

تحديد أهم صفات إنزيم البولي فينول أوكسيداز الخام المستخلص من بعض الفواكه والخضر ودراسة تأثير بعض العمليات التصنيعية في ثباتيته

رسالة تقدمت بها

سروه رمضان حمزه

إلى

مجلس كلية الزراعة والغابات في جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في اختصاص علوم الأغذية والتقانات الأحيائية

بإشراف

الدكتور وليد أحمد محمود و الدكتور صالح حمادي سلطان

استاذ مساعد

استاذ مساعد

كانون الثاني 2007 م

ذي الحجة 1427 هـ

Abstract الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى عزل إنزيم البولي فينول اوكسيداز (Polyphenol oxidase, ppo) من ثمار كل من المشمش والتفاح والبادنجان والبطاطا ودراسة بعض صفاته. كما هدفت الى اجراء بعض المعاملات التصنيعية للثمار المذكورة ودراسة تأثير هذه المعاملات على ثبات الإنزيم. وقد تضمنت الدراسة المحورين الآتيين:

أ- عزل وتوصيف الإنزيم: حيث تم استخلاص الإنزيم من الثمار باستخدام محلول الفوسفات الداريء (Potassium phosphate buffer)، ثم ترسيبه باستخدام الأسيتون البارد وإذابة الراسب في محلول الفوسفات الداريء والذي استخدم في توصيف الإنزيم. وقد تم التوصل الى النتائج الآتية:

1- بلغت قيمة الاس الهيدروجيني الأمثل (pH) لعمل الإنزيم في ثمار كل من المشمش و التفاح و البادنجان و البطاطا 7، 7، 7 و 6.4، على التوالي.

2- بلغت درجة الحرارة المثلى لعمل إنزيم البولي فينول اوكسيداز المستخلص من ثمار كل من المشمش والتفاح والبادنجان والبطاطا 20، 20، 22 و 22 م°، على التوالي.

3- كانت قيمة الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم المستخلص من المصادر الأربعة المذكورة في فقرة (1) هي 7 وانخفض الثبات بشكل ملحوظ عند انخفاض قيمة الاس الهيدروجيني عن 5.

4- فقد الإنزيم المستخلص من الثمار الأربعة المذكورة في فقرة (1) 12، 56، 6 و 12% من الفعالية بعد مرور 60 دقيقة من التحضين بدرجة الحرارة 40 م°، على التوالي. كما فقد 76، 88، 64 و 40 % من الفعالية بعد مرور 60 دقيقة من التخزين بدرجة الحرارة 60 م°، على التوالي.

5- بلغت قيمة ثابت ميكلس (Km) للإنزيم من المصادر الأربعة السابقة الذكر 4 و 4.16 و 1.25 و 1.42 ملليمولر، على التوالي وباستخدام مادة الكاتيكول (Catechol) كركيزة.

6- فقد الإنزيم المستخلص من كل من ثمار المشمش و البادنجان و البطاطا والمخزن بدرجة حرارة 4 م° 73، 74 و 35.6 % من الفعالية الأصلية، على التوالي بعد مرور 88 يوماً من التخزين، وفقد التفاح كل الفعالية بعد مرور 40 يوماً من التحضين.

7- فقد الإنزيم المستخلص من كل من ثمار المشمش والتفاح و البادنجان و البطاطا والمخزن بدرجة حرارة -18 م° 23، 55، 30 و 14 % من الفعالية الاصلية، على التوالي بعد مرور 88 يوماً من التخزين.

ب- اجراء عمليات الكبرتة والسلق والتجفيف الشمسي والمعاملة بالموجات الدقيقة (Microwaves) والخن بالتبريد والتجميد للثمار و دراسة تأثير هذه العمليات على ثبات الإنزيم. وقد تم التوصل الى النتائج الآتية:

1- أدت عملية سلق شرائح الباذنجان والبطاطا (بدرجة حرارة 85 م° لمدة 4 دقائق) الى تثبيط 95 و 90 ٪ من الفعالية الإنزيمية، على التوالي.

2- إن خزن ثمار كل من المشمش و التفاح والباذنجان بدرجة 4 م° أدى إلى تثبيط فعالية إنزيم البولي فينول اوكسيديز بنسبة 18، 36 و 30 ٪ بعد 16 أيام، على التوالي. أما في البطاطا فقد احتفظ الإنزيم بكامل فعاليته بعد مرور 32 يوماً من التخزين.

3- أدت عملية خزن الثمار بالتجميد (-18 م°) لمدة 88 يوماً الى فقدان الفعالية الإنزيمية بنسبة 10، 72، 52 و 5 ٪ من الفعالية الأصلية في كل من المشمش و التفاح و الباذنجان والبطاطا، على التوالي.

4- أدت معاملة شرائح كل من المشمش والتفاح والباذنجان والبطاطا بالموجات الدقيقة بتردد مقداره 2450 ميكاهيرتز (MHz) وقدره 145 واط الى تثبيط الإنزيم كلياً بعد 80، 40، 50 و 60 ثانية، على التوالي. أما عند زيادة القدرة المستخدمة الى 435 واط فقد انخفضت المدة اللازمة للتثبيط الكلي للإنزيم في الثمار المذكورة الى 40، 20، 30 و 30 ثانية، على التوالي.

