Received: 26/7/2020 **Accepted: 16/8/2020** **Published: 2021**

تنقية أنزيم البيروكسيديز من نبات الخس الشوكي (*Lactuca serriola* L.)

ا.د. رغد أكرم عزيز
كلية التربية الأساسية، الجامعة المستنصرية، قسم العلوم، بغداد، العراق
ragaad.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

مستخلص البحث:
استعملت طريقة الاستخلاص بوساطة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على 1ملي مولار L-cysteine مع اضافة 0.1 غم من مادة Polyclar AT للحصول على أنزيم البيروكسيديز من نبات الخس الشوكي Prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.)، وجرى تركيز الأنزيم باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم بنسب إشباع مقدارها 40-80% والحصول على الأنزيم بفعالية نوعية 6673 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 2.5 مرة وحصيلة أنزيمية 74.37%، تلاها تنقية الأنزيم باستعمال المبادل الأيوني DEAE-Sepharose، والحصول على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 11961 وحدة/ملغم وعدد مرات تنقية 4.5 مرة وحصيلة مقدارها 27.46%، ثم الترشيح الهلامي بمادة Sephacryl S-200 للحصول على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 15496 وحدة/ملغم وعدد مرات تنقية 5.8 مرة وحصيلة مقدارها 23.24%.

الكلمات المفتاحية: أنزيم البيروكسيديز، الخس الشوكي، استخلاص الأنزيم، تنقية الأنزيم.

المقدمة:

يعد أنزيم البيروكسيديز POD (EC:1.11.1.7) احد أنزيمات مجموعة الأكسدة والاختزال، ويعد احد أنواع البروتينات المعدنية كونه يحتوي على ذرة حديد في موقعه الفعال فضلا عن كونه بروتينا سكريا لاحتوائه على الكربوهيدرات خارج الموقع الفعال (Pandey & Dwivedi, 2011; Şişecioğlu *et al.*, 2010)، ويعمل هذه الأنزيم على تحفيز أكسدة مجموعة واسعة من مواد الأساس العضوية وغير العضوية بوجود بيروكسيد الهيدروجين كمستقبل للالكترونات (Sarika *et al.*, 2015).

يوجد الأنزيم في جميع الكائنات الحية (الأحياء المجهرية والنباتات والحيوانات) ويتركز وجوده بشكل رئيس في جدار الخلية (Gautério *et al.*, 2015)، ويعد أحد الإنزيمات الرئيسة التي تتحكم في نمو النبات وتطوره من خلال دوره في الفعاليات الحيوية المختلفة داخل الخلية (Koksal *et al.*, 2012) ، كما يقوم هذا الأنزيم مع أنزيم الكاتليز بدوره الفعال كمضاد للأكسدة من خلال قيامه بالإزالة الحيوية لبيروكسيد الهيدروجين المتكون في الخلية بسبب الفعاليات الحيوية وبالتالي يخلص الخلية من التأثير التراكمي المدمر لبيروكسيد الهيدروجين (Altın *et al.*, 2017)، وفيم يخص الدور الفسلجي له في الخلايا النباتية فقد وجد أنه يساهم في تكوين اللجنين في جدران الخلايا الثانوية أثناء النمو الطبيعي أو عند إصابة النباتات بمؤثرات خارجية (إصابات الأحياء المجهرية أو الضرر الفيزيائي كالقطع) مما يولد مما يوفر حاجزا دفاعيا لهذه النباتات تجاه تلك الأضرار (Koksal *et al.*, 2012)، وخارج الجسم الحي فأن الأنزيم يستعمل في العديد من التطبيقات المختبرية على نطاق

