مجلة الزراعة العراقية مجلد١٠ عدد١ ص١٢١-١٣٢ آيار/٢٠٠٥

انزيمات نبات جزيئة الديباج *Calotropis procera*

П استخلاص وتنقية جزئية لانزيم البيروكسيديز من نبات الديباج ودراسة بعض صفاته

خالدة عبد الرحمن شاكر

الملخص

تم استخلاص انزيم البيروكسيديز من الاوراق والسيقان الطرية لنبات الديباج باستخدام ثلاثة محاليل استخلاص مختلفة وشملت: ١- الماء المقطر، ٢- محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز ٠,٢ مولار وبأس هيدروجيني٧، ٣- محلول كلوريد الصوديوم بتركيز ٦% الحاوي على حامض البوريك بتركيز ٢%. اشارت النتائج الى ان الفعالية النوعية للانزيم المستخلص باستخدام محلول رقم (٣) قد تفوقت على تلك المستخلصة باستخدام المحلولين الاخرين (١،٢)، وعليه اعتمد هذا المحلول في هذه الدراسة.

استخدم ملح كبريتات الامونيوم وبدرجة تشبع بلغت ٦٥% لتركيز المحتوى البروتيني للمستخلص الانزيمي الخام واجريت عملية التنافذ الغشائي للراسب الناتج. اعقبتها عملية تجفيد الانزيم واكملت خطوات التنقية اللاحقة باستعمال عمود سيفاكريل (S-200) بابعاد (٦٠×١,٥ سم) لاجل الحصول على انزيم منقى جزئيا.

اشارت نتائج توصيف الانزيم الى ان الحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية والفعالية النوعية للانزيم الناتج بلغ (٧٩,٥%، ٢,٨ و٢١٥٠٢,٥٩ وحدة/ملغم) على التوالي. بلغ الوزن الجزيئي للانزيم ٥٥,٥٩٠ كيلو دالتون مقدرة بطريقة الترشيح الهلامي، واحتوى الانزيم على ١٤,٤% مواد كربوهيدراتية وكان الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية الانزيمية وللثباتية ٥,٥ و٥ على التوالي، الا انه فقد اكثر من ٩٠% من فعاليته الاصلية عند الأس الهيدروجيني ٨,٥ اما درجة الحرارة المثلى للفعالية فقد بلغت ٥٥م° واحتفظ الانزيم بكامل فعاليته لدى خزنه على درجات حرارة تراوحت بين ٣٠-٥٥م ولمدة ١٠ دقائق عند الأس الهيدروجيني الامثل للثباتية. وبلغت طاقة التنشيط للانزيم٣٠,٧٠٢ كيلو جول.

اوضحت نتائج الفحوص البكتريولوجية ان الانزيم كان فعالاً في ابادة بكتريا القولون *Escherichia coli* وبكتريا *Bacillus subtilis* وبكتريا *Salmonella typhimurium* عند استخدامه مع بيروكسيد الهيدروجين وثايوسيانيد الصوديوم، وهذا يؤهله للاستخدام في اطالة العمر الخزني للحليب الخام.

المقدمة

يعد انزيم البيروكسيديز احد أنزيمات الاكسدة والاختزال الشائعة وتوجد في خلايا النباتات. يختلف توزيع الانزيم في اجزاء النبات بحسب فعاليته التخصيصية والحركية، وله العديد من المناظرات الحامضية والقاعدية ويؤدي دوراً مهما في العمليات الفسيولوجية التي تجري داخل الخلية (٨). يحتوي الانزيم على المعادن في موقعه الفعال لذا فهو يعد من البروتيزات المعدنية وان فك ارتباط هذه المجموعة يؤدي الى تثبيط الانزيم (١٣). كما يحتوي الانزيم على المواد الكربوهيدراتية وبنسب متفاوته تختلف باختلاف نوع الانزيم.

كلية الزراعة- جامعة بغداد- بغداد، العراق.

تاريخ تسلم البحث:أيلول/٢٠٠٢

تاريخ قبول البحث:ت١/٢٠٠٢

للانزيم استخدامات عديدة، ففي المجال الطبي يستخدم في الفحوص المناعية كفحص الايلازا او في تقدير سكر الكلوكوز في الدم والادرار. اما في المجالات الزراعية فهو يعد مؤشرا للاصابات النباتية وفي الكشف عن عمليات تمايز الاعضاء وتخصصها في الزراعة النسيجية وغيرها من الاستخدامات (٥،٩) . اما في مجال الصناعات الغذائية فهو يعد مؤشراً لكفاءة عمليات السلق (blanching) في الفواكة والخضراوات المعدة للحفظ (١٧، ٢٢). كما انه يستخدم وبوجود انزيمات اخرى في تقدير الكلوكوز والسكروز في الاغذية وفي تقويم محتوى الاغذية من المضادات الحيوية.

هدفت هذه الدراسة الى اضافة مصدر جديد الى المصادر المستخدمة لانتاج وتحضير هذا الانزيم ومن نبات ينتشر في مناطق عديدة من القطر وبالامكان توسيع زراعته وبتكاليف قليلة إلا وهو نبات الدياج *Calotropis procera* الذي ينتمي الى العائلة العشارية الصقلاوية Asclepiadaceae، ويعد الدياج نباتاً بريا صحراويا يتحمل الجفاف والملوحة ويكون مستديم الخضرة سريع النمو وتحتوي انسجتة على العصارة اللبنية Latex (١).

