استخلاص أنزيم كاتيكول أكسيداز من السنديان العادي *Quercus calliprinos* L. ودراسة فعاليته والشروط المثلى لها

مها دكاك* **د. سهيل نادر****

د. نزار عيسى***

الملخص

تمّ في هذا البحث دراسة فعالية أنزيم الكاتيكول أُكسيداز الذي تم استخلاصه من أوراق وثمار السنديان العادي (***Quercus calliprinos* L.**)، المقطوفة من منطقتي جبلة والسويداء، ونظراً لوجود اختلافات شكلية في عينات جبلة وبخاصة في شكل الأوراق والثمار، فقد تمّ توزيعها في مجموعتين جبلة(1) وجبلة(2). كما تم تحديد الشروط المثلى للأنزيم من حيث درجتي الحرارة والحموضة.

بينت النتائج التي تم الحصول عليها أنّ أفضل فعّالية للأنزيم كاتيكول أكسيداز كانت في الأوراق الفتية يليها الكهلة، ثم الثمار، وتبين أنّ أفضل فعالية للأنزيم كانت عند درجة الحموضة (pH=5.5) في عينات جبلة1 (1.614 U)، وعند درجة الحموضة

* طالبة دكتوراه – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم– جامعة دمشق.

** أستاذ مساعد – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم– جامعة دمشق.

*** مدرس – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم– جامعة دمشق.

(pH=6.5) في عينات جبلة2 (1.440 U) والسويداء (1.046 U)، أما درجة الحرارة المثلى للحصول على أعلى فعالية للأنزيم فكانت 25 مْ في جميع العينات.
أكدت النتائج اختلاف فعالية الأنزيم بحسب مصدر العينة النباتية والمرحلة العمرية (التطورية)، إذ تبين أن الفعالية كانت أعلى معنوياً عند الأوراق الفتية وبكل الحالات عند عينات جبلة (1)، يليها جبلة (2)، ثمّ السويداء.

الكلمات المفتاحية: كاتيكول أكسيداز، فعالية أنزيمية، سنديان عادي.

Extraction of Catichol Oxidase from Oak (*Quercus calliprinos* L.) and Determining the optimal conditions for it's activity

Maha Dakkak[*] **Dr. Souhel Nader**[**]

Dr. Nizar Issa[***]

Abstract

In this research the enzyme catechol oxidase was extracted from some organs of *Quercus calliprinos* L.. Samples were taken from Jableh and swaida. there were morphological differences between Jableh samples , so they were grouped in to Jableh(1) and Jableh(2).

The enzyme was extracted from young and old leaves and from the fruits, after that the activity and the optimum conditions, especially, temperature and pH were evaluated.

Results showed that the highest activity of enzyme was in young leaves then in the old ones followed in fruits, there was a difference in pH between studied samples, the optimum pH for enzyme activity in Jableh 1 Quercus was pH= 5.5 (1.614U) , whereas , the optimum pH for enzymes in Jableh 2 and swaida Quercus was at pH =6.5(1.440, 1.046U) respectively, the optimum temperature for enzyme activity was at 25ºC for all samples.

The results indicate that there was a difference in the activity according to the source of the plant sample and the developmental stage/age, it was found that the activity was significantly higher in all cases in the samples of Jableh (1) followed by Jableh (2) and Swaida (2).

[*] PHD student in Department of botany. Faculty of science- Damascus university

[**] Department of botany. Faculty of science- Damascus university.

[***] Department of Animal life science- Faculty of science- Damascus university

Key words: Catechol oxidase, Enzyme activity, *Quercus calliprinos* L.

المقدمة:

ازداد التركيز في الآونة الأخيرة على استعمال الأنزيمات في التقانة الحيوية الخضراء، وتعد أنزيمات الأكسدة والإرجاع الأكثر استعمالاً، ومنها أنزيمات البولي فينول أُكسيداز القادرة على أكسدة الفينولات، الأمر الذي أكسبها أهمية كبيرة في مجال التقانة الحيوية، فقد استعملت في العديد من التطبيقات الطبية والصيدلانية والبيئية والغذائية، لذلك ركزنا في عملنا على دراسة فعالية هذه الأنزيمات والشروط المثلى لعملها كبداية لتجارب لاحقة في هذا المجال.

توجد أنزيمات الكاتيكول أُكسيداز في النباتات والفطريات ولا دليل حتى الآن على وجودها في البكتيريا والثدييات، وكل الأنزيمات المعروفة هي داخل خلوية Intracellular (Gasparetti. 2012).

