) دقيقة عند سرعة (7000 xg) للتخلص من المواد غير الذائبة بعد ذلك تم تقليص حجم المستخلص الرائق الى الثلث بأستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) ثم استخدم المستخلص الناتج في عملية فصل البروتين الكلي .

2- فصل البروتين الكلي :-

تم فصل البروتين الكلي بواسطة الترسيب بكبريتات الامونيوم وبتشيع (75%) (30) وكانت اضافة كبريتات الامونيوم بصورة تدريجية مع تحريك المزيج بالمحرك الكهربائي عند (4)مئوية ولمدة (90)دقيقه وترك المحلول لمدة (24) ساعه ثم فصل الر اسب عن الراشح بجهاز الطرد المركزي المبرد لمدة (15)دقيقه عند سرعة (8000xg) عند (4) مئوية بعد هذه العملية تم اذابة الراسب في اقل كمية من المحلول المنظم (Sodium carbonate) بتركيز (100mM) وعند اس هيدروجيني pH (6.5) ثم تم تجفيف العينه باستخدام جهاز التجفيد حيث تم الحصول على مسحوق بروتيني حفظ في درجة حرارة (20-) مئوية لحين استعماله .

3- تجزئة البروتين الكلي :-

تم تجزئة البروتين الكلي الناتج من الخطوه السابقه باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بأستعمال عمود الفصل ذي الابعاد (87x2.56)سم والحاوي على الهلام من نوع (Sephadex G-75) وبأستخدام الماء المقطر كمحلول روغان حيث تم اذابة الراسب الناتج من الخطوه السابقه في اقل كميه من الماء المقطر وبعد اجراء الطرد المركزي اخذ(3)مل من الراشح وتم حقنه في العمود ويتبع ذلك (3) من الماء المقطر للغسل وتم استرداد المواد البروتينيه بمعدل جريان (40)مل /ساعه وبمعدل (15)دقيقه لكل جزء من جامع الاجزاءعلى نظام الدقائق وتمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قراة شدة الامتصاص عند الطول الموجي (280)نانو ميتر باستخدام جهازمطياف الاشعه فوق البنفسجيه والمرئيه Ultra violet (&visible spectrophotometer) فضلا عن ذلك تم متابعة فعالية انزيم البيروكسديزمن خلال قياس فعالية الانزيم والاجزاء المفصوله بعد ذلك جمعت الاجزاء البروتينيه التي تمثل كل حزمه على حده .

4- تحديد الوزن الجزيئي :-

تم تحديد الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم البيروكسيديز المنقى جزئيا من نبات اللهانه المحلي بأستخدام تقنية الترشيح الهلامي وحسب طريقة الباحث (32) بأستخدام عمود الفصل الانف الذكر حيث تم مقارنة حجم استرداد الانزيم مع حجوم استرداد مركبات اخرى معلومة الوزن الجزيئي تراوحت اوزانها الجزيئية بين (204-2000000) دالتون والجدول (1) يبين المواد التي مررت على عمود الفصل الحاوي على مادة الهلام (SephadexG-75) واوزانها الجزيئية وحجوم روغانها .

وعند رسم حجم الروغان لكل مادة مقابل وزنها الجزيئي تبين ظهور خط مستقيم حدد من خلاله الوزن الجزيئي للحزمة البروتينية الاولى الحاوية على اعلى فعالية لانزيم البيروكسيديز حيث كان حجم روغانها يساوي(355)مليلتر كما هو موضح في الشكل (3).

جدول (١)العلاقة بين الوزن الجزيئي وحجم الروغان للمواد المستخدمة في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي

المادة	الوزن الجزيئي (الدالتون)	حجم الروغان (مليلتر)
الدكستران الازرق	2000000	119
البومين مصل البقر	67000	251
انزيم الفا-امايليز	58000	324
البومين البيض	45000	345
انزيم الببسين	36000	375
هرمون الانسولين	5750	418
التربتوفان	204	446