واسع للتشخيص السريري والتحاليل المناعية الدقيقة بسبب حساسيته العالية، كما يدخل في العديد من التطبيقات الطبية والصيدلانية والكيميائية والغذائية مثل توليف المركبات العطرية المختلفة وإزالة البيروكسيد من المواد الغذائية والمشروبات فضلا عن اعتماده كأحد الأدلة لكفاءة المعالجات الحرارة (البسترة) للأغذية وإزالة الفينولات من مياه الصرف الصحي ومعالجة النفايات الصناعية (Erdem *et al.*, 2015) ، وقد اتبعت طرائق عدة في استخلاص وتنقية هذا الأنزيم من مصادر نباتية مختلفة بغية دراسة صفاته، إذ استعمل (Şişecioğlu *et al.*, 2010) دارئ الفوسفات للاستخلاص وكبريتات الامونيوم للتركيز ومادة التبادل الأيوني CM-Sephadex A-50 لتنقية الأنزيم من الفجل الأسود black radish (*Raphanus sativus* L.)، وكذلك استعمل (Goyal & Chugh, 2014) دارئ الفوسفات للاستخلاص وكبريتات الامونيوم للتركيز والترشيح الهلامي بمادة Sephadex G-100 ثم التبادل الأيوني بمادة DEAE-cellulose عند تنقية الأنزيم من الدخن Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.)، واستعمل (Mall *et al.*, 2013) دارئ الفوسفات الحاوي على L-cysteine و Polyclar AT للسيطرة على الفينولات للاستخلاص وكبريتات الامونيوم للتركيز والترشيح الهلامي بمادة Sephadex G-100 عند تنقية الأنزيم من الطرنج (*Citrus medica* L.)، وتمكن (Kalin *et al.*, 2014) من تنقية الأنزيم من الفجل الأسود التركي Turkish black radish واللفت (الشلغم) Turnip roots (*Brassica rapa var. rapa* L.) بخطوة واحدة بعد الاستخلاص بدارئ الفوسفات بوساطة كروماتوكرافي الآلفة بمادة Sepharose 4B-L-tyrosine-4-aminobenzohydrazide، واستعمل (Erdem *et al.*, 2015) مادة الآلفة ذاتها للتنقية مع الاستخلاص بوساطة التجميد بالنتروجين السائل ومن ثم السحق والاستخلاص بفوسفات البوتاسيوم عند تنقية الأنزيم من الملفوف الأبيض (اللهانة) White cabbage (*Brassica oleracea var capitata f. alba*)، كما استعمل (Altın *et al.*, 2017) دارئ الفوسفات للاستخلاص والترسيب بكبريتات الامونيوم للتركيز ثم التبادل الايوني بوساطة CM-Sephadex A50 والترشيح الهلامي بمادة Sephadex G-25 عند تنقية الأنزيم من الحنطة Triticum wheat (*aestivum ssp. vulgare*)، كما تم تسجيل وجود الأنزيم وتنقيته من مصادر نباتية عدة منها الفجل البري Horseradish (*Armoracia rusticana* L.) (Sarika *et al.*, 2015)، وأوراق شجرة الاومبو Omb (*Phytolacca dioica* L.) (Guida *et al.*, 2011)، وثمار البابايا Papaya (*Carica papaya* L.) (Pandey *et al.*, 2012)، وشجرة الليوسينا Tree legume (*Leucaena leucocephala*) (Pandey & Dwivedi, 2011)، واليقطين (القرع) Sweet gourd (*Cucurbita moschata lam. poiret*) (Koksal *et al.*, 2012) ونخالة الرز (Gautério *et al.*, 2015)، ونظرا لأهمية هذا الانزيم واستعمالاته التطبيقية العديدة ولعدم توفر مصادر علمية تشير إلى تنقية هذا الانزيم من نبات الخس الشوكي (على حد علم الباحث) هدف هذا البحث الى دراسة إمكانية تنقية هذا الأنزيم (تميهدا لاجراء دراسات مستقبلة عليه) من هذا النبات الذي يعد احد الادغال النامية بصورة طبيعية في كافة ارجاء العراق.

المواد وطرائق العمل

استخلاص الأنزيم

قطعت أوراق النبات بعد تنظيفها إلى قطع صغيرة بمساحة 1سم^2 تقريبا، ثم جرى الاستخلاص باستعمال خلاط كهربائي لمدة 5 دقائق وبظروف مبردة وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Mall *et al.* (2013) وذلك بوزن 10غم من أوراق النبات والاستخلاص بـ50 مللتر من محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على

1ملي مولار L-cysteine مع اضافة 0.1 غم من مادة Polyclar AT للسيطرة على الفينولات المتحررة اثناء الاستخلاص للحفاظ على فعالية الانزيم من الضرر وتم استعمال قطعة من قماش الململ للترشيح وجرى التخلص من الاجزاء غير الذائبة واخضع الراشح للنبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4م وسرعة مقدارها 10000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة وأهمل الراسب واعتمد الرائق كمستخلص خام لاجراء خطوات التنقية اللاحقة، وجرى استعمال محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 و0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6 وماء المقطر كمحاليل استخلاص لغرض المقارنة.

تقدير الفعالية الأنزيمية

قدرت الفعالية الأنزيمية وفقا للطريقة التي قام بوصفها Whitaker & Bernhard (1972) باستعمال مادة Catecol كمادة أساس وتم استخراج الفعالية الأنزيمية (وحدة/ مللتر) وفقا للمعادلة الآتية:

$$\text{الفعالية الأنزيمية (وحدة/ مللتر)} = \frac{\Delta A_{420nm}}{0.001 \times 0.1 \times t}$$

إذ يمثل:

Δ A 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 البيروكسيديز عند رقم هيدروجيني مقداره 7 بدرجة حرارة 25م لحجم مقداره 3 مللتر من مزيج التفاعل.

0. 1 = كمية محلول الأنزيم المستعمل (مللتر).

t = وقت التفاعل بالدقائق.

