Partial Purification of laccase enzyme from rosemary leaves (*Rosmarinus officinals*) and study of some its properties

Dr . Ramez Mohammad*
Dr. Sanaa Sara**
Rabab Saoud***

(Received 19 / 5 / 2022. Accepted 20 / 9 /2022)

□ ABSTRACT □

In this study a partial purification of laccase enzyme was carried out from Rosemary plant. The purification steps included precipitation with acetone 75% as a first step, then purification using ion exchange chromatography on a DEAE-Sephadex column, followed by gel filtration chromatography using a Sephadex G100 column. Yield at the end of the purification steps was 54.14%, with a fold purification of 40.86 and a specific activity of 44.54 units/mg. The studied laccase showed a highest activity at pH 7, while its optimum temperature was 65 °C using 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) as a substrate. The results showed the thermal stability of the enzyme, where 55% of its activity remained after being incubated for an hour at a temperature of 75 °C, and laccase enzyme maintained more than 92% of its activity after being incubated for 24 hours at pH between (6-9). It should be noted that the above properties of the studied laccase enzyme give it great importance in various industrial applications.

Keywords: laccase, rosemary, purification, characterization, thermal stability.

* **Professor , Department of Food Sciences, Faculty of Agricultural Engineering, Tishreen University, Lattakia, dr.Ramezgobran@gmail.com.**
** **Assistant Professor , Department of Biology, Faculty of Science , Tishreen University, Lattakia, SannaSaraa@gmail.com.**
*** **PhD Student in The Department of Food Sciences Faculty of Agricultural Engineering, Tishreen University, Lattakia, rabab.saoud@tishreen.edu.sy.**

التنقية الجزئية لأنزيم اللاكيز laccase المستخلص من أوراق نبات إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) ودراسة بعض خصائصه

د. رامز محمد*

د. سناء ساره**

رباب سعود***

(تاريخ الإيداع 19 / 5 / 2022. قبل للنشر في 20 / 9 / 2022)

□ ملخّص □

تمت في هذه الدراسة تنقية جزئية لأنزيم اللاكيز المستخلص من نبات إكليل الجبل، وقد شملت خطوات التنقية الترسيب بالأسيتون 75% كخطوة أولى، ثم التنقية باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني على عمود DEAE-Sephadex تلتها كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephadex G100، وبلغت الحصيلة الأنزيمية في نهاية عملية التنقية 54.14% بعدد مرات تنقية 40.86 مرة وفعالية نوعية 44.54 وحدة / مغ، أبدى الأنزيم المدروس أعلى فعالية عند الرقم الهيدروجيني pH 7، بينما كانت درجة الحرارة المثلى له 65 م°، وذلك باستخدام مادة (ABTS) 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) كركيزة، وقد بينت النتائج ثباتية الأنزيم حرارياً حيث تبقى 55% من فعاليته بعد تحضينه مدة ساعة على درجة حرارة 75 م°، كما حافظ الأنزيم على أكثر من 92 % من فعاليته بعد تحضينه مدة 24 ساعة على درجات pH بين (6 – 9)، تجدر الإشارة إلى أن الخصائص السابقة للأنزيم تعطيه أهمية كبيرة في التطبيقات الصناعية المختلفة.

الكلمات المفتاحية: لاكيز– إكليل الجبل– تنقية– توصيف– الثبات الحراري.

* أستاذ في قسم علوم الأغذية، كلية الهندسة الزراعية، جامعة تشرين، اللاذقية، سوريا، dr.Ramezgobran@gmail.com

**أستاذ مساعد في قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة تشرين، اللاذقية، سوريا، SannaSaraa@gmail.com

***طالبة دكتوراه في قسم علوم الأغذية، كلية الهندسة الزراعية، جامعة تشرين، اللاذقية، سوريا،rabab.saoud@tishreen.edu.sy

مقدمة:

يعتبر أنزيم اللاكيز أحد أهم أنزيمات الأكسدة المحتوية على ذرات النحاس MCO (Multi Copper Oxidase) بسبب قدرته على أكسدة مجال واسع من الركائز الفينولية وغير الفينولية (Sondhi and Saini, 2019)، وهذا ما أكسبه أهمية في العديد من التطبيقات كصناعة الورق والنسيج والصناعات الغذائية (Moreno *et al.,* 2020)، ومع ذلك يعد الحصول على كميات كبيرة من الأنزيم عالي النشاط وبكلفة مقبولة أحد القيود المحددة لإنتاجه، ومايزال إلى وقتنا الحالي البحث عن مصادر غير مكلفة لإنتاج أنزيم اللاكيز قائماً (Shraddha *et al.*, 2011)، يحفز أنزيم اللاكيز تفاعلات الأكسدة بوجود الأكسجين الجزيئي الذي يتم اختزاله إلى ماء (Janusz *et al.*, 2020) وينتج جذور تفاعلية كمنتجات تفاعل أولية (Llevot *et al.*, 2015) يتم من خلالها عملية الربط التقاطعي بين مركبات محددة، مما يعطي اللاكيز أهمية في التطبيقات المختلفة، ويجعله قادراً على المشاركة في عمليات التصنيع العضوي (Riva, 2006)، ينتشر أنزيم اللاكيز بشكل واسع في الفطريات والنباتات، كما يوجد في البكتريا والحشرات (Kunamneni *et al.*, 2007) (Claus, 2004) (Mayer and Staples, 2002) (Messerschmidt and Huber, 1990)، تختلف خصائص اللاكيز بحسب مصدره (Gianfreda *et al.*, 2013) (Christopher *et al.*, 2014) فمثلاً لأنزيم اللاكيز ذو المصدر النباتي وزن جزيئي أكبر من الأنزيم ذو المصدر الفطري (Arora and Sharma, 2010) ويعود السبب في ذلك إلى احتواء اللاكيز ذي المصدر النباتي على جزء كربوهيدراتي (22– 45)% من كتلة الأنزيم، بينما لا تتعدى هذه النسبة في الأنزيم ذي المصدر الفطري (10– 25)% (Dwivedi *et al.*, 2011)، وقد بينت دراسات عدة أن pH الأمثل لعمل الأنزيم ذي المصدر النباتي يميل إلى الدرجات المتعادلة والقلوية، بينما يميل pH الأمثل للاكيز الفطري إلى درجات pH حامضية (Dwivedi *et al.*, 2011)، وعلى الرغم من الخصائص التي يملكها أنزيم اللاكيز ذو المصدر النباتي ماتزال الأبحاث التي اهتمت بدراسته إلى الآن قليلة (Jaiswal *et al.*, 2014) مع العلم أن أول اكتشاف للأنزيم كان من نبات السماق، وقد أثبتت الدراسات اللاحقة وجوده في العديد من النباتات الأخرى، كما أشارت دراسات عديدة على أهمية استخدامه في العديد من التطبيقات الصناعية كإزالة الملوثات من النفايات الصناعية. (Wang *et al.*, 2004) (Lafayette *et al.*, 1999) (Christopher *et al.*, 2014) (Gianfreda *et al.*, 2013).