قياس فعالية الانزيم :-

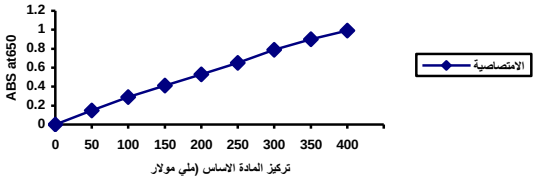
تم قياس فعالية الانزيم حسب طريقة الباحث (Chance)(33) والتي أستخدمت لقياس فعالية الانزيم المستخلص من نبات فجل الخيل وهي طريقة لونيه تعتمد على تكوين ناتج ملون يمكن قياس الامتصاصية له عند طول موجي معين في جهاز المطياف الضوئي ويحتوي محلول القياس في التجارب التمهيدية على :-

(5) مليلتر من (0.05)مولار من المحلول المنظم فوسفات الصوديوم عند اس هيدروجيني (7.0) و(0.1)مليلتر من (20)ملي مولار من مادة الاساس ال(guaicol) و(0.02)مليلتر من (40)ملي مولارمن

بيروكسيد الهيدروجين ويبدأ التفاعل بأضافة (0.02) مل من مستخلص الانزيم ويتم اجراء التجربة في درجة (25) مئوية ويتم قياس الامتصاص للناتج المتكون عند طول موجي (470) نانوميتر ويحضر كفؤ الكواشف Blank من الاضافات السابقة مع عدم اضافة مستخلص البيروكسيديز وقدرت الفعالية على انها مايكرومول من المادة الناتجة Tetraguaiacol /دقيقة /مليغرام بروتين . وحسبت كمية المادة الناتجة Tetraguaiacol بأستخدام معامل الاطفاء المولاري $E470$ = 1- mM 1- Cm 26.6.

تقدير كمية البروتين :-

استخدمت طريقة الباحث لاوري المحوره (34) لتقدير البروتين حيث تم تحضير المنحني القياسي باخذ تراكيز مختلفة من المحلول القياسي تتراوح بين (0-450)مايكروغرام /مليلتر حيث اضيف (1)مليلترمن كاشف النحاس القاعدي الى (1)مليلتر من النموذج في انبوبة اختبار وبعد المزج الجيد تركت الانابيب لمدة (10) دقائق عند درجة حرارة الغرفة ثم اضيف (4)مليلتر من كاشف الفينول بسرعة مع الرج الجيد ووضعت الانابيب في حمام مائي عند درجة حرارة (55)مئوية لمدة (5) دقائق بعد دلك تركت الانابيب لكي تبرد الى درجة حرارة الغرفة ومن ثم قرأت شدة الامتصاص ضد محلول الكفء عند طول موجي يساوي (650) نانوميتر وكما هو مبين في الشكل (1)٠



شكل (١) المنحني القياسي لتركيز البروتين (BSA)

النتائج والمناقشة

ان مراحل عزل وتنقية انزيم البيروكسيديز من نبات اللهانه المحلي موضحة في الجدول (2) حيث يلاحظ ان الفعالية النوعية للانزيم (الحزمة البروتينية الاولى) زادت بمقدار (24)مرة عن الفعالية النوعية للانزيم في المستخلص الخام .

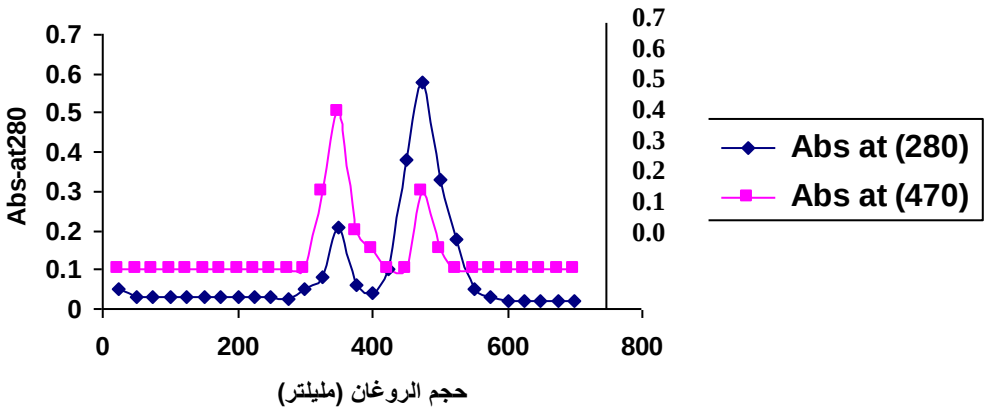
جدول (2) يوضح مراحل تنقية انزيم البيروكسيديز من نبات اللهانة المحلي