يأخذ الأنزيم عدة أسماء Catecholases, *o*-diphenol oxidases, catechol oxidase, *o*-diphenol : oxygen oxireductase, polyphenol oxidase ويُحفز الأنزيم أكسدة *o*-diphenol مثل caffeic acid أو الكاتيكول Catechol إلى الكينون الموافق *o*-quinones وهو 1,2-benzoquinone, في حال استعمال الكاتيكول(Solomon *et al*., 2001) هذه الكينونات مركبات نشيطة تتبلمر تلقائياً (تفاعل غير أنزيمي) لتكوين مركبات Catechol melanins ذات اللون البني، والتي يعتقد أنها تحمي النبات المجروح من العوامل الممرضة والحشرات، إضافة إلى تكوين Cross-linked polymers مع المجموعات البروتينية الوظيفية إذ يوجد أنزيم الكاتيكول أُكسيداز في الصانعات الخضراء Chloroplasts بينما توجد الفينولات ضمن حويصلات وعند حصول تخريب للخلية Damage تصبح الفينولات على تماس مع الأنزيم ويحدث التفاعل وتتشكل الصبغة بنية اللون في النهاية، كما تظهر لدى تعرض بعض الثمار المجروحة للهواء مثل التفاح وغيرها (Holderbaum 2010).

تمّ اختيار أوراق وثمار السنديان القِلِبْريني *Quercus calliprinos* للحصول على الأنزيم كون النبات متوافر بسهولة في البيئات السورية إضافةً إلى أهميته الطبية والصناعية، حيث تعدّ أشجار السنديان مصدراً مهماً من مصادر الخشب متنوع الاستعمال، إضافة إلى أنّه يستخدم لاستخراج مادّة العفص Tannin التي تستعمل في صناعة الحبر الأزرق وفي دبغ الجلود، كما تستخدم كمادة قابضة إلى جانب الجلوكسيد كويرسترين (الشلبي 2017، Aldrich and Jeannine. 2011).

تشغل أنزيمات الأكسدة والإرجاع Oxidoredoctases الصف الأول من صفوف الأنزيمات، وتشتهر بدورها في تغيير درجات الأكسدة للمواد المتفاعلة عن طريق نقلها للإلكترونات (أنزيمات الأُكسيداز Oxidases) أو إلكترون وبروتون من إحدى الركيزتين إلى الأخرى (أنزيمات ديهيدروجيناز Dehydrogenase)، إضافة إلى أنزيمات البيروكسيداز Peroxidases.

تنتمي أنزيمات البولي فينول أُكسيداز **Polyphenol oxidase (PPO)** إلى زمرة البروتينات المعدنية الحاوية على النحاس وهي تصنف ضمن أنزيمات الأكسدة والإرجاع، والتي تحفز أكسدة مجموعة واسعة من المركبات الفينولية بوجود الأكسجين الجزيئي (Guray 2009)، توجد في الصانعات الخضراء وفي السيتوبلاسم، وتصبح على تماس مع الفينولات عند تخرب الخلية نتيجة الشيخوخة أو عند الإصابة بالحشرات والعوامل الممرضة أو خلال عمليات النقل والتخزين (Taranto *et al.*) 2017، وتصنف حسب ألفتها للركيزة وآلية التفاعل إلى 3 أنماط:

التيروزيناز Tyrosinase (EC. 1.14.18.1).

الكاتيكول أُكسيداز Catechol oxidase (EC. 1.10.3.1).

اللاكاز Laccase (EC. 1.10.3.2).

يتراوح الوزن الجزيئي للتيروزيناز بين 30–50 كيلو دالتون، وللكاتيكول أُكسيداز بين 30–60 كيلو دالتون، وللاكاز 60–80 كيلو دالتون (three domain laccase)

وبين 30–40 (two domain laccase)، يوجد التيروزيناز بعدة أشكال Monomer, dimer, tetramer، بينما يوجد الكاتيكول أُكسيداز واللاكاز على هيئة جزيئة واحدة Monomer (Gasparetti. 2012).

درس Dogan *et al.* (2005) فعالية الكاتيكول أُكسيداز في الأعضاء المختلفة لنبات المردقوش الشائع (الورقة، الساق، والجذر)، *Origanum vulgare ssp. hirtum*، والمأخوذ من مناطق مختلفة، كانت أكبر فعالية للأنزيم في الورقة يليها الساق فالجذر، وكان الجزء الأساسي من فعالية PPO في الصانعات الخضراء، كما تختلف الفعالية حسب النوع والعمر.

تمت دراسة فعالية أنزيمي الكاتيكول أكسيداز والبيروكسيداز Peroxidase في السنديان القوي *Quercus robur* L. والفاصولياء *Phaseolus vulgaris* L. ، وتبين أن للأنزيمين دوراً في تحمل الإجهاد المسبب للنبات عن طريق النقص في عنصر المغنزيوم إضافة إلى الإجهاد المسبب بالتبريد، حيث زادت الفعالية الأنزيمية عند تطبيق الإجهاد، ويعزى هذه الزيادة في الفعالية لمقاومة أنواع الأكسجين التفاعلية Reactive oxygen species (ROS) التي نتجت بعد تطبيق الإجهاد (Németh *et al*., 2009).