أهمية البحث وأهدافه:

تختلف خصائص الأنزيم بحسب المصدر الذي استخلص منه، وبالتالي لكل أنزيم خصائص استقرار فريدة توضح مدى فعاليته في التطبيقات ذات الاحتياجات المختلفة، وقد أجمعت الدراسات على أهمية خصائص اللاكيز ذو المصدر النباتي للتطبيقات المختلفة، وعلى العموم هناك قلة في الدراسات التي تمت فيها تنقية اللاكيز من النبات، كما أن الحصول على الأنزيم عالي النشاط وبكلفة مقبولة ما تزال إلى الآن أحد القيود المحددة لإنتاجه، ومن هنا تأتي أهمية دراسة استخلاص وتنقية أنزيم اللاكيز من مصادر مختلفة لتحديد إمكانية الحصول على الأنزيم بإنتاجية عالية وبالخصائص المرغوبة بدلاً من هندسته وبالتالي إمكانية تطبيقه بشكل فعال في المجالات التي تتطلب هذه الخصائص.

وقد هدف هذا البحث إلى:

- تنقية أنزيم اللاكيز بشكل جزئي من نبات إكليل الجبل.
- تحديد درجة pH الأمثل ودرجة الحرارة المثلى للأنزيم المنقى.

– دراسة ثباتية الأنزيم الحرارية وثباتيته لدرجات pH مختلفة.

طرائق البحث ومواده:

1.مواد العمل:

تم الحصول على نبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* من محطة كسب البحثية التابعة لمركز البحوث العلمية الزراعية في اللاذقية.

أجريت الاختبارات في مخبر تكنولوجيا الأغذية ومخابر محطة الهنادي البحثية التابعة لمركز بحوث اللاذقية خلال الفترة (2019 – 2020).

2. طرق العمل:

–**استخلاص الأنزيم:** تم خلط الأوراق بنسبة (60:20) مع محلول منظم TRIS HCl تركيزه 100 mM و pH 7.5 يحوي 0.45 غ من مادة PVPP (polyvinylpyrrolidone) لكل غ من أوراق نبات إكليل الجبل، و1M من مادة كلوريد الصوديوم NaCl، و1,5 M من مادة كلوريد الكاسيوم CaCl2، و0.2% من مادة (SDS) Sodium dodecyl sulfate، و0.2 غ / مل من مجموعة الأنزيمات الهاضمة (Ultrazyme)، تم التحضين لمدة ساعتين على درجة حرارة 4 م°والترشيح، ثم التثفيل على درجة حرارة 4 م° بسرعة 10000 دورة / دقيقة ولمدة 30 د. (Harvey, 1997) (Swetha and Shivaprasad, 2019) (Jaiswal *et al.,* 2015).

–**تنقية الأنزيم:** تم اتباع طريقة (Kumar and Srikumar, 2011) مع بعض التعديلات، حيث تمت عملية التنقية بثلاث خطوات كان أولها الترسيب بالأسيتون 75% لمدة ساعة على درجة حرارة 4 م°، ثم عملية التثفيل باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة/ دقيقة ولمدة ربع ساعة على درجة حرارة 4 م°، تم حل الراسب بأقل كمية ممكنة من المحلول المنظم TRIS HCl تركيزه 100 mM و pH 7.5، وحمل الناتج على عمود التبادل الأيوني DEAE–Sephadex أبعاده (1.5×25) موازن بمحلول منظم TRIS HCl 100 1M تركيزه 1M وpH 7.5، وقد تم استرداد الأنزيم المدمص باستخدام التدرج الملحي الخطي لكلوريد الصوديوم بتراكيز (0–0.8) M مذاب بنفس المحلول المنظم، وبمعدل تدفق 0.7 مل / د، تم جمع الأجزاء المفصولة بمعدل 1 مل وقياس الامتصاص على طول موجة 280 نانومتر، ومن ثم قياس الفعالية للأجزاء التي تحوي بروتين، تم جمع الأجزاء التي أعطت فعالية للأنزيم وركزت بالتجفيد ثم حملت على عمود الترشيح الهلامي Sephadex – G100 أبعاده (1×50) موازن بمحلول منظم TRIS HCl تركيزه 1M وpH 7.5، وقد تم استرداد الأنزيم باستخدام المحلول المنظم نفسه وبمعدل تدفق 0.7 مل / د، تم جمع الأجزاء المفصولة بمعدل 1 مل وقياس الامتصاص على طول موجة 280 نانومتر وقياس الفعالية للأجزاء التي تحوي بروتين، ومن ثم جمعت الأجزاء التي أعطت فعالية للأنزيم وركزت بالتجفيد.

