تثبيط انزيم البولي فينول اوكسيديز المستخلص من بعض النباتات باستعمال بعض الزيوت العطرية الفعالة حيويا

Inhibition of polyphenol oxidase enzyme extracted from some plants using some bioactive essential oils

إعداد

وسن كاظم عبد الرزاق بتول محمود الانصاري

Batool Mahmood Alansari Wasan K. A. Al-Temimi

صلاح ناجي عزيز

Salah N. Aziz

قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة – جامعة البصرة ، البصرة – العراق

Doi: 10.21608/asajs.2023.279326

استلام البحث : ٢ / ١٠ /٢٠٢٢

قبول النشـر : ١٦ / ١١ / ٢٠٢٢

عبد الرزاق ، وسن كاظم والانصاري، بتول محمود وعزيز، صلاح ناجي (٢٠٢٣). تثبيط انزيم البولي فينول اوكسيديز المستخلص من بعض النباتات باستعمال بعض الزيوت العطرية الفعالة حيويا. ***المجلة العربية للعلوم الزراعية***، المؤسسة العربية للتربية والعلوم والآداب، مصر، ٦(١٧) يناير ، ٧٩- ١٠٢.

http://asajs.journals.ekb.eg

تثبيط انزيم البولي فينول اوكسيديز المستخلص من بعض النباتات باستعمال بعض الزيوت العطرية الفعالة حيويا

المستخلص:

يعد التلون البني الانزيمي احد اهم المشاكل التي يعاني منها منتجوا الغذاء ، اذ سبب لهم خسائر مالية جمة وصلت الى ملايين الدولارت سنويا ، من هنا دعت الحاجة لايجاد سبل فعالة وامنة في الحد من التلف وتقليل الخسائر الخسائر على ان لاتؤثر على صحة المستهلك. اجريت الدراسة الحالية باختبار قدرة بعض الزيوت العطرية ذات الفعالية الحيوية تمثلت زيت ورق الشاي الاخضرGreen Tea وزيت قشور الليمون Limon Peel وزيت جوز الطيب Nutmeg بالتراكيز (٥٠ و ١٠٠ و ١٥٠) ملي مولار وبمدة حضن تراوحت (٠-٦٠) دقيقة في خفض فعالية انزيم PPO المستخلص من الموز والباقلاء والتفاح وورق الريحان و الكمثرى . أظهرت المستخلصات أعلاه فعالية انزيمية بلغت (٤٨٨.٧٧ و ٤٥٨.٣٣ و ٤٣٩.١٧ و ٣٨١.١٥ و ٣٧٧.٩١) وحدة . مل$^{-1}$ على التوالي . من خلال إضافة الزيوت العطرية بالتراكيز أعلاه الى المستخلصات الانزيمية مع زيادة مدة الحضن لوحظ وجود فروق عالية المعنوية عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$ بين نوع الزيت والتركيز والوقت في خفض فعالية الانزيم . اذ اظهر التركيز ١٥٠ ملي مولار تفوقا واضحا في خفض فعالية انزيم PPO المستخلص ، اذ بلغت (٤٥.٣٣ و ٩٠.٦ و ٩٥.٢٢ و ٨٣.٣٢ و ٩٨.٨١) وحدة .مل$^{-1}$ وبنسبة مئوية تثبيطية بلغت (١١.١ و ١٩.٧ و ٢١.٦ و ٢١.٨ و ٢٦.١)% للمستخلصات الانزيمية أعلاه على التوالي . في حين اظهر حامض الاسكوربيك القياسي عند التركيز ١٠٠ ملي مولار نسبة مئوية تثبيطية بلغت (٨.٣ و ١٤.٣ و ٨.٧ و ١٤.٦ و ١٢.٠٢)% للمستخلصات الانزيمية أعلاه على التوالي . كما قيم تاثير الزيت العطري لجوز الطيب في خفض فعالية انزيم PPO لقلة الدراسات عليه ، اذ اظهر الزيت العطري نتائج واعدة في خفض فعالية الانزيم .

كلمات مفتاحية : Polyphenol Oxidase enzyme ، زيت الشاي الأخضر العطري ، زيت قشور الليمون العطري ، زيت جوز الطيب العطري ، المركبات الفينولية

Abstract:

The enzymatic browning is one of the most critical problems that food producers, as it causes huge financial losses amounting to millions of dollars annually. Hence, the need to find effective and safe ways to reduce spoilage and losses provided that they do not effect on consumers' health. The current study was

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

conducted to test the ability of some essential oils, green tea leaf essential oil, lemon peel essential oil, and Nutmeg essential oil, at concentrations of (50, 100, and 150) mmol with an incubation period (0-6) min., to reduce the activity of the PPO enzyme. Extracted from bananas, beans, apples, basil leaves, and pears. The extracts showed enzymatic activity of (488.77, 458.33, 439.17, 381.15, and 377.91) units. ml-1, respectively. Through the addition of essential oils to the enzyme extracts with an increase in the incubation time, it was observed that there were highly significant differences at P≤0.05 between the type of essential oil, concentration, and time in reducing the activity of the enzyme. The concentration of 150 mmol showed a clear superiority in reducing the effectiveness of the extracted PPO enzyme, reaching (45.33, 90.6, 95.22, 83.32, and 98.81) units.mL-1, with an inhibition percentage of (11.1, 19.7, 21.6, 21.8, and 26.1%) for the extracts. enzyme respectively. While the standard ascorbic acid at a concentration of 100 mmol showed an inhibition percentage of (8.3, 14.3, 0.8.7, 0.14.6, and 12.02)% for the enzymatic extracts, respectively. It also evaluated the effect of nutmeg essential oil in reducing the activity of the PPO enzyme due to the lack of studies on it, as the essential oil showed promising results in reducing the activity of the enzyme.

Keyword: Polyphenol Oxidase, Green Tea Essential Oil, Limon Peel Essential Oil, Nutmeg Essential Oil, Phenolic compounds

المقدمة:

تعد الفواكه والخضر احد المصادر الغذائية المهمة للإنسان لاحتوائها على العديد من العناصر المعدنية والفيتامينات والمركبات التي تمد الجسم بالطاقة ، فضلا عن دورها في تقليل مخاطر الإصابة بالأمراض (Anderson *etal.*, 2010).

هنالك عدد من السمات يعتمدها المستهلك لاختياره المادة الغذائية ، الا ان ابرزها المظهر واللون ، التي تتكون نتيجة الاصباغ الطبيعية او نتيجة التفاعلات الانزيمية اللونية كما في الاسمرار البني. يحصل الاسمرار البني للفواكه والخضر نتيجة لأنزيم

Polyphenol Oxidase، هذا التلون قد يكون مرغوبا به لتعزيز النكهة في الغذاء كما في الشاي والقهوة ، لكن في الغالب غير مقبول لدى المستهلك نتيجة لتأثر المظهر والنكهة والقيمة الغذائية للفواكه والخضر (Escobar *et al*., 2008).

حظي التلون البني باهتمام العديد من الباحثين لأهميته في التصنيع الغذائي والبستنة والفسلجة وغيرها، اذ يحصل التلون عند تعرض الفواكه والخضر الى الضرر الميكانيكي او القطع مما يؤدي الى حصول الاكسدة للمركبات الفينولية بوجود الاوكسجين مؤديا الى تكون اللون البني او الأحمر او الأسود (Delgado, 2021)

Polyphenol Oxidase (EC 1.14.18.1) انزيم معدني يحتوي على النحاس يتواجد في اغلب الكائنات الحية ، عادتا ما يرتبط بالعمر الخزني والاستجابة الدفاعية للنبات ، اذ يستعمل كدلالة لتقييم جودة العينات (Araji *et al*., 2014 و Lee *etal*., 2020) . تكمن الية عمل الانزيم على اكسدة Monopolyphenol الموجودة في النباتات مثل حامض الكلوروجينيك وحامض الكافيين والكاتيكول بوجود الاوكسجين الى مركبات O-diphenols ثم الى مركب O-quinones ، نتيجة لتفاعلها مع بعضها البعض او مع البروتينات المحيطة وهي تفاعلات غير انزيمية يسبب تراكم الميلانين مؤديا الى تكوين اللون البني او الأحمر او الأسود في الفواكه او الخضر ، اذ يعتمد شدة اللون على تركيز المادة الخاضعة المتمثلة بالمركبات الفينولية (Oms-Oliu *etal*., 2010 و Araji *et al*., 2014).