مواد وطرائق البحث

استخلاص الانزيم:

تم اختبار ثلاثة محاليل استخلاص مختلفة هي الماء المقطر ومحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز ٠,٢ مولار وذي أس هيدروجيني ٧، ومحلول كلوريد الصوديوم بتركيز ٦% والحاوي على حامض بوريك بتركيز ٢%. استخلص الانزيم بخلط ٥٠ غرام من اوراق النبات المقطعة بمساحة ٠,٥-١ سم^{٢} مع ١٥٠ مل من محلول كلوريد الصوديوم (٦%) والحاوي على ٢% حامض البوريك في خلاط كهربائي وفي درجة حرارة ٤م ولمدة ١٠دقائق ثم استبعدت بقايا الاجزاء الصلبة باستخدام قماش من الململ، ثم نبذ الراشح بسرعة ٥٠٠٠ دورة/ دقيقة ولمدة ٢٠ دقيقة وفي درجة حرارة ٤ م، استخدم الراشح لتقدير الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين، واهمل الراسب الناتج. واجريت العملية نفسها باستخدام المحلولين الاخرين لاستخلاص الانزيم.

تقدير الفعالية الانزيمية:

قدرت الفعالية الانزيمية حسب الطريقة التي وصفها عمران (٢) وباستخدام محلول الكوايكول بتركيز ٠,٠٥ مولار ومحلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ٠,٠٢ مولار ومحلول ترس Tris بتركيز ٠,٠٤ مولار والحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز ١ مولار الدارئ بأس هيدروجيني ٧.

حضر مزيج التفاعل بخلط جزء واحد من كل المحاليل المشار إليها أعلاه مع أجزاء من الماء المقطر وقبل الاستعمال مباشرة (وحدة الفعالية هي كمية الانزيم التي تسبب زيادة في امتصاص الضوء مقدارها ٠,٠٠١ عند طول موجي مقداره ٤٢٠ نانومتر في الدقيقة الواحدة).

تقدير تركيز البروتين:

قدر تركيز البروتين في المستخلص الانزيمي قيد الدراسة باستخدام طريقة Lowry وجماعته (١٠) في المستخلص الانزيمي قيد الدراسة.

تنقية الانزيم:

تضمنت عملية تنقية الانزيم الخطوات الاتية:

١- ترسيب الانزيم باستخدام ملح كبريتات الامونيوم وبنسبة اشباع تراوحت بين ٢٠-٨٥% ثم فصل الراسب بعد اجراء عملية النبذ المركزي وبسرعة ٥٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة ٢٠ دقيقة وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في كل من الراشح والراسب للتاكد من خلو الراشح من الانزيم.

٢- الترشيح الهلامي: مرر المحلول الانزيمي المرسب في الخطوة اعلاه بعد اجراء عملية التنافذ الغشائي له تجاه الماء المقطر على عمود الترشيح الهلامي الحاوي على مادة السيفاكريل (S-200) وبابعاد ١,٥ × ٨٠ سم، واستردت بمحلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز ٠,٢ مولار وبأس هيدروجيني ٦. وتم التاكد من استرداد جميع الاجزاء البروتينية بقراءة الامتصاصية للاجزاء المستردة بجهاز المطياف الضوئي وعند الطول الموجي ٢٨٠ نانومتر. وقدرت الفعالية الانزيمية لكل جزء منفصل ثم جمعت الاجزاء التي اظهرت فعالية واعيد امرارها على العمود نفسه لحين تطابق القمة البروتينية مع قمة الفعالية الانزيمية.

توصيف الانزيم:

الوزن الجزيئي: قدر الوزن الجزيئي بطريقة الترشيح الهلامي وباستخدام عمود التنقية نفسه، واحتسب حجم الفراغ void volume (Vo) باستخدام الدكستران الازرق (٢٠٠٠) ، اما البروتينات القياسية التي استخدمت لتعيين حجم الاسترداد elution volume (Ve) فقد شملت كلا من اللايسوزايم (١٤,٤٠٠كيلو دالتون) والتربسين (٢٣,٠٠٠كيلو دالتون) والبومين المصل البقري (٧٦,٠٠٠كيلو دالتون) والبومين البيض (٤٣,٠٠٠كيلو دالتون).

الأس الهيدروجيني الامثل للثبات وللفعالية الانزيمية:

تم تعيين الأس الهيدروجيني الامثل لثبات وفعالية الانزيم باتباع الطريقة التي وصفها Yoon وجماعته (٢٤) اذ تم تحضير محاليل دارئه (سترات، خلات وفوسفات) ذوات قوة ايونية ٠,٠٥ وعند قيم أس هيدروجينية تراوحت بين ٤-٨,٥. تم تعيين الأس الهيدروجيني الامثل للثبات بعد حضن حجم معين من المحلول الانزيمي مع حجم مساو له من المحاليل الدارئة في حمام مائي بدرجة حرارة ٣٥°م ولمدة ٣٠ دقيقة ثم نقلت الى حمام ثلجي وجري تقدير الفعالية الانزيمية المتبقية وحسب الطريقة التي ذكرها (٢) أما الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية الأنزيمية فقد تم تقديرها بمزج محلول التفاعل عند قيم الأس الهيدروجينية المشار أليها أعلاه مع الأنزيم.

درجة الحرارة المثلى للفعالية والثبات وتعيين طاقة التنشيط:

تم تحديدها باستخدام درجات حرارة تراوحت بين ٢٥-٧٥ م وبفارق خمس درجات وعند الأس الهيدروجيني الامثل للثبات. تم تعيين الثبات الحراري بحضن كمية معلومة من الانزيم مع المحلول الدارئ الامثل لثبات الانزيم لمدة ١٠ دقائق في درجات الحرارة المشار اليها اعلاه. ثم قدرت الفعالية المتبقية لكل درجة حرارة. اما درجة الحرارة المثلى للفعالية فقد تم تقديرها بحضن مزيج التفاعل مع كمية معلومة من الانزيم ولمدة ٨ دقائق وعند درجات الحرارة اعلاه ثم قدرت فعاليتها الانزيمية. قدرت طاقة التنشيط برسم العلاقة بين لوغاريتم سرعة التفاعل للانزيم ومقلوب درجة الحرارة المطلقة وطبقاً لمعادلة ارهينوس.