مراحل التنقية	تركيز البروتين ملغم/مل		الفعالية الانزيمية U	الفعالية النوعية U/ملغم بروتين	الاستعادة	عدد مرات التنقية
المتجانس الخام	2.360		3.6	1.52	100	1
المتجانس الرائق	1.300		2.9	2.23	80.5	1.46
الترسيب بكبريتات الامونيوم	0.4		2.3	4.79	63.8	3.15
الترشيح الهلامي	0.03	A	1.1	36.6	٣٠,٥	24.07
	0.09	B	0.6	6.6	16.6	4.3

(U) الوحدة الانزيمية :- كمية الانزيم التي تعمل على تكوين مايكرو مول من الناتج Tetraguaicol في الدقيقة الواحدة .

الفعالية النوعية :- مايكرومول من الناتج Tetraguaicol /دقيقة/ملغرام بروتين .

ان تجزئة البروتين الكلي بتقنية الترشيح الهلامي بأستخدام الهلام من نوع (Sephadex G-75) اظهرت حزمتين بروتينيتين هي (B,A) كما هو موضح في الشكل (2) ومن خلال قياس فعالية انزيم البيروكسيديز تبين ان الحزمة الاولى تمتلك فعالية اعلى من الحزمة البروتينية الثانية وبذلك اعتبرت الحزمة البروتينية الاولى (A) انزيم البيروكسيديز المنقى جزئيا من نبات اللهانه المحلي في الدراسات اللاحقة في هذا البحث .



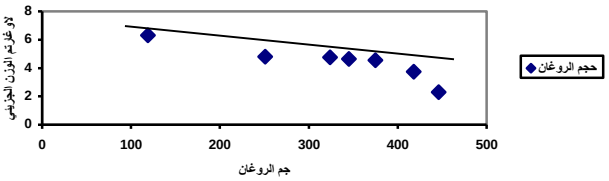
الشكل (2) المظهر الجانبي لروغان المحلول البروتيني الناتج من الترشيح الهلامي على عمود الفصل ذي الابعاد (87x2.56) سم والحاوي على الهلام من نوع (Sephadex G-75)

تحديد الوزن الجزيئي :-

من خلال استخدام تقنية الترشيح الهلامي على عمود الفصل ذي الابعاد(87x2.56) سم والحاوي على الهلام من نوع (Sephadex G-

75) تم تحديد الوزن الجزيئي لآنزيم البيروكسيديز المنقى جزئيا من نبات اللهانه المحلي وكان مساوياً (40000+2000) دالتون .

ويوضح الشكل (3) المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي للانزيم بتقنية الترشيح الهلامي

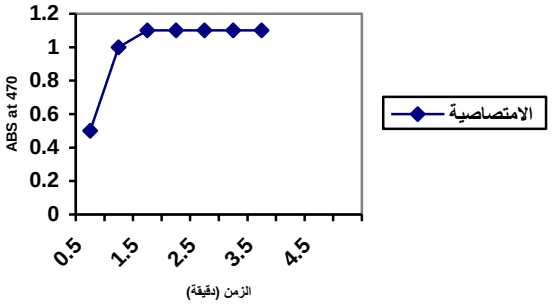


الشكل (3) المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي آنزيم البيروكسيديز المنقى جزئيا من نبات اللهانه المحلي

وهذا مقارب لما اشارة اليه الدراسات السابقة من ان الوزن الجزيئي لآنزيم البيروكسيديز المعزول من ثمار الكيوي كان بمدى (40000–42000) دالتون (35) وللانزيم المعزول من ثمار البابايا يساوي (41000) دالتون (27) .