طورت عدد من التقنيات على مر السنين للتحكم بالاسمرار البني ، اذ لوحظ ان معظم المثبطات الاصطناعية او الكيميائية عبارة عن مركبات سامة يمكن ان تتفاعل مع المكونات الخلوية مسببة السمية للمستهلك (Weerawardana *etal*., 2020) . بناءا على ما تقدم ولارتباط الفواكه والخضر في الحياة اليومية للمستهلك ولاطالة العمر الخزني لها ولاستعمال تقنيات تتوافق مع صحة المستهلك ـ لذا أجريت هذه الدراسة .

اهداف البحث

لذا هدفت هذه الدراسة الى استخلاص انزيم البولي فينول اوكسيديز Polyphenol Oxidase من الموز والتفاح والكمثرى والباقلاء وورق الريحان وقياس فعاليته الانزيمية ، ثم تحديد التركيز الأمثل للزيوت النباتية الطيارة زيت الشاي الأخضر وزيت قشور الليمون وزيت جوز الطيب عند التراكيز (٥٠ و ١٠٠ و ١٥٠)ملي مولار في تثبيط نشاط انزيم البولي فينول اوكسيديز عند مدد حضن مختلفة .

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

المواد وطرائق العمل:

المادة الاولية

استعملت في هذه الدراسة خمسة انواع من المصادر النباتية شملت (الموز Banana والتفاح الأصفر Apple والكمثرى Pear والباقلاء Bean واوراق الريحان Basil Leave) . اجريت الدراسة في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة. تم اختيار الثمار الجيدة الناضجة الخالية من الاصابات المرضية والحشرية والميكانيكية ثم نظفت وغسلت وازيلت بقايا الاوساخ والمبيدات ألكيميائية التي تم شرائها من الاسواق المحلية لمحافظة البصرة ، أزيلت قشور الموز والكمثرى و قرنات الباقلاء وثمار التفاح الاصفر المحلي وقطعت إلى شرائح صغيره بسمك ١.٥ سم لغرض استخلاص الانزيم .

الزيوت العطرية

اخذت مجموعة من النباتات من الاسواق المحلية لمحافظة البصرة – العراق ، شملت (أوراق الشاي الأخضر Green Tea وقشور الليمون Limon Peel وثمرة جوز الطيب Nutmeg) وبعد ان نظفت وغسلت بصورة جيدة استخلصت الزيوت العطرية من النباتات اعلاه كلا على حدة ، وحسب الطريقة Ultrasound Clevenger المبينة في (Pingnet *etal*., 2015)

استخلاص انزيم بولي فينول اوكسيديز

اتبعت طريقة Zhang and Shao (2015) مع اجراء بعض التحويرات البسيطة ، خلط 100غم من الخضر وثمار الفاكهة المذكورة اعلاه كلا على حد مع ٥٠٠ مل من محلول فوسفات الصوديوم بتركيز ٠.١ مولاري يحتوي على ١% Polyvinyl-polypyrrolidoe (PVP) في الخلاط الكهربائي لمدة ٢ دقيقة لحين الحصول على خليط متجانس ، رشح المحلول باستعمال قطعة قماش الجبن cloth cheese بعدة طبقات ، أجريت عملية الطرد المركزي بسرعة ١٠٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٢٠ دقيقه بدرجة حرارة ٤°م أهمل الراسب واخذ الراشح ، ثم قدرت الفعالية الانزيمية للمستخلصات النباتية .

تقدير الفعالية الانزيمية للمستخلص الانزيمي للبولي فينول اوكسيديز

قدرت الفعالية الانزيمية للبولي فينول اوكسيديز Polyphenol Oxidase (PPO) حسب الطريقة المتبعة في Mercimek *etal.* (2015) مع اجراء بعض التحويرات البسيطة ، خلط ٢.٩ مل من المادة الخاضعة بتركيز ١٠ ملي مولاري كاتيكول المجهز من شركة Merck الالمانية (المحضر من المحلول الدارئ فوسفات الصوديوم ٠.١ مولاري برقم هيدروجيني ٦.٥) مع ٠.١ مل من المستخلص الانزيمي ، وضع الخليط في انابيب اختبار وحضن في الحمام المائي بدرجة ٢٥° م ولمدة ٥ دقائق . قيست الامتصاصية لمحلول التفاعل عند طول

موجي ٤٢٠ نـانوميتر بجهـاز المطيـاف الضـوئي (UV- Spectrophotometer Vis ، Apel 303 UV ، UK) ، اما عينة السيطرة فقد حضرت بالطريقة أعلاه دون اضافة المستخلص الانزيمي واستبدل بالماء المقطر ، تعرف الوحدة الانزيمية Enzyme Unit لانـزيم البـولي فينـول اوكسـديز بأنهـا كميـة الانـزيم التـي تسـبب التغير في الامتصاصية مقدارها٠.٠٠١ في الدقيقة الواحدة على طول موجي ٤٢٠ نانوميتر وتحت ظروف قياسية .

. حسبت الفعالية الانزيمية من المعادلة الاتية :-

الفعالية الانزيمية وحدة/ مل = التغير في الامتصاصية لكل(دقيقة) / وزن المستخلص الانزيمي (ملغم)

تقدير تركيز البروتين للمستخلص الانزيمي

اتبعت طريقة Bradford (1976) في تقدير تركيز البروتين ، أستعمال المنحني القياسي لبروتين الالبومين Bovine serum Albumin (BSA) .

تحضير تراكيز الزيوت العطرية

حضرت الزيوت العطرية المستخلصة من زيت قشور الليمون وزيت اوراق الشاي الاخضر وزيت جوز الطيب بالتراكيز (٥٠ و١٠٠ و١٥٠) ملي مولاري ، استعمل حامض الاسكوربك القياسي المجهز من شركة Sigma ، الانكليزية بتركيز ١٠٠ ملي مولاري كعينة مقارنة .

تحضير خليط التفاعل

اتبعت طريقة Mercimek *etal.* (2015) في تقدير قابلية الزيوت العطرية الفعالة حيويا في تثبيط فعالية المستخلص الانزيمي الخام PPO مع اجراء بعض التحويرات البسيطة . اذا حضر خليط التفاعل بأخذ ٠.١ مل من الزيت العطري لكل تركيز على حدة ولجميع انواع الزيوت العطرية المستخلصة مع ٠.١ مل من المستخلص الانزيمي الخام للفواكه والخضر كلا على حده مع اضافة ٢.٩ مل من المادة الخاضعة ، قيست الفعالية الانزيمية بالطرق الضوئية لمدد (٠ و١ و٢ و ٤ و ٦) دقيقة .

التحليل الاحصائي

أستعمل التصـميم العشوائي الكامل (CRD) Completely Randomized Design، تم إجراء التحليلات الإحصائية باستعمال البرنامج الإحصائي GenStat Release 12.1 (2009) . واختبرت النتائج عند مستوى احتمالية $P\leq 0.05$. كما تشير الاحرف في المرتسمات الى وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية $P\leq 0.05$.

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

النتائج والمناقشة :