–**تقدير فعالية الأنزيم ونسبة البروتين:** تم تقدير الفعالية وفقاً ل (Matijosyte *et al.*, 2010) باستخدام مادة 2,2'–Azino–bis(3–ethylbenzthiazoline–6–sulfonic acid (ABTS) كركيزة بتركيز 10 mM وبوجود محلول منظم TRIS HCl تركيزه 100 mM وpH 7.5، وتم قياس الامتصاصية عند طول الموجة 420 نانومتر، (ε = 36000 M^{-1} Cm^{-1})، ويعبر عن الفعالية الأنزيمية بكمية الأنزيم التي تؤكسد 1 مكرومول من ABTS بالدقيقة الواحدة، تم تقدير نسبة البروتين باتباع طريقة لاوري (Lowry *et al.*, 1951).

-تحديد درجة الحرارة المثلى وثباتية الأنزيم للحرارة: تم قياس فعالية الأنزيم بإجراء التفاعل ضمن مجال حراري (10- 90) م° باستخدام نفس شروط قياس الفعالية سابقة الذكر، ولتحديد الثباتية الحرارية تم استخدام نفس الشروط ولكن بعد تحضين الأنزيم على الدرجتين (75، 85) م° مدة (15، 30، 60) دقيقة.

-تحديد درجة pH الأمثل وثباتية الأنزيم لدرجات pH: تم قياس فعالية الأنزيم بإجراء التفاعل ضمن مجال pH (5- 9) باستخدام نفس شروط قياس الفعالية السابقة، ولتحديد الثباتية لدرجات pH استخدمت نفس الشروط ولكن بعد تحضين الأنزيم على درجات pH (6، 7، 8، 9) مدة 24 ساعة، وقد تم استخدام المحاليل المنظمة التالية: خلات الصوديوم Sodium acetate لدرجات pH (5، 6)، HCl TRIS لدرجات pH (7، 8)، وبورات الصوديوم Sodium borate لدرجة pH (9).

النتائج والمناقشة:

-تنقية الأنزيم: أجريت عدة خطوات تنقية موضحة بالجدول رقم (1) شملت هذه الخطوات بداية ترسيب الأنزيم، وتجدر الإشارة إلى أن ترسيب البروتينات باستخدام كبريتات الأمونيوم يعد خطوة أولى واسعة الانتشار في تنقية الأنزيمات بسبب ذوبانها وانعدام تأثيرها على البروتينات، ولكن في ما يخص أنزيم اللاكيز فقد وجد (Kumar and Srikumar, 2011) أن ترسيب أنزيم اللاكيز من المستخلص الخام لنبات الصبار *Opuntia vulgaris* باستخدام كبريتات الأمونيوم أدى إلى فقدان فعالية الأنزيم بشكل كامل، وقد تم في هذه الدراسة الترسيب باستخدام كل من كبريتات الأمونيوم والأسيتون ولوحظ أن الأنزيم لم يفقد كامل فعاليته باستخدام كبريتات الأمونيوم وإنما 65% مقارنة مع الفعالية عند الترسيب باستخدام الاسيتون، وبلغت الفعالية النوعية بعد الترسيب 1.41 وحدة / مغ بروتين، وبعدد مرات تنقية 1.29 وإنتاجية 71.16%، أعقب عملية الترسيب خطوة كروماتوغراقيا التبادل الأيوني باستخدام عمود DEAE Sephadex وتشير النتائج الموضحة في الجدول رقم (1) إلى أن الفعالية النوعية زادت بمقدار 9.84 عن قيمتها في المستخلص الخام وقد بلغت 10.74 وحدة / مغ وبإنتاجية 60.1%، تلت الخطوة السابقة عملية الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephadex G 100 حيث أشارت أغلب الدراسات إلى أهمية خطوة الترشيح الهلامي بعد عملية التبادل الأيوني في زيادة نقاوة الأنزيمات، وقد بلغت الفعالية النوعية بنهاية عملية التنقية 44.54 وحدة / مغ بعدد مرات تنقية 40.86 وحصيلة إنتاجية 54.14%.

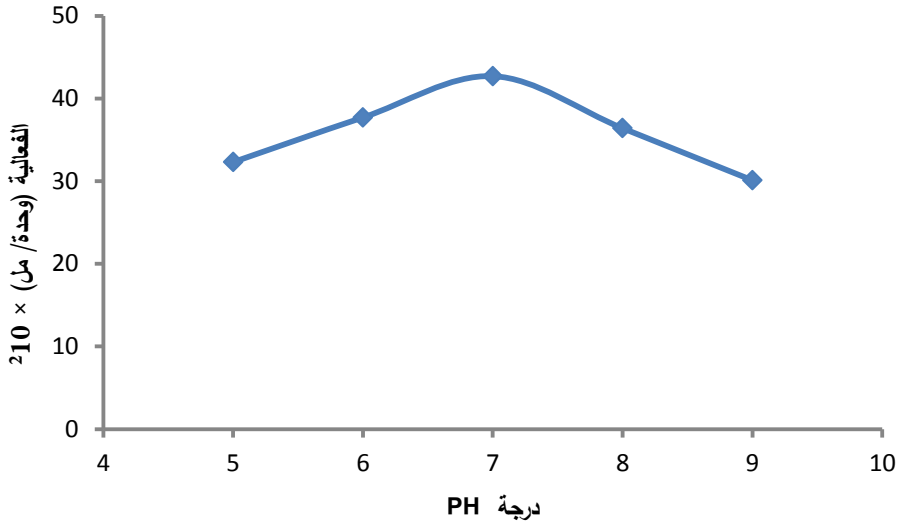
جدول رقم (1) تنقية أنزيم اللاكيز من نبات إكليل الجبل (4 كغ)