5- أدت معاملة الكبرتة لثمار المشمش باستخدام مادة ميتا ثنائي كبريتيت الصوديوم ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) بتركيز 12.8 و 64 و 128 جزء بالمليون لأيونات (SO_2^{2-}) الى تثبيط الإنزيم بنسبة 100 ٪ بعد مرور 80، 70 و 60 دقيقة من الغمر، على التوالي. وفي شرائح التفاح ثبت الإنزيم كلياً بعد 50 و 40 و 30 دقيقة من الغمر في التراكيز المذكورة، على التوالي. اما في شرائح البطاطا فقد تطلب الغمر في التراكيز الثلاثة لمدة 30، 25 و 15 دقيقة لتثبيط الإنزيم كلياً، على التوالي.

6- كان إنزيم البولي فينول اوكسيديز في كل من المشمش والتفاح حساساً تجاه التجفيف الشمسي للثمار إذ لم تتجاوز نسبة الفعالية الإنزيمية المتبقية بعد التجفيف 0.4 و 0.7 ٪، على التوالي. في حين كان الإنزيم الموجود في الباذنجان والبطاطا أكثر ثباتاً إذ بلغت نسبة الفعالة المتبقية بعد التجفيف 31.8 و 63.5 ٪، على التوالي.

Abstract

This study was undertaken to isolate and characterize polyphenol oxidase from apricot, apple, eggplant and potato fruits and to determine the effects of some processing operations on the stability of the enzyme. The study contained:

- A. Isolation and characterization of the enzyme: The enzyme was extracted from the fruits by homogenizing with potassium phosphate buffer, precipitation by cold acetone. The precipitated enzyme was dissolved in the buffer and used for characterization. The following results were obtained:
1. Optimum pH of activity was 7 for enzyme isolated from apricot, apple and eggplant and was 6.4 for potato polyphenol oxidase.
 2. Optimum temperature of activity was 20 °C for enzyme isolated from apricot and apple and it was 22 °C for enzyme isolated from eggplant and potato.
 3. The optimum pH for the enzyme stability from the four sources was found to be 7.0. The stability was decreased significantly at pH values lower than 5.
 4. Incubation of the enzyme from the four sources and stored at 40 °C resulted loss of 12, 56, 6 and 12% of activity after 60 minutes, respectively and caused the loss of 76, 88, 64 and 40% after 60 minutes of incubation at 60 °C, respectively.
 5. Michaelis constants (K_m) towards catechol as substrate were 4.0, 4.16, 1.25 and 1.42 millimolar for enzyme isolated from apricot, apple, eggplant and potato, respectively.
 6. The enzyme isolated from apricot, eggplant and potato and stored at 4 °C caused the loss of 73, 74, and 35% of the original activity after

88 days of storage, respectively; Apple polyphenol oxidase had lost all activity after 40 days.

7. The enzyme isolated from the four sources (apricot, apple, eggplant and potato) and stored at -18 °C caused the loss of 23, 55, 30 and 14% of their original activity after 88 days of storage, respectively.

B- The second part of the study included the study of the effects of sulfuring, blanching, sun drying, microwave treatment and refrigeration and freezing storage on the stability of the polyphenol oxidase. The following results were obtained.

1. Blanching of eggplant and potato slices (at 85 °C for 4 minutes) caused the loss of 95 and 90% of the original ppo activity, respectively.
2. Storage of apricot, apple and eggplant at 4 °c caused inactivation of 18, 36 and 30% of ppo activity after 16 days, respectively, in potato, the enzyme retained all the original activity after 32 days of storage.
3. Freezing storage at -18 °C for 88 days caused loss of 10, 72, 52 and 5% of ppo activity from the apricot, apple eggplant and potato, respectively.
4. The enzyme in the four fruits had completely inactivated upon microwave treatment at 2450 MHz and 145 watt after 80, 40, 50 and 60 seconds. However, when 435 watt was used, the time required for the complete inactivation was decreased to 40, 20, 30 and 30 seconds, respectively.
5. Sulfuring of apricot fruits using sodium metabisulfite (12.8, 64 and 128 part per million SO_2^{-2}) resulted in the complete inactivation of the enzyme after 80, 70 and 60 minutes of treatment, respectively. Apple slices needed 50, 40 and 30 minutes, respectively. However, potato ppo reached the complete inactivation after 30, 25 and 15

Abstract

minutes of dipping in the above mentioned concentration, respectively.

6. Apricot and apple ppo was found to be sensitive towards sun drying of the fruits. The residual activities after drying were 0.4 and 0.7%, respectively, while eggplant and potato ppo was more resistant against this treatment. The residual activities after drying were found to be 31.8 and 63.5% of the original activities, respectively.

Properties of Crude Polyphenol Oxidase Isolated from Some Fruits and Vegetables and Study of the Effect of Some Processing Operations on its Stability

A Thesis Submitted

By

Sirwa Ramazan Hamza

To

The Council of the College of

Agriculture and Forestry

University of Mosul

In

Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

In

Food Science and Biotechnology

Supervised By

Dr. Walid A. Mahmood and **Dr. Salih H. Sultan**
Assistant Professor Assistant Professor