تاثير الزيت العطري لاوراق الشاي الأخضر على فعالية انزيم (Polyphenol Oxidase (PPO

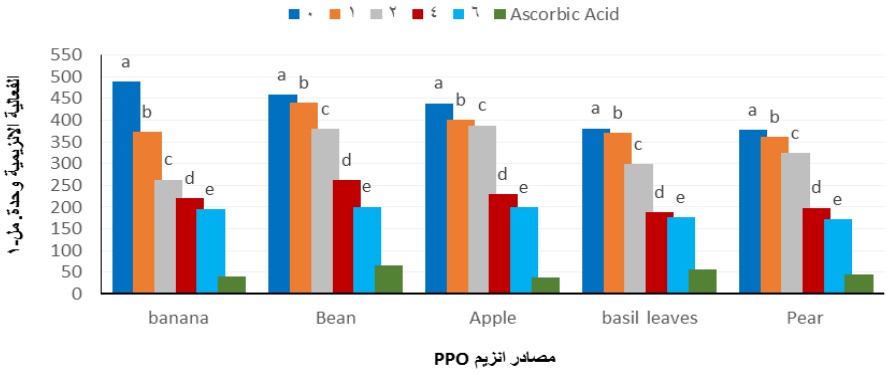
يظهر الشكل (١ و ٢ و ٣) تاثير زيت الشاي الاخضر بالتراكيز ٥٠ و ١٠٠ و ١٥٠ ملي مولار الى المستخلص الانزيمي لانزيم Polyphenol Oxidase (PPO) المتحصل عليه من Banana و Bean و Apple وBasil Leave و Pear عند معاملته للمدد الزمنية (٠و١ و٢و ٤ و٦) دقيقة ، وتم مقارنة النتائج مع معاملة انزيم PPO المستخلص من الفواكه والخضر بحامض الاسكوربيك بتركيز (١٠٠) ملي مولار . أظهرت النتائج ان اعلى فعالية انزيمية بلغت ٤٨٨.٧٧ وحدة.مل$^{-1}$ لمستخلص الموز يليه الباقلاء ثم التفاح بفعالية انزيمية بلغت (٤٥٨.٣٣ و ٤٣٩.١٧) وحدة.مل$^{-1}$ على التوالي ، في حين لوحظ اقل فعالية كانت ٣٧٧.٩١ وحدة.مل$^{-1}$ في ثمار Pear . لدراسة اجراها Kolodziejczyk *etal.*(2010) وجد ان فعالية انزيم PPO لاصناف من التفاح تراوحت ٥-٢٤٠ وحدة.غم$^{-1}$. في حين لاحظ Kaviya *etal.*(2021) ان اعلى فعالية لانزيم PPO كانت في مخلفات الموز . ووجد Aziz and Al-Saady (2016) ان اعلى فعالية لانزيم PPO كانت في ثمار الموز وقشوره و درنات الالمازة والتفاح والبطاطا بفعالية بلغت (١١٢٧ و ٩١١.٧ و ١٥٧ و ١٣٧ و ١١٢)وحدة.ملغم$^{-1}$ على التوالي . وقد يعزى السبب التفاوت في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO في المستخلصات قيد الدراسة الى التفاوت في تركيز المادة الخاضعة Substrate ونوعها ، فقد أشار Rocha (2009) ان شدة التفاعل تعتمد على مادة التفاعل وطبيعة المركبات الموجودة بالانسجة ، اذ تعد مركبات Catechin و Epicatechin و Chlorogenic Acid من اهم مواد التفاعل لانزيم PPO . كما بين Vamos Vigyazo (1981) و Roch (2001) ان Catechin و Epicatechin عوامل مؤكسدة سريعة مقارنة بحامض Chlorogenic Acid في تكوين اللون البني . ذكر Kolodziejczyk *etal.*(2010) ان Chlorogenic Acid مسؤول عن تكون اللون البني في التفاح لوجوده بتراكيز اعلى بعدة مرات من Catechin .

مع إضافة تراكيز من الزيت العطري ٥٠ و١٠٠ و١٥٠ ملي مولار لوحظ انخفاضا تدريجيا في الفعالية الانزيمية مع زيادة كل من تركيز الزيت المضاف ووقت المعاملة ، اذ بلغ اقصى انخفاض في فعالية PPO عند التركيز ١٥٠ملي مولار والمعاملة لمدة ٦ دقيقة لجميع الفواكه والخضر قيد الدراسة . كما لوحظ ان النسبة المئوية للفعالية المتبقية عند التركيز ٥٠ ملي مولار للمدة ٦ دقيقة تراوحت (٣٩.٩ – ٤٦.١) % اظهر فيها انزيم PPO لمستخلص الموز اقل نسبة مئوية تثبيطية . في حين اظهر التركيز ١٠٠ ملي مولار اقل نسبة مئوية متبقية لفعالية الانزيم في

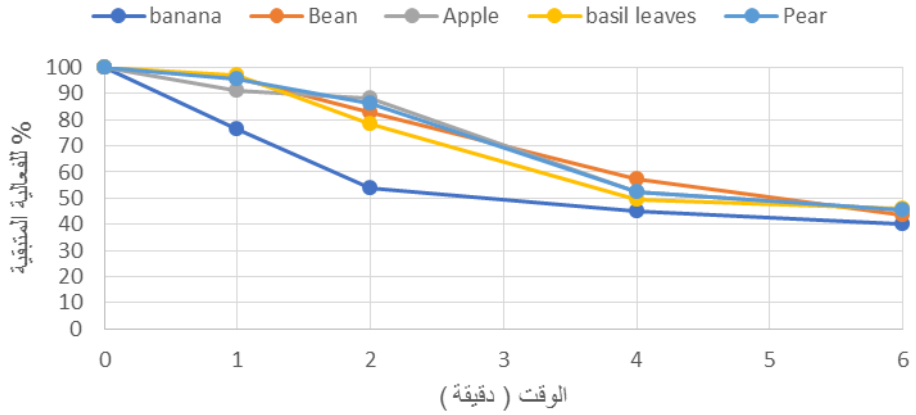
مستخلص Banana بلغت ٢١.٤% يليه Bean بنسبة ٢٦.٤% . اما التركيز ١٥٠ ملي مولار فقد اظهر أنخفاضا واضحا في النسبة المئوية لفعالية انزيم PPO لجميع الفواكه والخضر تفوق فيها مستخلص Banana بنسبة مئوية متبقية بلغت١١.١% ثم Bean ١٩.٧% . . وعند مقارنة النتائج أعلاه باضافة حامض الاسكوربيك الى المستخلصات الانزيمية للفواكه والخضر قيد الدراسة لوحظ انخفاضا ملحوظا في قيم الفعالية الانزيمية ، اذ بلغ اقصى انخفاض له في مستخلص Banana و Apple و Pear بنسبة مئوية متبقية (٨.٣ و ٨.٧ و ١٢.٠٢)% على التوالي .

قد يعزى سبب انخفاض الفعالية الانزيمية لانزيم PPO بإضافة الزيت العطري للشاي الأخضر الى احتواء الزيت على عدد من المركبات المهمة مثل Terpenes و n-Hexylcinnamaldehyed و D-Limonene التي ترتبط بالموقع الفعال للانزيم او تتنافس مع المادة الخاضعة Substrate للارتباط بالموقع الفعال للانزيم من خلال قوى Van der Waals او روابط هيدروجينية تؤدي الى تثبيط فعالية الانزيم ، او قد تسبب في إعاقة ارتباط الحامض الاميني His مع ايونات النحاس في الموقع الفعال للانزيم مسببه في تثبيطه . اذ أشار كل من Virador *etal.*(2009) و Teng *etal.* (2020) ان Eugenol يمنع ارتباط انزيم PPO مع المادة الخاضعة او يؤدي الى إعاقة ارتباط الحامض الاميني His مع ايونات النحاس في الموقع الفعال للانزيم مؤديا الى تثبيطه من خلال تكوين الروابط الهيدروجينية مع الاحماض الامينية او الارتباط بالموقع الفعال من خلال قوى Van der Waals و الكتروستاتيكية مما ينجم عنه تثبيط التفاعل بين ايونات النحاس والحامض الاميني His . كما وجد Perumal *etal.*(2021) ان الزيت العطري للشاي الأخضر يحتوي على المركبات n-Hexyl Cinnamaldehyed و α-Terpenes و D-Limonene بالتراكيز (١٥.٢١ و ١٠.٠٢ و ٨.٤٢)% التي تعد من المركبات المهمة في خفض نشاط انزيم PPO . فقد اكد Nakatsu *etal.*(2000) ان Terpenes الموجودة في الزيوت الطيارة أظهرت تثبيطا قويا في فعالية انزيم PPO ، اما مركب n-Hexyl Cinnamaldehyed وهو احد مركبات زيت Cinnamon الذي أدى الى تثبيط ٨٠-٩٠% من فعالية انزيم PPO المستخلص من Mushroom من خلال تقليل او منع تكون Orto-Quinons . في حين ذكر Sun (2007) ان مركب D-Limonene هو احد اكثر مركبات Terpenes شيوعا في الطبيعة .