قام (Stich and Ebermann. 1987) بإجراء دراسة على أنزيم البيروكسيداز في نبات السنديان *Quercus robur* لمعرفة ما إذا كان هناك مركز فعال ثاني في القسم البروتيني من الأنزيم Appoenzyme، وبينت النتائج عدم وجود مركز ثانٍ وكان الهيم فقط هو العامل المساعد للأنزيم (protoporphyrin IX).

ينتمي جنس السنديان إلى الفصيلة الزانيّة Fagaceae، ويضم نحو 500 نوعاً وهي من الأشجار الضخمة المعمرة، تعيش بين 200 و400 سنة بعضها دائم الخضرة وبعضها الآخر نفضي، متحملة للجفاف، وتتعايش ميكوريزاً، الأوراق متعاقبة، بسيطة، مسننة أو مفصصة أو مجزَّأة أو ريشية العروق حسب النوع، ونادراً ما تكون كاملة الحافة، الأزهار وحيدة الجنس وحيدة المسكن، الثمار جافة غير متفتحة تدعى

بلوطة، تنضج الثمار في كثير من الأنواع في الخريف من كل سنة، تتَكَوَّن الأزهار وتُحمل على أغصان عمرها سنة واحدة، وعند بعض الأنواع تُحمل الثمار على أغصان عمرها سنتان؛ من أهم أنواع السنديان المتوسطية: السِنْدِيان العادي أو القِلِبْريني (*Quercus calliprinos*)، السنديان المنفتك (*Q.infectoria*)، السنديان الأشعر، نويع الأشعر الزائف (*Q. pseudocerris*)، السنديان القرمزي (*Q.coccifera*)، السنديان الفليني *Q.suber*، السنديان الأخضر (Q.ilex)، تنتشر الأنواع الأربعة الأولى بكثرة في سورية، أما الاثنان الأخيران فينتشران في الجزء الشمالي الغربي من البحر المتوسط (Nader. 1985 ، Quezel. 1981).

أهمية البحث وأهدافه:

تنبع أهمية هذا البحث من استعمال مصادر نباتية محلية (السنديان)، غنية بأنزيمات PPO وكذلك المركبات الفينولية، حيث لم يسبق وأن جرى الاستفادة من الطاقة الكامنة لهذا النبات كمصدر لأنزيم الكاتيكول أُكسيداز الذي يمكن الحصول عليه والاستفادة من تطبيقاته الحيوية في معالجة بعض المشاكل البيئية كالتلوث بالمركبات الفينولية، وكذلك يعدُّ أداة صديقة للبيئة للحصول على جزيئات حيوية يمكن استخدامها صناعياً في بعض المجالات.

لذلك يهدف هذا البحث إلى:

- استخلاص أنزيم الكاتيكول أُكسيداز من أوراق وثمار نبات السنديان المنتشر طبيعياً في البيئة السورية (جبلة والسويداء).
- تحديد بعض الشروط المؤثرة في فعالية الأنزيم من درجة حرارة ودرجة حموضة (pH)، لاعتمادها في تجارب استعمال الأنزيم لإنتاج الجزيئات الحيوية (الكينونات).

مواد البحث:

العينات النباتية: مصدرها، جمعها وحفظها وتحضيرها للاستخلاص:

تمثلت العينات النباتية بالأوراق الفتية والكهلة والثمار، وقد تم جمعها من موقعين مختلفين بيئياً في سورية، موقع جبلة، وموقع السويداء (في الفترة الممتدة من شهر كانون الثاني وحتى شهر أيار)، ثمّ فُصلت الأوراق عن الأغصان كذلك الأوراق الفتية عن الكهلة، وبعدها غسلت الأوراق بالماء المقطر ومن ثم تم استخلاص الأنزيم منها.

طرائق البحث:

استخلاص أنزيم الكاتيكول أكسيداز بشكله الخام:

تم الاستخلاص من كل من الأوراق الفتية والكهلة والثمار، فبعد غسل الأوراق الطازجة وسحقها مع كمية مكافئة من رمل الكوارتز، تم استخلاص الأنزيم بسحق 1.2 غ من العينة مع 15 مل من موقي الفوسفات البوتاسيوم الذي تم تحضيره من فوسفات أحادية البوتاسيوم (KH_2PO_4) وفوسفات ثنائية البوتاسيوم (K_2HPO_4) , بدرجة حموضة (pH= 6) وبتركيز 0.05 M، مع إضافة 0.125% triton x100 لتحرير الأنزيم المرتبط بالغشاء البلاسمي و(Polyvinelpyrrolidone (PVP بتركيز 2% ودوره ربط الفينولات الموجودة في المستخلص حتى لا يتفاعل معها الأنزيم، جرى الاستخلاص بدرجة حرارة 4° م ولمدة 30 دقيقة، ثم التثفيل في جهاز الطرد المركزي (*Boeco - U32R*) بسرعة (5000 rpm)، مدة 10 دقائق بدرجة حرارة 4° م، أُخذت الرشاحة الناتجة واستعملت كمستخلص أنزيمي (Gálosb and Albert.2009).