تقدير الفعالية الحيوية لنظام البيروكسيديز تجاه الاحياء المجهرية:

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر (Well diffusion) للتعرف على فعالية الانزيم في نظام البيروكسيديز المضادة لعزلات بكتريا الاختبار والتي شملت *B. subtilis* و*S. phimurium* و*E. coli* اذ تم الحصول على هذه العزلات من مختبرات كلية العلوم / الجامعة المستنصرية عدا بكتريا *B. subtilis* فقد تم الحصول عليها من مختبرات كلية الزراعة / جامعة بغداد. تم زرع (١٠٠ مايكرلتر) من لقاح العزلات البكترية بمعدل ١٠° خلية / مل في اطباق بتري معقمة، فيها الوسط الغذائي الصلب nutrient agar وبطريقة النشر، ومزج انيا بيروكسيد الهيدروجين وثايوسيانيد الصوديوم بنسبة ٤:٦حجم / حجم وعقم المزيج بوساطة الترشيح بمرشح بكتريولوجي Millipore (٠,٢٢ مايكرون)، كما تم تعقيم انزيم البيروكسيديز وخلط مع المزيج بنسبة ١:١حجم / حجم واستخدمت ماصة باستور معقمة لعمل ثقوب (٣) في

الوسط الغذائي ثم ملئ احد هذه الثقوب (الحفر) بمقدار ١٠٠ مايكرولتر من مزيج بيروكسيد الهيدروجين وثايوسيانيد الصوديوم، ملئ الثاني بمقدار ١٠٠ مايكرولتر من المزيج السابق الذكر مضاف اليه انزيم البيروكسيديز وترك الثقب الثالث (حفرة) بدون اضافة وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ١٠ م ولمدة ٢ ساعة لغرض السماح للمواد بالانتشار خلال الوسط الغذائي ثم نقلت الاطباق الى حاضنة على درجة حرارة ٣٧م وتركت لمدة ٢٤ ساعة جرى قياس اقطار مناطق التثبيط Inhibition zone لكل ثقب او حفرة.

النتائج والمناقشة

استخلاص الانزيم:

يوضح جدول (١) الفعالية الانزيمية (وحدة / مل) والفعالية النوعية (وحدة / ملغم) لانزيم البيروكسيديز المستخلص من نبات الديباج (اوراق وسيقان) وباستخدام محاليل استخلاص مختلفة. اذ يلاحظ ان افضل محلول استخلاص كان محلول كلوريد الصوديوم بتركيز ٦% الحاوي على حامض البوريك بتركيز ٢%، وقد اعطى الانزيم فعالية انزيمية وفعالية نوعية مقدارها (٣٦٢٠٠، ١٠٩٠٣٦) على التوالي. بينما اعطت المحاليل ١ و٢ فعالية انزيمية وفعالية نوعية مقدارها (١٦٨٠٠ ، ٣٩٥٢٩) و(٣١٨٦٦,٦ ، ٨٠٥٦٧) على التوالي. واستناداً الى هذه النتائج المستحصلة استخدم محلول رقم (٣) في استخلاص الانزيم في هذه الدراسة.

جدول ١: الفعالية النوعية لانزيم البيروكسيديز المستخلص من نبات الديباج باستخدام ثلاثة محاليل استخلاص مختلفة

المحاليل	الفعالية (وحدة / مل)	الفعالية النوعية وحدة/ملغم
الماء المقطر	١٦٨٠٠	٣٩٥٢٩,٤
فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز ٠,٢ مولار ورقم هيدروجيني ٧	٣١٨٦٦,٦	٨٠٥٦٧,٠
كلوريد الصوديوم بتركيز ٦%+حامض البوريك بتركيز ٢%	٣٦٢٠٠	١٠٩٠٣٦,١

تركيز وتنقية الانزيم:

تم تركيز الأنزيم باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع بلغت ٢٠-٨٥% وباسلوب الاضافة التدريجية للملح الى محلول المستخلص الأنزيمي. وكانت نسبة اشباع ٦٥% هي الافضل لانها حققت اعلى فعالية انزيمية مقارنة بنسب الاشباع الاخرى، جاءت هذه النتائج مغايرة الى ماتوصل اليه الصوفي (٣) اذ وجد ان افضل نسبة اشباع لترسيب انزيم البيروكسيديز من الحليب النباتي لنبات الديباج هو ٨٠%، اكملت عملية تنقية الانزيم باستخدام تقنية الترشيح الهلامي خلال عمود سيفاكريل (S-200) وكما موضح في الشكل (١) فقد تم الحصول على قمة فعالية واحدة تطابقت مع قمة البروتين الرئيسة ولم تتفق هذه النتائج مع نتائج دراسات أخرى (٣،٢) التي اشارت الى وجود اكثر من مناظر انزيمي للبيروكسيديز. ويعزى السبب الى اختلاف المصادر الانزيمية اضافة الى اختلاف التقنية المتبعة في عملية التنقية .

