1. المقدمة

1.1هدف الدراسة

- تهدف الدراسة إلى استخلاص إنزيم البيروكسيديز من ثمرة الطماطم خلال ثلاث مراحل من نمو الثمرة (الثمرة الخضراء – متوسطة النضج – الحمراء) ، وحساب الفعالية الأنزيمية لكل مستخلص ومقارنة النتائج المتحصلة .

- كما تهدف الدراسة لمعرفة تأثير بعض العوامل المؤثرة على الفعالية الإنزيمية مثل (تركيز مادة التفاعل – الرقم الهيدروجيني – الأملاح (المنشطات الإنزيمية)).

1.2 الإنزيمات

إنزيم مفردة لاتينية تعني (في الخميرة) (in yeast) ، إذ أن عملية الحفز الحيوي اكتشفت لأول مرة في تخمر الجلوكوز إلى كحول. د.حمادي أحمد إسماعيل (2002)

أثبتت الدراسات الأولى للإنزيمات أنها تشترك مع البروتينات في كثير من الخواص ولم يتم عزل الإنزيمات في البداية ، ولكن تم بعد ذلك عزل إنزيم اليوريز على شكل بلورات نقية وقد اتضح أنها عبارة عن بروتين ، بعدها أمكن عزل عدد من الإنزيمات من النباتات وقد ثبت أنها بروتينات على الرغم من أن كثيرا منها يحتوي على مكونات غير بروتينية إما ذرات معدنية أو جزيئات عضوية .

ويعرف الإنزيم أنه مادة بروتينية متخصصة ، ذات وزن جزيئي كبير ، شديدة الحساسية للحرارة ، لها قوة حفز عالية فهي تزيد معدل التفاعل ، وفي الحقيقة معظم التفاعلات في الأنظمة الحيوية لا يمكن أن تحدث في غياب الإنزيم .

1.3 الوظيفة والتركيب

يتكون الإنزيم بصورة أساسية من اتحاد عدد كبير من الأحماض الأمينية مرتبطة مع بعضها بالروابط الببتيدية .

قسمت الإنزيمات من حيث التكوين إلى قسمين :

1- الإنزيمات التي تتكون من البروتينات البسيطة و تشمل عدد من الإنزيمات المحللة مثل إنزيم اليوريز وإنزيم الأميليز .

2- الإنزيمات التي تتكون من شقين أحدهما بروتيني والآخر غير بروتيني حيث يتكون من ذرة معدنية أو جزيء عضوي ، ويمكن فصل الشق البروتيني عن الشق غير البروتيني .
د.أحمد عبد الله ثابت (1991)

وظيفة الإنزيمات

الإنزيمات مواد متخصصة بمعنى أن لكل إنزيم مادة معينة أو مجموعة مواد يستطيع أن يؤثر فيها دون غيرها ، وله أنواع مختلفة ودرجات متفاوتة ، فمثلا هناك إنزيمات تخصص في التأثير على المواد ذات التشابه الفراغي ، ويعرف هذا التخصص باسم تخصص التشابه الفراغي .

فوظيفة الإنزيم تعتمد على تخصصه وبصورة عامة تعمل الإنزيمات على :

1- حفظ توازن الجسم عن طريق التحكم بتفاعلاته.

2- تعمل على تقليل كمية الطاقة اللازمة لبدء التفاعل وهذا يساعد على حماية التفاعل من التعرض للحرارة العالية التي قد تؤدي لتفكيك بنية البروتين .

3- إسراع التفاعلات الخاصة بعمليتي الهدم والبناء وإنتاج الطاقة داخل الكائن الحي .

د.حسني فرح عثمان (2011)

1.4 كيفية عمل الإنزيم

يكتمل عمل الإنزيم داخل الخلايا الحية بعدة خطوات :

1- الخطوة الأولى

في أي تفاعل إنزيمي يرتبط الإنزيم (E) مع المادة الهدف (S) مكونا معقد يعرف بالإنزيم والهدف (ES).

$$E + S \rightarrow ES$$

يتم هذا الارتباط في موقع معين في الإنزيم يسمى الموقع الفعال أو الموقع النشط ، ويتم الارتباط بين الأنزيم والهدف بمشاركة مجموعة من القوى الضعيفة مثل الروابط الأيونية والروابط الهيدروجينية .

2- الخطوة الثانية

يتفكك المعقد ويتكون ناتج التفاعل ويتحرر الإنزيم مثله مثل أي عامل حفز آخر.

$$ES \rightarrow Product + E$$

طاقة التنشيط

في الميكانيكية السابقة جزيئات مادة التفاعل (S) تحتوي على كمية من الطاقة ، لذلك فهي دائمة الحركة والتصادم مع بعضها ، فإذا اكتسبت تلك الجزيئات كمية طاقة كافية لبدء التفاعل مع جزيء مادة أخرى فإنها نتيجة لتصادمها تصبح قادرة على التفاعل والتحول لمادة جديدة .

لذلك تعرف كمية الطاقة التي يجب لجزيئات المادة أن تكتسبها بطاقة التنشيط . وبدراسة تأثير الإنزيمات على التفاعلات وجد أنها تؤدي لتقليل طاقة التنشيط اللازمة لبدء التفاعل وينتج عن ذلك أن عددا أكبر من جزيئات المادة سوف يصل لمستوى طاقة التنشيط اللازمة وبذلك تزيد سرعة التفاعل.

1.5 أهمية الإنزيمات

يعتبر دور الإنزيمات أساسي في الأنظمة الحيوية حيث لا يمكن اكتمال عدد كبير من التفاعلات في الخلايا في غياب الإنزيمات ، وللإنزيمات أهمية كبيرة في الصناعات الغذائية حيث تستخدم للحصول على مواد ذات قيمة غذائية عالية ولها خواص جيدة من حيث الطعم والرائحة والشكل الخارجي ، وللإنزيمات دور في كثير من الصناعات مثل :

صناعة الخبز ، الشاي ، النشا ، الجبن ، المنظفات ، دباغة الجلود ، إنتاج الأحماض العضوية والمضادات الحيوية ، واستخدمت الإنزيمات المنتجة بواسطة الكائنات الدقيقة في الصناعات الدوائية .

1.6 إنزيمات الأكسدة والاختزال

جميع التفاعلات التي تتم بين الجزيئات أو الأيونات أو الذرات وتعتمد على انتقال الكترونات تسمى تفاعلات أكسدة.

وعملية الأكسدة يقابلها اختزال ، أي عند أكسدة أيون لا بد من مستقبل مباشر وكثيراً ما يتكافأ اكتساب إلكترون مع إضافة أيون H لأن اكتساب الجزيء لإلكترون واحد أو أكثر من شأنه أن يمكن هذا الجزيء من كسب أيونات الهيدروجين والتي عادة تكون متاحة في الخلية الحية.

فتفاعلات الأكسدة والاختزال التي تتم في الخلية لا تختلف عن تفاعلات الأكسدة والاختزال عامة حيث يكون فيها انتقال الإلكترون مصحوباً بانتقال الهيدروجين وانتقال الإلكترون من مادة مختزلة إلى مادة مؤكسدةيكون مصحوباً بانطلاق الطاقة.

ويوجد عدد من إنزيمات الأكسدة والاختزال مثل :

إنزيم الأوكسيديز Oxidase ، إنزيم الديهيدروجينيز Dehydrogenase ، إنزيم البيروكسيديز Peroxidase ، إنزيم الكاتاليز Catalase.

1.7 إنزيم البيروكسيديز

تجارب تحضير بيروكسيد الهيدروجين هي التي قادت إلى بداية اكتشاف الإنزيمات ، حيث كان العالم الفرنسي لويس أول من حضر بيروكسيد الهيدروجين معمليا وذلك في منتصف القرن ال 19 ، ولاحظ العالم أن كثير من الحيوانات والنباتات تستطيع تحويل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء و أكسجين ، فاستنتج أن هناك تفاعل كيميائي يحدث بين البيروكسيد ومادة أخرى في هذه الكائنات ، ومن هذا الاستنتاج تم اكتشاف الإنزيمات ووجد أنه تحديدا إنزيم البيروكسيديز .

