جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة تثبيطية وحركية لأنزيم التايروسينيز المنقى جزئياً من فاكهة السفرجل العراقي(*Cydonia oblonga* Miller)

أية إحسان جميل رشان

رسالة ماجستير
الكيمياء

بإشراف
الاستاذ المساعد
الدكتور عمر يونس محمد العباسي

1442هـ 2020م

الخلاصة

شملت الدراسة ، تنقية أنزيم التايروسينيز جزئياً من لب فاكهة السفرجل المزروع في مدينة الموصل في العراق. بلغت الفعالية النوعية للأنزيم الخام (342.07) وحدة أنزيمية / ملغم بروتين. بعد تطبيق الترسيب بواسطة كبريتات الأمونيوم والفرز الغشائي بلغت الفعالية النوعية (217.86 و 258.09) وحدة أنزيمية /ملغم بروتين، على التوالي، وكانت عدد مرات التنقية (0.63 و 0.75) مرة على التوالي . بعد تطبيق تقنية كروموتوغرافيا التبادل الأيوني بأستخدام المبادل DEAE-Cellulose ، أظهرت النتائج النهائية وجود حزمة واحدة من أنزيم التايروسينيز فعاليتها النوعية 11406.77 وحدة أنزيمية / ملغم بروتين وعدد مرات التنقية 33.34 مرة . أظهر توصيف الأنزيم المُنقى جزئياً أن الرقم الهيدروجيني (6.8) الأمثل ودرجة الحرارة المُثلى 40 م°. في حين تراوحت درجة الحامضية لأستقرارية الأنزيم من 6 إلى 7.5 ، بينما حددت أستقراريتهُ عند درجة الحرارة 40 م°.

حددت المتغيرات الحركية والحرارية لأنزيم التايروسينيز المنقى جزئياً، وكانت كالأتي: ثابت ميكاليس Km (1.96) ملي مولار، السرعة القصوى Vmax (228.13) وحدة/ ملي لتر/ دقيقة ، طاقة التنشيط Ea (6.742) جول / مول ، ΔH (4.14) جول / مول ، Q10 (22.391) ، kcat (5.00) دقيقة$^{-1}$ و Vo (2.551) ملي مولار$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$.

أظهر أنزيم التايروسينيز الخام للب فاكهة السفرجل أنخفاضاً في الفعالية التحفيزية مع زيادة درجة الحرارة ومدة التسخين والذي أنعكس على زيادة قيم ثابت التوازن من المرتبة الأولى من 0.0023 الى 0.515. وأنخفضت قيمة عمر النصف مع زيادة درجة الحرارة من 30.1 الى 1.3دقيقة، كما أنخفضت قيم معامل D لأنزيم التايروسينيز المستخلص مع زيادة درجة الحرارة من 35–75 م° من 1001 الى 44.6 دقيقة.

تَضمنت الدراسة أيضاً تثبيط فعالية أنزيم التايروسينيز وشدة الأسمرار في عصير السفرجل عن طريق المعاملة بالمركبات المضادة للأكسدة الفانيلين ،الكلوتاثيون والميلاتونين مقارنة بمحلول السيطرة، وكانت النسبة المئوية القصوى لتثبيط التايروسينيز 83، 68.8 و 90.3 ٪ والتأثير المثبط لشدة الأسمرار 13.9 و 9.7 و 29.8٪ عند التراكيز 10 ، 8 و 10 ملي مولار على التوالي.

ظهر نوع التثبيط للأنزيم بأستخدام الفانيلين تثبيطا تنافسيا ، أذ زادت قيمة Km من 1.96 الى 5 ملي مولار، و بقيت قيمة السرعة القصوى ثابتة 228.13 وحدة/ ملي لتر/ دقيقة وثابت التثبيط Ki 2.312 ملي مولار. فضلاً عن ذلك فقد أظهرت النتائج بأن الكلوتاثايون والميلاتونين كانا مثبطان غير تنافسيان. بقيت قيمة ثابت ميكاليس ثابتة 1.96 ملي مولار بينما أنخفضت

قيمة السرعة القصوى من 228.13 الى 159.69 و 114.06 وحدة/ ملي لتر/ دقيقة وقيمة ثابت التثبيط كانت (5.5 و 6.9) ملي مولار، على التوالي.