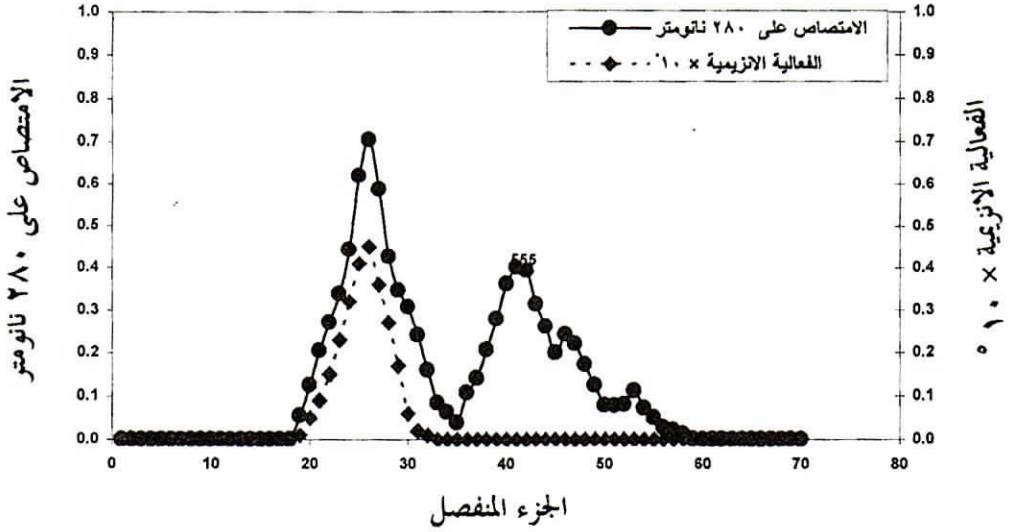
يبين جدول (٢) ازدياد الفعالية النوعية للانزيم وانخفاض المحتوى البروتيني مع تقدم خطوات التنقية اذ كانت الفعالية النوعية للمستخلص الانزيمي الخام بواقع ٧٦٦٤,٢٣ وحدة / ملغم، بينما ازادت بعد خطوة الترشيح الهلامي لتصبح ٢١٥٠٢,٥٩ وحدة / ملغم. وبلغت الحصيلة الانزيمية ٧٩,٠٤% وعدد مرات التنقية ٢,٨. وكانت الحصيلة الانزيمية في هذه الدراسة اعلى بالمقارنة مع دراسات آخرى (١٩،٢) اجريت لتنقية انزيم البيروكسيديز من مصادر نباتية أخرى. اما عدد مرات التنقية فقد كان اقل ويعود السبب الى اختلاف التقنيات والخطوات المتبعة في تنقية الانزيم من مصادر نباتية مختلفة.

جدول ٢: مراحل تنقية انزيم البيروكسيديز من نبات الديباج

المراحل	الحجم	الفعالية الانزيمية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (%)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكمية (وحدة/مل)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية (%)
مستخلص خام	١٠٠	٢١٠٠٠	٢,٤٧	٧٦٦٤,٢٣	٢١٠٠٠٠٠	١	١٠٠
الترسيب بكبريتات الامونيوم والديلزة والتركيز	١٠	١٧٢٠٠٠	٩,٣١	١٨٤٧٤,٧٦	١٧٢٠٠٠٠	٢,٤١	٨١,٩١
الترشيح الهلامي باستخدام S-200	٢٠	٨٣٠٠٠	٣,٨٦	٢١٥٠٢,٥٩	١٦٦٠٠٠٠	٢,٨٠٦	٧٩,٠٤٧

الوزن الجزيئي للانزيم:

يوضح شكل (٢) العلاقة الخطية بين (Ve/Vo) ولوغاريتم الوزن الجزيئي لعدد من البروتينات القياسية (لايسوزايم، تربسين، البومين المصل البقري والبومين البيض) والتي استخدمت لتقدير الوزن الجزيئي للانزيم قيد الدراسة باتباع تقنية الترشيح الهلامي بوساطة عمود سيفاكريل (S-200) وبابعاد ١,٥ × ٦٠سم. كانت القيمة المستحصلة للوزن الجزيئي ٥٥,٥٩ كيلو دالتون، وجاءت هذه القيمة اعلى من تلك التي حصل عليها الصوفي (٣) لاحدى المناظرات لأنزيم البيروكسيديز المنقى من الحليب النباتي لنبات الديباج حيث حصل على ٤٦,٢٣٨ كيلودالتون وباستخدام التقنية نفسها ويعزى السبب الى اختلاف اجزاء النبات التي تم استخلاص الأنزيم منها.

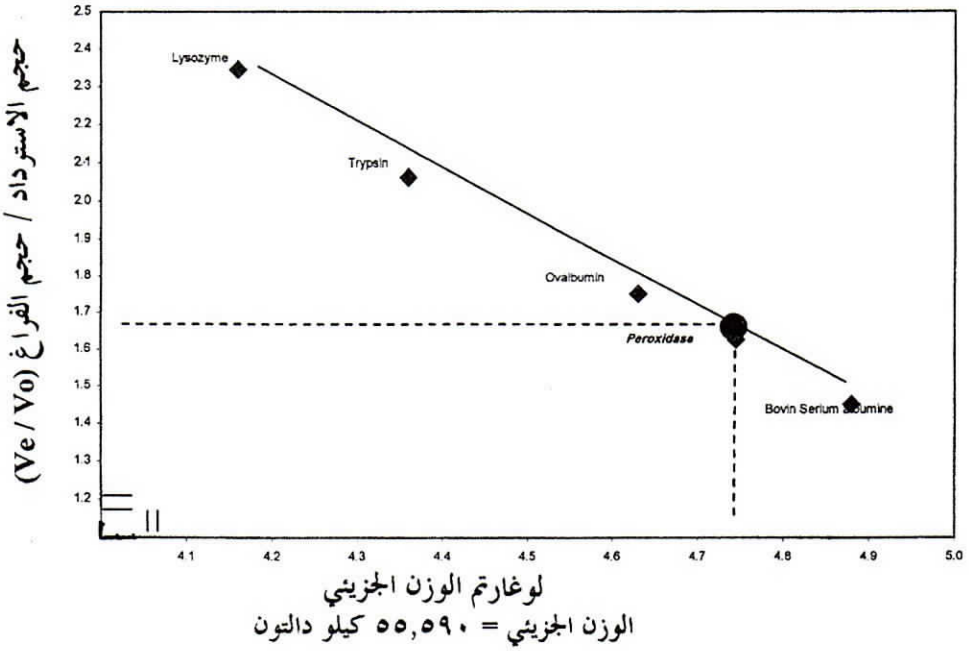


شكل ١: كروماتوكرافي الترشيح الهلامي في عمود (S-200) Sephacryl بأبعاد ١,٥×٥٨ سم والموازن بمحلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز ٠,٢ مولار وبأس هيدروجيني ٦,٠، وتم الاسترداد بالمحلول الدارئ نفسه بسرعة جريان ١٨ مل/ ساعة وبواقع ٣,٠ مل/ جزء.