الخطوة	الفعالية الكلية (وحدة)	البروتين الكلي (مغ)	الفعالية النوعية (وحدة/مغ)	عدد مرات التنقية	الإنتاجية %
المستخلص الخام	10260	9450	1.09	1	100
الترسيب	7300.7	5170	1.41	1.29	71.16
كروماتوغرافيا التبادل الأيوني	6166.26	574.21	10.74	9.84	60.1
كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي	5554.76	124.7	44.54	40.86	54.14

استخدم (kumar and Srikumar, 2011) نفس الطريقة السابقة لتنقية اللاكيز من نبات *Opuntia vulgaris* وحصل بنهاية عملية التنقية على نظيرين من الانزيم بأوزان جزيئية (137، 90) KD، وقد بلغت الإنتاجية لكل منهما (6.6، 9.6)% على التوالي، لوحظ تنوع في خطوات التنقية التي استخدمها باحثون آخرون في تنقية أنزيم اللاكيز من مصادر مختلفة، فمثلاً استخدم الباحث Jaiswal *et al.*, (2015) كروماتوغرافيا Con-a affinity chromatography لتنقية اللاكيز من أوراق نبات البابايا pappaya وقد بلغت الإنتاجية 61.5% والفعالية النوعية 41.3 وحدة / مغ، وعند تنقية أنزيم اللاكيز من أوراق نبات اللوسينيا *Leucaena leucocephala* باستخدام طريقة Affinity Precipitation Chromatography Celite بلغت الانتاجية 51% والفعالية النوعية 58.5 وحدة /مغ (Jaiswal *et al.*, 2014)، كما بلغت الفعالية النوعية 6.62 وحدة / مغ بإنتاجية 36% عند تنقية الأنزيم من جذور نبات الخردل *Brassica juncea* باستخدام Anion Exchange Chromatograohy (Telke *et al.*, 2011)، في حين كانت الفعالية النوعية 465 وحدة / مغ والإنتاجية 6.21% عند تنقية اللاكيز من فطر *Aspergillus sp* باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني على عمود DEAE Cellulose والترشيح الهلامي على عمود Sephadex G 100 (Sayyed *et al.*, 2020)، وعند استخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE Cellulose لتنقية اللاكيز من فطر *Penicillium chrysogenum* بلغت الفعالية النوعية 74.1 وحدة / مغ والإنتاجية 52.53% (Senthivelan *et al.*, 2019)، وبالتالي يمكن اعتبار طريقة التنقية المستخدمة في هذه الدراسة فعالة واقتصادية للحصول على أنزيم اللاكيز من نبات إكليل الجبل.

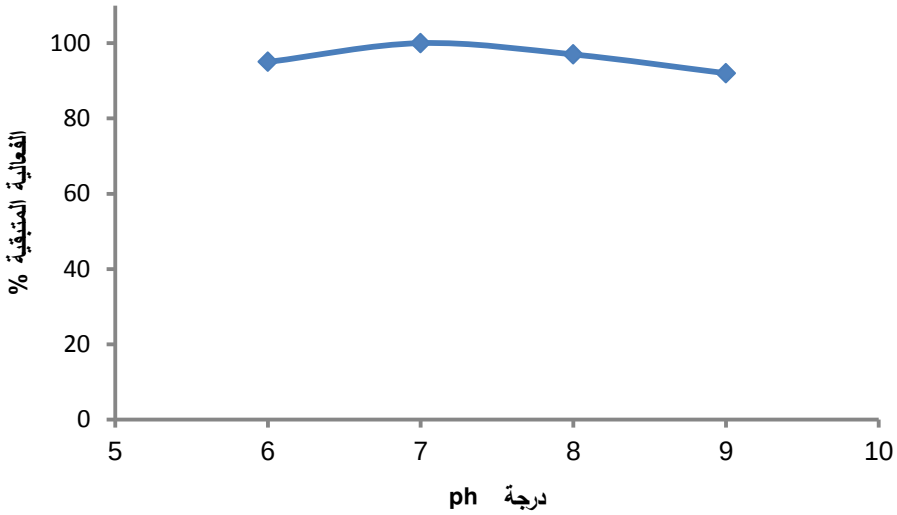
2.4. تحديد درجة الأس الهيدروجيني pH الأمثل والثباتية لدرجات pH: يوضح الشكل رقم (1) الفعالية الأنزيمية للاكيز على مدى قيم pH مختلفة، وتشير النتائج إلى زيادة الفعالية مع زيادة درجات pH حتى درجة pH 7 وهي الدرجة المثلى لعمل الأنزيم، ويلاحظ انخفاض الفعالية بعدها بشكل تدريجي، تتفق هذه النتيجة مع العديد من الدراسات التي تناولت اللاكيز النباتي، حيث أثبتت الدراسات أن درجة pH الأمثل لأنزيم اللاكيز ذو المصدر النباتي متعادلة أو قاعدية، بينما يملك اللاكيز ذو المصدر الفطري درجات pH أمثل حامضية، يمكن تفسير ذلك بأن الفطر ينمو تحت ظروف حامضية في حين أن الأنزيمات ذات المصدر النباتي تكون خصائصها أقرب إلى النطاق الفيسيولوجي المتعادل، وعلى سبيل المثال كانت درجة pH الأمثل لعمل الأنزيم اللاكيز المنقى من نبات القيقب الدلبي الكاذب *Acer pseudoplatanus* المعروف باسم (Sycamore) 6.6 وذلك باستخدام مادة الكاتيكول catechol كركيزة (Bligny and Dollce, 1983)، في حين بلغت 10 لأنزيم اللاكيز المنقى من نبات الصبار الهندي *Opuntia vulgaris* باستخدام مادة 2،6 دايميثوكسي فينول2,6 Dimethoxy Phenol كركيزة (Kumar and Srikumar, 2011)، كما بلغت درجة pH الأمثل لعمل اللاكيز المستخرج من لاتيكس latex نباتي السماق *Rhus succedanea* و *Rhus vernicifera* 6.4 و7.5 على التوالي وذلك باستخدام مادة الهيدروكينون كركيزة (Omura, 1961)، وكانت درجة pH الأمثل 8 لعمل أنزيم اللاكيز المستخرج من نبات البابايا (Jaiswal *et al.*, 2015)، و7 لعمل أنزيم اللاكيز المنقى من أوراق نبات اللوسيينيا (Jaiswal *et al.*, 2014) باستخدام مادة الكاتيكول كركيزة لكلا الأنزيمين، بينما كانت درجة pH الأمثل لعمل الأنزيم المستخرج من فطر *Trametes polyzona* 4.5(Nnamchi *et al.*, 2019)، وبالنسبة للأنزيم المستخرج من فطر *Pleurotus pulmonarius* فقد بلغت درجة pH المثلى لعمله ضمن مجال (4.5- 5) (Contato *et al.*, 2020)، وكانت 4.5 للأنزيم المستخرج من فطر *Alternaria altenata* (Thakkar and Bhatt, 2020)، ولابد من الإشارة إلى