قياس فعالية الأنزيم:

يتم الكشف عن فعالية الأنزيم كل 15 ثانية ولمدة ثلاث دقائق من خلال قياس امتصاصية ناتج التفاعل الأنزيمي باستعمال جهاز قياس الطيف الضوئي عند طول موجة 420 نانو متر، تم استعمال مادة الكاتيكول كركيزة للأنزيم.

ينتج عن أكسدة الكاتيكول مركبات ملونة، ما يؤدي إلى ازدياد امتصاصية وسط التفاعل بازدياد تركيز المنتجات الأنزيمية الملونة.

يضم مزيج التفاعل بفر فوسفاتي (0.05 M – pH=6)، 0.5 مل ركيزة و50 ميكروليتر مستخلص أنزيمي بحيث يكون الحجم النهائي لمزيج التفاعل 1مل (Fluhkey and Jen 1978)، وقد جرى لكل قياس ثلاث مكررات.

يذكر أن وحدة واحدة من فعالية الأنزيم (**µmole/min**) One unit: هي كمية الأنزيم التي تؤدي إلى إنتاج ميكرومول من الكينون خلال دقيقة .

قياس درجة الحموضة المثلى:

عند تحديد درجة الحموضة المثلى لفعالية أنزيم الكاتيكول أكسيداز استعملت ستة محاليل ذات درجات حموضة متدرجة بين pH=3.5 وحتى pH=8.5، وتم قياس الفعّالية وفق الطريقة المذكورة أعلاه.

قياس درجة الحرارة المثلى:

لتحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم الكاتيكول أكسيداز، تم اعتماد درجات حرارة مختلفة (10، 20، 25، 30، 35، 40، 45، 50، 55، 60ºم) حيث حضنت مكونات مزيج التفاعل في الدرجة المطلوبة وبعد استقرار حرارتها تم مزجها وقياس الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 420 nm، مع وجود شاهد لكل حالة.

الدراسة الإحصائية:

تم حساب أقل فرق معنوي Least significant difference (LSD) عند مستوى ثقة (0.01)، باستخدام برنامج **Mstatc** لمعرفة ما إذا كانت الفروقات معنوية، تم عمل ثلاث مكررات لكل نتيجة وأخذ المتوسط الحسابي لها.

النتائج والمناقشة:

فعالية أنزيم الكاتيكول أكسيداز في الأوراق والثمار:

بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية في الفعالية الأنزيمية بين الأعضاء النباتية المختلفة والمواقع والتفاعل المتبادل بينهما (الجدول 1)، كان

متوسط الفعالية الأنزيمية الأعلى معنوياً في الأوراق الفتية (0.379 U) يليه في الأوراق الكهلة (0.351 U)، ثم الثمار (0.351 U).

الجدول (1): متوسط فعالية الكاتيكول أكسيداز في أوراق وثمار السنديان (U) (µmole/min)

الموقع	العضو النباتي			المتوسط	نسبة الفعالية%	نسبة الانخفاض في الفعالية%	
	أوراق فتية	أوراق كهلة	ثمار		أوراق فتية	أوراق كهلة	ثمار
(جبلة 1)	0.514^{a}	0.496^{b}	0.382^{c}	0.464^{a}	100	3	25
(جبلة 2)	0.346^{d}	0.301^{e}	0.287^{f}	0.311^{b}	100	13	17
(سويداء)	0.279^{g}	0.256^{h}	0.232^{i}	0.256^{c}	100	8	17
المتوسط	0.379^{a}	0.351^{b}	0.300^{c}	0.343	100	8	20.6
المتغير	المواقع		العضو النباتي		التفاعل بينهما		
LSD(0.01)	0.001		0.001		0.002		
CV%	%0.73						

تُشير الأحرف المتماثلة أمام المتوسطات على مستوى السطر والعمود إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية 0.01.

أما عند مقارنة المواقع فكانت دوماً عينات جبلة (1) هي الأكثر فعالية (0.464 U) يليها عينات جبلة 2 (0.311 U) ثم السويداء (0.256 U) مع فروقات معنوية بينهم، وبلغت الفعالية في الأوراق الفتية لعينات جبلة (2) والسويداء 67% و54% على التوالي مقارنة بفعالية الأنزيم عند الأوراق الفتية لعينات جبلة(1)، وكذلك بلغت هذه الفعالية نحو 61% و52% عند الأوراق الكهلة لعينات جبلة (2) والسويداء على التوالي مقارنة مع الفعالية في الأوراق الكهلة لعينات جبلة (1)، أما في الثمار فكانت الفعالية بحدود 75% و60% عند ثمار عينات جبلة (2) والسويداء على التوالي.