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

تقدير تركيز البروتين

جرى تقدير تركيز البروتين وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Bradford (1976) باستعمال ألبومين المصل البقري كبروتين قياسي على طول موجي مقداره 595 نانومتر، في حين تم الكشف النوعي عن البروتين خلال خطوات الفصل الكروماتوكرافي باستعمال الامتصاص الضوئي على طول موجة مقداره 280 نانومتر.

تركيز الأنزيم

جرى استعمال التركيز بملح كبريتات الامونيوم والتركيز باستعمال الكحول الاثيلي المبرد لتحديد الطريقة الامثل لتركيز انزيم البروكسيديز وفقا للطريقة التي قام بوصفها Al-Hasnawi *et al.* (2010)، اذ استعملت نسب اشباع تراوحت بين 20 الى 90% من ملح كبريتات الامونيوم والت تمت عبر الاضافة التدريجية لهذا الملح الى المستخلص الخام لغاية ايصاله لنسبة الاشباع المطلوبة ثم فصل الرواسب المتكونة بعد كل إضافة بوساطة النبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4م وبسرعة مقدارها 10000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة، ثم إذابة الرواسب المستحصل عليها بعد كل نسبة اشباع بوساطة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 7، وبعد تحديد درجة الإشباع التي أعطت أعلى فعالية، جرى جمع الرواسب المستحصل عليها وأذيبت في المحلول الدارئ نفسه واجريت له عملية التنافذ الغشائي حيال المحلول الدارئ ذاته لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 4م مع استبدال المحلول كل 6 ساعات، تلاها تركيز الانزيم.

بينما جرى تركيز الانزيم باستعمال الكحول الاثيلي المبرد عن طريق اضافة حجم معين من الكحول الاثيلي المبرد 98% بشكل تدريجي مع التحريك المستمر للحصول على نسب مئوية متدرجة من الكحول تراوحت بين 20 الى 80%، ثم فصل الرواسب المتكونة بعد كل اضافة بوساطة النبذ المركزي المبرد بدرجة حرارة 4م وبسرعة مقدارها 10000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة، وتم اذابة الراسب المستحصل عليه بعد كل اضافة من الكحول في كمية قليلة من محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6.8 وتقدير الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين فيه.

تنقية الأنزيم بالتبادل الايوني

امرر الأنزيم المستحصل عليه من الخطوة السابقة بتركيز 10 ملغم/ مللتر على عمود التبادل الأيوني DEAE-cellulose ذي أبعاد مقدارها 1.5×30 سم والموازن بدارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 7 وفقا للطريقة التي قام بوصفها Al-Soufi (2016)، وبعد غسل العمود بثلاثة أضعاف حجمه بنفس دارئ الموازنة، استرد الأنزيم بوساطة التدرج الملحي الخطي باستعمال كلوريد الصوديوم بتركيز 0-1 مولار بواقع 4.5 مللتر/ جزء وبسرعة جريان مقدارها 90 مللتر/ ساعة، ثم جمعت الأجزاء الحاوية على فعالية أنزيمية عالية وأجريت لها عملية التنافذ الغشائي حيال الماء المقطر المزال منه الايونات لمدة 24 ساعة ثم التركيز.

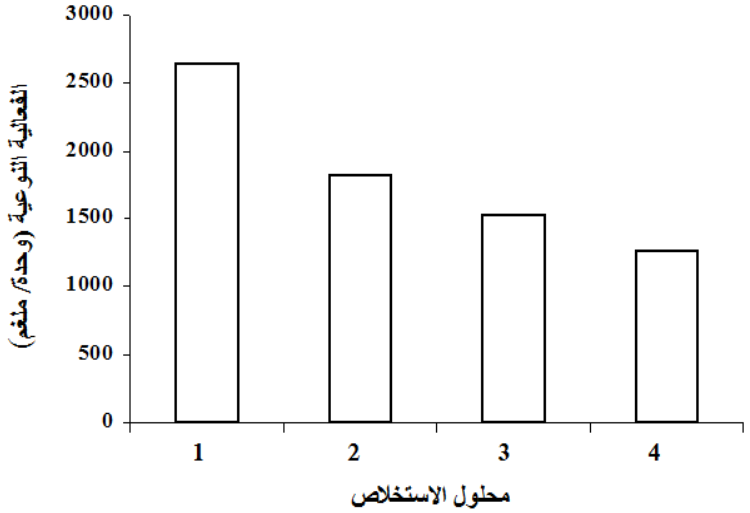
تنقية الأنزيم بالترشيح الهلامي

اتبعت الطريقة التي قام بوصفها Aziz *et al.* (2014) وذلك بامرار الانزيم المستحصل عليه من خطوة التبادل الايوني بعد تركيزه 10 ملغم/ مللتر على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 ذي ابعاد 1.5×60 سم، وجرت عملية الموازنة والاسترداد باستعمال محلول Tris-HCl الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 7 بواقع 3 مللتر/ جزء وبسرعة جريان بلغت 18 مللتر/ ساعة.