بعد التقدم في دراسة الإنزيمات وجد أن البيروكسيديز عبارة عن عائلة واسعة من الإنزيمات جميعها تعمل كعوامل حفازة لتفاعلات الأكسدة والاختزال.

يعتبر إنزيم البيروكسيديز من الإنزيمات المعقدة جدا ويتضمن جزيئات معقدة ومتعددة الأشكال والتراكيب ، وتبعا لهذا الاختلاف تختلف البيروكسيدات التي يتم اختزالها بواسطتها ويختلف تخصص الإنزيم حسب المرافق الإنزيمي المرتبط بالشق البروتيني .

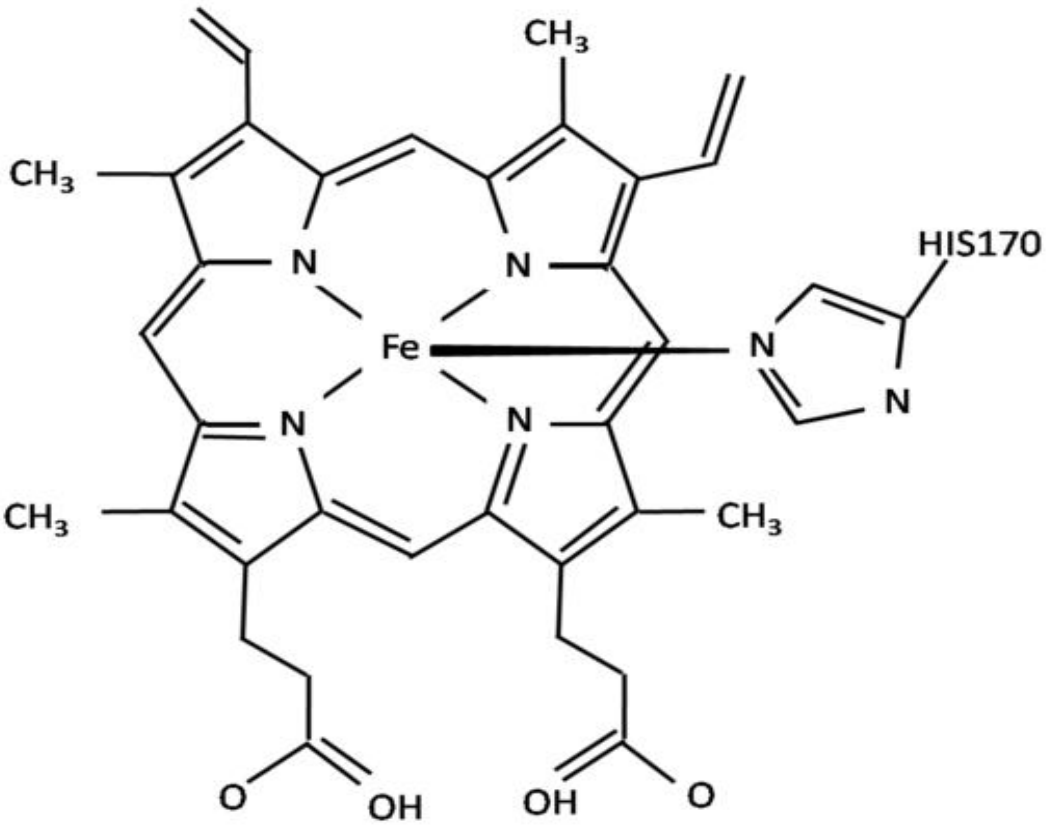
1.8 مصادر البيروكسيديز

لاختلاف أنواع البيروكسيديز نجد أنه متسع الانتشار والوجود ، حيث يوجد في البكتيريا والفطريات وكثير من الكائنات وحيدة الخلية ، كما يوجد أيضا في النباتات بمختلف أنواعها وفي الإنسان والحيوان وتحديدا نجده في خلايا الدم البيضاء والصفائح الدموية .

1.9 تركيب البيروكسيديز

مثل بقية الإنزيمات يتكون البيروكسيديز أساسا من بروتين يرتبط به إما شق بروتيني أو شق غير بروتيني ولا نستطيع تحديد الشق الآخر نظرا لاختلاف أنواعه وتعقيد تركيبها ، فلكل نوع من البروكسيديز تركيب مختلف حسب وظيفته ونوع الجزيئات التي يتفاعل معها .

يحتوي الإنزيم على ما يعرف بالموقع الفعال (Active site) أو الموقع النشط وهو الجزء الذي يحدث فيه التفاعل بسهولة .



الشكل (1.1) يوضح الموقع الفعال لإنزيم البيروكسيديز

1.10 ميكانيكية التفاعل

يتبع تفاعل البيروكسيديز التفاعل العام للإنزيمات حيث يرتبط الإنزيم بالمادة الهدف مكونا معقد وسيط ثم يتحلل ليعطي الناتج والإنزيم ، لكن البيروكسيديز يتخصص في أنه يدعم عمليتي الأكسدة والاختزال في وجود البيروكسيد وخاصة بيروكسيد الهيدروجين حيث يختزله ليكون ماء وأوكسجين ويؤكسد المادة الأخرى بإضافة هيدروجين وكسر الرابطة فيها ، ولا يمكن تحديد ميكانيكية عامة للتفاعل لأن كل تفاعل يختلف باختلاف المرافق الإنزيمي والجزيء المانح للإلكترون .

1.11 خواص إنزيم البيروكسيديز

يعتبر إنزيم البيروكسيديز من الإنزيمات المقاومة للحرارة فهو لا يتأثر بالحرارة لذلك يمكن وصفه بأنه ثابت حراريا .

ومن الممكن أن يعاود هذا الإنزيم نشاطه بعد عدة ساعات من المعالجة الكيميائية للمركبات ، وهذا أمر غير مألوف بالنسبة للإنزيمات وتختلف هذه الخاصية حسب مصدر الإنزيم .

1.12 العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم

وتشمل تركيز الإنزيم ، تركيز المادة المتفاعلة ، درجة الحرارة ، الرقم الهيدروجيني (PH) ، المرافق الإنزيمي ، المنشطات والمثبطات الإنزيمية .

1.13 وظيفة البيروكسيديز في الأنظمة الحيوية

يعمل البيروكسيديز بشكل خاص مع البيروكسيد حيث أن البروكسيدات يتم إنتاجها بصورة طبيعية في خلايا الكائنات الحية عن طريق التفاعلات الكيميائية الحيوية ، لكنها قد تسبب ضررا لهذه الكائنات باعتبارها عوامل مؤكسدة لأنها قد تحدث عمليات أكسدة للخلايا .

إنزيم البيروكسيديز يقوم بتكسير البيروكسيدات ويحولها لمركبات أقل ضررا عن طرق إضافة هيدروجين وتحويل البيروكسيد إلى ماء وأكسدة الجزيء الآخر .

1.13.1مضادات الأكسدة :

تعتبر الأكسدة أحدى التفاعلات الأساسية المهمة في جسم الإنسان ، فمثلا يقوم الجسم بأكسدة الغذاء للحصول على الطاقة وتكون المتفاعلات عبارة عن المواد الغذائية والأكسجين ، لكن نواتج هذه العملية (الجذور الحرة) والتي قد يسبب وجودها ضررا ، إذ أنها تقوم بتقسيم أجزاء الخلية الحية وتدميرها من خلال سلسلة من التفاعلات ، كما تدمر الأحماض الدهنية الموجودة في الخلية مما يجعل الجسم عرضة للعديد من الالتهابات والفيروسات والسرطانات .