وجود بعض الاستثناءات لبعض الأنزيمات المعزولة من الفطريات والبكتريا فمثلاً كانت درجة pH الأمثل لعمل الأنزيم المنقى من فطر *Myrothecium verrucaria* 9 (Sulistyaningdyah *et al*., 2004)، و9.4 للأنزيم المنقى من بكتريا *Streptomyces coelicolor* (Machczynski *et al*., 2004)، و8 للأنزيم المنقى من البكتيريا الخيطية *Thermobifida fusca* (Chen *et al*., 2013).



الشكل رقم (1) درجة pH المثلى لعمل أنزيم اللاكيز المستخلص والمنقى من نبات إكليل الجبل

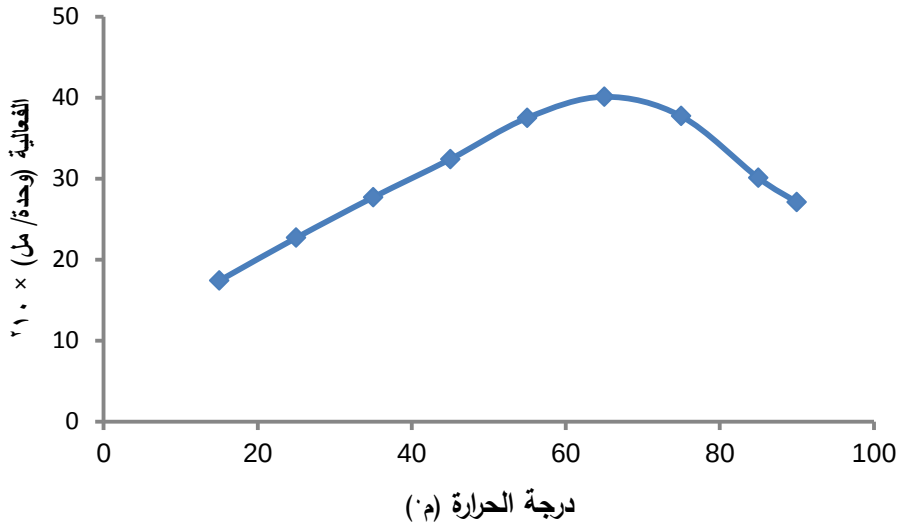
وفي ما يخص الثباتية لدرجات pH فقد وجد أن الأنزيم المدروس قد حافظ على أكثر من 92% من فعاليته بعد التحضين على درجات pH متفاوتة بين (6- 9) مدة 24 ساعة كما هو واضح في الشكل رقم (2)، كما حافظ الأنزيم المستخرج من نبات اللوسينيا على أكثر من 80% من فعاليته بعد التحضين مدة 24 ساعة على قيم pH (6- 9) (Jaiswal *et al*., 2014)، في حين حافظ الأنزيم المستخرج من نبات البابايا على أكثر من 75% من فعاليته بعد التحضين مدة يوم في مجال درجات pH بين (6.5- 9) (Jaiswal *et al*., 2015)، بينما لم يتبقى أكثر من 60% من فعالية الأنزيم المعزول من فطر *Pleurotus pulmonarius* بعد التحضين على درجة pH 5 مدة 24 ساعة (Contato *et al*., 2020).



الشكل رقم (2) ثباتية أنزيم اللاكيز المستخلص والمنقى من نبات إكليل الجبل لدرجات pH مختلفة