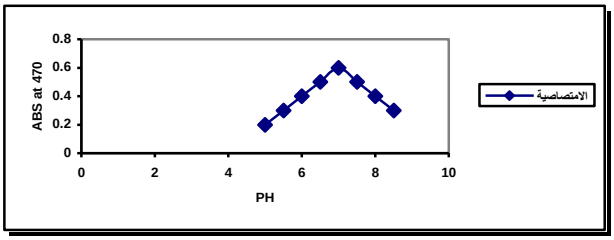
تحديد الظروف المثلى للانزيم :-

تم تحديد الظروف المثلى لعمل انزيم البيروكسيديز المنقى جزئيا من نبات اللهانه المحلي حيث وجد ان اعلى فعالية تظهر عن الدقيقة الاولى على بدء التفاعل كما هو موضح في الشكل (4) وهذا مطابق لما وجدته الدراسات السابقة (16) ،(36) .



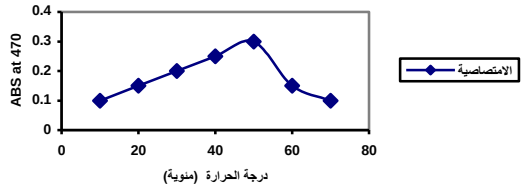
الشكل (4) تأثير الزمن على فعالية انزيم البيروكسيديز

كما اظهرت النتائج ان اعلى فعالية للانزيم عند pH يساوي(7.0) في المحلول المنظم Sodpi (100mM) وكما هو موضح في الشكل (5) وتشير الدراسات السابقه ان pH الامثل لانزيمHRP يساوي(7.0) (37) وpH الامثل لانزيم البيروكسيديز المستخلص من الشلغم الابيض يساوي (6.5) (23) وpH الامثل للبيروكسيديز المستخلص من البطاطه الحلوه يساوي (6.5) (38) وللبيروكسيديز المستخلص من القرنابيط (6.5) (19) وللبيروكسيديز المستخلص من الفول السوداني (7.0) (36)



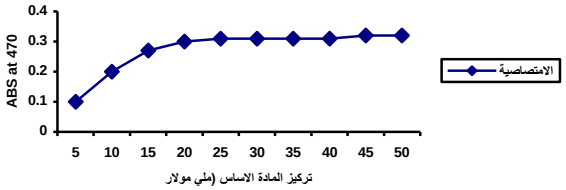
شكل (5) تـأثير الاس الهيدرجيني على فعالية انزيم البيروكسيديز

كما وجد ان درجة الحرارة المثلى تساوي (50)مئوية وهذا مقارب لما اشارت الية الدراسات السابقة مثل (20) حيث اشارت الى ان درجة الحرارة المثلى لانزيم البيروكسيديز المستخلص من فول الصويا هي (55)مئوية .



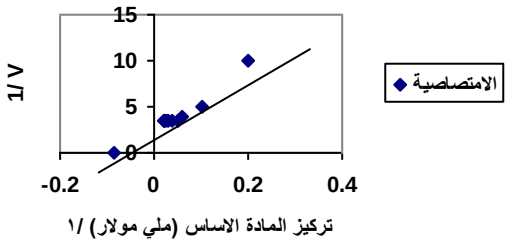
الشكل (6) تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم البيروكسيديز

كما تم دراسة تأثير تركيز الماة الاساس على فعالية الانزيم واتضح ان اعلى فعالية للانزيم كانت عند تركيز (20)ملي مولار لمادة الـ (Guaicol) كما هو موضح في شكل (7)



الشكل (7) تأثير تركيز المادة الاساس على فعالية انزيم البيروكسيديز

واظهر رسم لاينويفربرك شكل (8) ان قيمة Vmax (0.4) مايكرومول /مليلتر/دقيقة و Km (11.0–11.5) ملي مولار ولقد اظهرت الدراسات السابقة ان Kmتساوي (7) ملي مولار للانزيم المعزول من فول الصويا (20) و(10.2–10.8)ملي مولار للانزيم المعزول من البزاليا الخضراء (9) .



