Journal of Nature, Life and Applied Sciences (JNSLAS) • Vol 7, Issue 4 (2023) • P: 13 – 1
https://journals.ajsrp.com/index.php/jnslas
ISSN: 2522-3356 (Online) • ISSN: 2522-3356 (Print)

Producing a sweetened drink for diet using invertase enzyme extracted from some Iraqi dates

Dr. Zahraa S. Al-Garawi*[1], Mr. Ahmed R. Ahmed[1], Mr. Ahmed M. Hussein[1], Mrs. Naba` S. Nasir[1]

[1] College of Science | Mustansiriya University | Iraq

Received: 12/07/2023

Revised: 23/07/2023

Accepted: 18/09/2023

Published: 30/12/2023

* Corresponding author: z.mohsin@uomustansiriyah.edu.iq

Citation: Al-Garawi, Z. S., Ahmed, A. R., Hussein, A. M., & Nasir, N. S. (2023). Producing a sweetened drink for diet using invertase enzyme extracted from some Iraqi dates. *Journal of natural sciences, life and applied sciences, 7*(4), 1 – 13 . https://doi.org/10.26389/AJSRP.A120723

2023 © AISRP • Arab Institute of Sciences & Research Publishing (AISRP), Palestine, all rights reserved.

• **Open Access**

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license

Abstract: This research was conducted at the Department of Chemistry at Mustansiriyha University, to prepare a diet sweetie syrup for baking with no chemical additives. To achieve this aim, the activity of the enzyme invertase was determined in four types of Iraqi dates. By environmentally friendly method, the sugar solution was prepared from four types of dates (Khastawi, Ashrassi, Barhi, and Zuhdi) by crushing the dates and separating the mixture using a centrifuge. The crude enzyme was extracted and the solution was characterized using high-performance liquid chromatography HPLC. The enzymatic activity of the crude invertase enzyme was measured using the chemical method. The results showed a high activity of the invertase enzyme in all the studied types of dates, but the highest activity of the enzyme was in Barhi dates (0.072) units / kg, and the lowest activity was in Khastawi type (0.051) units / kg. There were percentage of monosaccharides in all types of dates but disaccharides appeared in Al-Barhi, Al-Zuhdi, and Al-Ashrasi only. The enzymatic solution of Al- Barhi was used to prepare a natural sweetened syrup by mixing with sucrose solution. The results of the qualitative test indicated di saccharide before adding the enzymatic solution and only monosaccharides after adding the enzymatic solution, which referred to a successful sweetie syrup. In a conclusion, invertase activity in dates is depending on the type of date, and that a natural sweetened syrup for drinking or eating can be easily and successfully prepared from date extract without chemical additives.

Keywords: invertase enzyme, Iraqi dates, high-performance liquid chromatography technique, sucrose.

إنتاج شراب محلى للحمية الغذائية باستخدام انزيم الانفرتيز المستخلص من بعض التمور العراقية

الدكتورة / زهراء سالم محسن*[1]، أ. احمد رياض احمد[1]، أ. احمد محمد حسين[1]، أ. نبا صباح ناصر[1]

[1] كلية العلوم | الجامعة المستنصرية | العراق

المستخلص: تم في هذا البحث تحديد فعالية إنزيم الانفرتيز والسكريات الأحادية والسكريات الثنائية في أربعة أنواع من التمور العراقية، اذ كان الهدف من الدراسة هو اختيار نوع التمر الذي يحوي انزيم الانفرتيز ذو الفعالية الأعلى واستخدامه لتحضير شراب محلى يستخدم في طبخ المعجنات والحلويات يكون صديق للبيئة ومساند للحمية الغذائية. تم اجراء البحث في مختبر أبحاث الكيمياء الحياتية، في قسم الكيمياء في الجامعة المستنصرية وذلك خلال شهر شباط ٢٠٢٣. تم استخلاص المحلول السكري من أربعة أنواع من التمور (الخستاوي ,الاشرسي، البرحي، الزهدي) بواسطة سحق التمور وفصل المزيج بجهاز الطرد المركزي، وبعدها تم استخلاص الانزيم الخام بواسطة جهاز فصل مايكروي وتشخيص المحلول الناتج باستخدام تقنية الكروموتوغرافيا السائل عالي الأداء. تم بعدها الكشف عن وجود السكريات والدهون وانواعها وقياس الفعالية الانزيمية لانزيم الانفرتيز الخام باستخدام الطريقة الكيمياوية. أظهرت النتائج وجود سكريات غير مختزلة ثنائية في كلاً من الاشرسي، البرحي، الزهدي فعالية عالية لانزيم الانفرتيز بجميع انواع التمور المدروسة، وكانت أعلى فعالية للإنزيم في ثمار التمر نوع البرحي حيث بلغت (0.072) وحدة /كغم، بينما أقل فعالية إنزيمية كانت في ثمار التمر نوع الخستاوي وبلغت (0.051) وحدة /كغم ثمار، بينت الكشوفات اللونية لمستخلصات التمور وجود نسبة من السكريات الاحادية في ثمار التمر نوع الخستاوي، ووجود سكريات ثنائية فقط في باقي الأنواع المدروسة البرحي والزهدي والاشرسي. تم استخدام المحلول الانزيمي المستخلص من ثمار البرحي لتحضير شراب محلى طبيعي Syrup، اذ اظهرت الكشوفات وجود سكريات ثنائية في المحلول السكري قبل إضافة المحلول الانزيمي ولكن بعد إضافة المحلول الانزيمي ظهرت سكريات أحادية فقط في الشراب المحلى. تستنتج الدراسة ان انزيم الانفرتيز متواجد في التمور بفعاليات مختلفة حسب أنواعها وانه يمكن تحضير شراب محلى طبيعي من ثمرة تمر البرحي بنجاح يكون نافع للحمية الغذائية بدون إضافات كيمياوية.