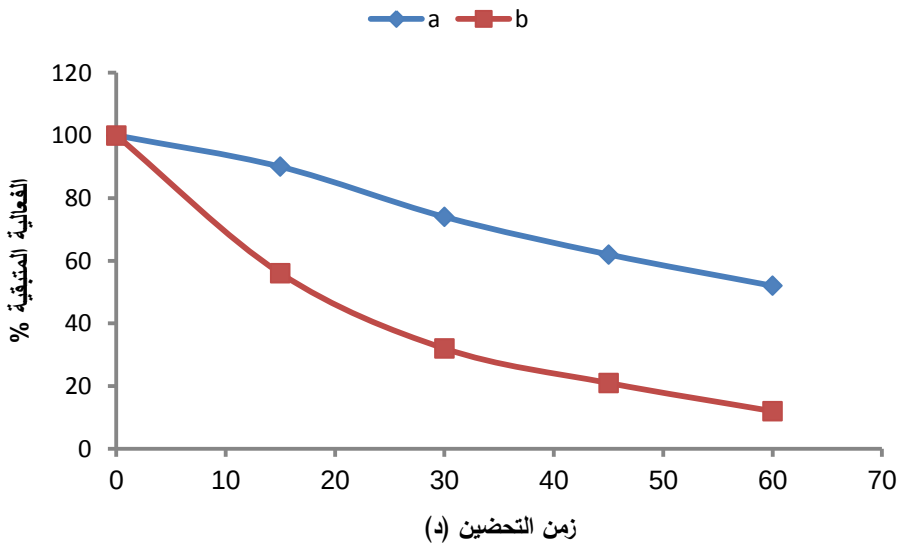
يمكن الاستدلال من النتائج السابقة أن للأنزيم مدى ثبات واسع في مجال قيم pH (6 – 9)، إذ يمكن خزنه ضمن هذا المدى مع ضمان حفاظه بفعالية جيدة، يمكن تفسير الاختلافات السابقة بناءً على تأثير حموضة الوسط في تركيب بروتين الأنزيم من خلال التغيرات التي تحدث في الحالة الأيونية لسلاسل الأحماض الامينية المكونة لجزيئة الأنزيم والضرورية للحفاظ على تركيبه ثلاثي الأبعاد وبالتالي شكل الموقع الفعال، كما أنه من الممكن أن تؤثر حموضة الوسط في الحالة الأيونية لمادة التفاعل أو لمعقد الأنزيم ومادة التفاعل أيضاً، وبالتالي التأثير على الفعالية ضمن الأوساط المختلفة (Ali *et al.*, 2020).

–**الحرارة المثلى والثبات الحراري للأنزيم:** يعبر الشكل رقم (3) عن تأثير درجة الحرارة على فعالية الأنزيم، ويتبين زيادة الفعالية بزيادة درجات الحرارة حتى (65 م°) وتعتبر درجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم، وهذا يعود إلى التأثير الايجابي للحرارة حتى حد معين بحسب معادلة Arrhenius حيث تمنح الحرارة جزيئات الانزيم طاقة حركية أي زيادة فرص التصادم بينها وبين الركيزة، وبالتالي زيادة معدل التفاعل، ثم تنخفض بعد هذا الحد بسبب تأثير درجات الحرارة الأعلى في تحطم الروابط الهيدروجينية والأيونية في تركيب الأنزيم والتي تحافظ على موقعه الفعال، وهذا بالتالي يفسر انخفاض الفعالية للاكيز المدروس عند إجراء التفاعل على درجات حرارة أعلى من (65 م°)، كما تؤدي زيادة درجات الحرارة العالية إلى حدوث تغير طبيعة الأنزيم Denaturation وبالتالي فقدان الفعالية بشكل (Miyanaga and Unno, 2011)، تبين النتيجة السابقة أن الأنزيم محب للحرارة وعموماً تصنف الأنزيمات المستخلصة من النباتات بأنها محبة للحرارة ومتحملة لها، بلغت درجة الحرارة المثلى (80 م°) لأنزيم اللاكيز المستخلص من نبات الصبار الهندي (التين الشوكي) *O.vulgaris* للنظير ذي الوزن الجزيئي 137 KD و(70 م°) للنظير ذي الوزن الجزيئي 90 KD (Kumar and Srikumar, 2011)، كما بلغت (70 م°) للأنزيم المستخلص من أوراق نبات البابايا (Jaiswal *et al.*, 2015)، في حين كانت (80 م°) للاكيز المستخرج من أوراق نبات اللوسينيا (Jaiswal *et al.*, 2014).



الشكل رقم (2) درجة الحرارة المثلى لعمل أنزيم اللاكيز المستخلص والمنقى من نبات إكليل الجبل

بينما بلغت درجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم المنقى من فطر *Aspergillus sp* (34 م°) (Sayyed *et al.*, 2020)، و(55 م°) للأنزيم المعزول من فطر *Trametes polyzona* (Nnamchi *et al.*, 2019)، و(30 م°) للاكيز المستخرج من فطر *Alternaria atteranta* (Thakkar and Bhatt, 2020)، إضافة إلى ذلك فقد كان لأنزيم الاكيز المعزول من بعض الميكروبات درجات حرارة مثلى عالية حيث بلغت (80 م°) للأنزيم المعزول من فطر *Marasmius quercophilus* (Farnet *et al.*, 2002)، وبالنسبة للثباتية الحرارية يوضح الشكل رقم (4) أن الأنزيم المدروس حافظ على 12% و55% من فعاليته بعد تحضينه مدة ساعة على درجتي الحرارة (75 و85) م° على التوالي، بينما فقد الأنزيم المستخرج من نبات البابايا (25، 18، 47، 100)% من فعاليته بعد التحضين مدة ساعة على درجات الحرارة (50، 60، 70، 80) م°على التوالي (Jaiswal *et al.*, 2015).



الشكل رقم (4) الثبات الحراري للاكيز المستخلص والمنقى من نبات إكليل الجبل (a: درجة الحرارة 75 م°، b: درجة الحرارة 85 م°)

في حين فقد الأنزيم المعزول من فطر *Pleurotus ostreatus* كامل فعاليته بعد تحضينه على درجة حرارة (50 م°) مدة 10 دقيقة (Patel *et al*., 2014)، أيضاً فقد الأنزيم المعزول من فطر *Fomitella fraxinea* فعاليته بشكل كامل بعد التحضين مدة ساعة على درجة حرارة (80 م°) (Park and Park, 2008)، بينما فقد اللاكيز المعزول من فطر *Peniophora lycii* نصف فعاليته بعد تحضينه على درجة حرارة (60 م°) مدة 20 دقيقة (Glazunova *et al*., 2020)، يعود هذا الاختلاف بدرجة بالحرارة المثلى وثباتية الحرارة إلى الاختلاف بمصدر الأنزيم والاختلاف في عدد الروابط ثنائية السلفيد di sulphide الموجودة في بناء الأنزيم حيث تزداد ثباتية الأنزيم الحرارية بزيادة هذه الروابط (Xu *et al*., 1996)، ولابد من الإشارة إلى أن اللاكيز ذو المصدر النباتي يحوي جزء كربوهيدراتي أكبر من اللاكيز ذو المصدر الفطري ولهذا الجزء دور هام في زيادة مقاومة وثباتية الأنزيم للحرارة (Xu, 1999).