أما بالنسبة للتفاعل بينهما فكان متوسط الفعالية الأعلى معنوياً في الأوراق الفتية في الموقع جبلة 1 (0.514 U) يليها في الأوراق الكهلة (0.496 U) ثم الثمار

(0.382 U) للموقع نفسه، وبعدها متوسط الفعالية الأنزيمية للأوراق الفتية في الموقع جبلة 2 (0.346 U)، مع وجود فروقات معنوية بين جميع الحالات وكانت الفعالية الأقل معنوياً في ثمار عينات السويداء (0.232 U).

تسمح هذه المقارنة بالإشارة إلى أن الموقع الجغرافي للعينات يؤثر في حيوية وفعالية المركبات المتكونة في الأعضاء النباتية مع استبعاد أي اختلاف تصنيفي للعينات وتبعيتهم للنوع نفسه، كما أن لعمر العضو النباتي دور في ذلك، حيث تختلف عملية اصطناع البروتين الأنزيمي من عضو إلى آخر ضمن النبات نفسه، وفي العضو النباتي نفسه بحسب العمر، حيث بين (Aniszewski *et al* ., 2008) أن فعالية الأنزيم في المراحل المبكرة من الإنتاش أكبر مما هي عليه في المراحل اللاحقة، إضافة إلى أن الأنزيم يكون في حالة كامنة في بعض النباتات ثم يتم تنشيطه، حيث تتألف بنية الكاتيكول أُكسيداز من ثلاثة مجالات:

C-terminal domain, Central catalytic domain, N- terminal domain

وظيفة المجال C تغطية المركز الفعال جاعلة الأنزيم بشكل غير منشط Inactive ويتم تنشيط الأنزيم بشطر المجالين C و N (Gasparetti. 2012).

استناداً إلى التجارب السابقة فقد تم اختيار الأوراق الفتية كمصدر للأنزيم في كل العينات، في باقي التجارب.

الشروط المثلى لعمل الأنزيم

درجة الحموضة المثلى:

تعد درجة الحموضة واحدة من أهم العوامل المؤثرة في سرعة التفاعل الأنزيمي، ودرجة الحموضة المثلى هي درجة الحموضة التي يظهر عندها الأنزيم أعلى فعالية تحفيزية.

كانت درجة الحموضة المثلى لعمل الأنزيم في عينات جبلة (1) هي 5.5 أما بالنسبة لعينات جبلة (2) كانت درجة الحموضة المثلى هي 6.5 ولعينات السويداء 6.5 (الجدول 2).

الجدول (2): تأثير تغيرات درجة الحموضة في فعالية أنزيم الكاتيكول أكسيداز في أوراق السنديان الفتية

pH	الموقع			المتوسط
	جبلة (1)	جبلة (2)	السويداء	
3.5	0.035^{ghi}	0.214^{hi}	0.176^{i}	0.269^{e}
4.5	1.170^{bc}	0.783^{def}	0.376^{ghi}	0.776^{c}
5.5	1.614^{a}	0.959^{cde}	0.654^{efg}	1.075^{b}
6.5	1.401^{ab}	1.440^{ab}	1.046^{cd}	1.296^{a}
7.5	1.118^{bcd}	0.967^{cde}	0.856^{cdef}	0.980^{b}
8.5	0.656^{efg}	0.518^{efg}	0.304^{hi}	0.492^{d}
المتوسط	1.085^{a}	0.814^{b}	0.567^{c}	0.822
المتغير	pH		المواقع	التفاعل بينهما
LSD(0.01)	0.157		0.138	0.338
CV%	%18.22			

تُشير الأحرف المتماثلة أمام المتوسطات على مستوى السطر والعمود إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية 0.01.

بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية في الفعالية الأنزيمية بين درجات الحموضة المختلفة والمواقع والتفاعل المتبادل بينهما، كان متوسط الفعالية الأنزيمية الأعلى معنوياً عند درجة الحموضةpH=6.5 (1.296 U)، تلاه وبفروقات معنوية عند درجتي الحموضة pH=5.5 و pH= 7.5 ودون فروقات معنوية بينهما (1.075 U، 0.980)، على التوالي، في حين كانت الفعالية الأنزيمية الأدنى معنوياً عند درجة الحموضة pH=3.5 (0.269 U).

أما فيما يتعلق بالمقارنة بين المواقع فكانت الفعالية الأنزيمية الأعلى معنوياً في موقع جبلة1 (1.085 U)، يليه جبلة2 (0.814 U)، ثم السويداء (0.567 U) مع فروقات معنوية بينهم كما ذكر سابقاً.