وتوجد بعض العوامل الخارجية التي تساعد على حدوث عملية الأكسدة في الجسم مثل :

التعرض للإشعاع ، تناول المواد المحتوية على مواد حافظة وهرمونات صناعية ودهون مشبعة ، التدخين ، استنشاق الهواء الملوث ، وتناول بعض أنواع الأدوية .

لكن هذه العملية يمكن الحد منها بواسطة مضادات الأكسدة و هي مواد لها القدرة على منع أو إبطاء عملية الأكسدة في جسم الكائن الحي ، حيث تنهي سلسلة تفاعلات الأكسدة المتلفة للخلايا بإزالة الوسيط الأساسي تماما ومنع حدوث عملية الأكسدة ، وعادة ما تنزع عامل الأكسجين .

تستخدم مضادات الأكسدة بكثرة كمكونات في ملحقات النظم الغذائية للوقاية من الأمراض ومقاومة تلف الخلايا .

1.13.2 البيروكسيديز في النبات

تحتوي النباتات على عدة أنواع من إنزيم البيروكسيديز ويعتبر مهم جدا لأنه يساعد في تقليل الضرر الذي ينتج بسبب العوامل الخارجية التي يتعرض لها النبات .

عندما يتعرض النبات لضغط خارجي مثل درجات الحرارة العالية والرطوبة أو عندما يتعرض لهجوم من قبل كائنات طفيلية فإنه ينتج فصائل الأكسجين النشطة (ROS)(Reactive Oxygen Species) ، وهو شكل من أشكال الأكسجين يكون نشط جدا ويمكن أن يسبب ضررا أو يقتل الخلايا ، فيقوم إنزيم البيروكسيديز بإزالة (ROS) وبذلك يقلل من الضرر الناتج عن وجوده .

1.13.3 البيروكسيديز في جسم الإنسان

توجد في جسم الإنسان مجموعة من إنزيمات البيروكسيديز تسمى (Glutathions) ، وهي تحتوي على عنصر السيلينيوم ، ويوجد هذا الإنزيم داخل وخارج الخلية ، يتضمن تفاعل هذا الإنزيم بيروكسيد الهيدروجين وهنالك تفاعلات أخرى تتضمن بيروكسيدات الدهون ، والقاعدة العامة لهذه التفاعلات تتمثل في إزالة المركبات المؤكسدة الضارة .

من ناحية أخرى يساعد البيروكسيديز في تفاعل بيروكسيد الهيدروجين مع مركبات كيميائية تسمى (thio cynates) وينتج عنها مركبات تساعد على قتل الكائنات الحيوية الدقيقة الضارة بجسم الإنسان .

وهناك أيضا (thyroid peroxidase) والذي يحرر اليود من المواد الغذائية ليكون هرمون الثيروكسين .

1.13.4 البيروكسيديز وسيلة دفاع

يوجد إنزيم البيروكسيديز في نوع من أنواع الحشرات يسمى (bombardier beetles) ، عندما تشعر هذه الحشرة بالخطر أو تتعرض لهجوم تقوم بمزج إنزيم البيروكسيديز مع خليط من بيروكسيد الهيدروجين ومادة الهيدرو كينون ، حيث يحفز البيروكسيديز هذا التفاعل لينتج عنه كمية كبيرة جدا من الحرارة ، وتعتبر وسيلة فعالة للدفاع .

1.14 فوائد البروكسيديز واستخداماته

يستخدم البيروكسيديز في أكسدة المركبات الفينولية في وجود بيروكسيد الهيدروجين لذا يستخدم في معالجة المياه الصناعية ، كما يستخدم لأكسدة فيتامين C ، ويمكن الاستفادة من نشاط البيروكسيديز كدليل لتحديد النكهة غير المرغوبة في الأغذية .

هناك الكثير من الدراسات حول استخدام البيروكسيديز في الصناعات مثل : رقائق الكمبيوتر ، أجزاء من السيارات ، طلاء المعادن . وأثبت أن البيروكسيديز يكمن استخدامه في بلمرة الأنلين والفينول في المركبات العضوية .

يستخدم فحص الأجسام المضادة للبيروكسيديز في الجسم والتي يدل وجودها على مشاكل في هرمون الثيروكسين كما يستخدم لقياس نسبة الجلوكوز في البول .

1.15 الطماطم

الطماطم من فصيلة الباذنجانيات في التصنيف النباتي ، جاءت تسميتها عن كلمة (tomato) في اللغة الإنجليزية ، واسمها العلمي (Solanum lycopersicum) .

ويعتبر الموطن الأصلي للطماطم أمريكا الجنوبية ومنها انتشرت في جميع أنحاء العالم وهي الآن تزرع على نطاق واسع ، وتعتبر من أكثر الثمار الغذائية استهلاكا.

وتعتبر الطماطم من المحاصيل المهمة في العالم ويتم إنتاجها بكميات كبيرة . ويوضح الجدول (1.1) ترتيب الدول المنتجة للطماطم في العالم :

الدولة	الإنتاج بالطن لعام 2010
الصين	41,879,684
الولايات المتحدة الأمريكية	12,902,000
الهند	11,979,700
تركيا	10,052,000
البرازيل	8,544,990
ايطاليا	6,024,800
إيران	5,256,110
اسبانيا	4,312,700
المغرب	4,114,310
المكسيك	2,997,640

1.16 إنتاج الطماطم في السودان

يصنف السودان الدولة رقم (33) في قائمة الدول الأكثر إنتاجا للطماطم في العالم .

وتعتبرالطماطم من أهم المحاصيل الزراعية في السودان ، حيث تزرع في جميع أنحاء القطر وعلى الرغم من أنها محصول شتوي إلا أنها تزرع أيضا عن طريق الأمطار وفي البيوت المحمية .

1.17 مناخ وبيئة ومواقيت الزراعة

تحتاج النباتات لدرجة حرارة متوسطة أثناء النهار تتراوح بين (ºC 28– 41) ودرجة حرارة معتدلة و منخفضة ليلا (ºC 15 – 20) لتنمو و تثمر ، ويمكن زراعتها في جميع أنواع التربة ماعدا التربة الرملية الفقيرة من ناحية العناصر الغذائية ، التربة الخفيفة الخصبة تؤدي إلى التبكير في مواعيد النضج ، كما ينجح المحصول في الأراضي الطينية جيدة الصرف .

الموسم الرئيسي لزراعة الطماطم في السودان هو الموسم الشتوي ، إلا أنها يمكن أن تزرع طوال العام في ثلاث فترات:

1- فصل الصيف (يناير – فبراير) .

2- موسم الخريف (يونيو – يوليو) .

3- فصل الشتاء (أغسطس – سبتمبر) .

1.18 طريقة الزراعة

يمكن تأسيس حقل الطماطم عن طريق الشتول واستعمال الشتول له عدة فوائد تتمثل في :

انه يمكن التحكم في الكمية المستهلكة من البذور لتأسيس حقول الطماطم ، يمكن حماية الشتول من العوامل الطبيعية ووقايتها من الحشائش والآفات ، تزيد الفرص للتخلص من الشتول الصغيرة أو الشاذة .

وتتم زراعتها في خطوط مع مراعاة انتظامها .

كما يمكن تأسيس حقل الطماطم بالزراعة المباشرة والتي قد تؤدي إلى تبكير النضج بمقدار أسبوعين إلى ثلاثة أسابيع .

ويجب في هذه الطريقة العناية بتحضير الحقل جيدا نسبة إلى صغر حجم البذور ، بعد ذلك تأتي خطوة النقل إلى الحقل المستديم حيث تؤخذ الشتول الجاهزة إلى الحقل المستديم والذي يتم تحضيره مسبقا .

1.19 نظام الري

يعتمد ري المحصول على نوع التربة ، الطقس وعمر النبات .