النتائج والمناقشة

استخلاص الانزيم

أظهرت النتائج الموضحة في (الشكل، 1) ان استعمال محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على 1ملي مولار L-cysteine مع اضافة 0.1 غم من مادة Polyclar AT اعطى اعلى فعالية نوعية بلغت 2650 وحدة/ ملغم، تلاه محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6 بفعالية نوعية مقدارها 1820 وحدة/ ملغم، ثم محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6 بفعالية نوعية مقدارها 1530 وحدة/ ملغم، واخيرا الماء المقطر بفعالية نوعية مقدارها 1270 وحدة/ ملغم.



شكل (1): الفعالية النوعية لانزيم البيروكسيديز المستخلص من اوراق نبات الخس الشوكي باستعمال محاليل استخلاص مختلفة، اذ يمثل:
1- محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على 1ملي مولار L-cysteine مع اضافة 0.1 غم من مادة Polyclar AT.
2- محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6.
3- محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6.
4- ماء المقطر.

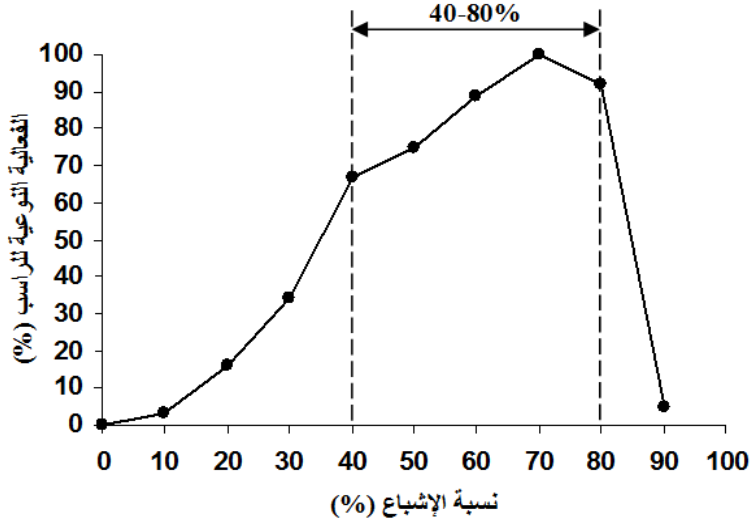
يمثل اختيار طريقة الاستخلاص المناسبة أحد الأسس الهامة التي تعتمد في تنقية الأنزيمات، إذ تؤدي هذه الخطوة إلى تحديد كفاءة عملية التنقية وذلك لدورها الهام في الحصول على اكبر قدر ممكن من الأنزيم المراد تنقيته دون الإضرار بفعاليته (Aziz *et al.*, 2014)، وتعتمد اغلب طرائق الاستخلاص على استعمال محاليل استخلاص ذات قوة أيونية عالية من اجل انتزاع الأنزيم المطلوب من النسيج الحاوي له وبالأخص تلك الأنزيمات التي تكون مرتبطة بجدار الخلية، فضلا عن ذلك يتم إضافة بعض المواد الأخرى إلى هذه المحاليل بهدف منع أي تداخل بين الأنزيم وبعض مكونات الخلية التي يؤثر في فعالية الأنزيم المستهدف (Al-Soufi, 2013)، فقد استعمل Şişecioğlu *et al.* (2010) محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.3 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 7 وحصل على فعالية نوعية مقدارها 24158.4 وحدة/ ملغم عند تنقيته للأنزيم من الفجل الاسود التركي، وبين Koksal *et al.* (2012) انه تمكن من استخلاص الانزيم من ثمار اليقطين بواسطة التجميد بالنتروجين السائل ثم الاستخلاص بوساطة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني مقداره 7 وحصل عليه بفعالية نوعية مقدارها 8280 وحدة/ ملغم، وتمكن Mall *et al.* (2013) من استخلاص الانزيم من نبات الطرنج باستعمال محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6 والحاوي على 1 ملي مولار L-cysteine مع اضافة 0.1 غم من مادة Polyclar AT للسيطرة على الفينولات المتحررة اثناء الاستخلاص للحفاظ على فعالية الانزيم من الضرر وحصل على الانزيم بفعالية نوعية مقدارها 4000 وحدة/ ملغم، و أشار Goyal & Chugh (2014) إلى استعمال محلول فوسفات البوتاسيوم الدرائ ذي تركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6.8 لاستخلاص الأنزيم من الدخن والذي حصل عليه بفعالية

نوعية مقدارها 8.4 وحدة/ ملغم، واستطاع Gong *et al*, (2015) من استخلاص الأنزيم من الكستناء باستعمال مسحوق الاسيتون ومحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.05 ملي مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 7 وحصل على الانزيم بفعالية نوعية مقدارها 1733 وحدة/ ملغم.