الكلمات المفتاحية: انزيم الانفرتيز، التمور العراقية، تقنية كروتوغرافيا السائل عالية الأداء، سكروز.

المقدمة

تعرّف الإنزيمات بأنها بروتينات كروية معقدة توجد في الخلايا الحية، وتعمل كمحفز حيوي يسهل تفاعلات التمثيل الغذائي في جسم الكائن الحي، في عام 1878 صاغ كوهني مصطلح "إنزيم" من الكلمة اليونانية "إنزوما" والتي تشير إلى تخمير الخبز بالخميرة. يشارك الانزيم في التفاعل بدون أن يتم استهلاكه، ويحقق معدلا مرتفعا من تكوين الناتج عن طريق خفض الطاقة الحرة لـ (ΔG^0) المطلوبة لحدوث التفاعل [1]. في التطبيقات الصناعية، يمكن أن تؤدي هذه الصفات للانزيم غير السام والقابل للتحلل الحيوي إلى منتجات عالية الجودة والكمية، بالإضافة الى منتجات ثانوية أقل وإجراءات تنقية أبسط، وأحد هذه الإنزيمات هو انزيم الانفرتيز، اذ يركز هذا البحث على طرق الاستخراج والطبيعة التحفيزية وتطبيقاتها في عالم اليوم. يلعب انزيم الانفرتيز دورا مركزيا في تحلل السكريات اذ يسمى بانزيم الاستقلاب يعمل على تحلل السكروز المائي، والذي سمي بسبب الانقلاب في الدوران البصري أثناء التحلل المائي للسكروز. يمكن أيضا الحصول على الإنزيمات من كائنات دقيقة مختلفة وبكميات كبيرة جدا دون استخدام أي طرق مقاومة للمواد الكيميائية [2]. تعد الكربوهيدرات المصدر الأساسي للطاقة في جميع الكائنات الحية، حتى السكريات غير المختزلة مثل التريهالوز أو السكروز لها أدوار أخرى مثل العمل كجزيء للإشارة بالإضافة إلى واقيات الإجهاد [3]. بالإضافة إلى ذلك ، يلعب السكر الأحادي مثل الكلوكوز أو الفركتوز وظائف تنظيمية في المسار الأيضي المركزي لعملية التمثيل الغذائي للخلية [4].

مشكلة الدراسة

الحصول على شراب للتحلية احادي السكريات باستخدام مصادر طبيعية صديقة للبيئة.

فرضيات الدراسة

1. مستخلص التمور يحتوي على مكونات متنوعة من الكربوهيدرات والدهون.
2. هناك تركيز عالي من الانزيم يعمل على تحلل السكريات الثنائية بالتمر يدعى انزيم الانفرتيز.
3. فعالية الانزيم متغيرة بتغير انواع التمور.
4. التمور ذات محتوى مختلف من المواد المحلية

اهمية الدراسة

الحصول على الانزيم المسؤول عن تحطيم سكر الكلوكوز (انزيم الانفرتيز) بطرق طبيعية من مصادر طبيعية متوفرة بالسوق المحلية مثل التمور، ومقارنة فعالية الانزيم المستخلص من أنواع مختلفة من التمور.

الهدف من الدراسة

الكشف عن فعالية الانزيم الأعلى بين أربعة أنواع من التمور لإيجاد حل لمشكلة الحصول على مواد محلية طبيعية تنفع للحمية الغذائية بدون الحاجة الى استخدام سكر صناعي

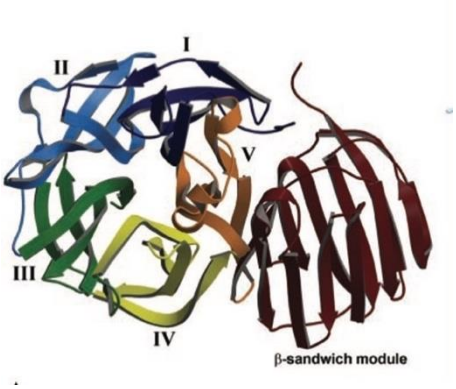
فرضية الدراسة

استخدام انزيم الانفرتيز المستخلص من ثمرة التمر لتحقيق هدف الدراسة وذلك لفعاليته بتجزئة السكر الثنائي الى سكريات احادية.

الاطار النظري و الادبيات السابقة Introduction and literature review

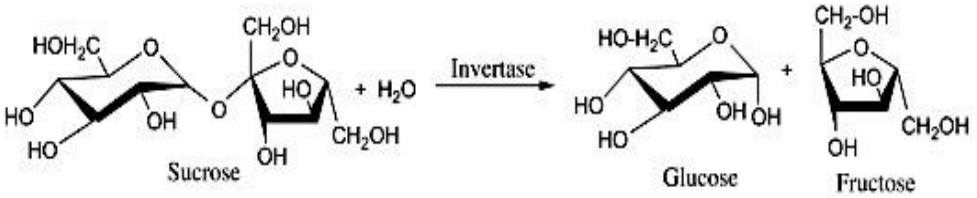
انزيم الانفرتيز Invertase (EC.3.2.1.26)

الاسم الرسمي لانزيم الانفرتيز هو بيتا فروكتوفيورانوسيداز ß-fructosidase، مما يعني أن التفاعل المحفز بواسطة الإنزيم هو التحلل المائي لمخلفات بيتا فروكتوفيورانوسيد غير المختزلة[5] . يوضح شكل رقم (1) التركيب الجزيئي لانزيم الانفرتيز، اذ يتواجد انزيم الانفرتيز في نطاق واسع بالمحيط الحيوي.