وبشكل عام احتياج نبات الطماطم من الري يشمل :

ري الحقل قبل الشتل ، ري خفيف بعد الشتل ، ري كل 3-4 أيام لتثبيت الشتول ، ري كل 5-7 أيام في الطقس الحار ، ري كل 7-10 أيام في الطقس المعتدل .

الري المنتظم يؤدي للمحافظة على النبات وتقليل الأمراض والري الزائد يضر بالمحصول .

(Senassudan.com)

1.20 الفوائد الصحية للطماطم

تحتوي الطماطم على فوائد صحية عديدة للإنسان حيث تحتوي على الكثير من فيتامين C وA و Dوالفلافونويد والبوتاسيوم والليكوبين والبيروكسيديزمضادات الأكسدة وبسبب احتوائها على هذه المضادات فإن الطماطم تقلل أخطار السرطان كما أظهرت العديد من الأبحاث لا سيما البروستاتا والرحم والبنكرياس والمستقيم والقولون والثدي والرئة.

كما تحمي الطماطم الجلد من أضرار الأشعة فوق البنفسجية الناتجة من الشمس بجانب دورها الهام في حماية البشرة من التجاعيد ، وأيضا لها دور في الحماية من هشاشة العظام وذلك بسبب احتوائها على فيتامين D والليكوبين .

2.المواد وطرق التحليل

2.1 جمع العينات

تم جمع العينات للموسم 2015 في شهر مايو لكل من الطماطم الخضراء ومتوسطة النضج والحمراء ، من ولاية الخرطوم محلية كرري منطقة كرري البلد الزراعية شمال امدرمان ، وجمعت عينات الطماطم من ثلاث أحواض مختلفة حيث قسم الحوض لأربعة أجزاء وأخذ من كل جزء ثمرة واحدة .

2.2 الكيماويات

2.2.1 حمض الخليك

99.5% ,density : 1.048 – 1.051 g\L , CDH

Pyrogallol 2.2.2

1.2.3, tri hydroxy benzene , 99% ,CDH.

2.2.3 بيروكسيد الهيدروجين

%6 (wt\v)

2.2.4 خلات الصوديوم

99% , CDH

2.2.5 كلوريد البوتاسيوم

97% , CDH .

2.2.6 كلوريد الصوديوم

%99.5 ، Alpha chemika

2.2.7 كلوريد الباريوم

99%, CDH .

2.3 الأجهزة

2.3.1 جهاز المطيافية الضوئية (Spectrophotometer)

JENWAY , 6505 UV\Vis Spectrophotometer , UK .

2.3.2 جهاز الطرد المركزي

CENTURION SCIENTIFIC LTD , K28OR Series , UK .

2.3.3 ميزان (Electronic balance)

SHIMADZU CORPORATION , UX820S , Japan .

2.4 طرق التحليل

2.4.1 استخلاص إنزيم البيروكسيديز من الطماطم

تم هرس عينات الطماطم ثم وزنت 50 جم من كل عينة في كأس سعة 250 مل ثم أضيف 50 مل من منظم الخلات PH=5.6 وتم تحريك الخليط جيدا باستخدام ساق زجاجية وترك لمدة 15 دقيقة ثم تم ترشيح الخليط باستخدام شاش طبي نظيف ، نقل الرشيح لكل عينه كلله إلى أنابيب في جهاز الطرد المركزي وتم تشغيل الجهاز لمدة 15 دقيقة بمعدل 6000 دورة /دقيقة .

تم نقل الرشيح لكل عينة من الأنابيب إلى كأس سعة 50 مل ثم تم تبريد الرشيح بالثلج إلى درجة حرارة C^0 5 ثم رشح مرة أخرى بورقة ترشيح .

2.4.2 الكشف عن وجود الإنزيم

نقل بالماصة المدرجة 1 مل من المستخلص الإنزيمي إلى أنبوبة اختبار نظيفة وجافة وأضيف إليه 0.5 مل من محلول pyrogallol (0.02M) و 1مل من بيروكسيد الهيدروجين .

وفي أنبوبة أخرى نقل بالماصة المدرجة 1 مل من المستخلص الإنزيمي وأضيف إليه 0.5 مل من محلول pyrogallol .سجلت مشاهدة كل من الأنبوبتين .

2.4.3 تقدير الفعالية الإنزيمية للمستخلص

نقل بالماصة المدرجة 0.5 مل من المستخلص الإنزيمي لكل عينة إلى كأس سعة 50 مل ، وأضيف إليه 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين (0.02 M) و 1 مل من محلول pyrogallol (0.02M) و 0.5 مل من المحلول المنظم PH=5.6 ، ثم قيست الامتصاصية للمحلول بجهاز المطيافية الضوئية عند الطول الموجي = 420 nm وأخذت نتائج الامتصاص سبعة مرات بمعدل قراءة كل 5 دقائق .سجلت النتائج وتم تمثيلها بيانيا ثم حسبت الفعالية الإنزيمية لكل لمستخلص كل عينة بالقانون :

$$\frac{\text{الحجم الكللي لخلية الجهاز} \times \text{الميل}}{\text{ثابت النفاذية} \times \text{طول المسار} \times \text{حجم الإنزيم}}$$

حيث:
ثابت النفاذية = 12

2.4.4 دراسة تأثير مادة التفاعل

نقل بالماصة المدرجة 1 مل من المستخلص الإنزيمي للطماطم الحمراء إلى كأس سعة 50 مل ، وأضيف إليه 0.5 مل من بيروكسيد الهيدروجين (0.02M) و 1مل من محلول pyrogallol (0.02M) و 0.5 مل من المحلول المنظم PH=5.6 . قيست الإمتصاصية للمحلول بواسطة جهاز المطيافية الضوئية عند الطول الموجي = 420 nm .

أعيدت التجربة عدة مرات باستخدام محلول pyrogallol بالتراكيز (0.005M , 0.045M , 0.065M) وسجلت النتائج .

2.4.5 قياس تأثير الرقم الهيدروجيني

نقل بالماصة المدرجة 1مل من المستخلص الإنزيمي لعينة الطماطم الحمراء وأضيف إليه 0.5 مل من بيروكسيد الهيدروجين (0.02M) و 0.5 مل من محلول pyrogallol (0.02M) و 1 مل من محلول منظم من الخلات PH=4 قيست الامتصاصية للمحلول بواسطة جهاز المطيافية الضوئية عند الطول الموجي = 420 nm وسجلت النتيجة .

أعيدت التجربة باستخدام محلول منظم من الخلات PH=10 .

2.4.6 تأثير إضافة بعض الأملاح

نقل بالماصة المدرجة 1 مل من المستخلص الإنزيمي للطماطم الحمراء وأضيف إليه 0.5 مل من بيروكسيد الهيدروجين (0.02M) و 0.5 مل من المحلول المنظم PH=5.6 و 1مل من محلول pyrogallol (0.02M) و1 مل من محلول كلوريد الصوديوم (0.1M) ، قيست الامتصاصية للمحلول باستخدام جهاز المطيافية الضوئية عند الطول الموجي 420 nm وسجلت النتيجة .

أعيدت التجربة باستخدام محاليل أملاح كلوريد البوتاسيوم وكلوريد الباريوم بالتركيز (0.1M) بدلا عن كلوريد الصوديوم .