ومن خلال النتائج التي تم الحصول عليها والمشار اليها في اعلاه يتضح ان القوة الايونية تؤدي دوره هاما في الحصول على اعلى فعالية نوعية للانزيم المستهدف فضلا عن ان المواد المضافة الى محليل الاستخلاص والتي تعمل على منع التداخل بين الانزيم وبعض مكونات الخلية النباتية يكون لها دور فعال في زيادة الفعالية النوعية من خلال الحفاظ على الانزيم وعدم الاضرار بفعاليته (Al-Soufi, 2010).

تركيز الانزيم

جرى استعمال تقنية الترسيب بملح كبريتات الامونيوم والكحول الاثيلي المبرد لتحديد الطريقة الأمثل لتركيز أنزيم البيروكسيديز المستخلص من أوراق نبات الخس الشوكي، ويبين (الشكل، 2) أن تركيز البيروكسيديز باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم يشير إلى وجود زيادة واضحة في الفعالية النوعية للراسب المستحصل عليه، ويلاحظ أن أفضل نسبة إشباع لتركيز الأنزيم كانت بمدى 40 إلى 80%، عليه فقد أدى استعمال هذه الطريقة في ترسيب الأنزيم من المستخلص الخام إلى الحصول عليه بفعالية نوعية 6673 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 2.5 مرة وحصيلة أنزيمية 74.37% (الجدول، 1).



شكل (2): الترسيب التدريجي لأنزيم البيروكسيديز من مستخلص نبات الخس الشوكي باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم بنسب إشباع تراوحت بين 0-90%.

تهدف خطوة التركيز إلى ترسيب الأنزيم المستهدف والتخلص من اكبر قدر ممكن من الماء والبروتينات المرافقة في المستخلص الخام والذي سيؤدي إلى رفع الفعالية النوعية للأنزيم المراد تنقيته (Al-Soufi, 2016)، ولأجل ذلك تستعمل مواد وطرائق عدة لهذا الغرض منها التركيز بملح كبريتات الأمونيوم والكحول الاثيلي والتي يتباين تأثيرها وفقا لنوع الأنزيم المستهدف ونوعية ومكونات المستخلص الخام الذي يجري التعامل معه (Al-Hasnawi *et al.*, 2010)، إلا أن ملح كبريتات الأمونيوم يعد أكثر المواد المستعملة في التركيز شيوعا بسبب قابليته الذوبانية العالية في

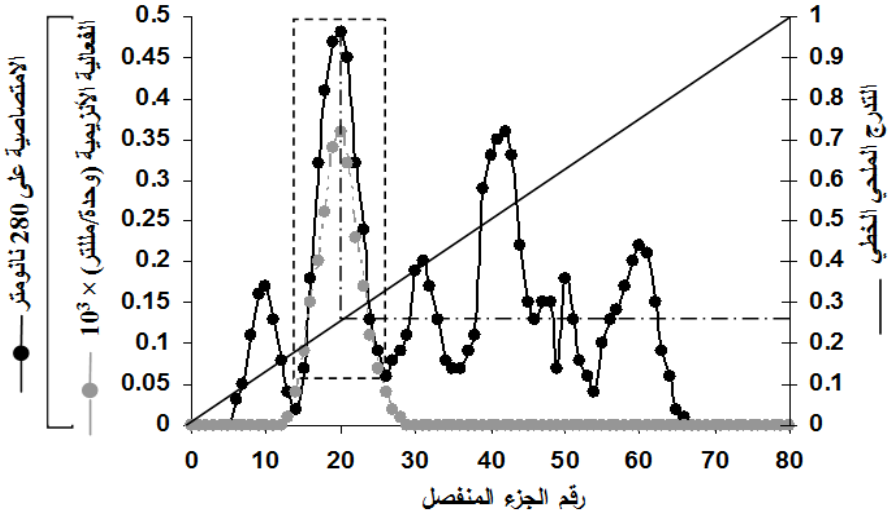
الماء وعدم إضراره بالأنزيم (Al-Soufi, 2013)، وفي هذا السياق أشار Pandey & Dwivedi (2011) إلى أن استعمال ملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 0 إلى 50% لترسيب الأنزيم من شجرة الليوسينا أدى إلى الحصول على الأنزيم بفعالية نوعية 2.62 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 3.6 مرة وحصيلة 61.73%، وتمكن Hu *et al.* (2012) من ترسيب الأنزيم من الخس باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 40 إلى 80% وحصل عليه بفعالية نوعية 3771.93 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 1.32 مرة وحصيلة 75.66%، كما استطاع Pandey *et al.* (2012) من ترسيب أنزيم البيروكسيديز من ثمار البابايا باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 0 إلى 50% وحصل عليه بفعالية نوعية 4.19 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 1.85 مرة وحصيلة 77.11%، وبين Koksal *et al.* (2012) ان استعمال ملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 60 إلى 90% أدى إلى الحصول على الأنزيم من نبات اليقطين (القرع) بفعالية نوعية 9333.3 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 1.127 مرة وحصيلة 18%، كما تمكن Gong *et al.* (2015) من ترسيب الأنزيم من نبات الكستناء باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 30 إلى 80% وحصل عليه بفعالية نوعية 6943 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 4.01 مرة وحصيلة 38.55%.