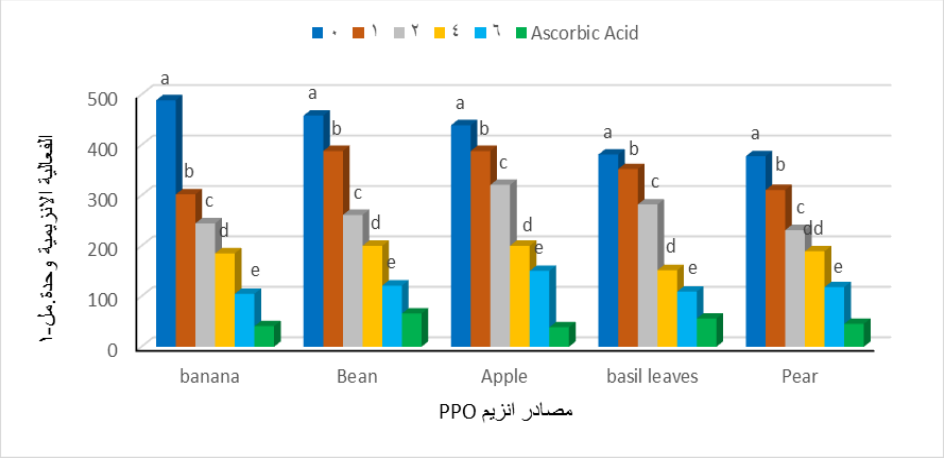
ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855



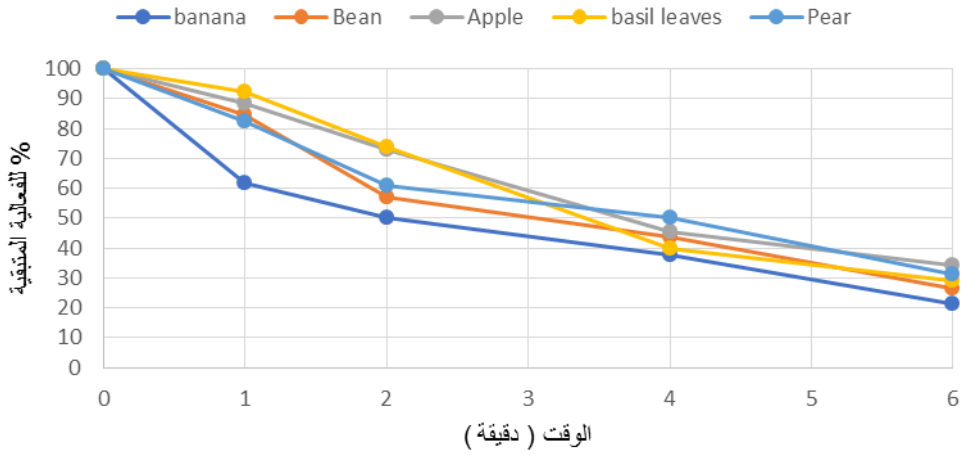
شكل (١): تاثير الزيت العطري للشاي الاخضر بتركز ٥٠ ملي مولار في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO عند مدد حضن مختلفة .



شكل (١.١): % الفعالية الانزيمية المتبقية لانزيم PPO بإضافة الزيت العطري للشاي الاخضر بتركز ٥٠ ملي مولار

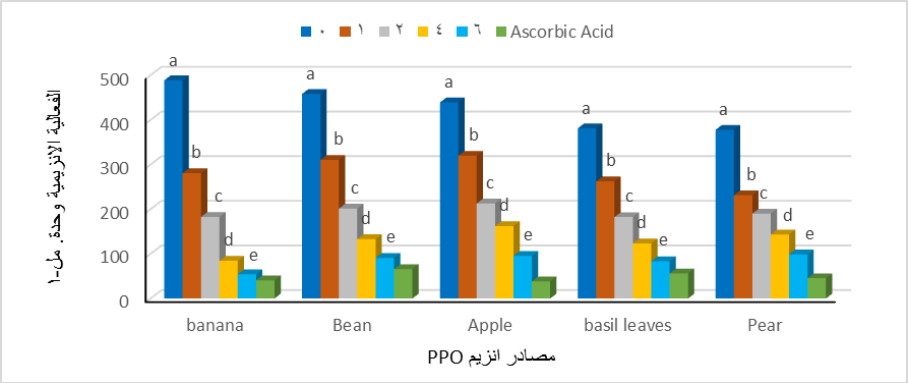


شكل (٢): تاثير الزيت العطري للشاي الاخضر بتركز 100 ملي مولار في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO عند مدد حضن مختلفة .

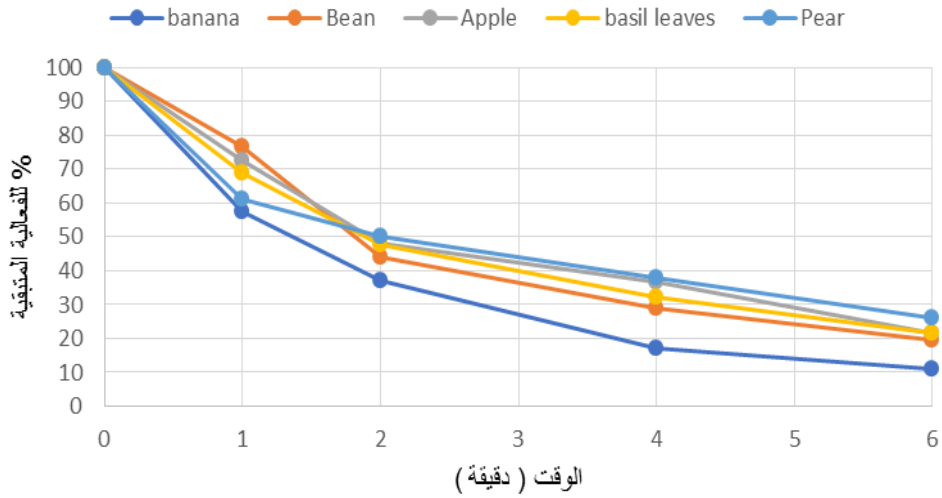


شكل (٢.٢): % للفعالية الانزيمية المتبقية لانزيم PPO بإضافة الزيت العطري للشاي الاخضر بتركز ١٠٠ ملي مولار

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855



شكل (٣): تاثير الزيت العطري للشاي الاخضر بتركز 150 ملي مولار في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO عند مدد حضن مختلفة .



شكل (٣.٣): % للفعالية الانزيمية المتبقية لانزيم PPO بإضافة الزيت العطري للشاي الاخضر بتركز 150 ملي مولار

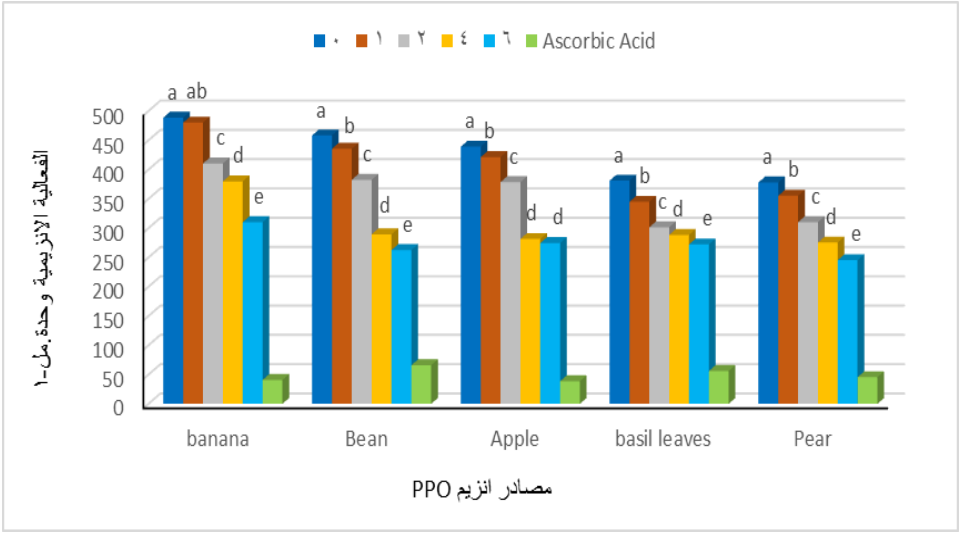
تاثير الزيت العطري لقشور الليمون على فعالية انزيم Polyphenol Oxidase (PPO)

يظهر الشكل (٤) و (٤.٤) تاثير إضافة الزيت العطري لقشور الليمون Limon Peel بتركيز ٥٠ ملي مولار للمستخلصات الانزيمية للفواكه والخضر قيد الدراسة ، عند ممد حضن (٠ و ١ و ٢و ٤ و ٦) دقيقة على التوالي . اذ لوحظ انخفاضا تدريجيا في قيم الفعالية مع وقت الحضن ، حيث أظهرت بلغ اقصى انخفاض في فعالية انزيم PPO عند مدة ٦ دقيقة ، اذ بلغت (٣١٠.١١ و ٢٦٢.٤٨ و ٢٧٤.٥٥ و ٢٧٢.١٥ و ٢٤٥.٢٩) وحدة.مل$^{-1}$ بنسبة تثبيط مئوية بلغت (٦٣.٤ و ٥٧.٢ و ٦٢.٥ و ٧١.٤ و ٦٤.٩)% للنباتات Banana و Bean و Apple و Basil Leave و Pear على التوالي . في حين أظهرت معاملة المستخلص الانزيمي للعينات بحامض الاسكوربيك القياسي بتركيز ١٠٠ ملي مولار انخفاضا ملحوظا في الفعالية الانزيمية بلغت (٤٠.٧٦ و ٦٥.٨٨ و ٣٨.٥٥ و ٥٥.٩٧ و ٤٥.٤٤) وحدة.مل$^{-1}$ ، بنسبة مئوية تثبيطية بلغت (٨.٣ و ١٤.٣ و ٨.٧ و ١٤.٦ و ١٢.٠٢)% على التوالي .