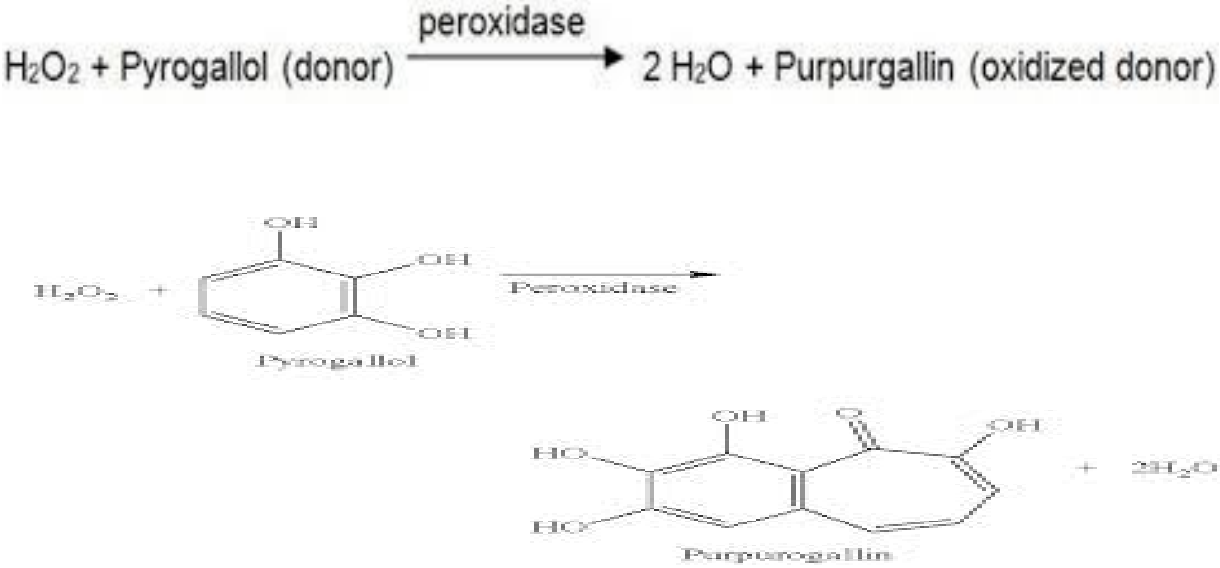
3. النتائج والمناقشة

3.1 الكشف عن وجود الإنزيم

ظهور لون برتقالي بني في الأنبوب الأول بينما ظل اللون كما هو في الأنبوب الثاني .

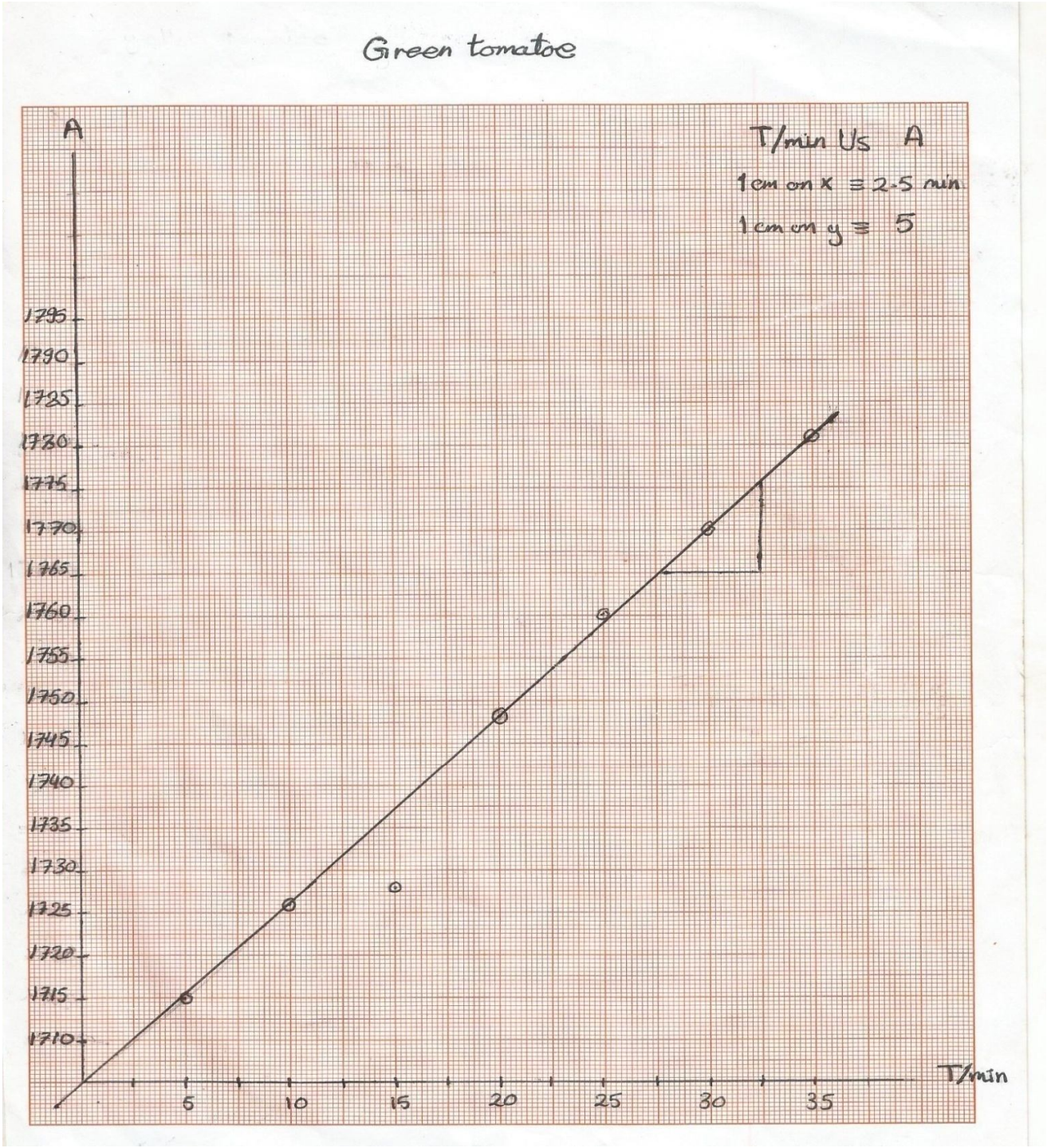
3.1.1 المناقشة

ظهور اللون البرتقالي البني في الأنبوب الأول يدل على وجود الإنزيم وذلك لأنه يعمل على أكسدة المادة الفينولية المتمثلة في مادة pyrogallol في وجود بيروكسيد الهيدروجين والذي يعمل كمستقبل للهيدروجين المنزوع من مادة التفاعل وفي غياب بيروكسيد الهيدروجين لا يتم هذا التفاعل لعدم وجود مستقبل وهذا يفسر عدم ظهور اللون في الأنبوب الثاني .