شكل رقم 1. التركيب الجزئيئ لانزيم الانفرتيز

يحفز هذا الإنزيم تحليل سكر السكروز الثنائي إلى سكريات الكلوكوز والفركتوز الأحادية والذي يعمل بدرجة حرارة ٤٥-٥٥ م ° وعند درجة الحموضة ٤,٥ الى ٥,٥ ، مخطط رقم (1).



مخطط رقم (1). التفاعل الذي يحفزه انزيم الانفرتيز

مصادر الإنزيم Enzyme sources

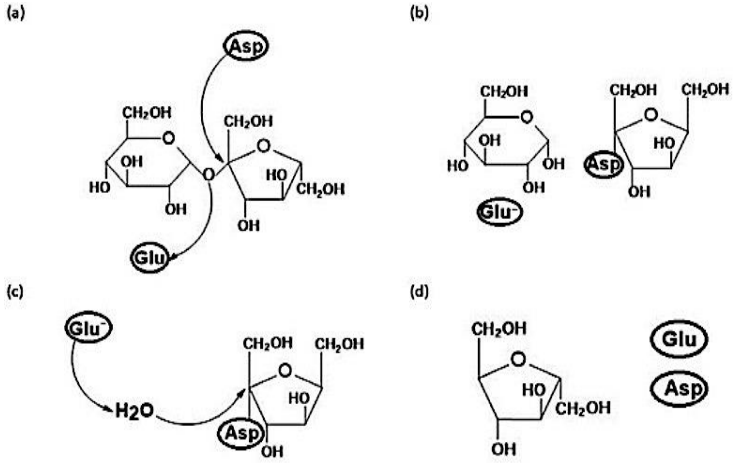
يتواجد انزيم الانفرتيز بشكل رئيسي في النباتات والكائنات الحية الدقيقة، اذ ان خميرة الخباز التي تسمى عادة خميرة بيكر هي السلالة الرئيسية المستخدمة لإنتاج انزيم الانفرتيز تجاريًا. توجد هذه الخميرة في الزراعة البرية ، على العنب والفواكه الأخرى [5]. على الرغم من أن النباتات مثل فاكهة الكمثرى اليابانية (Pyrus pyrifolia) ، والبازلاء (Pisum sativum) ، والشوفان (Avena sativa) يمكن استخدامها أيضًا كمصادر للانزيم ، إلا أن الكائنات الحية الدقيقة بشكل عام مثل .S-cerevisiae و Candida utilis و A. Niger تعتبر مثالية لدراستها [6].

مثبطات الانزيم Enzyme inhibitors

هناك عدد من العوامل التي تقوم بتثبيط نشاط انزيم الانفرتيز ، على سبيل المثال الايونات الثنائية للنحاس و الكالسيوم و الزئبق تظهر تثبيطا ملحوظا للإنزيم و كذلك المذيبات العضوية والاحماض المعدنية مثل حامض الكبريتيك كما يتم التثبيط بواسطة السيانيد في تفاعل ثنائي الطور .

آلية عمل الانزيم Mechanism of action

يوضح الشكل رقم (2) آلية عمل الانزيم حيث يحدث هجوم نكليوفيلي من مجاميع الهيدروكسيل بالحامض الاميني الاسبارتيك والحامض الاميني الكلوتاميك الموجودة في الموقع الفعال للانزيم على ذرات كربون الاصرة الكلايكوسيدية في جزيئة السكروز مما يسبب بانشقاق الاصرة وإنتاج جزيئة فركتوز-اسبارتيك و جزيئة كلوكوز-كلوتاميك و بالوسط المائي ستتكون جزيئة وسطية من اقتراب الجزيئتين وتنتهي بتكوين الناتج ، شكل رقم 2.



الشكل رقم (2) الآلية التحفيزية للإنفرتيز: (a) هجوم البروتونات والنوكليوفيليك على السكروز بواسطة الإنفرتيز ، (b) تكوين الكلوكوز والفركتوز – الانفرتيز الوسيط ، (c. & d) التحلل المائي للفركتوز – الانفرتيز، الفركتوز الوسيط الناتج كمنتج نهائي.

متماثلات الانزيم Isoenzymes

- خميرة بيكر Isozymes in Baker's yeast

يوجد إنفرتيز في أكثر من شكل في الخمائر بشكل عام، إما إنفرتيز خارج الخلية أو إنفرتيز داخل الخلايا [7]. كلاهما يختلف في تسلسل الأحماض الأمينية خاصة أن الانفرتيز الداخلي لا يحتوي على السيستين [8]. اما الخميرة فانها تحتوي على انفرتيز خارجي عبارة عن بروتين سكري يحتوي على حوالي 50٪ كربوهيدرات، 5٪ مانوز ، 3٪ كلوكوزامين والوزن الجزيئي للانزيم بحدود 135 كيلو دالتون، بينما تلك الخميرة التي تحتوي على انفرتيز داخلي لاتحتوي على كربوهيدرات وله وزن جزيئي 270 كيلو دالتون[9] .