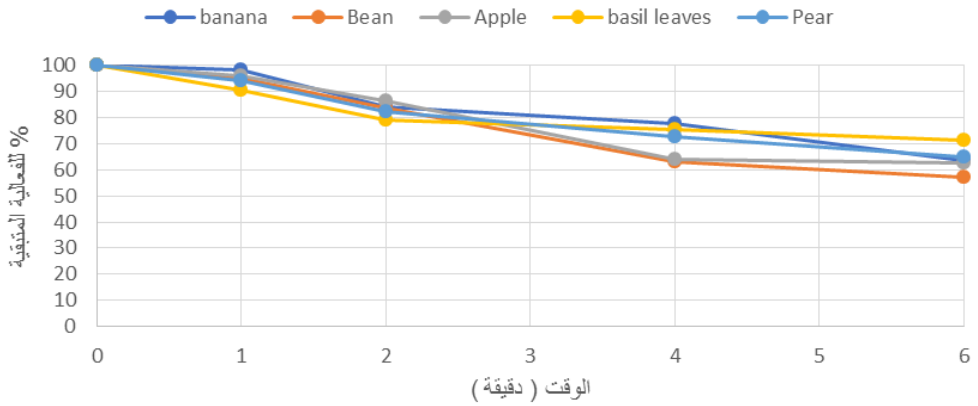
بزيادة تراكيز الزيت العطري الى ١٠٠ ملي مولار المضاف الى المستخلص الانزيمي PPO للفواكه والخضر أعلاه ، لوحظ انخفاضا في الفعالية الانزيمية مع تقدم مدة الحضن ، أظهرت المدة ٦ دقيقة اقصى انخفاض لجميع المستخلصات الانزيمية تراوحت (٢١٠.٣٤ – ٢٤٥.٨١) وحدة.مل$^{-1}$ وبنسبة مئوية تثبيطية (٤٥.٩ – ٦٠.٣)% وكما مبين في الشكل (٥) و (٥.٥) . اما عند معاملة مستخلصات PPO للفواكه والخضر انفة الذكر بتركيز ١٥٠ ملي مولار زيت Limon Peel كما في الشكل (٦) فقد بينت النتائج تاثيرا واضحا للزيت العطري في فعالية الانزيم مع تقدم مدد الحضن لتظهر المدة ٦ دقيقة اقصى انخفاض وبنسبة مئوية تثبيطية بلغت (٢٤.٩ و ١٥.٧ و ١١.٤ و ١٨.٤ و ٢١.٢)% على التوالي ، كما مبينة في الشكل (٦.٦) . اذ كانت هذه النتائج مقاربة لتاثير حامض الاسكوربيك القياسي في فعالية انزيم PPO للمستخلصات النباتية أعلاه . وقد يعزى الانخفاض في الفعالية الانزيمية لامتلاك زيت Limon Peel العديد من المركبات الفعالة حيويا لاسيما D-Limonene و Linalool و α,β- Pinen والتربينات التي تربط الاوكسجين اوتتنافس مع المادة الخاضعة للارتباط بالموقع الفعال للانزيم . أشار Taranto *etal.*(2017) ان حصول التلون البني الانزيمي يحتاج الى اربع مكونات أساسية هي ، الاوكسجين و الانزيمات المؤكسدة والنحاس والمادة الخاضعة التي يعمل عليها الانزيم (Shehata *etal.*,2020) . ذكر Oms-Oliu *etal.*(2010) ان التلون البني يمر بمرحلتين ، المرحلة الأولى Hydroxylation لتحويل Monophenol الى O-diphenol ، اما المرحلة الثانية يحصل اكسدة للمركب O-

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

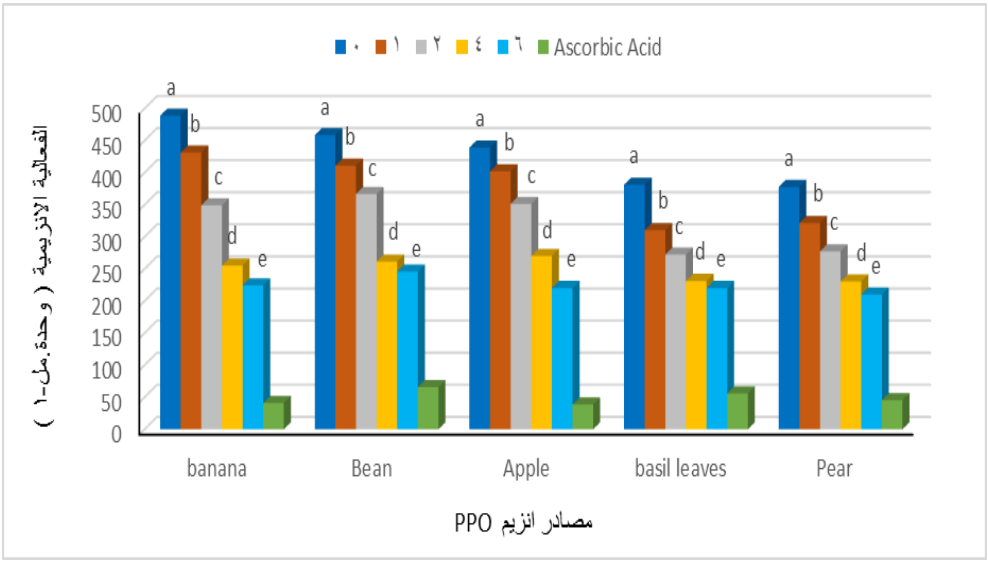
diphenol الى O-quinones وباستمرار التفاعلات غير الانزيمية اللاحقة قد تؤدي الى تراكم مركب Melanin وتكون اللون الأسود او الأحمر ، تعتمد شدة الصبغة على تركيز المادة الخاضعة . وجد Jain and Sharma (2017) من خلال تشخيص زيت Limon Peel بتقنية GC-MS احتواءه على العديد من المركبات الفعالة حيويا ، لاسيما D- Limonene بنسبة ٤٣.٧% و α,β- Pinen (٣.٣٩ – ١٢.٦١)% . و Linalool و Geraniol العديد من المركبات التربينية . أشار Jisun *etal.*,(2020) ان إضافة ٨٠ ملي مولار من D-Limonene و Linalool خفض من فعالية انزيم PPO الطماطم (٥٠.٣ و ٢٨)% على التوالي . ذكر Badawy *et al.* (2016) ان إضافة 0.04% من مركب Geraniol سبب في خفض فعالية انزيم PPO . بين Taranto *etal.*(2017) ان انزيم PPO مسؤول عن التلون البني الذي يحصل للفواكه والخضرنتيجة اكسدة المركبات الفينولية تاركا خسائر مالية كبيرة تصل الى ملايين الدولارات ، وان إضافة زيت Limon Peel و Mandarin و Orange خفض فعالية انزيم PPO في مستخلص الفراولة وبشكل ملحوض ، تفوق فيها زيت Mandarin ثم الليمون والبرتقال ؟ معلنا سبب ذلك لاحتواء زيت Mandarin على D-Limonene على نسبة ٩٣-٩٦)% ، يليه زيت قشور الليمون بنسبة (٥٩-٨٠)% .