درجة الحرارة المثلى والأس الهيدروجيني الأمثل لثباتية وفعالية الأنزيم:

يوضح شكل (٣) نتائج دراسة درجة الحرارة المثلى لفعالية ثباتية الأنزيم، ازدياد الفعالية الانزيمية مع ارتفاع درجة حرارة وسط التفاعل حتى بلغت اقصاها عند درجة حرارة ٥٥°م ثم بدات بالانخفاض مع زيادة درجة الحرارة. وقد احتفظ الانزيم بكامل فعاليته لدى حضنه عند درجات حرارة تراوحت بين ٣٠-٥٥م ولمدة ١٠ دقائق بينما فقد الانزيم ٣٥% من فعاليته عند حضنه عند درجة حرارة ٧٥م للمدة نفسها. جاءت هذه النتائج مقاربة الى ماشار اليه الصوفي (٣) عند دراسة انزيم البيروكسيديز القاعدي المنقى من الحليب النباتي لنبات الديباج وكذلك جاءت متفقة مع

ماشارت اليه عمران (٢) عند دراستها انزيم البيروكسيديز المستخلص من اوراق سعف النخيل. وقد اشار Ganthavor وجماعته (٧) الى ان فعالية انزيم البيروكسيديز المستخلص من نبات الهليون لم تتاثر لدى حضنها بدرجة حرارة ٥٠م لمدة ١٠ دقائق، الا انه فقد ٩٠% من فعاليته عند حضنه عند درجة حرارة ٧٠م ولمدة ١٠ دقائق. ويعود سبب اختلاف درجة ثبات انزيمات البيروكسيديز المستخلص من مصادر مختلفة الى كونها تمتلك مناظرات حامضية وقاعدية. ومن المعروف ان المناظرات الحامضية تكون اكثر ثباتا غالباً من المناظرات القاعدية تجاه الحرارة (١٢).



شكل ٢: تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم البيروكسيديز بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephacryl (S-200)

يوضح شكل (٤) نتائج تعيين الأس الهيدروجيني الامثل لفعالية وثباتية الانزيم. اذ لوحظ ازدياد فعالية الانزيم مع زيادة الأس الهيدروجيني لوسط التفاعل ولغاية ٥,٥ وعندها بلغت الفعالية الإنزيمية أقصاها ثم اخذت بالانخفاض مع زيادة قيم الأس الهيدروجيني اذ فقدت حوالي ٩٠% من فعاليتها عندما بلغ الأس الهيدروجيني لوسط التفاعل ٨,٥.

اظهر الانزيم افضل ثباتية عند الأس الهيدروجيني ٥ وفقد مايقارب ٩٥% من فعاليته لدى حضنه عند الأس الهيدروجيني ٨,٥ ولمدة ١٠ دقائق بينما احتفظ الانزيم بحوالي ٩٠% من فعاليته لدى حضنه عند الأس الهيدروجيني ٥,٥ للمدة نفسها. كما لوحظ ان الانزيم فقد مايقارب ٨٤% و٨٠% من فعاليته لدى حضنه عند قيم الأس الهيدروجيني ٤,٥ و٨ على التوالي. ولم تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه الباحث (٣) عند دراسته انزيم البيروكسيديز القاعدي المنقى من حليب نبات الدياج اذ كان الأس الهيدروجيني الامثل للفعالية الانزيمية ٦,٥ الا ان الأس الهيدروجيني للثبات كان مقارباً الى النتائج التي حصل عليها في هذه الدراسة اذ فقد الانزيم نسبة كبيرة من فعاليته عند قيم الأس الهيدروجيني المتطرفة. وجاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما ذكره الباحثون (٦) حيث وجد ان الأس الهيدروجيني الامثل لانزيم البيروكسيديز المنقى من ثمار الشليك هو ٦. ويعود سبب اختلاف قيم الأس الهيدروجيني المثلى للفعالية الانزيمية الى اختلاف وسط التفاعل واختلاف الطرائق المتبعة لتقديرها (٢١).

المحتوى الكربوهيدراتي للانزيم:

اشارت النتائج المستحصلة الى ان الانزيم قيد الدراسة يحتوي على مواد كربوهيدراتية بنسبة ١٤,٤%. وجاءت هذه النتائج اعلى بقليل من تلك التي حصل عليها الباحث (٣) عند دراسته المحتوى الكربوهيدراتي لانزيم

البيروكسيديز المنقى من حليب نبات الديباج الا ان القيمة المستحصلة كانت ضمن المدى الذي اشار اليها عدد من الباحثين اذ وجدوا ان المناظرات الانزيمية للبيروكسيديز المنقى من اوراق الشعير ومن بادرات الشعير تراوحت بين ١٣-٢٦% (١٩، ٢٠).