جدول (3.1) يوضح تقدير الفعالية الإنزيمية لمستخلص الطماطم الخضراء

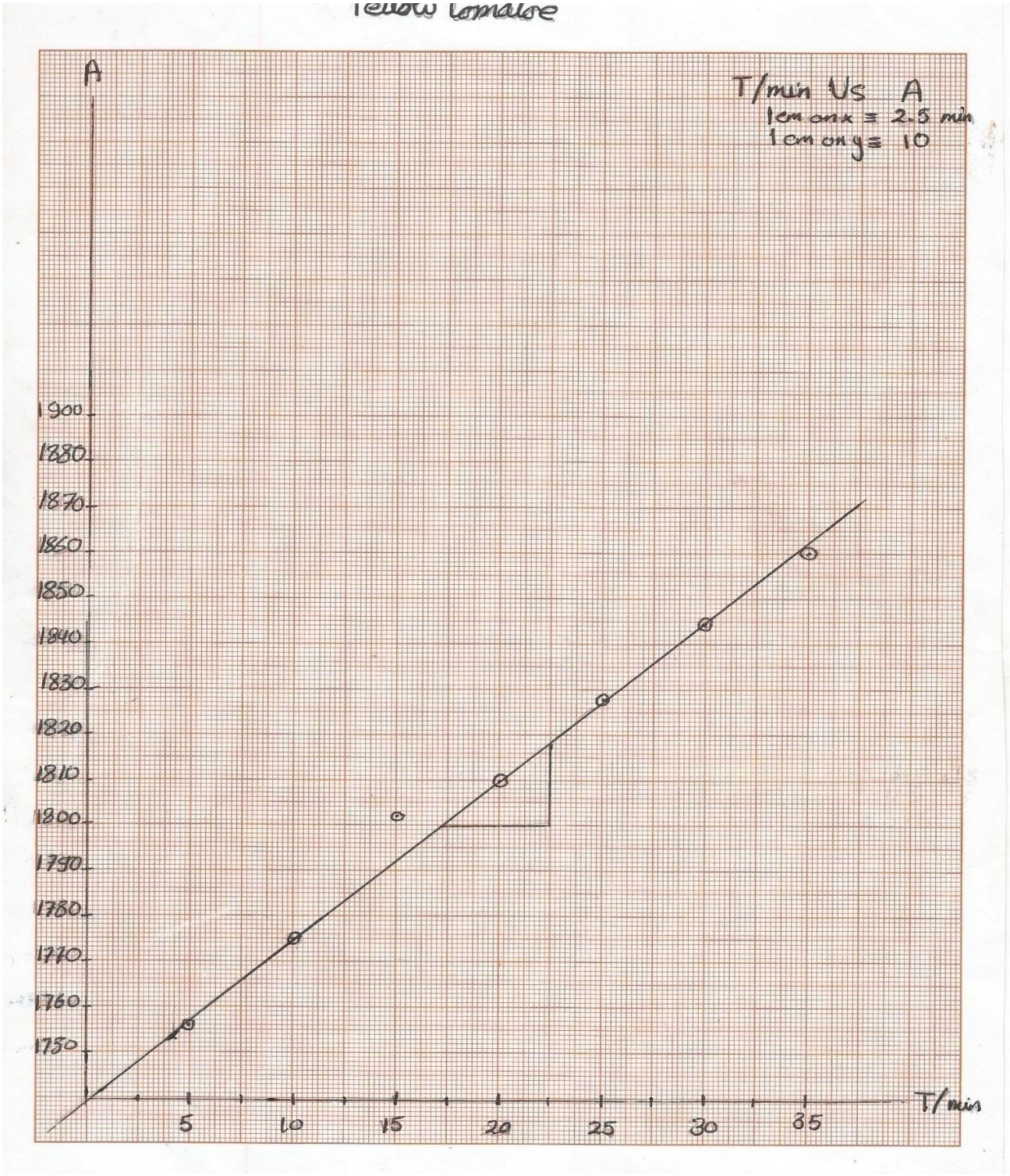
الزمن / دقيقة	الامتصاصية
5	1.715
10	1.726
15	1.728
20	1.748
25	1.760
30	1.770
35	1.781



شكل (3.1) رسم بياني يوضح تقدير الفعالية الإنزيمية للطماطم الخضراء

جدول (3.2) يوضح تقدير الفعالية الإنزيمية لمستخلص الطماطم متوسطة النضج

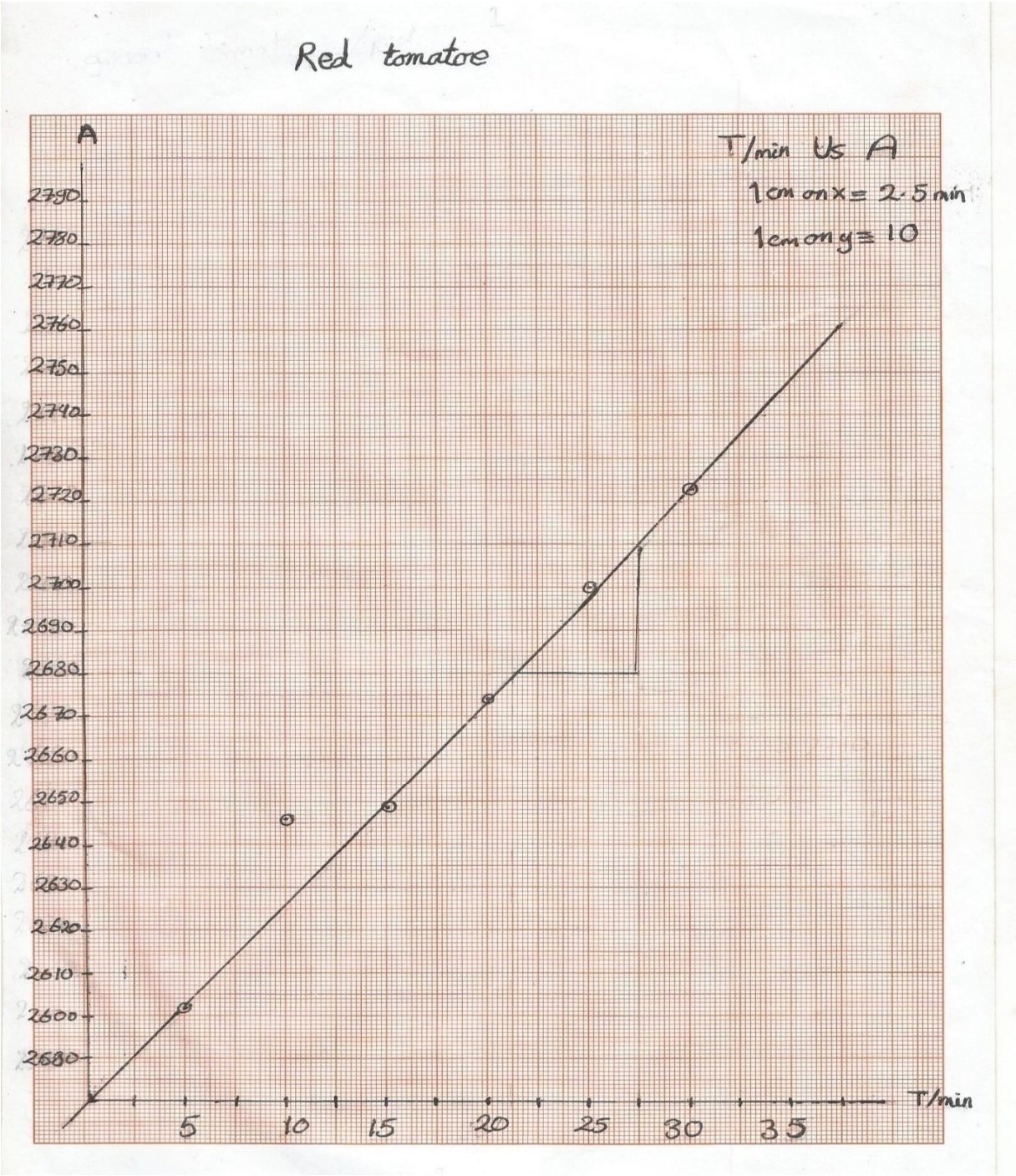
الزمن / دقيقة	الامتصاصية
5	1.757
10	1.775
15	1.802
20	1.810
25	1.828
30	1.844
35	1.860



شكل (3.2) رسم بياني يوضح تقدير الفعالية الإنزيمية للطماطم متوسطة النضج

جدول (3.3) يوضح تقدير الفعالية الإنزيمية لمستخلص الطماطم الحمراء

الزمن / دقيقة	الامتصاصية
5	2.602
10	2.646
15	2.649
20	2.674
25	2.700
30	2.722
35	2.782