شكل (٤): تاثير الزيت العطري Limon Peel بتركز ٥٠ ملي مولار في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO عند مدد حضن مختلفة

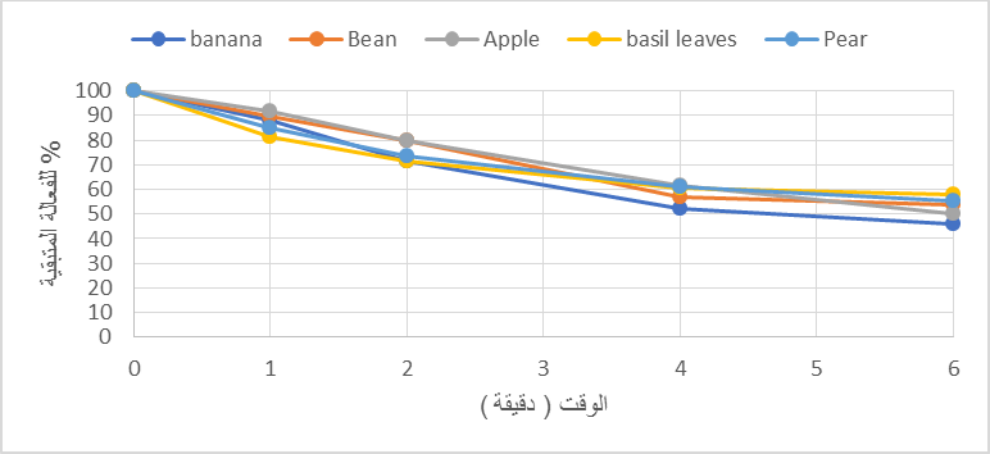


شكل (٤.٤): % للفعالية الانزيمية المتبقية لانزيم PPO بإضافة الزيت العطري Limon Peel بتركز ٥٠ ملي مولار

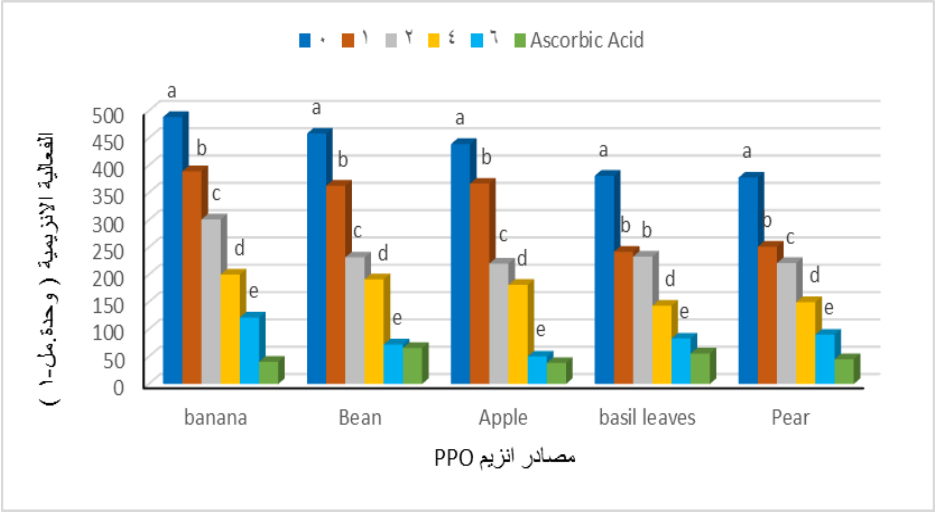


شكل (٥): تاثير الزيت العطري Limon Peel بتركز ١٠٠ ملي مولار في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO عند مدد حضن مختلفة

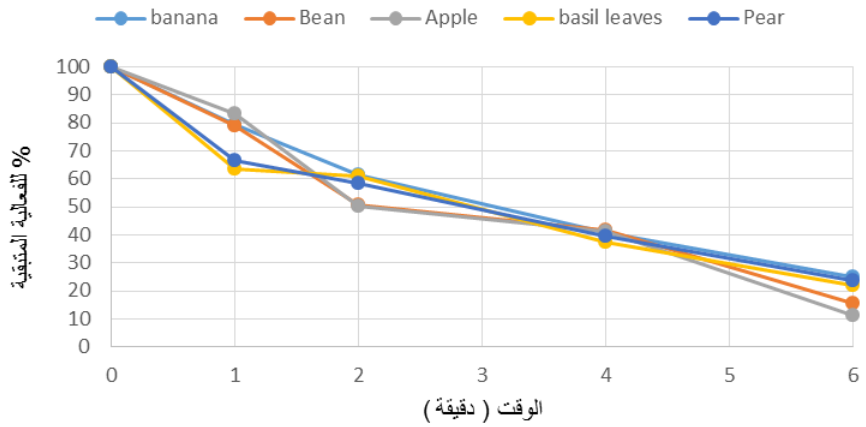
ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855



شكل (٥.٥): % للفعالية الانزيمية المتبقية لانزيم PPO بإضافة الزيت العطري Limon Peel بتركز ١٠٠ ملي مولار



شكل (٦): تاثير الزيت العطري Limon Peel بتركز 150 ملي مولار في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO عند مدد حضن مختلفة .



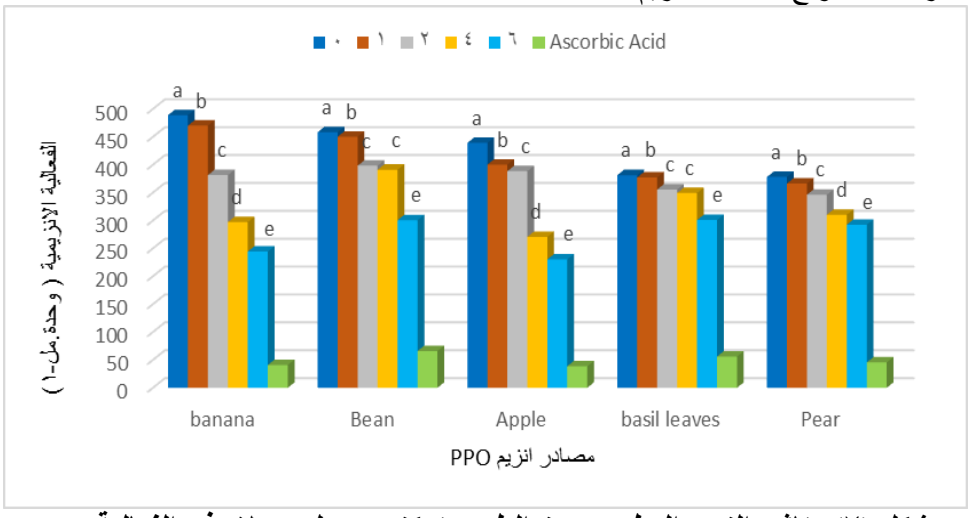
شكل (٦.٦): % للفعالية الانزيمية المتبقية لانزيم PPO بإضافة الزيت العطري Limon Peel بتركز ١٥٠ ملي مولار

تاثير الزيت العطري جوز الطيب على الفعالية انزيم Polyphenol Oxidase (PPO)

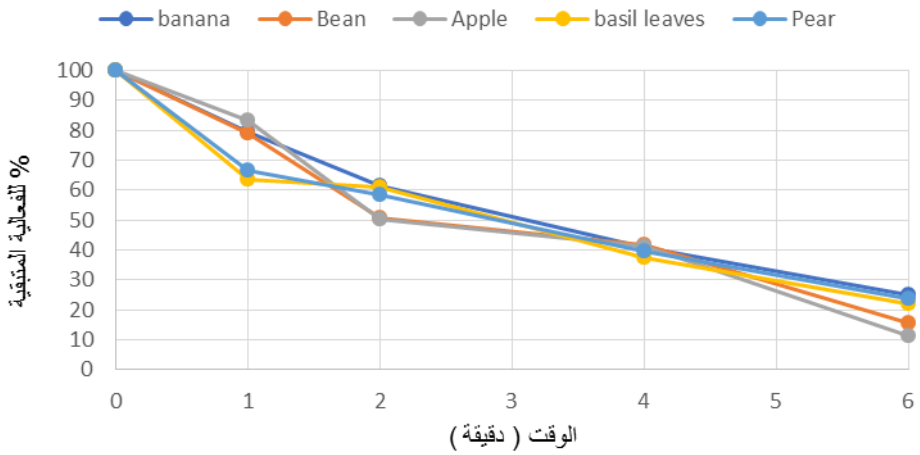
يظهر الشكل (٧ و ٨ و ٩) تاثير إضافة زيت جوز الطيب Nutmeg بتركيز (٥٠ و ١٠٠ و ١٥٠) ملي مولار الى المستخلص الانزيمي PPO للفواكه والخضر المبينة في الاشكال أعلاه والحضن لمدة (٠-٦) دقائق ، ومقارنة النتائج المتحصل عليها مع معاملة الانزيم بحامض الاسكوربك القياسي . اذ أظهرت جميع تراكيز جوز الطيب المضافة مع زيادة مدة الحضن لجميع المستخلصات الانزيمية لتصل الى اقصى انخفاض لها عند مدة الحضن ٦ دقائق عند التركيز ٥٠ ملي مولار ، اذ بلغت الفعالية الانزيمية (٢٤٤.٣ و ٣٠٠.٥ و ٢٠٠.١ و ٣٠٠.٦٧ و ٢٩٢.٣) وحدة.مل$^{-1}$ على التوالي ، وبنسبة مئوية تثبيطية بلغت (٤٩.٤ و ٦٥.٥ و٥٢.٣ و ٧٨.٨ و ٧٧.٣)% على التوالي . في حين بلغت الفعالية الانزيمية بزيادة تركيز الزيت العطري الى ١٠٠ ملي مولار عند مدة الحضن الأخيرة (٢٠١.١١ و ١٢٠.٣٠ و ١٣٥.١١ و ١٦١.٠١ و ١٣٠.٢٠) وحدة .مل $^{-1}$ وبنسبة مئوية تثبيطية (٤١.١ و ٢٦.٢ و ٣٠.٧ و ٤٢.٢ و ٣٤.٤)% على التوالي . بزيادة تركيز الزيت العطري لجوز الطيب الى ١٥٠ ملي مولار لوحظ انخفاضا ملحوظا في فعالية الانزيم PPO اذ بلغت (٩٥.٠١ و ١٠٤.٣١ و ١٠٩.١٢ و ١١٠.١٧ و ١٠٣.٣٣) وحدة.مل$^{-1}$ بنسبة تثبيطية (١٩.٤ و ٢٢.٧ و ٢٤.٨ و ٢٨.٩ و ٢٧٣)% على التوالي . وقد يعزى سبب انخفاض الفعالية لامتلاك زيت جوز الطيب العديد من المركبات