وفيما يتعلق بالتفاعل بينهما كانت الفعالية الأنزيمية الأعلى معنوياً عند درجة حموضة (pH= 5.5) في الموقع جبلة 1 (1.614 U)، يليها عند الدرجة (pH=6.5) في الموقع

جبلة 2 (1.440 U) مع فروقات معنوية بينهما، وكانت الفعالية الأقل معنوياً عند درجة الحموضة (pH=3.5) في موقع السويداء (0.176U).

تُعدُّ درجة الحموضة من أهم العوامل المساهمة بتنظيم الفعّالية الأنزيمية، لأنّ لكل أنزيم درجة حموضة مثلى لفعّاليته ويمكن أن يؤدي الابتعاد عن تلك العوامل إلى انخفاض في فعالية الأنزيم نتيجة لتغيرات بنيوية في البروتين الأنزيمي (Chesworth *et al.*,1998) والشحنات المحددة للبنية الثالثية، علماً أنّ الدرجة المثلى من الحموضة لعمل الأنزيم تعتمد على مصدره أيضاً (Aydemir and Kuru , 2003).

بين (Németh *et a l.*, 2009) أن درجة الحموضة المثلى للكاتيكول أكسيداز في أوراق السنديان القوي *Quercus robur* L. هي عند الدرجة (pH=6)، كما أثبت (Jadhav *et al.*, 2011) أن درجة الحموضة لفعالية PPO المستخلص من لب الموزهي pH= 4 وبين (Shinde *et al.*, 2012) أن فعالية الأنزيم تكون أعلى ما يمكن في نبات اليطروفة *jatropha curcas* عند pH= 6، في حين بلغت pH= 7 للأنزيم المستخلص من الفلفل الحار *apsicum annum* L. (Arnnok *et al.*, 2010).

درجة الحرارة المثلى

تضاف درجة الحرارة إلى العوامل المؤثرة أيضاً في سرعة التفاعل الأنزيمي، ودرجة الحرارة المثلى هي درجة الحرارة التي يُظهر عندها الأنزيم أعلى فعالية تحفيزية، وأي انخفاض أو ارتفاع في درجة الحرارة تحت أو فوق الدرجة المثلى يؤدي إلى انخفاض الفعالية.

يتبين من الجدول (3) أن درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم هي عند 25 °م لكل العينات، حيث سجلت الفعالية (0.548U) بالنسبة لعينات جبلة (1) و(0.507U) في عينات سنديان جبلة 2 أما بالنسبة لعينات السويداء بلغت الفعالية (0.105U).

الجدول (3): تأثير تغيرات درجة الحرارة في فعالية أنزيم الكاتيكول أوكسيداز

في أوراق السنديان الفتية

درجة الحرارة (°م)	الموقع			المتوسط
	جبلة 1	جبلة 2	سويداء	
10	0.303^{o}	0.313^{m}	0.046^{y}	0.222^{i}
20	0.525^{d}	0.508^{e}	0.092^{t}	0.375^{c}
25	0.547^{b}	0.577^{a}	0.106^{r}	0.410^{a}
30	0.474^{h}	0.474^{h}	0.096^{s}	0.348^{d}
35	0.503^{f}	0.543^{c}	0.084^{u}	0.377^{b}
40	0.476^{h}	0.481^{g}	0.080^{v}	0.345^{e}
45	0.416^{j}	0.455^{i}	0.068^{w}	0.313^{f}
50	0.408^{k}	0.408^{k}	0.057^{x}	0.291^{g}
55	0.361^{l}	0.309^{n}	0.044^{y}	0.238^{h}
60	0.267^{p}	0.214^{q}	0.032^{z}	0.171^{j}
المتوسط	0.428^{a}	0.428^{a}	0.070^{b}	0.309
المتغير	الحرارة	الموقع	التفاعل بينهما	
LSD(0.01)	0.0013	0.0006	0.0022	
CV%	%4.36			

تُشير الأحرف المتماثلة أمام المتوسطات على مستوى السطر والعمود إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية 0.01.

بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية في الفعالية الأنزيمية بين درجات الحرارة المختلفة، كان متوسط الفعالية الأنزيمية الأعلى معنوياً عند درجة الحرارة 25°م (0.410U)، تلاه وبفروقات معنوية عند درجتي الحرارة 35 و20 °م وبوجود فروقات معنوية بينهما (0.377 U ، 0.375)، على التوالي، في حين كانت الفعالية الأنزيمية الأدنى معنوياً عند درجة الحرارة 60 °م (0.171 U).

أما فيما يتعلق بالمقارنة بين المواقع فلم تكن هناك فروق معنوية بين الموقعين جبلة1 وجبلة2، حيث بلغت قيمة الفعالية الأنزيمية (0.428 U) في كلا الموقعين، تلته الفعالية في عينات السويداء (0.070 U) مع فروقات معنوية بينها وبين موقعي جبلة 1 وجبلة 2.