الاستنتاجات والتوصيات:

1- تمت تنقية أنزيم اللاكيز من أوراق نبات إكليل الجبل باستخدام ثلاث خطوات للتنقية، بلغت الفعالية النوعية للأنزيم المدروس 44.54 وحدة / مغ وبحصيلة إنتاجية 54.14%.

2- كانت درجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم 65 م° ودرجة pH الأمثل 7، كما تميز الأنزيم بالثباتية للحرارة ولدرجات pH (6 – 9).

3- لنتائج هذه الدراسة أهمية من ناحية الغرض البحثي الأساسي من جهة وإمكانية طرح الأنزيم للتطبيقات الصناعية من جهة اخرى، حيث أن خواص الأنزيم السابقة إضافة للركائز التي يعمل عليها الأنزيم تجعله مهماً في التطبيقات الصناعية المختلفة في مجالات عدة كالتلوث البيئي وصناعة الأغذية والصناعات الصيدلانية وغيرها. 4- يقترح دراسة الخواص الحركية والجزيئية للأنزيم إضافة إلى دراسة إضافته وتطبيقه في كافة المجالات الممكنة ومقارنة تأثيره مع تأثير أنزيمات اللاكيز المعزولة من مصادر اخرى.

References:

1- ALI, E., ABD ELLATIF, S., ELSAYED, S., ABDEL RAZIK, A. *Production, Purification, Characterization and Immobilization of Laccase from Phoma betae and its Application in Synthetic Dyes Decolorization*. Egypt. J. Bot, 2020, 60 (1), 301-312.

2- ARORA, ARD.S., SHARMA, R.K. *Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications*. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 160,1760–1788. DOI 10.1007/s12010-009-8676-y.

3- BLIGNY, R., and DOUCE, R. *Excretion of laccase by sycamore (Acerpseudoplatanus L.) cells Purification and properties of the enzyme*. Biochem. J, 1983, 209, 489-496.

4- CHEN, C.Y., HUANG, Y.C., WEI, C.M., MENG, M., LIU, W.H., YANG, C.H. *Properties of thenewly isolated extracellular thermo-alkali-stable laccase from thermophilicactinomycetes, Thermobifida fusca and its application in dye intermediates oxi-dation*. AMB Express, 2013,3 (49), 1-9.

5- CHRISTOPHER , L.P., YAO, B., JI, Y. *Lignin biodegradation with laccase-mediator systems*. Frontiers in Energy Research, 2014, 2 (12), 1-13. doi: 10.3389/fenrg.2014.00012.

6- CLAUS, H. *Laccases: structure, reactions, distribution*. Micron, 2004, 35, 93–96.

7- CONTATO, A.G., INÁCIO, F.D., BRUGNARI,T., ARAÚJO, C.A., MACIE, G.M., HAMINIUK, CH., PERALTA, R.M., MARQUES DE SOUZA, C.G. *Solid-state fermentation with orange waste: optimization of Laccase production from Pleurotus pulmonarius CCB-20 and decolorization of synthetic dyes.* Acta Scientiarum. Biological Sciences, 2020, 42,1-9.
8- DWIVEDI, U.N., SINGH, P., PANDEY, V.P., KUMAR, A. *Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 68, 117–128.
9- FARNET, A.M., CRIQUET, S., POCACHARD, E., GIL, G., FERRE, E. *Purification of a new isoformof laccase from a Marasmius quercophilus strain isolated from a cork oak litter(Quercus suber L.).* Mycologia, 2002,94 (5),735–740.
10- GIANFREDA , L., XU, F., BOLLAG, J. *Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes*. BioremedIation Journal, 2013, 3 (1), 1-26. DOI: 10.1080/10889869991219163.
11- GLAZUNOVA, O.A., MOISEENKO, K.V., SAVINOVA, O.S., FEDOROVA, T.V. *Purification and Characterization of Two Novel Laccases from Peniophora lycii*. J. Fungi, 2020, 6 (340), 1-16. doi:10.3390/jof6040340. 1-16.
12- HARVEY, B. 1997. Higher Plants.Thesis of Masters of Science in Biochemistry. University of Canterbury.
13- JAISWAL, N., PANDEY, V.P., DWIVEDI, U.N. *Purification of a thermostable alkaline laccase from papaya (Carica papaya) using affinity chromatography.* Int. J. Biol. Macromol, 2015, 1-32. DOI: http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.032.
14- JAISWAL, N., PANDEY, V.P., DWIVEDI, U.N. *Purification of a thermostable laccase from Leucaena leucocephalausing a copper alginate entrapment approach and the applicationof the laccase in dye decolorization*. Process Biochemistry, 2014, 1-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.002.
15- JANUSZ, G., PAWLIK, A., SWIDERSKA-BUREK, U., POLAK , J., SULEJ, J., JAROSZ-WILKOŁAZKA, A., PASZCZYNSKI , A. *Laccase Properties, Physiological Functions and Evolution.* Int. J. Mol. Sci, 2020, 21(966), 1-25. doi:10.3390/ijms21030966.
16- KUMAR, G.N., SRIKUMAR, K. Thermophilic *Laccase from xerophyte species Opuntia vulgaris*. Biomed. Chromatogr, 2011, 25: 707–711.
17- KUNAMNENI, A., BALLESTEROS, A., Plou, F.J., Alcalde, M. *Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications*. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A. Méndez-Vilas (Ed.), 2007, 233-245.
18- LAFAYETTE, P.R., ERIKSSON, K.L., DEAN, J.F.D. *Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (Liriodendron tulipifera)*. Plant Molecular Biology, 1999, 40, 23–35, 1999.
19- LLEVOT, A., GRAU, E., CARLOTTI, S., GRELIER, S., CRAMAIL, H. Selective *laccase-catalyzed dimerization of phenolic compounds derived from lignin: Towards original symmetrical bio-based (bis) aromatic monomers.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2015,DOI: http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.molcatb.2015.12.006.
20- LOWRY,O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem, 1951, 193,265-275.
21- MACHCZYNSKI, M.C., VIJGENBOOM, E., SAMYN, B., CANTERS, G.W. *Characterization of SLAC: a small laccase from Streptomyces coelicolor with unprecedented activity*.Protein Sci, 2004,13 (9), 2388–2397.