- اشكال الانزيم في النباتات Isoforms of Invertase in plants

توجد العديد من اشكال الانفرتيز و بخصائص كيميائية حيوية مختلفة ومواقع تحت خلوية في النباتات [10]. على أساس قابلية الذوبان ، ودرجة الحموضة المثلى ، ونقطة تساوي الكهرباء والتوطين تحت الخلوي ، وبناءا على ذلك، يمكن تصنيف الانفرتيز النباتي إلى ثلاث مجموعات فرعية: فجوي (Olar-vacu) (حمض قابل للذوبان) ، حشوي (cytoplasmic) (قلوي قابل للذوبان) ، وإنفرتيز مرتبط بجدار الخلية. إن وجود العديد من اشكال الانفرتيز في الطبيعة له دور مفيد وظيفيًا للنباتات [11].

- الإنزيم المرتبط بجدار الخلية cell wall bound Invertase

إلانفرتيز غير قابل للذوبان عبارة عن بروتين مرتبط بجدار الخلية مع وزن جزيئي متغير يتراوح بين 28 و 64 كيلو بايت. يعمل بدرجة حموضة مثالية تبلغ 4.0 ودرجة حرارة مثالية تبلغ 45 درجة مئوية [12]. يتم تثبيط نشاطه بواسطة 6.2 ملي مولار من كبريتات النحاس. يتم توطينه في نسيج السويداء القاعدية والقمل في حبات الذرة باستخدام تقنيات المناعة ، والتي يعتقد أنها تشارك في التطور الطبيعي لخلايا السويداء وخلايا الأم في أنسجة القمل في الذرة. باستخدام الفاصوليا كمواد نباتية ، في تطوير البذور ، تم العثور عليها في الجدران الرقيقة من غلاف البذور لخلايا النسيج. إنه عضو حقيقي في β-fructofuranosidases الذي يمكن أن يتفاعل مع السكروز والرافينوز كركائز [13].

- أنفرتيز الفراغ vacuolar Invertase

يحتوي انفرتيز الفراغ Vacuolar Invertase على نقطة تعادل كهربائي حمضية بين 4.5 و 5.0. إلى جانب السكروز، فإنه يحلل أيضًا رافينوز كعضو حقيقي في عائلة β-fructofuranoside. يفقد الإنزيم نشاطه عندما يتفاعل مع أيونات المعادن الثقيلة مثل الزئبق أو الفضة. يعمل الكلوكوز النتاج من التحلل كمثبط غير تنافسي للإنزيم اما الفركتوز فيعمل مثبطًا تنافسيًا . أن عديد الببتيد الناضج هو N- جليكوزيلاتي ذو كتلة جزيئية تقارب 70 كيلو دالتون[14] . كان الانفرتيز أول حامض نباتي مرتبط بجدار الخلية من الجزر، اذ كشفت هذه الدراسة أن كل شكل من الانفرتيز يتم ترميزه بواسطة جين مختلف. على الرغم من أن تسلسلات الأحماض الأمينية تشترك في بعض الميزات الشائعة مثل خماسي الببتيد (βF-motif) Asn-Asp-Pro-Asn-Gly ، وهو قريب من النهاية الامينية للبروتين الناضج ، وبقايا السيستين Cys و الأحماض الأمينية المجاورة ، والتي تقع بالقرب من النهاية الكربوكسيلية[15] . يحتوي الحامض القابل للذوبان Invertase

(AIV) على اثنين أو أكثر من اشكال الإنزيم، والتي يمكن تنقيتها وتمييزها من النباتات مثل فاكهة الكمثرى اليابانية ، أو ليكتين الشعير أو إنزيم اللاكتينيز. لقد وجد أن AIV I و AIV II عبارة عن إنزيمات أحادية بوزن جزيئي 80 Kda و 86 Kda على التوالي[14] . يؤدي الحامض القابل للذوبان Invertase وظائف بيولوجية مهمة تتعلق باستقلاب السكروز ويتحلل في الغالب السكروز بالماء من أجل عمليات النمو والتطور. أيضًا ، يساعد التحلل المائي للسكروز بواسطة الانفرتيز القابل للذوبان في تنظيم الضغط الأسموزي الذي يتم التحكم فيه عن طريق تمدد الخلية الذي يعتمد على حجم الفجوة [17,16].

تطبيقات الانفرتيز Applications of invertase

يتميز الانزيم بقابليته على جذب جزيئات الماء واختزالها على التركيب مما يجعل له خاصية مفيدة بصنع الحلوى و يستخدم بإنتاج الكليسرول وحامض اللاكتيك الناتجة من تخمير السكروز كونه الركيزة التي يعمل عليها الانزيم ، كما يستخدم في صناعة العسل الصناعي وعوامل التلدين التي تستخدم في مستحضرات التجميل. يعتبر إنفرتيز عاملًا قويًا مضادًا للميكروبات ومضادًا للأكسدة يساعد في الوقاية من الإصابة البكتيرية وتخمير الأمعاء بسبب الأكسدة[18] . يؤثر التحلل المائي للسكروز بواسطة الانفرتيز على الضغط الاسموزي للخلايا وبالتالي يساعد في استطالة الخلايا ونمو النبات. ان تطوير جذور الجزر أو استطالة سيقان الفاصوليا هي بعض أعضاء النبات التي تحتوي على نشاط عالٍ من حامض إنفيرتيز وخاصة في الأنسجة سريعة النمو. تؤدي كل من نظائر الإنزيمات ، أي إنفرتيز جدار الخلية وفجوة إنفرتيز ، وظائف في تجزئة السكروز. يمكن ملاحظة المستويات الأعلى من نشاط الانفرتيز في الشوفان الداخلي الذي يعكس زيادة متطلبات الطاقة والكربون للحفاظ على التفاعلات الكيميائية الحيوية خلال فترة النمو ، مما يشير إلى وجود علاقة وثيقة بين معدل النمو ومستوى نشاط الانفرتيز. لوحظ أيضًا أن تحلل الكربوهيدرات في الأنسجة يتناسب مع التحسينات في التنفس ، والتخليق الحيوي للبروتين وجدار الخلية خلال فترة النمو [14].