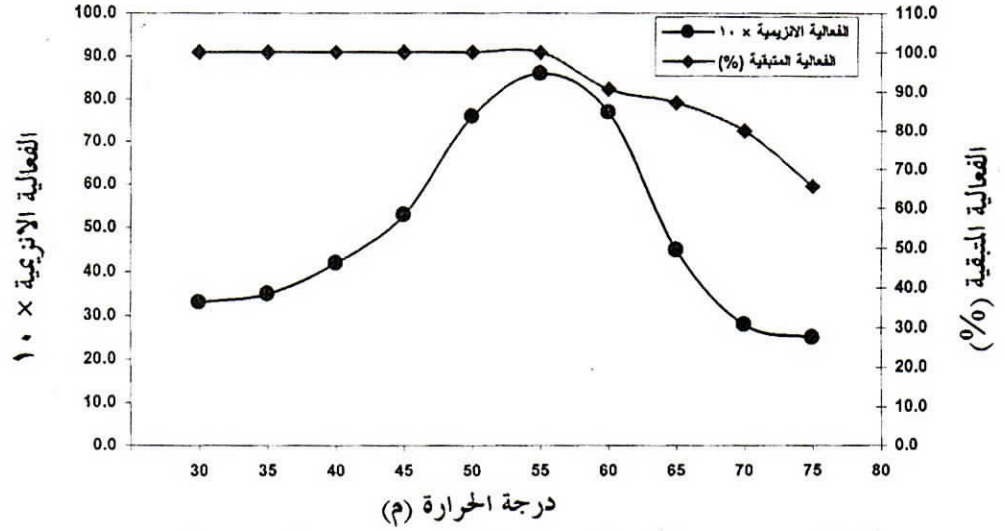
الفعالية الحيوية لنظام البيروكسيديز:

يشير جدول (٣) الى ان وجود انزيم البيروكسيديز مع بيروكسيد الهيدروجين وثايوسيانيد الصوديوم يشكل معاً مضاداً لعدد من الاحياء المجهرية. وفي هذه الدراسة وقع الاختيار على بكتريا *B. subtilis*، *S. typhimurium* و*E.coli* اذ كان قطر منطقة التثبيط في حالة استخدام النظام اكبر بالمقارنة مع المناطق التي لم يستخدم فيها النظام بالكامل. ويوضح الشكل (٦ A,B,C) الاوساط الزرعية التي استخدم فيها انزيم البيروكسيديز في النظام المضاد تجاه الاحياء المجهرية المشار اليها اعلاه. وتأتى أهمية أنزيم البيروكسيديز في هذا النظام في المساعدة على اكسدة مركب الثايوسيانيت بوساطة بيروكسيديز الهيدروجين الى هايبوثايوسيانيت وهذا المركب يتميز بتاثيره المضاد لنمو البكتريا (١٥) ، ويكون نظام البيروكسيديز غير متخصص في فعاليته الحيوية بسبب تباين حساسية البكتريا المختلفة تجاه هذا النظام ولذلك فهو اما ان يكون مثبطاً للنمو bacteriostatic او يكون قاتلاً لها bactericidal (١٨).

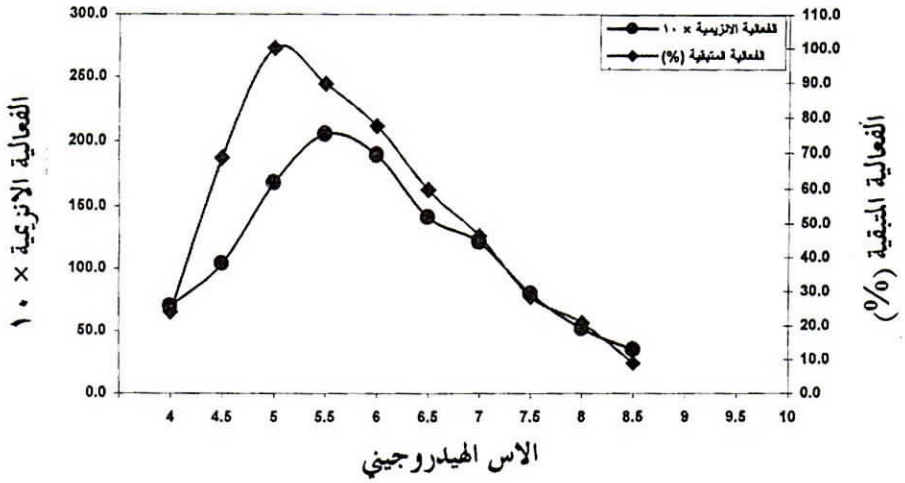
وتشير العديد من الدراسات (١١، ١٦ و٢٣) الى ان تاثير نظام البيروكسيديز تجاه البكتريا السالبة لصبغة كرام يكون قاتلاً . ويذكر بعض الباحثين (٤ و١٤) أن هذا النظام له دور في تثبيط بكتريا العائدة للجنس *Streptococci* الشائعة التي يحملها الانسان وان الرضيع يمتلك ، وبشكل طبيعي انزيم البيروكسيديز في لعابه خلال الايام الاولى بعد الولادة. لذا يمكن القول ان الانزيم قيد الدراسة بامكانه ان يكون احد العناصر المهمة في هذا النظام لاجل اطالة العمر الخزني للمواد الغذائية.