22- MATIJOSYTE, I., ISABEL, W.C.E.A., SIMON, D.E., ROGER, A.S. *Preparation and use of cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases*. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2010, 62, 142-148.
23- MAYER, A.M., STAPLES, R.C. *Laccase: new functions for an old enzyme*. Phytochemistry, 2002, 60, 551–565.
24- MESSERSCHMIDT, A., HUBER, R. *The Blue Oxidases, Ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin Modelling and structural relationships.* Eur. J. Biochem, 1990,187, 341 -352.
25- MIYANAGA, K., UNNO,H. Reaction Kinetics and Stoichiometry. Elsevier B.V. All rights reserved ,Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan, 2011, 33-46.
26- MORENO, A. D., IBARRA, D., Eugeniob. M.E., Tomás-Pejó, E. *Laccases as versatile enzymes: fromindustrial uses to novel applications.* Chem Technol Biotechnol, 2020, 95, 481–494. DOI 10.1002/jctb.6224 .
27- NNAMCHI, C.I., EZEOFOR, G.A., Amadi, C.O. *Preliminary Production and Partial Purification of Laccase from a White Rot Fungus and Its Application in Dye Degradation*. Biotechnology Journal International, 2019, 23(4), 1-9.
28- OMURA, T. *Studies on Laccases of Lacquer Trees I. Comparison of Laccases Obtained from Rhus vernicifera and Rhus succedanea.* The Journal of Biochemistry, 1961, 50 (3), 264-272.
29- PARK, K.M., PARK, S. Purification and Characterization of Laccase from Basidiomycete Fomitella Fraxinea. J. Microbiol. Biotechnol, 2008,18(4), 670–675.
30- PATEL, H., GUPTE,S., GAHLOUT, M., GUPTE, A. *Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of Pleurotus ostreatus HP-1*. 3 Biotech, 2014, 4 (1), 77-84. doi: 10.1007/s13205-013-0129-1.
31- RIVA, S. *Laccases: blue enzymes for green Chemistry*. Trends in Biotechnology, 2006, 24 (5),219-226.
32- SAYYED, R.Z., BHAMARE, H.M., SAPNA., MARRAIKI, N., ELGORBAN, A.M., SYED, A., EL-ENSHASY, H.A., DAILIN, D.J. *Tree bark scrape fungus: A potential source of laccase for application in bioremediation of non-textile dyes*. PLOS ONE, 2020, 1-17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229968.
33- SENTHIVELAN, T., KANAGARAJ, J., PANDA, R. C., NARAYANI, T. *Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from Penicillium chrysogenum: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD).* Biotechnology Reports, 2019, 23, 1-15. https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00344.
34- SHRADDHA., SHEKHER, R., SEHGAL, S., KAMTHANIA, M., KUMAR, A. Laccase:Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. Enzyme Research, 2011, 1-11. doi:10.4061/2011/217861, 2-11.
35- SONDHI, S., SAINI, K. *Response surface based optimization of laccase production from Bacillus sp MSK-01 using fruit juice waste as an effective substrate*. Heliyon, 2019, 5, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01718.
36- SULISTYANINGDYAH,W.T., OGAWA, J., TANAKA, H., MAEDA, C., SHIMIZU, S. *Characteriza-tion of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of Myrotheciumverrucaria 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase.* FEMS Microbiol Lett, 2004, 230 (2), 209–214.
37- SWETHA, CH., SHIVAPRASAD, P. V. *Extraction and Purification of Laccases from Rice Stems.* Bio-protocol, 2019, 9 (07), 1-8. DOI:10.21769/BioProtoc.3208.
38- TELKE, A.A., KAGALKAR , A.N., JAGTAP, U.B., DESAI, N.S., BAPAT, V.A., GOVINDWAR, S.P. *Biochemical characterization of laccase from hairy root culture of*

Brassica juncea L. and role of redox mediators to enhance its potential for the decolorization of textile dyes. Planta, 2011, 234, 1137–1149. DOI 10.1007/s00425-011-1469-x.
39- THAKKAR, A.T., BHATT, S.A. *Isolation, identification and optimization of laccase from Alternaria alternate*. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 2020, 8(03), 64-69.
40- WANG, G., LI, Q., LUO, B., CHEN, X. Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. Nature Biotechnology, 2004, 22 (7), 893-879.
41- XU, F., SHIN, W., BROWN, S.H., WAHLEITHNER, J.A., SUNDARAM, U.M., SOLOMON, E.I. *A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability*. Biochem. Biophys. Acta, 1996, 1292, 303- 311.
42- XU, F. *The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*, in: M.C. Flickinger, S.W. Drew (Eds.), Wiley, New York, 1999, pp. 1545-1554.