الشكل (8) رسم لاينووفربيرك

اذن الظروف المثلى لعمل انزيم البيروكسيديز المنقى جزئيا من نبات اللهانه المحلي موضحه في الجدول (3)

جدول (3) الظروف المثلى لقياس فعالية انزيم البيروكسيديز المنقى جزئيا من نبات اللهانه المحلي

تركيز الانزيم مايكروغرام/مللتر	زمن التفاعل دقيقة	التركيز والاس الهيدرجيني للمحلول المنظم	درجة الحرارة مئوية	تركيز مادة الاساس ملي مولار
50	1	100ملي مولار pH=7.0	50 (37.5)	20

ان درجة الحرارة المثللعمل الانزيم في المختبر تساوي (50) مئوية لكن تم اختيار (37.5) مئوية لقياس فعالية الانزيم في جميع التجارب اللاحقه لانها تمثل الدرجة الحرارية المستخدمة في اغلب الطرق الانزيمية التي يدخل ضمن محتوياتها انزيم البيروكسيديز والتي تستخدم في التشخيصات الطبية وفي العديد من التجارب المختبرية .

تأثير الخزن على فعالية الانزيم :-

يوضح الجدول (4) تاثير فترة الخزن على فعالية الانزيم حيث ظهر بأن الانزيم يحتفظ بـ (63%) من فعاليته عند خزنه لمدة (28) يوم عند (4) مئوية بينما يحتفظ بـ (55%) عند خزنه في درجة حرارة الغرفة (30-35) مئوية.

فترة الخزن بالايام	% للفعاليات *،** عند (٤) مئوية	% للفعاليات *،** عند درجة حرارة الغرفة (٣٠-٣٥)مئوية
0	100	100
2	96	90
7	88	82
12	81	77
18	76	68
23	70	61
28	63	55

*% للفعالية تحتسب بالاعتماد على ان فعالية الانزيم قبل الخزن هي (100%).

** تم قياس فعالية الانزيم تحت الظروف المثلى الموضحة في الجدول (3).

المصادر

1- Srivastara, O. P. and Vanhystee, R. B., Can. J. Bot. , 55: 2630 -2635 . (1927) .

2- West, E. S., Todd, W. R., Mason ,H. S. and Van Bruggen, J.T.,"Text Book of Biochemistry". 4th. ed , Macmillan Company, London, p457,940(1966) .

٣- ديفلين وويذام،ترجمة د.عبدالهادي خضر، د.علي سعدالدين سلامه ود.ناديه كمال "فيسولوجيا النبات" المجموعة العربية للنشر، ص٧٩٤ (١٩٨٥)

4- Singer, T. P. Interscience Publishers, Inc., New York, p .404 (1968).

5- Lobarzewski, J, Brzyska , M. and Greppin, H. Plant Peroxidases : Biochmistry and Physiology (Obinger, C.,Burner, U., Ebermann, R. Penel, C. and Greppin, H. eds.). University of Geneva, P. 153 -156(1996).

6- Kim, Y. H. and Yoo, H. J., Enzyme and Microbial Technology, 18: 531-535 (19967- Kermasha, S. and Metche, M., J.Food Sci ., 53(1):247-249(1988) .

8- Khann, A.A. and Robinson, D.S., Food Chem.,47:53-59(1993) .

9- Haplin, B., Pressey, R., Jen , J. and Mondy, N.,J. Food Sci., 54(3) : 644 – 649 (1989).

10- Willstatter, R. and Stoll, Liebigs Ann., 416:21(1918).

11- Willstatter, R. and Pollinger, A. Liebigs Ann., 430: 269 (1923).

12- Keilin, D. and Hartree, E. F., Biochem. J., 49:88-104 (1951).

13- Theorall. H. Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 16A (2). Cited by "Methods in Enzymology" .Academic Press, Inc. Publishers, New York, 4(2)802

14- Shannon, L. M., Kay, E. and Yew, J. Y., J. Biol. Chem., 241 (9): 2166 - 2172 (1966)

15- Evans, J. J., Plant Physol., 43:1034-1041 (1968) .

16- Takeo, T. and Kato, Y., Plant and Cell Physiol., 12 : 217 – 223 (1971) .

17- Mader, M., Meyer, Y. and Bapp, M., Planta,122:257-268 (1975) .