منهجية الدراسة Research methodology

- اختيار أنواع تمور عراقية مختلفة
- تشخيص المحلول السكري
- استخلاص المحلول الأنزيمي
- قياس فعالية الانزيم الخام
- إنتاج شراب محلى

المحاليل والأجهزة المستعملة Materials and methods

المحاليل المستعملة Solutions

أ- محلول السكروز : يوزن 5.13 غرام من السكروز يذوب في 5مل ماء مقطر وتوضع في دورق معياري 50 مل وتملئ بالماء المقطر لحد العلامة.

ب- محلول 3,5-Dinitrosalicylic acid DNS: تمت اذابة 1غرام من حامض 3،5-ثنائي نايتروساليسيليك في 50 مل من الماء المقطر، ثم أُضافة 20 مل من هيدروكسيد الصوديوم واكماله الى حجم نهائي 100 مل بالماء المقطر.

ج- محلول فيتامين B1 100ppm: تمت اذابة 1غم من فيتامين B1 في 25 مل ماء مقطر.

د- محلول 10 ppm: يخفف 0.5 مل من محلول 1000 ppm في 50 مل من الماء المقطر.

الأدوات المستعملة Materials

أنواع من ثمرة التمر (البرحي ،الاشرسي، الزهدي، الخستاوي) كمادة أولية في البحث تم تجهيزها من الشركة العامة لإنتاج التمور، في بغداد العاصمة. المصدر الرئيسي لهذه التمور هي محافظة البصرة الجنوبية. فيتامين B2 النقي لمعايرة جهاز كروموتوغرافيا السائل عالي الأداء من ، محلول سكروز صناعي من Aldrich

الاجهزة المستعملة Instruments

عمود فصل مايكروي، كروموتوغرافيا السائل عالي الأداء، جهاز المطياف (1900i SHIMADZU,(JAPAN، حمام مائي مزود برجاج (Memmert, (Germany ، جهاز الطرد المركزي Beckman model TJ-6

.

طرق العمل Methods

- تحضير عينة التمر Date preparation

تم جمع 4 انواع من ثمار التمور (الزهدي ،الاشرسي، البرحي ، الزهدي) من الشركة العراقية لإنتاج التمور في العاصمة بغداد وذلك خلال شهر شباط ٢٠٢٣ .

طريقة الاستخلاص Extraction method

تم نزع النوى من الثمار المجهزة (1 كغم من كل نوع) وغسل التمور باستخدام الماء المقطر للتخلص من الأوساخ والأتربة العالقة. لتحضير المستخلص، تمت اذابة 100 غ من كل نوع من ثمار التمر المدروسة في 100 مل ماء مقطر، مع التحريك المستمر بمحرك زجاجي و بعدها فُصل المزيج بجهاز الطرد المركزي بسرعة 4500 rpm لمدة 30 دقيقة، تم بعدها فصل 10 مل من الراشح من كل نوع والتخلص من الراسب [19]

تشخيص المستخلص Characterization

- تقنية كروتوغرافيا السائل عالية الأداء HPLC

استخدم فيتامين vitamin B2 النقي كمادة اساس لمعايرة الجهاز، اذ حُضّر محلول ppm1000 بوزن 0.025 غم من المادة في 25 مل، وتم استخدام هذا التركيز لتحضير تركيز ادنى ppm10 لايجاد الطول الموجي والامتصاصية المطلوبة، كان الطول الموجي الأمثل له بحدود 440nm اذ استخدم المحلول المخفف للتشخيص باستخدام جهاز HPLC نوع Shimadzu-Japan ، تم حقن 20 مايكروليتر الى عمود الفصل C18، حجم الجسيمات ٥ مايكروميتر (Revised phase column (Macherey Nagel-Germany ذو ابعاد ٢٥٠ * ٤,٦ ملم وتالف الطور المتحرك من ميثانول: ماء مقطر، وكانت نسبة الجريان 1 مل / دقيقة و محلول الاسترجاع حامض الفسفوريك في الماء (0.1% v/v).

- الكشوفات النوعية Quantitative tests [20]

أ- كشوفات السكريات Saccharides tests

1. كاشف مولش Mulish test

1 مل من المستخلص يضاف لها 1 مل من الكاشف ويوضع داخل حمام مائي لمدة 3-5 دقائق ونلاحظ ظهور النتيجة. النتيجة الموجبة هي ظهور حلقة بنفسجية داكنة بين طبقتين.

2. كاشف بندكت Benedict test

1 مل من المستخلص يضاف لها 1 مل من الكاشف ويوضع داخل حمام مائي لمدة 3-5 دقائق بعدها نلاحظ النتيجة . النتيجة الموجبة ظهور راسب احمر-برتقالي.

3. كاشف بارفويد Barfoed test :

1 مل من المستخلص يضاف له1 مل من الكاشف ويوضع داخل حمام مائي لمدة 3-5 دقائق نلاحظ بعدها النتيجة. النتيجة الموجبة ظهور راسب احمر بني و محلول ازرق.