تنقية الأنزيم

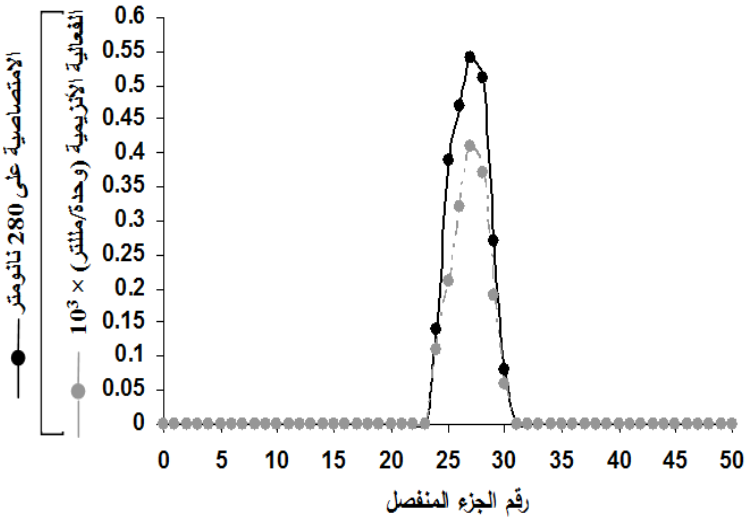
يظهر (الشكل 2) الأجزاء المنفصلة خلال تنقية الأنزيم باستعمال عمود التبادل الأيوني DEAE-cellulose ، إذ يلاحظ وجود قمم بروتينية عدة خلال مرحلة الاسترداد باستعمال تدرج ملحي خطي من كبريتات الأمونيوم بتركيز 0 إلى 1 مولار، وعند التحري عن فعالية أنزيم البيروكسيديز وجدت قمة واحدة للفعالية تطابقت مع أحد القمم البروتينية المنفصلة، ولغرض الحصول على الأنزيم بدرجة عالية من النقاوة ولتجنب حصول تداخل بين الأجزاء المنفصلة في قمة البروتين والفعالية، جمعت الأجزاء المشار إليها في (الشكل 2) والتي أعطت الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 11961 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 4.5 مرة وحصيلة مقدارها 27.46% (الجدول 1)، ولأجل زيادة تنقية الأنزيم استعمل المرشح الهلامي Sephacryl S-200 كخطوة تنقية إضافية لوحظ من خلالها ظهور قمة واحدة للبروتين تطابقت معها قمة الفعالية الأنزيمية بشكل تام، وهذا يشير إلى وصول الأنزيم إلى درجة عالية من النقاوة (الشكل 3)، وقد أعطت هذه الخطوة من التنقية الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 15496 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 5.8 مرة وحصيلة مقدارها 23.24% (الجدول 1).

جدول (1): خطوات تنقية أنزيم البيروكسيديز من نبات الخس الشوكي.

الخطوة	الحجم (مللتر)	تركيز البروتين (ملغم/ مللتر)	الفعالية الأنزيمية (وحدة/ مللتر)	الفعالية الكلية (وحدة)	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الخام	100	4.28	11342	1134200	2650	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم 40-80% ثم التنافذ الغشائي	10	12.64	84347	843470	6673	2.5	74.37
المبادل الأيوني DEAE-Sepharose	31	0.84	10047	311457	11961	4.5	27.46
المرشح الهلامي Sephacryl S-200	21	0.81	12552	263592	15496	5.8	23.24



شكل (3): تنقية أنزيم البيروكسيديز من نبات الخس الشوكي باستعمال عمود التبادل الأيوني DEAE-Sepharose ذي أبعاد مقدارها 1.5×30 سم والموازن بدارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.05 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 6.5، وتم الاسترداد بوساطة التدرج الملحي الخطي باستعمال ملح كبريتات الأمونيوم بتركيز 0-0.5 مولار بواقع 4.5 مللتر/ جزء وبسرعة جريان مقدارها 90 مللتر/ ساعة.



شكل (4): تنقية أنزيم البيروكسيديز من نبات الخس الشوكي باستعمال عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 ذي أبعاد مقدارها 1.5×60 سم، وجمعت الأجزاء المنفصلة باستعمال دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني مقداره 7 بواقع 3 مللتر/ جزء وبسرعة جريان بلغت 18 مللتر/ ساعة.

