دراسة الخواص الكيميائية الحيوية لإنزيم البروكسيديز من الفجل *أرموراسيا روستيكا*

إعداد
عاطف سعدى رباح عدس

إشراف
أ. د. صالح بن أحمد محمد
أ.د. خالد بن عمر أبوالنجا

المستخلص

تستخدم إنزيمات البيروكسيديز فى عدد من التطبيقات الصناعية والتحليلية. وهناك اهتمام متزايد لإيجاد إنزيمات بيروكسيديز بديلة/ مضافة مع خصائص جديدة. لذلك تركز هذه الدراسة على إستتباب وتنقية ودراسة خواص إنزيم البيروكسيديز من جذور الفجل السعودى. ولإستتباب نشاط الإنزيم وجد أن معدل نشاط إنزيم البيروكسيديز يتزايد خطيا مع زيادة تركيز البيروكسيديز ووقت التحضين. تم تنقية إنزيم البيروكسيديز بإستخدام الترسيب بسلفات الأمونيوم والفصل الكروماتوجرافى على عمود ثنائى ايثيل أمينوإيثيل- سيفاروز والترشيح على الجل بإستخدام عمود السيفاكريل س-٢٠٠. تم تقدير الوزن الجزيئى للانزيم ب ٥٦ كيلو دالتون. تم دراسة أكسدة بعض المركبات الفينولية وبواسط إنزيم POIII . ويعتبر نشاط الانزيم مع الجوايكول يمثل ١٠٠% من النشاط. تبين أن الأورثو-فينيلينديامين والجوايكول لهم نفس النشاط (١٠٠%)، بينما الاورثو-ديانيزيدين له نشاط متوسط. كما تبين أن البيروجالول و البارا-امينوانتيبيرين لهما قابلية منخفضة تجاه الانزيم.. وقد قدرت قيم ثابت ميكائيل إنزيم POII لفوق أكسيد الهيدروجين والجوايكول ب ٣,٣ و ١٦,٤ مللى مولار، على التوالى. وأعلى نشاط ٠,٦٩ و ٠,٧١ وحدة نشاط/ مل لفوق أكسيد الهيدروجين والجوايكول ، على التوالي. وجد أن إنزيم POIII له درجة حرارة مثلى عند ٤٠°م وثابتيته للحرارة حتى درجة ٤٠°م. تبين أن إنزيم POIII له أس هيدروجينى أمثل عند ٥,٥. كما تبين أن كل الكاتيونات الفلزية المختبرة لها تأثيرات تثبيطية مختلفة على نشاط الإنزيم، ما عدا الحديد الذى زاد نشاط الإنزيم ١٦٠% عند ٥ مل مللى مولار. كما وجد أن المكونات المخلبية للفلزات لهم نشاط تثبيطي على الإنزيم، ما عدا EDTA عند ١ مللى مولار التى ليس لها أى تاثير على الانزيم. وفى الاستنتاج، قررت الدراسة ان انزيم البيروكسيديز من الفجل له القدرة على اكسدة بعض المركبات الفينولية التى تعتبر مركبات ملوثة للبيئة.

Biochemical Characterization of Peroxidase from Horseradish *Armoracia rusticana*

By
Atef Sady Rbhh Ads
Supervised By
Prof. Saleh Ahmed Mohamed
Prof. Khalid Omar Abulnaja

Abstract

Peroxidases are used in a number of industrial and analytical applications. There is increased interest to find alternative/additional peroxidases with novel properties. Therefore, the present study focused on the establishment, purification and characterization of peroxidase from Saudi horseradish roots. For establishment the enzyme, the rate of peroxidase activity was linearly increased with increasing the peroxidase concentration and incubation time. The purification procedure of horseradish peroxidase was carried out using ammonium sulphate precipitation, chromatography on DEAE-Sepharose column followed by Sephacryl S-200 column. The molecular weight of horseradish POIII was 56 kDa. The oxidation of some phenolic compounds by horseradish POIII has been examined. The activity with the guaiacol is regarded as 100% activity. *o*-Phenylenediamine and guaiacol had the same peroxidase activity (100%), while *o*-dianisidine had moderate peroxidase activity. Pyrogallol and *p*-aminoantipyrine had low affinity toward POIII. The apparent K_m value of POIII for H_2O_2 and guaiacol were 3.3 and 16.4 mM/ml, respectively. The catalytic efficiency Vmax was 0.69 and 0.71 units/ml for H_2O_2 and guaiacol, respectively. POIII was found to have temperature optimum at 40˚C and the enzyme activity was remained stable up to 40˚C. POIII exhibited pH optimum at pH 5.5. All the examined metal cations had partially inhibitory effects toward POIII, except of Fe^{3+} enhanced the activity by 160% at 5 mM. All the metal chelators caused partially inhibitory effects toward POIII, except of EDTA at 1 mM which had no effect on the enzyme. In conclusion, the study reported that horseradish POIII had the ability for oxidation of some of phenolic compounds which considered pollutant compounds for environment.