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

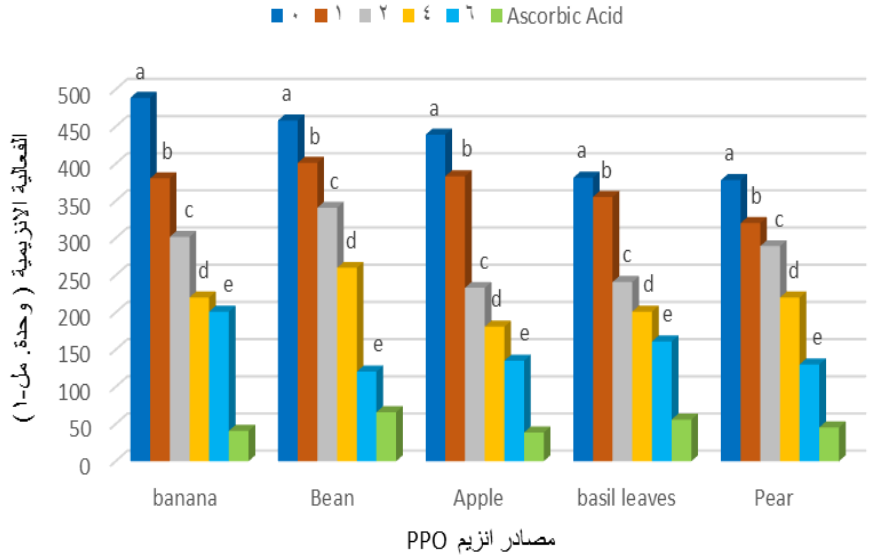
المهمة ذات الفعالية الحيوية ، اذ تعمل هذه المركبات على حجب الاوكسجين عن الانزيم او إمكانية عملها كمركبات كلابية لايون النحاس المتواجد في الموقع الفعال للانزيم مسببا في تثبيط الانزيم ، او قد يتنافس مع المادة الخاضعة لغرض الارتباط بالموقع الفعال للانزيم . فقد أشار كل من Jiang *etal.* (2004) و Yamaguchi *etal.*(2010) الى ان انزيم PPO من الانزيمات المعدنية التي تحتوي على النحاس في الموقع الفعال وهو من مجموعة Prosthetic اذ تعمل بعض المركبات لاسيما الببتيدات كمادة كلابية لربط النحاس وإيقاف نشاط الانزيم (Lee, 2013 و Lim and Wong, 2018) . ذكر Carolina and Maman (2016) ان زيت جوز الطيب يحتوي على العديد من المركبات الحيوية منها α,β Pinen و Sabinen و D- Limonene و Linalool والتربينات ، حيث اشارت الدراسات الى قدرة مركب Limonene و Linalool في خفض فعالية انزيم PPO ، فضلا عن احتواء الزيت العطري على مركب Sabinene ذات الفعالية العالية في منع تكون البيروكسيدات ، فقد لاحظ Quiroga *etal.*(2014) في دراسته على قدرة Sabinene في إطالة العمر الخزني لزيت زهرة الشمس . يمكن الإشارة الى ان الانخفاض في الفعالية الانزيمية في الدراسة الحالية الى احتمالية قدرة هذا المركب في تثبيط انزيم PPO من خلال حجب الاوكسجين او التنافس مع المادة الخاضعة للارتباط بالموقع الفعال للانزيم .



شكل (٧): تاثير الزيت العطري جوز الطيب بتركز ٥٠ ملي مولار في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO عند مدد حضن مختلفة

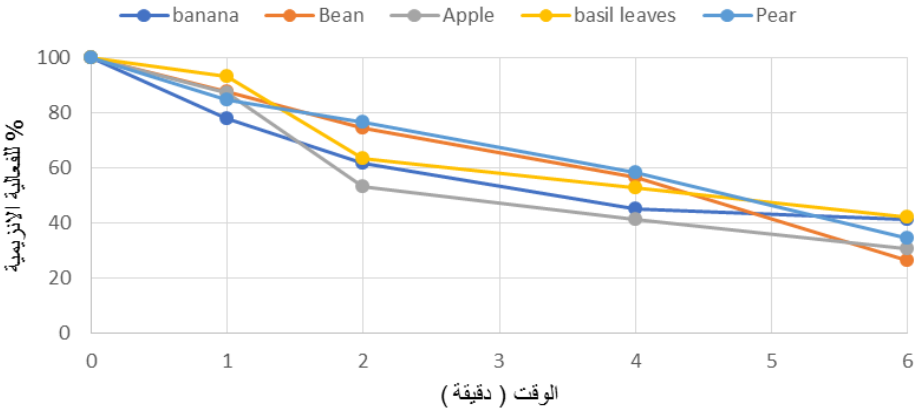


شكل (٧.٧): % للفعاليه الانزيميه المتبقيه لانزيم PPO بإضافه الزيت العطري جوز الطيب بتركز ٥٠ ملي مولار

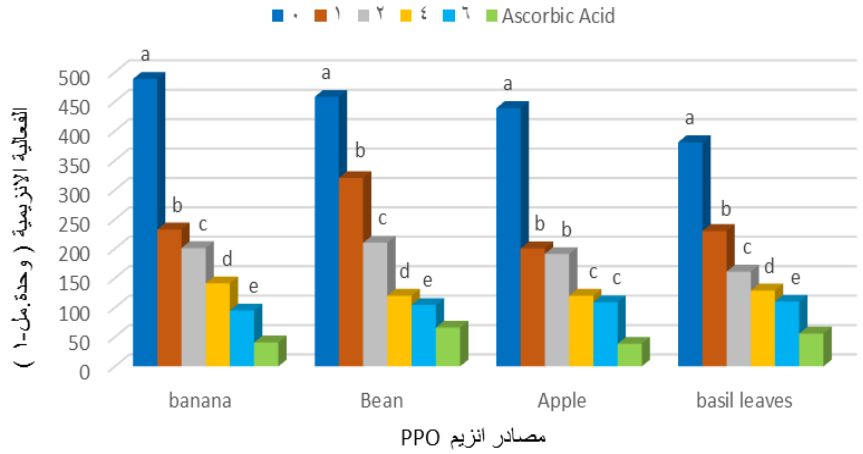


شكل (٨): تاثير الزيت العطري جوز الطيب بتركز ١٠٠ ملي مولار في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO عند مدد حضن مختلفة