تتباين الطرائق المستعملة في تنقية الأنزيمات اعتماد على الخواص التي تتمتع بها الأنزيمات كالتبادل الأيوني اعتمادا على الشحنة والترشيح الهلامي بالاعتماد على الوزن الجزئي والآلفة اعتمادا على ميل الأنزيم للارتباط بمادة محددة، لذا فأن اختيار طريقة التنقية المناسبة اعتمادا على الإمكانات المتوافرة ودرجة التنقية المطلوبة ونوع التطبيق للأنزيم المنقى يعد احد المؤشرات الهامة لنجاح الهدف من عملية التنقية (Al-Soufi *et al.*, 2016; Al-Soufi 2010)، عليه فقد تعددت الطرائق المستعملة لأجل ذلك (Aziz *et al.*, 2014)، وفي هذا السياق فقد بين Hu *et al.* (2012) إمكانية تنقية الأنزيم من نبات الخس باستعمال تقنية الترشيح الهلامي بوساطة مادة Sephadex G-100 والحصول عليه بفعالية نوعية مقدارها 7725.91 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 2.71 مرة وحصيلة مقدارها 32.94%، تلاها استعمال تقنية الآلفة بوساطة عمود concanavalin A وحصل على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 51136.10 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 17.92 مرة وحصيلة مقدارها 2.67%، وتمكن Koksal *et al.* (2012) من تنقية الأنزيم من نبات القرع (اليقطين) باستعمال التبادل الأيوني بوساطة مادة CM-Sephadex A-50 وحصل على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 84545.4 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 10.2 مرة وحصيلة مقدارها 12%، وأشار Pandey *et al.* (2012) إلى إمكانية تنقية الأنزيم من ثمار البابايا باستعمال تقنية التبادل الأيوني بوساطة مادة DEAE-Cellulose والتي حصل من خلالها على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 21.24 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 9.36 مرة وحصيلة 57.92% تلاها الترشيح الهلامي بوساطة مادة Sephadex G-200 وحصل على الأنزيم بفعالية 68.59 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 30.22 مرة وحصيلة 44.37%، واستطاع Mall *et al.* (2013) من تنقية الأنزيم من فاكهة الطرنج باستعمال الترشيح الهلامي بوساطة مادة Sephadex G-100 بفعالية نوعية مقدارها 62080 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 15.10 مرة وحصيلة 28.6%، وذكر Kalin *et al.* (2014) إمكانية استعمال تقنية الآلفة بوساطة مادة Sepharose 4B-L-tyrosine-4-aminobenzohydrazide لتنقية الأنزيم من الفجل الأسود التركي واللفت (الشلغم) بفعالية نوعية 947.5 و9626.67 وحدة/ ملغم وعدد مرت تنقية 40.3 و269.13 مرة وحصيلة مقدارها 10.6 و9% على التوالي، وتمكن Goyal & Chugh (2014) من تنقية الأنزيم من نبات الدخن باستعمال الترشيح الهلامي بمادة Sephadex G-100 وحصل على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 160.3 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 19.2 مرة وحصيلة مقدارها 68%، تلاها تقنية التبادل الأيوني باستعمال مادة DEAE-cellulose وحصل على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 277.1 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 33.2 مرة وحصيلة 41%، واستطاع Erdem *et al.* (2015) من تنقية الأنزيم من الملفوف الأبيض (اللهانة البيضاء) باستعمال تقنية الآلفة بوساطة مادة 4-Amino-Benzohydrazide وحصل على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 964.5 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 24.7 مرة وحصيلة 4.3%، وبين Gong *et al.* (2015) إمكانية تنقية الأنزيم من الكستناء باستعمال تقنية التبادل الأيوني بمادة DEAE-52 وحصل على الأنزيم بفعالية نوعية مقدارها 16,500 وحدة/ ملغم وعدد مرات تنقية 9.52 مرة وحصيلة مقدارها 4.21%.