وبالنسبة للتفاعل بين الحرارة والمواقع بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية في الفعالية الأنزيمية، كان متوسط الفعالية الأنزيمية الأعلى معنوياً عند درجة الحرارة 25 °م في الموقع جبلة 2 (0.577 U)، يليها عند الدرجة 25 °م في الموقع جبلة 1 (0.547 U)، ثم عند الدرجة 35 °م في الموقع جبلة 2 (0.543 U)، وكانت الفعالية الأنزيمية الأقل معنوياً عند درجة الحرارة 60 °م في موقع السويداء (0.032 U).

تزداد الفعالية الأنزيمية تدريجياً مع زيادة درجة الحرارة نتيجة زيادة حركة الجزيئات ومن ثمَّ زيادة فرص التقاء الركيزة بالأنزيم إلى أن تصل إلى الدرجة المثلى بعد ذلك نلحظ انخفاض الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة ويعود ذلك إلى تخرب البروتين الأنزيمي بالحرارة (تخثر البروتين)، و من ثمَّ يتغير الشكل الفراغي للأنزيم ويصبح غير قادر على الارتباط مع الركيزة.

تسمح مقارنة المعطيات في الجدول (3) بتأكيد النتائج السابقة وهي أن الفعالية الأنزيمية لعينات جبلة(1) هي الأعلى دوماً على الرغم من أن التطابق في درجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم وهي 25 °م مع عينات جبلة (2) والسويداء وتبقى دوماً عينات السويداء في المرتبة الثالثة، ويمكن أن يعود ذلك إلى أن التعبير البروتيني عن الأنزيم هو أكثر في عينات جبلة 1 أو أن نسبة الأنزيم الكامن فيها كانت أقل ويعود لك لأسباب وراثية وبيئية تحتاج مزيد من الدراسة.

تتشابه النتائج التي توصلنا إليها مع ما توصل إليه (Bello and Sule 2012) حيث وجدا أن درجة الحرارة المثلى للكاتيكول أكسيداز المستخلص من ثمار الجوافة guava (*Psidium guajava*) هي 30°م في حين بلغت بالنسبة للأنزيم نفسه المستخلص من

ثمار البابايا (*Carica papaya*) والمانغو (*Irvingia gabonnensis*) bush mango 40 °م و 50 °م على التوالي.

درس Dogan *et al* 2005 فعالية أنزيم البولي فينول أكسيداز في نبات المردقوش الشائع *Origanum vulgare ssp. Hirtum* حيث أكد أن الفعالية القصوى لأنزيم البولي فينول أكسيداز (الكاتيكول أكسيداز) لعينات الأوراق والجذر والساق سواء في المرحلة الخضرية أو مرحلة التكاثر تقع عند درجة حموضة أعلى مما أظهرت نتائج البحث في حين كانت درجة الحرارة المثلى للإنزيم في الأوراق هي 30 °م.

كما اختلفت النتائج مع ما توصل إليه الباحث نفسه في عام 2013 على نبات المليسة المخزنية الترنجان) *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* (lemon balm)، حيث سجلت الفعالية القصوى لأنزيم البولي فينول أكسيداز عند درجات حرارة أعلى بكثير 40–50–60 °م، حيث استخدم ثلاث ركائز للأنزيم هي كاتيكول، 4– ميتيل كاتيكول، بيروغالول.

أخيراً إن الاختلاف بين نتائجنا والنتائج المذكورة سابقاً يعود إلى اختلاف نوع النبات، مصدر الأنزيم، الركيزة، العضو النباتي والموقع الجغرافي.

إضافة لذلك تؤكد نتائجنا أن درجتي الحموضة والحرارة المثلى لأنزيم الكاتيكول أكسيداز تختلف ليس فقط حسب النوع النباتي وإنما أيضاً ضمن النوع الواحد حسب عمر العضو والموقع الجغرافي للعينات المدروسة ومن ثمَّ العوامل البيئية.

الاستنتاجات:

1. تختلف الفعالية الأنزيمية للكاتيكول أكسيداز بحسب درجة الحرارة والحموضة التي يتم بها التفاعل.
2. تختلف الفعالية الأنزيمية حسب العضو النباتي وعمره وبحسب الموقع الجغرافي للعينة النباتية.

3. ظهرت الفعالية القصوى عند الأوراق الفتية وأقل فعالية عند الثمار، أما الأوراق الكهلة فقد تفوقت على الثمار لكن الفعالية الأنزيمية فيها أقل مقارنة مع الأوراق الفتية.
4. الفعالية القصوى لأي أنزيم ليست ثابتة عند درجتي حرارة وحموضة وإنما يختلف ذلك حسب معايير عديدة.