18- Vanhuystee , R. B. , Can .J. Bot., 54:876-880(1976).

19- Lee, C. Y., Pennesi, A. P. and Dickson, M.A., J. Agric. Food Chem.32 (1):18-21(1984)

Accademic Prss, Inc. PybIshers, Inc. Newyouk, 2:813 (1943).
30- Dioxin, M. and Weeb, E. C., "Tools of Biochemistry", T. G. Coppero l:370 John Wiley and Sons. Inc 1977 (1961).
31- Andrews, P., J. Biol. Chem. 96:595 (1965).
32- Chance, B.S., Park, K. H. and Lund, D. B., J. Food Sci., 53 (3):920 – 923 (1988).
33- Schacterle, G. R. and Pollack, R. L., Anal. Biochem., 51:654 – 655 (1973).
34- Perstamo, G. ,J. Food Sci., 54 (3):760-762 (1989).
35-Stva, E. D. Lourenco, E. J. and Neres, V. A., Phytochem., 29 (4):1051-1056 (1990).
36- Vanhuystee, R. B. and Lobarzewski, J., Plant. Scilett., 27:59-67 (1982).
٣٧- جيرالد ريد ،ترجمة د.باسل دلالي "الانزيمات في التصنيع الغذائي " ،مديرية دار الكتب للطباعة والنشر ،جامعة الموصل ص١٩٩(١٩٨٢) .
38- Neres, V. A. and Lournco, E. J., Rev. Cience. Farm., Saopoulo, 7:101-107 (1985)
20- Chuang, W. T. and Chen, A. K., Chem. Abstr., 109 11, 88588a (1988).
21- SunH. Y, Yu, R. H. and Chang, C. T, Biochem. Mol. Biol.2 9(1):185-195(1993).
22- Loyurenco, E. J. and Neres, V. A., Cienc .Tecnol. Aliment., 17(1):42 – 48 (1997).
23- Ahmad, T.Y. and Hamody, I. A., Raf.J. of Sci., 12 (2) : 28 – 40 (2000).
24-Van Huystee, R. B., Malko, M., Wen, K. and Gijzen, M. Can. J. Bot., 72:1432.1435.(1994)
25-Khan, V., Goldshmidt, S., Amir, J. and Granit, R. J. Food Sci., 46: 756 – 764 (1981)
26-Robinson, D. S., Bretherick, M. R. and Donnelly, J. K. Inter. J. Food Sci. and Technonl 24:613 – 618 (1989).
27- Al6tschul, M. Abrams, R. and Hogenss, T. R. J. Biol. Chem., 136:777. Citedby" Advances in Enzymology" Interscience Publishers, Inc. New York, 3: 146 (1940).
28-Anger,K." Vero Peroxidase", Advances in Enzymogy, Interscience Puplishers, I. C. Newyourk, 3:37(1943) .
29- Summer, J. B. and Gjessing, E. S., Arch. Bio Chem.,2:291 Cited by" Methods in Enzymology" .

(Received / / 2007, Accepted / / 2008)

Abstract

The research was conducted by isolation of peroxidase from cabbage (*Brassica oleracea Var. capitate L)* using different biochemical techniques.

It was shown that using gel filtration chromatography on sephadex G-75, the solution of proteinous precipitate produced by ammonium sulphate saturation contains two proteinous peaks. The first peak obtained maximum specific activity (24) folds of purification while the second peak obtained minimum specific activity

Further more the comparative molecular weight of partially purified peroxidase **(**first proteinous peak**)** using gel filtration was found to be (40000+2000) Dalton.

The research was also concerned with determination the optimum conditions of peroxidase as maximum activity was obtained by using sodium phosphate buffer (100mM) at PH(7.0) with optimum temperature (50)C,the incubation time was one minute and the[s] was (20)mM by using linweaver-Burk plot was found that the Vmax and Km have the values of (0.4) µmol /ml /min of proteinous solution and (11.0- 11.5)mM respectively

The results also indicated that the activity of enzyme decreased gradually to 63% and 55% when the enzyme stored for (28) day at 4C and 30-35C respectively.