جدول ٣: الفعالية الحيوية لنظام البيروكسيديز "قيد الدراسة" تجاه بكتريا *S. typhimurium, E. coli* و B. subtilis

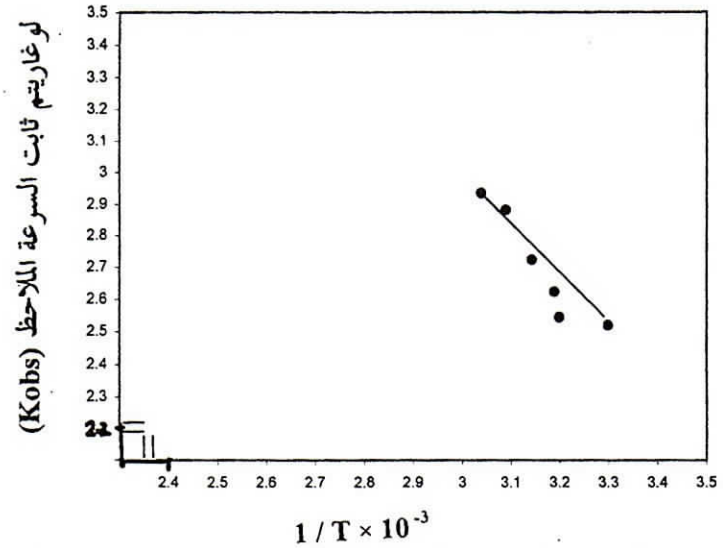
قطر منطقة التثبيط (ملم)					
E. coli		B. subtilis		S. typhimurium	
ضد العاملين فقط	ضد النظام	ضد العاملين فقط	ضد النظام	ضد العاملين فقط	ضد النظام
١,٥	٢,٤	١,٩	٢,٧	١,٤	٢,٥
العاملان هما بيروكسيد الهيدروجين و ثايوسياليد الصوديوم					



شكل ٣: منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات انزيم البيروكسيديز المنقى من حليب نبات الديباج.



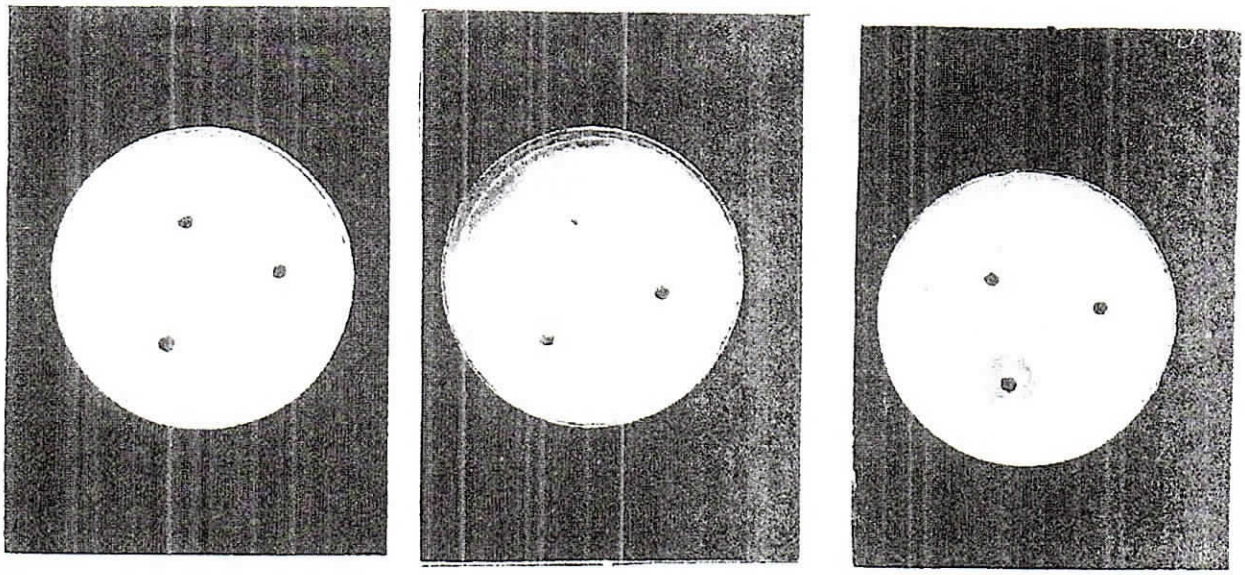
شكل ٤: منحنى الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات أنزيم البيروكسيديز المنقى من حليب نبات الديباج.



شكل ٥: منحنى آرهينوس لأنزيم البيروكسيديز المنقى من حليب نبات الديباج باستخدام الكوايكول كمادة أساس

طاقة التنشيط = ٧,٣١ سعرة / مول

طاقة التنشيط = ٣٠,٧٠٢ كيلوجول



شكل ٦: الفعالية الحيوية لنظام البيروكسيديز (باستخدام انزيم قيد الدراسة) باتجاه بكتريا S. E. coil ، Typhimurium (A)، (B) والـ B. subtilis (C)

المصادر

1- الدجوى، علي (١٩٩٦). موسوعة انتاج النباتات الطبية والعطرية. الكتاب الثاني. مكتبة مدبولي – مصر.

2- عمران، محفوظة عباس (١٩٩٧). تنقية وتحديد الصفات الاساسية لانزيم البيروكسيديز من اوراق نخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.). رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة بغداد.

3- الصوفي، محمد عبد الرزاق (٢٠٠١). فصل أنزيم البيروكسيديز وتنقيته وتوصيفه في الحليب النباتي لنبات الديباج *Calotropis procera* وإمكانية استخداماته التطبيقية . رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد .

4- Bjorck, L. (1990). Antimicrobial Agent in Milk. In: Porc. 23ed Int. Dairy Conger. Inter. Dairy Federation, Ottawa, Canada., 2:1652–1667.

5- Bouazza, A.; S. Rambour; T. Gaspar and B. Legrand (1993). Peroxidase During the Course of Callusing and Organ Differentiation from Root Explants of (*Cichorium intybus*). Biologia Planta., 35(4): 481–489.

6- Civello, P. M.; G. A Martinez; A. R. Chaves and M. C. Anon (1995). Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* duch.):Partial Purification and Determination of Some Properties. (Abs). J. Agricultural and Food Chem., 43(10):2596–2601.

7- Ganthavorn, C.; C. W. Nagel and J. R. Powers (1991). Thermal Inactivation of Asparagus Lipoxygenase and Peroxidase. J. Food Sci., 56(1):47.