سُخن عصير السفرجل غير المعامل(محلول السيطرة) لمدة 5 ساعات عند درجة حرارة 100م°، ولوحظَ أرتفاعاً في الأمتصاصية عند 294 نانوميتر، شدة الأسمرار A420 نانوميتر و القوة المختزلة عند 700 نانوميتر، وأنخفاضاً في محتوى السكريات المختزلة، الأحماض الأمينية الحرة، المركبات الفينولية ونسبة تثبيط بيروكسدة الدهون.

وقد لوحظ أنخفاضاً في الأمتصاصية عند 294 نانوميتر ، شدة الاسمرار عند 420 نانوميتر والقوة المختزلة مقارنة بمحلول السيطرة عند المعاملة بـ 10 ملي مولار من الفانيلين و 8 ملي مولار من الكلوتاثيون. وعلى عكس الكلوتاثيون، فأن اضافة الفانيلين الى عصير فاكهة السفرجل أظهر أرتفاعاً في محتوى السكريات المختزلة والمركبات الفينولية ونسبة تثبيط بيروكسدة الدهون، بينما أنخفضَ محتوى الأحماض الأمينية الحرة مقارنة بمحلول السيطرة.

وأخيراً بأستخدام أختبار كشف مولش و طريقة الفينول – حامض الكبريتيك ، تم فحص الأنزيم المنقى وتبين أنهُ بروتين سكري.

Abstract

In this study, tyrosinase was partially purified from quince fruit pulp which was organically grown in Mosul city of Iraq . specific activity of crude enzyme was (342.07) U/mg. After applying precipitation by ammonium sulfate and dialysis, specific activties were (217.86) and (258.09)U/mg and purification fold were (0.63) and (0.75) respectively. After ion exchange chromatography using DEAE-Cellulose, final result revealed one peak of tyrosinase with specific activity of (11406.77) U/mg and purification fold of (33.34). Characterization of partially purified enzyme showed that optimum pH and tempreture were 6.8 and 40C° respectively. However, pH stability proved in a pH range from 6 to 7.5, while thermal stability was determined at (40°C).

The kinetic and thermal parameters of partially purified tyrosinase were assessed: Km (1.96 mM), Vmax (228.13 U/mL.min), Ea (6.742 J/mol), ΔH (4.14J/mol), Q10 (22.391), kcat (5.00 min^{-1}) and Vo (2.551 $mM^{-1}.min^{-1}$).

Crude Tyrosinase from quince pulp exhibited a decline in catalytic activity as the temperature and period of heat inactivation increased, Which reflected by an increment in first order constants k values from 0.0023 to 0.515. Half-life ($t_{1/2}$) values was diminished with increasing temperature from 30.1 to 1.3 min. As increasing tempreture from 35-75 °C , the D values of quince tyrosinase decreased from 1001 to 44.6 min.

The study also included, inhibition of tyrosinase activity and browning intensity in quince juice by treating with antioxidant compounds vanillin, glutathione and melatonin as compared to the

control. The maximum inhibition percentage of tyrosinase were 83, 68.8 and 90.3 % and the maximum inhibitory effect of browning intensity were 13.9, 9.7 and 29.8% at 10 , 8 and 10 mM respectively.

Inhibition type of tyrosinase were showed competitive by using vanillin, Km value increased from (1.96) to (5)mM , Vmax remains (228.13)U/ml.min and Ki (2.312)mM . As well as, the results revealed glutathione and melatonin were noncompetitively inhibitors. The K*m* value remains constant (1.96mM), while V*max* reduced from (228.13) to (159.69) and (114.06) $U.ml^{-1}.min^{-1}$, inhibition constant K*i* value were (5.5) and (6.9) mM respectively.

For untreated quince juice which heated to 5 hours at 100 ^{o}C, the results showed increasing in A294, browning intensity (A420) and reducing power at 700nm, decreasing in reducing sugar, free amino group, phenolic compounds contents and inhibition percentage of lipid peroxidation. The decreasing of A294, and browning intensity but increasing in reducing power by treating with (10mM) vanillin and (8mM) glutathione were observed compared to control. Conversely to glutathione, the addition of vanillin to quince juice revealed increasing in inhibition percentage of lipid peroxidation, reduced sugar and phenolic contents but decreasing in free amino acid content compared to control.

Finally, by using molish test and phenol- sulfuric acid method, purified enzyme investigated as a glycoprotein.

University of Mosul
College of Education
for pure Science

Inhibition and Kinetic Study of Partially Purified Tyrosinase From Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Fruit

Ayaa Ihsan Jamel Rashan

M. Sc. Thesis
Chemistry

Supervised by
Assist. Prof.
Dr. Omar Younis Mohammed Al- Abbasy

2020 AD **1442 AH**