4. كاشف سلفانوف Silvanof test

يؤخذ 1 مل من المستخلص يضاف له 1 مل من الكشف ويوضع داخل حمام مائي لمدة 3-5 دقائق نلاحظ بعدها النتيجة. النتيجة الموجبة ظهور لون وردي محمر.

ب- كشف الدهون Fatty acid tests

- كشف خلات النحاس

1 مل من المستخلص يضاف له 1 مل من الكاشف ويوضع داخل حمام مائي لمدة 3-5 دقائق نلاحظ بعدها النتيجة. النتيجة الموجبة ظهور راسب ازرق مخضر.

المنحني القياسي للسكر Standard curve of glucose

أ- المحلول القياسي الأساسي Stock solution 50 مل مول

0.5 غرام من الكلوكوز في 50 مل ماء مقطر

ب- المحلول القياسي الفاعل working solution

تحضير سلسلة من التراكيز (5 ملي مول - 30 ملي مول) باستخدام المحلول الأساسي 50 مل مول.

ج- تحضير المنحني القياسي

1مل من المستخلص واضيف له 1 مل من محلول الكلوكوز المحضر وتم حضن المحلول في حمام مائي عند درجة حرارة 40 °م لمدة 10 دقائق، ثم اضيف له 1مل من محلول DNS المحضر، ووضع داخل حمام مائي عند درجة حرارة 100 °م لمدة 10 دقائق . بعدها ، تم تبريد الأنبوب واضافة 1 مل ماء مقطر، ثم قيست الامتصاصية عند طول موجي 450 نانوميتر ضد محلول السيطرة (20 مل ماء مقطر + 1مل محلول الغلوكوز).[19]

تقدير الفعالية الانزيمية Determination of Invertase activity

1مل من المستخلص واضيف له 1 مل من محلول السكروز المحضر وتم حضن المحلول في حمام مائي عند درجة حرارة 40 م^0 لمدة 10 دقائق، ثم اضيف له 1مل من محلول DNS المحضر، ووضع داخل حمام مائي عند درجة حرارة 100 ^{0}م لمدة 10 دقائق . بعدها ، تم تبريد الأنبوب واضافة 1 مل ماء مقطر، ثم قيست الامتصاصية عند طول موجي 450 نانوميتر ضد محلول السيطرة (20 مل ماء مقطر + 1مل محلول السكروز).).[19]

تم استخدام معادلة الخط المستقيم في المنحني القياسي للسكر (y=25.23x) لاحتساب تركيز سكر الكلوكوز الناتج من التحلل بواسطة انزيم الانفرتيز والذي يعكس فعالية الازيم .

تحضير الشراب المحلى Preparation of the sweetie syrup

تم مزج 9 مل من المحلول السكري مع 1 مل من المستخلص الانزيمي.).[19]

الكشف عن السكريات بالشراب المحلىTests of the sweetie syrup

تم استخدام كاشف بندكت لمعرفة نشاط السكروز قبل وبعد اضافة المحلول الانزيمي الى المحلول السكري.

1 مل من المحلول السكري-الانزيمي أضيف لها 1 مل من كاشف بندكت ووضعت داخل حمام مائي لمدة 3-5 دقائق بعدها تم اختبار النتيجة .

التحليل الاحصائي

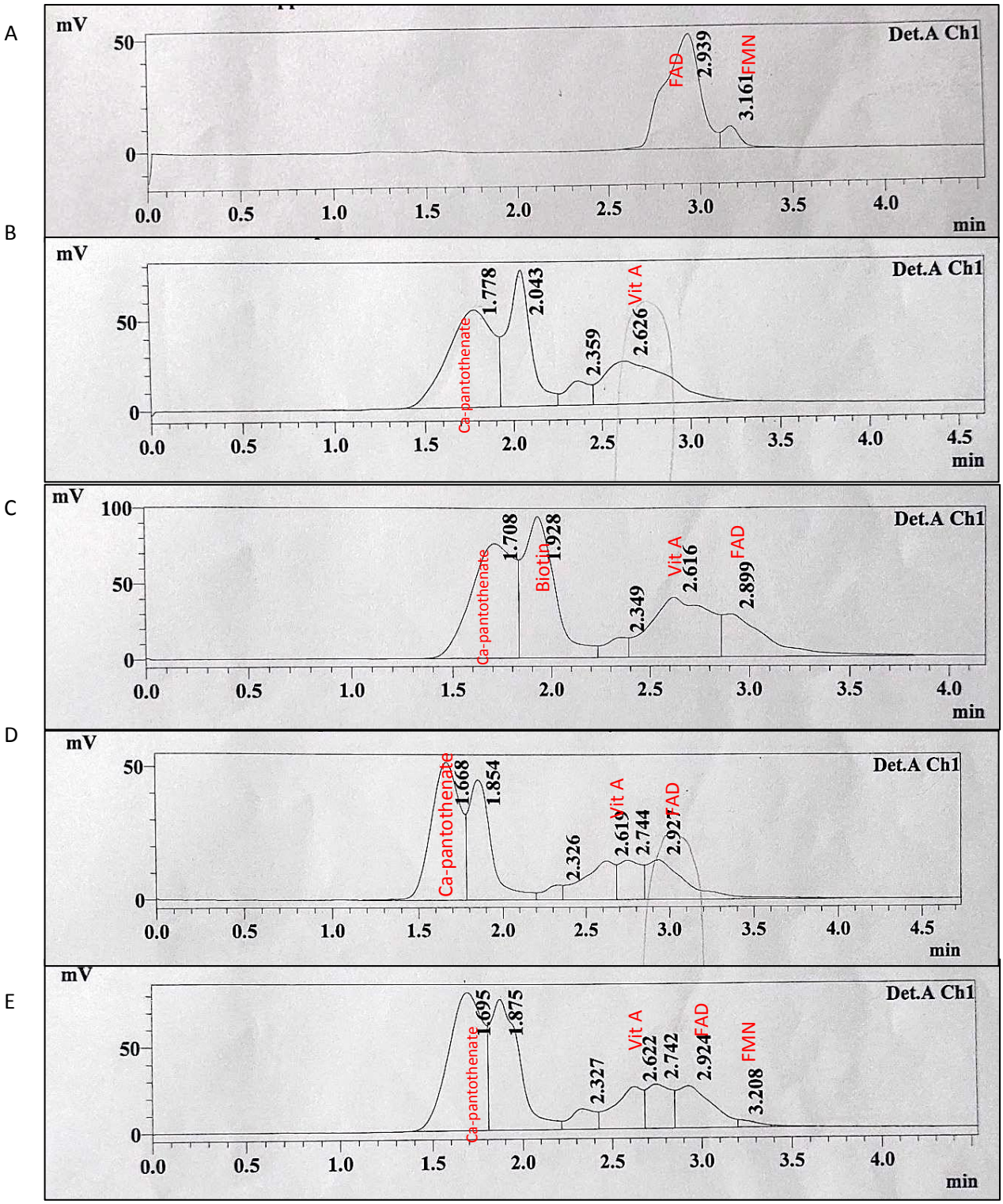
تم استخدام برنامج Microsoft ® Excel for Mac اصدار 15.38 لتنفيذ التحليل الاحصائي.