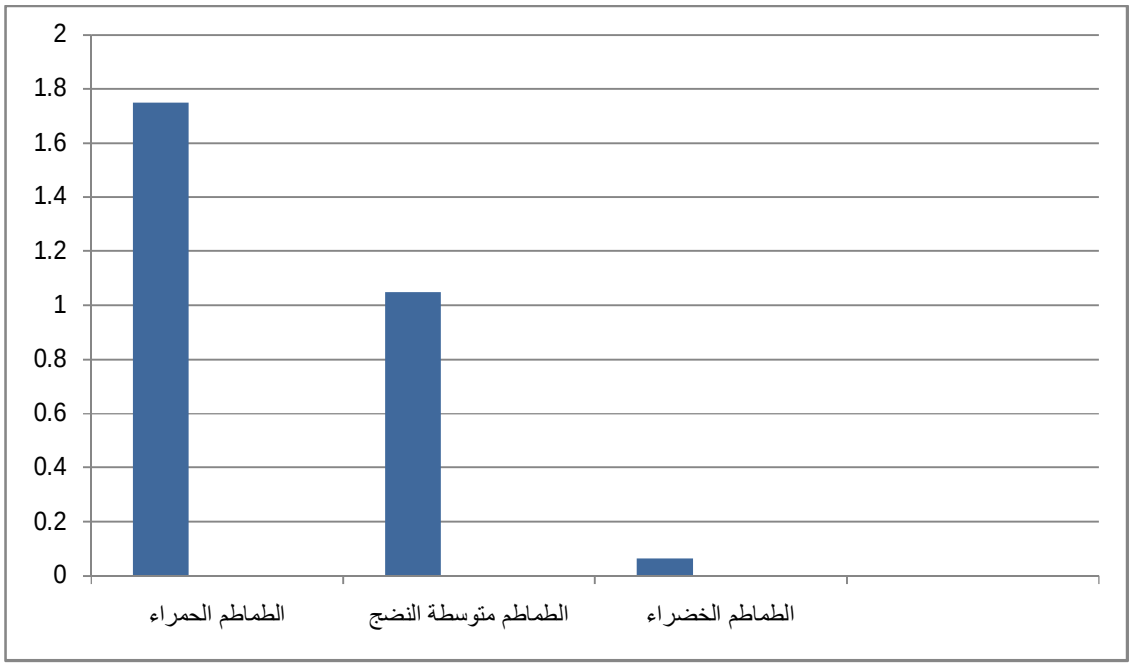


شكل (3.3) رسم بياني يوضح تقدير الفعالية الإنزيمية للطماطم الحمراء

3.2 فعالية المستخلص الإنزيمي لعينات الطماطم الثلاث

من النتائج المتحصل عليها وجد أن المستخلص الإنزيمي لثمرة الطماطم الحمراء أعطى فعالية نوعية أعلى بالمقارنة مع ثمرتي الطماطم متوسطة النضج والخضراء ، اذ بلغت الفعالية النوعية للطماطم الحمراء 1.75 ملغم/بروتين كللي ، ومتوسطة النضج بلغت 1.05 ملغم / بروتين كللي وللخضراء 0.065 ملغم / بروتين كللي .

وذلك لأن تركيز الإنزيم يختلف باختلاف مراحل نضج الثمرة ويزيد كلما زاد نضجها لذلك أعطى أكبر قيمة في الطماطم الحمراء وتدرجت القيمة بالزيادة مع مراحل النمو .



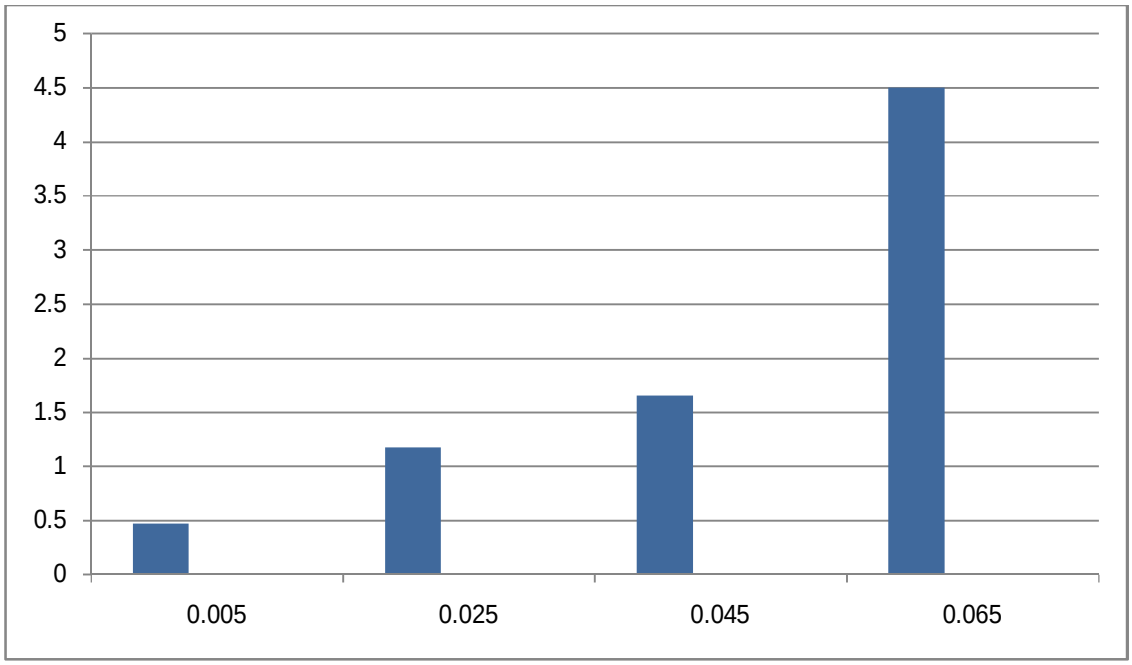
شكل (3.4) أعمدة بيانية توضح زيادة الفعالية الإنزيمية بزيادة نضج الثمرة

جدول (3.4) يوضح تأثير تركيز مادة التفاعل

تركيز M / pyrogallol	الامتصاصية
0.005	0.471
0.025	1.178
0.045	1.657
0.065	1.857

3.3 تأثير تركيز مادة التفاعل على المستخلص

كانت أعلى امتصاصية للمستخلص عند استخدام تركيز عالي من مادة التفاعل (pyrogallol) ، وذلك لأن سرعة التفاعل تزيد بزيادة تركيز مادة التفاعل وبالتالي تزيد الامتصاصية .



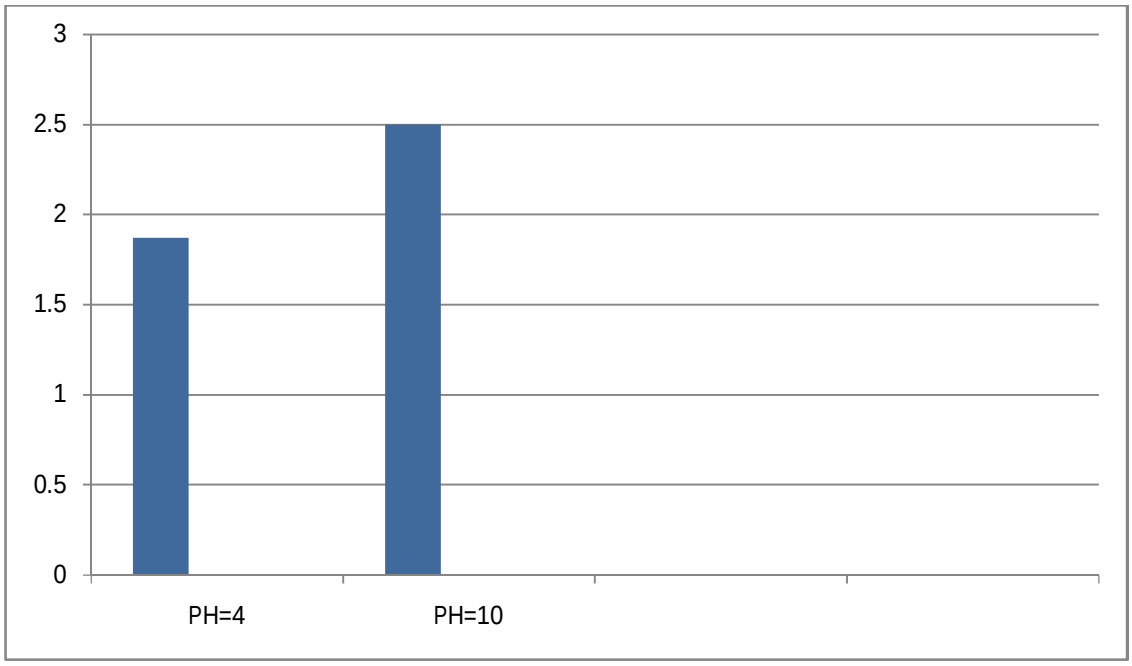
شكل (3.5) أعمدة بيانية توضح تأثير مادة التفاعل على امتصاصية المستخلص الإنزيمي

جدول (3.5) يوضح قياس تغير الرقم الهيدروجيني

PH	الامتصاصية
4	1.870
10	1.822

3.4 تأثير الرقم الهيدروجيني على المستخلص

تزيد فعالية الإنزيم في الأوساط الحمضية ويقل النشاط عند زيادة الرقم الهيدروجيني لذلك أعطى أعلى امتصاصية عند PH=4 وقلت القيمة عند PH=10 .