8- Gaspar, Th.; C. Penel; D. Hagege and H. Grreppin (1991). Peroxidases in Plant Growth, Differentiation, and Development Processes. In: Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidase. (eds. J. Lobarzewki, H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar). Univ. Geneva-Switazerland pp. 249–280.

9- Gaspar, Th.; C. Kevers; JF.; Hausman, JY. Berthon and V. Ripetti (1992). Partical Uses of Peroxidase Activity as a Predictive Marker of Rooting Performance of Micropropagated Shoots. Agron., 12: 757– 765.

10- Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough; A. L. Farr and R. J. Randall (1951). Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. J. Biological Chem., 193 (1):265–275.

11- Marshal, V. M. and B. Reiter (1980). Comparison of the Antibacterial Activity of Hypothiocyanite Anion Towards *Streptococcus lactis* and *Echerichia coli*. J. Gen. Microbial., 120:512–516.

12- Mclellan, K. M. and D. S. Robinson (1981). The Effect of Heat on Cabbage and Brussels Sprout Peroxidase Enzymes. Food Chem., 7: 257–266.

13- Morimoto, S.; N. Tateishi; N. Inuyama; F. Taura; H. Tanaka and Y. Shoyama (1999). Identification and Molecular Characterization of Novel Peroxidase With Structural Protein-Like Properties. J. Biological Chem., 274(37): 26192–26198.

14- Pruitt, K. M. and B. Reiter (1985). Biochemistry of Peroxidase System: Antimicrobial. In: The Lactoperoxidase System: Chemistry and Biological Significance. Marcel Dekker, New York.

15- Pruitt, K. M. and J. Tenovuo (1982). Kinetics of Hypothiocyanate Production During Peroxidase- Catalyzed Oxidation of thiosyanate. Biochem. Biophys. Acta., 704:204–214.

16- Purdy, M. A.; J. Tenovuo; K. M. Pruitt and J. R White.(1983). Effect of Growth Phase and Cell Envelop Structure on Susceptibility of *Salmmonella typhimurium* to the Lactoperoxidase-Thiocyanate-Hydrogen peroxide system. Infect. Immunol., 39:1187–1195.

17- Reed, G. (1975). Oxidoreductases In: Enzymes in Food Processing. Academic Press, New York.

18- Reiter, B.; V. M. Marshall; L. Bjorck and C. G. Rosen (1976). Nonspesific Bacterial Activity of the Lactoperoxidase, Thiocyanate, Hydrogen Peroxide system of Milk Against *Escherichia coli* and some gram-negative pathogenic. Infect. Immunol., 13:800-807.

19- Rescigno, A.; E. Sanjust; N. Curreli; A. Padiglia and G. Floris (1993). Improved Chromotographic Purification of Peroxidase and β-Glucosidase from *Hordum vulgare* Seedling. Preparative Biochem., 23(4):485–492.

20- Saeki. K.; O. Ishikawa; T. Fukuoka; H. Nakagawa; Y. KAI; T. Kakuno; J. Yamashita; N. Kasai and T. Horio (1986). Barley Leaf Peroxidase: Purification and Characterization. J. Biochem., 99: 485–494.

21- Serrano, L. M. and R. A. Barcelo (1997). Kinetic Properties of (+) – Catechin Oxidation by a Basic Peroxidase Isoenzyme from Strawberries. J. Food Sic., 62(4):676–679.

22- Shew, S. C.; A. O. Chen (1991). Lipoxygenase as Blanching Index for Frozen Vegetable soybeans. J. Food Sic., 56(2):510–517.

23- Shimazaki, K. I. (1996). Antimicrobial Proteins of Milk, Inter. Sympo. On Food Hygiene and Safety. Seoul. Koria., p.136.

24- Yoon, E. S.; S. J. Kang;Noh, B. S. And Choi, E. H. (1993). Isolation and Characterization of Peroxidase from Jeruslam Artichoke Tucers. Korean. J. Food Sci. Technol., 25 (5):565-570.

Iraqi J. Agric. Vol.10 No.1 pp.121–132 May/2005

"*CALOTROPIS PROCERA*" ENZYMES II–EXTRACTION, PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE FROM *CALOTROPIS PROCERA*

K. A. Shakir

ABSTRACT

Three different solutions [1- distilled water, 2- potassium phosphate buffer (0.2 M), pH7 and 3- sodium chloride (6%) + boric acid (2%)] were used separately to extract peroxidase from *Calotropis procera* leaves and stems at 4° C. The specific activity of enzyme extracted by solution (No. 3) was the highest, and considered as the best extraction solution.

The enzyme was precipitated by gradual addition of ammonium sulphate to final saturation of 65%. The precipitate was dialyzed against distilled water, lyophilized and then applied on a column of sephacryl S-200 (60 x 1.5cm) for partial purification. The purification folds, enzyme yield and specific activity were 79.05%, 2.8 and 21502.59 respectively.
The molecular weight of partially purified enzyme was 55.590 kda as determined by gel filtration chromatography and the carbohydrates content was 14.4%. The optimum temperature for enzyme activity was 55°C, and the enzyme was most stable at 30-55°C over 10 min. incubation. The enzyme showed maximum activity at pH 5.5 and it retained more than 90% of original activity over 10 min. incubation at pH 5. While it lost more than 90% of the original activity at pH 8.5 over the same incubation period. The activation energy for conversion of substrate to product was 30.702KJ.

It was found that the obtained enzyme was effective against *E. coli*, *B. subtilis* and *S. typhimurium* as used in combination with hydrogen peroxide and sodium thiocyanate. In conclusion this enzyme could be considered to extend the shelf life of raw milk.

College of Agric. - Baghdad Univ. – Baghdad, Iraq.