النتائج والمناقشة

تشخيص المستخلص

- طيف كروموتوغرافيا السائل عالي الأداء

يبين الشكل رقم 3 طيف الامتصاص لمستخلص التمر من الانواع الأربعة (B –E) مقارنة بطيف الامتصاص لفيتامين ب 2 الذي استخدم للمعايرة . كان زمن الاسترجاع مستمر على مدى 4 دقيقة . اظهرت النتائج ان مستخلص الخستاوي والبرحي والاشرسي تحتوي على نسبة جيدة من ونسبة من الكالسيوم المرتبط (زمن الاسترجاع 1.6) ونسبة من حامض الفوليك (وقت الاسترجاع 1.6- 1.7 دقيقة) ونسبة من البايوتين (زمن الاسترجاع ١,٨-١,٩ دقيقة) ونسبة من فيتامين أ (زمن الاسترجاع ٢,٥- ٢,٦ دقيقة ونسبة من Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) (زمن الاسترجاع ٢,٤ – ٢,٩ دقيقة) بينما احتوت ثمرة البرحي ايضا على نسبة من FMN Flavin Adenine Mononucleotide (زمن الاسترجاع ٣,١- ٣,٢ دقيقة)[20,21]



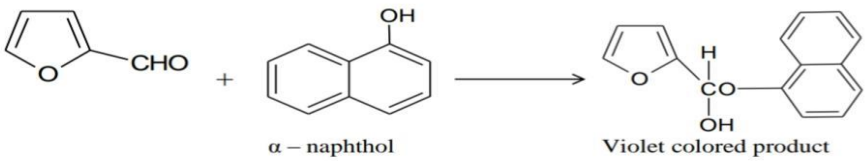
شكل رقم (3). طيف كروموتوغرافيا السائل عالي الأداء للمحلول السكري المستخلص من ثمرة التمر. A) فيتامين ب ٢، B) ثمرة الزهدي ، C) ثمرة الاشرسي، D) ثمرة البرحي، E) ثمرة الخستاوي.

- **الكشوفات اللونية**

أ- كشوفات السكريات:

1. كشف مولش :

يتفاعل الفورفورال خماسي الحلقة الناتج من السكر مع الفا-نفثول ليتكون مركب أحمر بنفسجي يظهر كحلقة بنفسجية بين سطحين في حالة وجود سكر، شكل رقم (4).



شكل رقم (4). تفاعل كشف مولش. ظهور حلقة بنفسجة داكنة بين محلولين

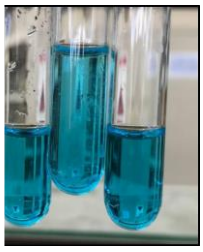
النتيجة كانت موجبة في جميع انواع التمر فنلاحظ ظهور حلقة بنفسجة مما يدل على وجود سكريات وحسب الصورة الظاهرة في الشكل رقم (4) .

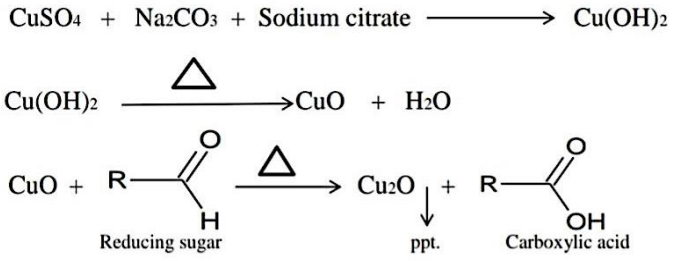
2. كشف بندكت:

يتم اكسدة السكريات المختزلة عن طريق ايونات النحاس فينتج حامض كربوكسيلي ، ويتكون اوكسيد النحاسوز الاحمر حيث يظهر بشكل راسب احمر او برتقالي كما في المعادلات الموضحة بالشكل 5 أ.