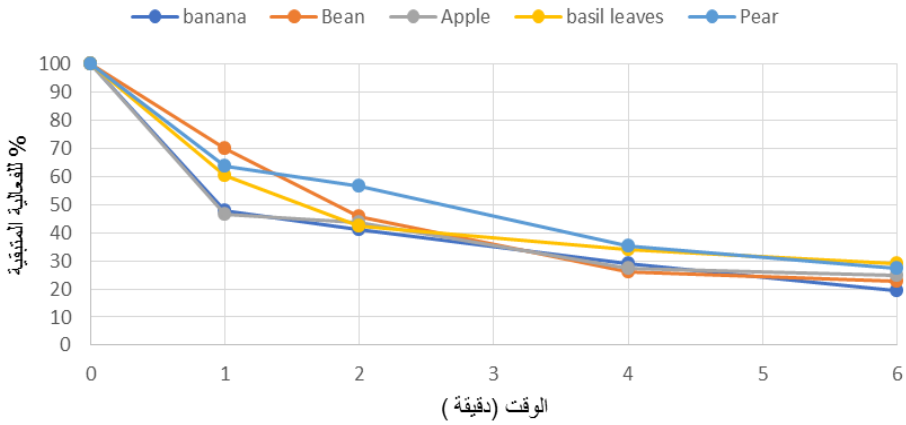
ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855



شكل (٨.٨): % للفعالية الانزيمية المتبقية لانزيم PPO بإضافة الزيت العطري جوز الطيب بتركز ١٠٠ ملي مولار



شكل (٩): تاثير الزيت العطري جوز الطيب بتركز ١٥٠ ملي مولار في الفعالية الانزيمية لانزيم PPO عند مدد حضن مختلفة



شكل (٩.٩): % للفعالية الانزيمية المتبقية لانزيم PPO بإضافة الزيت العطري جوز الطيب بتركز ١٥٠ ملي مولار

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

References

Anderson, J. V., Fuerst, E. P., Tedrow, T., Hulke, B., and Kennedy, A. C. (2010). Activation of polyphenol oxidase in dormant wild oat caryopses by a seed-decay isolate of Fusarium avenaceum. J. Agric. Food Chem., 58: 10597–10605.

Araji, S. Grammer, T.A., Gertzen, R., Anderson, S.D., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Phu, M.L., Solar, A., Leslie, C.A., Dandekar, A.M., and Escobar, M.A. (2014) Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut. Plant Physiol 164(3):1191–1203

Aziz, G. M. and AL-Sa'ady, A.J.R. (2016). Extraction conditions of polyphenol oxidase from banana peel. Baghdad Science Journal,13(3):469-474.

Badawy, M.E.I., Rabea, E.I., El-Nouby, M., Ismail, R.I.A. Taktak, N.E.M. (2016). Strawberry shelf life, composition, and enzymes activity in response to edible chitosan coatings. Int. J. Fruit Sci.,17: 1–20.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. , 72 : 248-254.

Carolina, A. and Maman, M. (2016). Larvicidal Activity of Essential Oils from the Leaves and Fruits of Nutmeg (Myristica fragrans Houtt) Against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 4(7): 552-556.

Delgado, S. N. (2021). Polyphenoloxidase (PPO): Effect, Current Determination and Inhibition Treatments in Fresh-Cut Produce. Appl. Sci., 11: 7813-26.

Escobar, M.A., Shilling, A., Higgins, P., Uratsu, S.L., Dandekar, A.M. (2008) Characterization of polyphenol oxidase from walnut. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 133(6):852–858.

Hernando, M.I.H., Munuera, I.P., Fiszman, S., and Martín-Belloso, O. (2010). Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. Postharvest Biol. Technol., 57:139–148.

Jain, N. and Sharma, M. (2017). Evaluation of Citrus lemon Essential Oil for its Chemical and Biological Properties Against Fungi Causing Dermatophytic Infection in Human Beings. TACL, 7 (3):402 – 409.

Jiang, Y.M., Duan, X.W., Joyce D, Zhang ZQ, and Li J.R., (2004). Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit.Food Chem., 88, 443–446

Jisun, H.L., Deepak, M. K., Guddadarangavvanahally, K. J., Carlos, A. A., Kevin, M. C., and Bhimanagouda, S. P. (2020). Effect of production system and inhibitory potential of aroma volatiles on polyphenol oxidase and peroxidase activity in tomatoes. J. Sci. Food Agric.,101(1):307-314.

Kaviya, R.; Jacob, R. S. J., Sasireka, R., Deepika, P., Nagajothi, N. and Stephen, V. R. (2012). Comparative Studies on the Inhibitors of Banana Peel Polyphenol Oxidase (PPO). National Conference on Developing Scenario in Applied Sciences and Communicative English. 27-31.

Kolodziejczyk, K., Milala, J., Sojka, M., Kosmala, M., and Markowski, J. (2010). Polyphenol oxidase activity selected apple cultivars. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(2): 51-61

Lee, J. H. J., Kasote, D. M., Jayaprakasha, G. K., Avila, C. A., Crosby, K. M., A. and Patil, B. S. (2020). Effect of Production System and Inhibitory Potential of Aroma Volatiles on

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

Polyphenol Oxidase and Peroxidase Activities of Tomatoes. Journal of the Science of Food and Agriculture.

Lee, J.H., Deepak, M.K., Guddadarangavvanahally, K. J. , Carlos, A. A., Kevin, M. C. and Bhimanagouda, S. P. (2020). Effect of production system and inhibitory potential of aroma volatiles on polyphenol oxidase and peroxidase activity in tomatoes. J. of Sciences of Food and Agriculture,101(1):307-314.

Lee, M.C. (2013) United States Patent Application No. 13/336,180, Publication No. 20130164233 A1.

Lim, W.Y. and Chen Wai Wong, C. W. (2018). Inhibitory effect of chemical and natural anti-browning agents on polyphenol oxidase from ginger (Zingiber officinale Roscoe). J. Food Sci., Technol., 55(8):3001–3007.

Mercimek, H.A., Guzeldag, G., Guler, K.C., Karaman,M. and Karayilan, R. (2015). Inhibition of Polyphenol Oxidase Purified from Potato (Solanum tuberosum). Romanian Biotechnological Letters, 20(6): 10961-10968.

Nakatsu T., Lupo A.T., Jr., Chinn J.W., Jr., Kang R.K. (2000). Studies in Natural Products Chemistry. Volume 21. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2000. Biological Activity of Essential Oils and Their Constituents; pp. 571–631.

Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M.A., González, L.A., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Pingret, D Fabiano-Tixier, A. and Chemat, F. (2014). An Improved Ultrasound Clevenger for Extraction of Essential Oils.Food Anal. Methods, 7:9–1.

Quiroga, P.R., Asensioa, C.M., and Nepoteb, V. (2014). Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability `of roasted sunflower seeds. J Sci Food Agric 2015; 95: 471–479.

Rocha, A. M. C.; Cano, M. P.; Galeazzi, M. A. M. and Morais, A. M. M. (2009). Characterisation of starking apple polyphenoloxidase. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1-92.

Shehata, S.A., Abdeldaym, E., Ali, M.R., Mohamed, R. M., Bob, R. I., and Abdelgawad, K. F. (2020). Effect of Some Citrus Essential Oils on Post-Harvest Shelf Life and Physicochemical Quality of Strawberries during Cold Storage. Agronomy, 10: 1466-29.

Sun, J. (2007). D-Limonene: safety and clinical applications. Altern Med Rev., 12(3):259-64.

Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M.M., Pavan, S., Montemurro, C. (2017). Polyphenol oxidases in crops: Biochemical, physiological and genetic aspects. Int. J. Mol. Sci., 18: 377.

Teng, Y., Ayesha Murtaza, A., Iqbal, A., Fu, J. , Ali, S.W., Iqbal, M.A., Xu, X., Pan, S. and Hu, W. (2020). Eugenol emulsions affect the browning processes, and microbial and chemical qualities of fresh-cut Chinese water chestnut. Food Bioscience, 38:1-9.

Virador, V. M., Grajeda, R. J. P., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G.M., Moreno, A., and Whitaker, J.R. (2009). Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of Grenache (Vitis vinifera) polyphenol oxidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 1189–1201.

Weerawardana, M.B.S., Thiripuranathar, G. and Paranagama,P.A. (2020). Natural antibrowning agents against polyphenol oxidase activity in Annona muricata and Musa acuminate. Journal of Chemistry, (2020): 1-6. doi.org/10.1155/2020/1904798

Yamaguchi, K., Kato, T., Noma, S., Igura, N. and Shimoda. M. (2010). The Effects of High Hydrostatic Pressure Treatment on the Flavor and Color of Grated Ginger. Biosci. Biotechnol. Biochem., 74 (10): 1981–1986.

Zhang, X and Shao, X. (2015). Characterisation of Polyphenol Oxidase and Peroxidase and the Role in Browning of Loquat Fruit. Czech J. Food Sci., 33(2): 109–117.

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855