المراجع References:

1. الشلبي، محمد نبيل .(2017). السنديان. الموسوعة العربية.2

2. مالو، أحمد؛ حمو، سامح .(2014) .الكيمياء الحيوية، منشورات جامعة دمشق .كلية العلوم

3. نادر، سهيل. (1999). الفريغانا في سوريا، دراسة بيئية واجتماعية. منشورات أسبوع العلم الـ 39، دمشق.

4. Aldrich P. and eannine C. B. (2011). Quercus. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
5. Arnnok P., Ruangviriyachai C., Mahachai R., Techawongstien S. and Chanthai S. (2010). Optimization and determination of polyphenol oxidase and peroxidase activities in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) pericarb. *Int. Food Res. J.* 17: 385-392.
6. Aydemir T ., and Kuru K. (2003). Purification & partial characterization of catalase from chicken erythrocytes & effect of various inhibitors on enzyme activity. Turk . J. Chem . 27: 85 – 97.
7. Bello A.B. and Sule M.S. (2012). Optimum Temperature and Thermal Stability of Crude Polyphenol Oxidase from some Common Fruits. Nigerian Journal of Basic and Applied Science (20(1): 27-31.
8. Chesworth J.M., Stuchbury T., Scaife, J.R. (1998). An Introduction to Agricultural biochemistry. Chapman & Hall. London.
9. Copeland R. A. (2000). Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. SECOND EDITION .Copyright by Wiley-VCH, Inc.
10. Darnell J . (1990). Molecular Cell Biology. Published by Scientific American Books.
11. Dogan S., Arslan O., Ozen F. (2005). Polyphenol oxidase activity of oregano at different stages.Food Chemistry. 91:341–345.
12. Doğan S., Ayyildiz Y., Doğan M., Alan and Diken M. E. (2013). Characterisation of polyphenol oxidase from *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* (lemon balm). Vol. 31, No. 2: 156–165. Czech J. Food Sci.

13. Fluhkey W. H., and Jen J . .I. (1978).Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches . .1. Food Sei. 43, 182G - 1831.
14. Gálos B and Albert L. (2009). Stress Sensitivity of Correlation between POD and PPO Activities in Plants *Vol. 5 :27-45*.
15. Gasparetti C. (2012). Biochemical and structural characterisation of the copper containing oxidoreductases catechol oxidase, tyrosinase, and laccase from ascomycete. fungi- Doctoral dissertation for the degree of Doctor Philosophy.pp 16:30.
16. Güray M. Z. (2009). partial purification and characterization of polyphenol oxidase from thermophilic *Bacillus* sp. A Thesis Submitted to the Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology.
17. Holderbaum D. F. (2010). Enzymatic Browning, Polyphenol Oxidase Activity, and Polyphenols in Four Apple Cultivars: Dynamics during Fruit Development.HortScience 45(8): 1150-1154.
18. Jadhav U. U., Dawkar V. V., Jadhav M. U. and Govindwar S. P. (2011). Decolorization of the textile dyes using purified banana pulp polyphenol oxidase. *Int. J. Phytoremedi.* 13:357-372.
19. Nader S.(1985). Les phryganas orientals rapport de D.E.A. Aix Marseille III. France.
20. Nader S.(1990). Contribution AL etude structural des phytocenoses Mediterraneennes:Aspects ecologiques et biochimiques. thesis Univ Aix-Marseille III.
21. Németh, Z. I., Harsány, M. P., Gálos, B., Alber, L.(2009). Stress Sensitivity of Correlation between POD and PPO Activities in Plants. Acta Silv. Lign. Hung., Vol. 5) :27-45.
22. Quezel M.B. 1981. Les ferrets Mediterranee orientales dans une prespective d ecologie appliqué a la sylviculture Mediterraneenne. Acta Ecologia 2(3)311-412.
23. Shinde U. G., Metkar S. K., Bodkhe R. L., Khosare G. Y. and Harke S.N.(2012). potential of polyphenol oxidases of *Parthenium hysterophorus, Alternanthera sessilis* and *Jatropha curcas* for simultaneous degradation of two textile dyes: yellow 5g and brown r .No. 1. dama international science journal.(7):20- 27.

24. Solomon E.I., Chen P., Metz M., Lee S.K., Palmer A.E. (2001). Oxygen binding, activation,and reduction to water by copper proteins. Angew Chem Int Ed Engl. 40(24): 4570–4590.
25. Stich K and Ebermann R. (1987). Oak Peroxidase: Relationship with Polyphenol Oxidase. Holzforschung. 41 :19-21.
26. Taranto F., Pasqualone A., Mangini G., Tripodi P., Miazzi M. M ., Pavan, S., and Montemurro C. (2017). Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical,Physiological and Genetic Aspects. International Journal of Molecular Sciences.18(2).377-393.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2018/06/15.
تاريخ قبوله للنشر 2018/09/27 .