المصادر

1. Al-Hasnawi, A. N., Al-Soufi, M. A. and Aziz, R. A. (2010). Use of partial purified lipase from local chicken kidney for improvement the flavor of butter fat. Ibn Al- Haitham Journal for Pure & Applied Science, 23(3), 88-98.
2. Al-Soufi, M. A. (2013). Partial purification and estimated some characterization of protease from prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.) leaves and used it in some applications. Iraqi Journal of Biotechnology, 12(2), 1-18.
3. Al-Soufi, M. A. (2010). Purification of polyphenoloxidase from (*Lactuca serriola* L.) Prickly lettuce. Iraqi Journal of Biotechnology, 9(4), 701-715.
4. Al-Soufi, M. A. (2016). Use of purified laccase from Prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.) in removal of phenolic compound from some foods. International Journal of Novel Research in Life Sciences, 3(3), 7-17.
5. Al-Soufi, M. A.; Al-Bayati, S. I. and Abbas, S. H. (2016). Purification of red wasp *Vespa orientalis* and yellow wasp *Polistes olivaceaus* toxin and estimating some of its biological characteristics, 57(2A), 843-854.
6. Altın, S.; Tohma, H.; Gülçin, I. and Köksal, E. (2017). Purification, characterization, and inhibition sensitivity of peroxidase from wheat (*Triticum aestivum* ssp. vulgare). International Journal of Food Properties, 20(9), 1949-1959.
7. Aziz, R. A.; Al-Soufi, M. A. and Ateia, A. M. (2014). Purification and determination of some proteins inhibitors properties that produced from bakery yeast and study their activity against some types of bacteria that cause diarrhea. First International Scientific Conference, Cihan University, Erbil-Kurdistan Region, Iraq. https://www.researchgate.net
8. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
9. Erdem, H. Ü.; Kalın, R.; Özdemir, N. and Özdemir, H. (2015). Purification and biochemical characterization of peroxidase isolated from white cabbage (*Brassica oleracea var. capitata f. alba*). International Journal of Food Properties, 18, 2099-2109.
10. Gautério, G. V.; Fernandes, S. S.; Molon, F. O.; Figueira, F. S.; Buffon, J. G. and Kalil, S. J. (2015). Purification of peroxidase from rice bran using expanded bed ion exchange chromatography. Adsorption Science and Technology, 33(2), 153-164.
11. Gong, Z.; Li, D.; Liu, C.; Cheng, A. and Wang, W. (2015). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. LWT-Food Science & Technology, 60, 1095-1099.

12. Goyal, P. and Chugh, L. K. (2014). Partial purification and characterization of peroxidase from pearl millet (*Pennisetum glaucum* [l.] R. Br.) grains. Journal of Food Biochemistry, 38, 150-158.
13. Guida, V.; Criscuolo, G.; Tamburino, R.; Malorni, L.; Parente, A. and Di Maro, A. (2011). Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). BMB Reports, 64-69.
14. Hu, Yihong.; Wu1, J.; Luo, P. and Mo, Y. (2012). Purification and partial characterization of peroxidase from lettuce stems. African Journal of Biotechnology, 11(11), 2752-2756.
15. Kalin, R.; Atasever, A. and Ozdemir, H. (2014). Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish and Turnip roots. Food Chemistry, 150, 335-340.
16. Koksal, E., Bursal, E., Aggul, A. G. and Gulcin, I. (2012). Purification and characterization of peroxidase from sweet gourd (C*ucurbita moschata* lam. poiret). International Journal of Food Properties, 15, 1110-1119.
17. Mall, R.; Naik, G.; Mina, U. and Mishra, S. K. (2013). Purification and characterization of a thermostable soluble peroxidase from *Citrus medica* leaf. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 43, 137-151.
18. Pandey, V. P. and Dwivedi, U. N. (2011). Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 68, 168-173.
19. Pandey, V. P., Singh, S., Singh, R. and Dwivedi, U. N. (2012). Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) Fruit. Applied Biochemistry and Biotechnology, 167, 367-376.
20. Sarika, D.; Ashwin Kumar, P. S. S.; Arshad, S. and Sukumaran, M. K. (2015). Purification and evaluation of horseradish peroxidase activity. International Journal of Current Microbiology Applied Science, 4(7), 367-375.
21. Şişecioğlu, M.; Gülçin1, I.; Çankaya, M.; Atasever, A.; Şehitoğlu, M. H.; Kaya, H. B. and Özdemir, H. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). Journal of Medicinal Plants Research, 4(12), 1187-1196.
22. Whitaker, J. R. and Bernhard, R. A. (1972). Experiments for an Introduction to Enzymeology. The Whiber Press. Davis, Calif. USA.

Purification of peroxidase from Prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.)

Raghad Akram Aziz
Prof. PhD. Department of Science, College of Basic Education,
Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq.
ragaad.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

Abstract

Peroxidase was extracted from Prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.) by used sodium phosphate buffer 0.1 M which content 1 mM L-cysteine and 0.1 gm Polyclar AT. crude enzyme was concentrated by gradual addition of ammonium sulfate at 40-80% saturation, the specific activity, fold of purification and yield were 6673 unit/mg, 2.5 and 74.37% respectively. Then purified throw ion exchange chromatography by DEAE-cellulose, the specific activity, fold of purification and yield were 11961 unit/mg, 4.5 and 27.46% respectively, and gel filtration through Sephacryl S-200, the specific activity, fold of purification and yield were 15496 unit/mg, 5.8 and 23.24% respectively.

Keywords: Peroxidase, Prickly lettuce, Enzyme extraction, Enzyme purification.