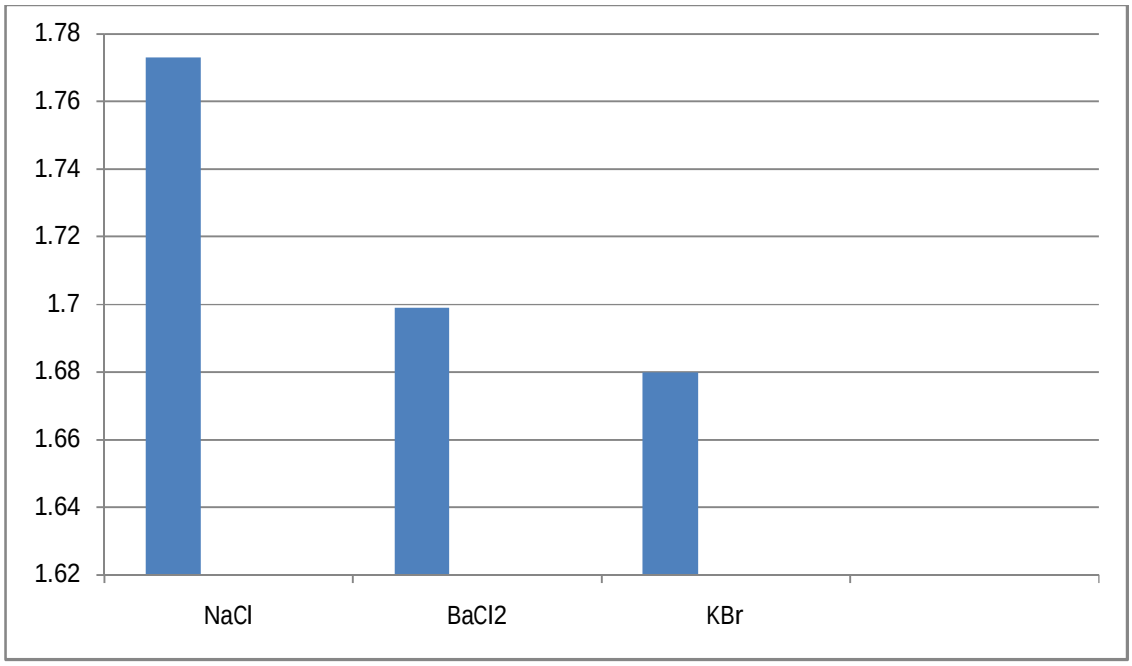
شكل (3.6) أعمدة بيانية توضح تأثير الرقم الهيدروجيني على امتصاصية المستخلص الإنزيمي

جدول (3.6) يوضح تأثير إضافة بعض الأملاح

الملح	الامتصاصية
كلوريد الصوديوم	1.773
كلوريد البوتاسيوم	1.680
كلوريد الباريوم	1.699

3.5 تأثير إضافة الأملاح

تعتبر الأملاح التي تمت إضافتها منشطات إنزيمية تؤثر على التفاعل وتزيد من سرعته ويختلف تأثيرها باختلاف نوع الملح المضاف فنجد أن اكبر قيمة امتصاص كانت عند إضافة ملح كلوريد الصوديوم بعده يأتي كلوريد الباريوم ثم كلوريد البوتاسيوم .



شكل (3.7) أعمدة بيانية توضح تأثير إضافة الأملاح إلى المستخلص الإنزيمي

التوصيات والمقترحات :

- توصي الدراسة بإجراء مزيد من البحوث في هذا المجال وذلك بدراسة عينات من الطماطم مأخوذة من مناطق مختلفة ذلك لأن محتوى الثمرة يختلف باختلاف نوع الثمرة وبيئتها .

- توصي الدراسة بإجراء بحوث إضافية لدراسة إنزيم البيروكسيديز المستخلص من مصادر غير الطماطم مثل التفاح والجوافة والمقارنة بينها وبين المستخلص الإنزيمي للطماطم .

- نقترح دراسة تأثير العوامل المختلفة على الإنزيم بصورة أوسع ودراسة عوامل أخرى غير التي تمت دراستها .

- نقترح مزيد من تطبيق طرق فصل وترسيب الإنزيمات للاستفادة من المستخلصات الإنزيمية واستخدامها في المجالات المختلفة .

- نقترح إجراء بحوث ودراسات في ظروف مختبرية أفضل في معامل متخصصة بالدراسات الكيميائية الحيوية وذلك لحساسيتها وحاجتها للدقة بدلا من المختبرات التعليمية بالجامعة.
- ولأن الطماطم تعتبر مكون غذائي مهم ومستهلك بصورة كبيرة نقترح دراسته بصورة أوسع .

المراجع العربية

- د.أحمد عبد الله ثابت ، " أساسيات في الكيمياء الحيوية " ، (2000) .
- د.أيمن سليمان المزاهرة ، أ.أميرة محمد الشناوي ، أ.حسن سعيد خليفة ، " الكيمياء الحيوية العملية " ، (2005) .
- د.السيد البدراوي يوسف البدراوي ، " الكيمياء الحيوية " ، (2009) .
- د.حسني فرح عثمان ، " مفتاح الإبداع لأساسيات الكيمياء الحيوية الطبية " ، (2011)
- د.حمادي أحمد إسماعيل ، " الكيمياء الحيوية " ، (2011) .
- أ.صابر منصور ، " أسس الكيمياء الحيوية " ، (2013) .
- د.عبد المنعم الأعسر ، " التحليل الطيفي للأنظمة الكيميائية والبيوكيميائية " .
- د.محجوب الحارث محمد ، " الكيمياء الحيوية الأساسية " .
- د.محمود زيد ، د.محمود أبو العمايم ، د.جمال الدين طنطاوي ، د.عبد السلام المرعي ، " كيمياء تحليلية عامة " .
- استخلاص إنزيم البيروكسيديز من التفاح ، " بحث تكميلي لنيل درجة البكالوريوس (الشرف) " ، (2013) ، جامعة الخرطوم ، الخرطوم .
- المجلة العراقية للعلوم ، المجلد 50 ، العدد 2 ، (2009) .

المراجع الإنجليزية

- **Kathrin J.Dennistor , Ioseph J.Topping , " Foundations of General, Organic and Biochemistry " , (2012) .**
- **Richard A.Harvy , PhD , Denise R.Ferrier , PhD , " Biochemistry" , (2011).**
- **Terener Forro , " Recent Advances in Nutritional Biochemistry and Metabolism " , (2013) .**
- **http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/peroxidase-enzymes.html**
- **http://scialert.net/fulltext/?doi=ijbc.2011.200.206&org=10**
- https://en.wikipedia.org/wiki/**Peroxidase**
- https://ar.wikipedia.org/wiki/**طماطم**
- **http://agricultureforme.blogspot.com/p/blog-page_3987.html**