النتيجة كانت سالبة في الانواع (زهدي و برحي واشرسي) لم نلاحظ ظهور راسب برتقالي مما يدل على عدم وجود سكر مختزل كما في الشكل رقم (5 ب) اما في الخستاوي فكانت النتيجة موجبة وظهور راسب برتقالي مما يدل على وجود سكر مختزل . كما في الشكل رقم (5 ج) .

ج ب أ

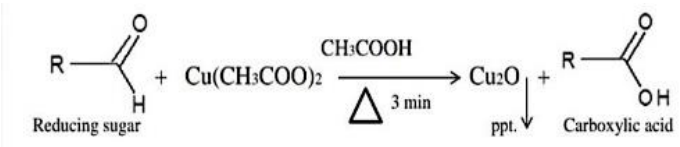




شكل رقم (5). تفاعل كشف بندكت. (أ) التفاعلات الكيمياوية، (ب) السكريات غير المختزلة تظهر بلون ازرق شفاف ، (ج)السكر المختزل يظهر على شكل راسب برتقالي

3. كشف بارفويد:

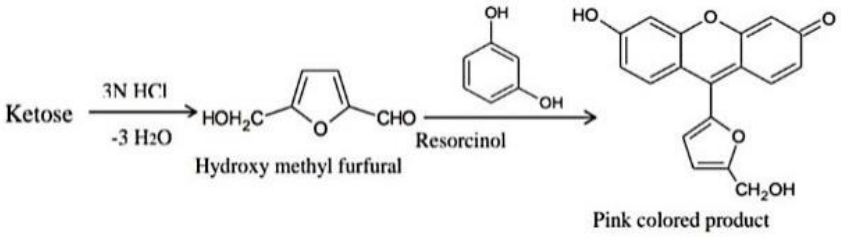
تفاعل كاشف بارفويد (محلول خلات النحاسيك وحامض الخليك) مع السكريات الموجودة بالمحلول السكري في جميع أنواع التمور وانتج راسب محمر دلالة على وجود سكريات الفركتوز واللاكتوز المختزلة، كما في الصورة في الشكل رقم (6).



شكل رقم (6). تفاعل كشف بارفويد. (أ) التفاعلات الكيمياوية، (ب) السكريات الأحادية راسب بني محمر.

4. كشف سلفانوف:

يتفاعل كاشف سلفانوف (هيدروكسي مثيل فورفورال) بوجود السكر سداسي ذرات الكربون و وسط حامضي لينتج مركب ذو لون وردي محمر،



شكل رقم (7). تفاعل كشف سلفانوف. التفاعلات الكيمياوية، وصورة تبين نتيجة كشف السكريات سداسية ذرات الكربون، مركب وردي محمر.

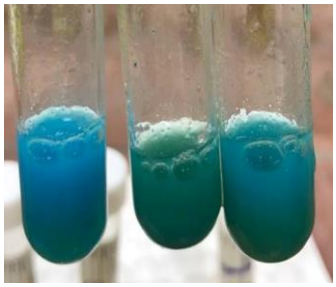
شكل رقم 7 النتيجة كانت موجبة في جميع انواع التمر فنلاحظ ظهور محلول احمر اللون وبالتالي فان السكر سداسي كما موضح بالصورة في الشكل (7) .

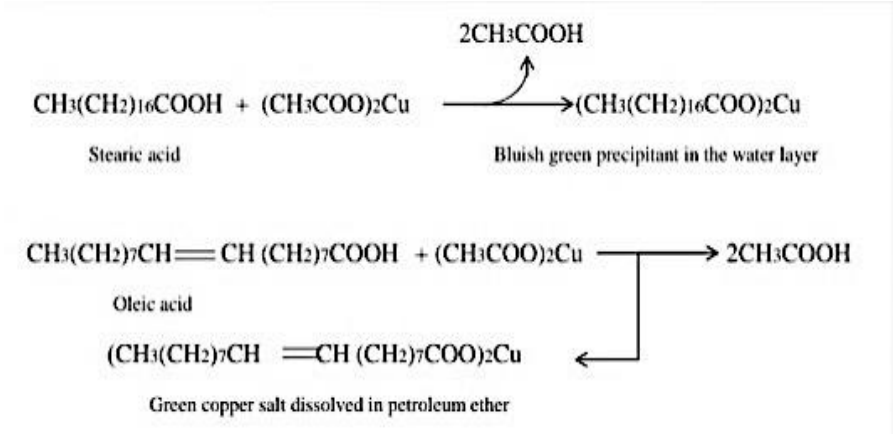
ب- كشوفات الدهون

- كشف خلات النحاس :

الكليسيريدات المتعادلة ليس لها القابلية على التفاعل مع محلول خلات النحاس، ولكن الأحماض الشحمية الحرة المشبعة تتفاعل مع هذا المحلول لتنتج راسب أخضر مزرق (في الطبقة المائية السفلى) بينما الأحماض الشحمية غير المشبعة تعطي مع محلول خالت النحاس أملاح النحاس الخضراء اللونية والذائبة في طبقة البترولیوم ايثر وبذلك يمكن بسهولة التمييز بين الأحماض الشحمية المشبعة وغير المشبعة بواسطة هذا التفاعل [22] . شكل رقم (8).

كانت نتيجة الكشف في هذه الدراسة ظهور راسب اخضر مزرق في جميع انواع ، دلالة على وجود الاحماض الشحمية المشبعة، كما في الشكل رقم (8) جدول رقم 2.





شكل رقم (8). تفاعل كشف خلات النحاس. التفاعلات الكيمياوية وصورة تبين نتيجة كشف خلات النحاس للدهون المشبعة.

جدول رقم (2) نتائج الكشوفات اللونيه للمحلول السكري.

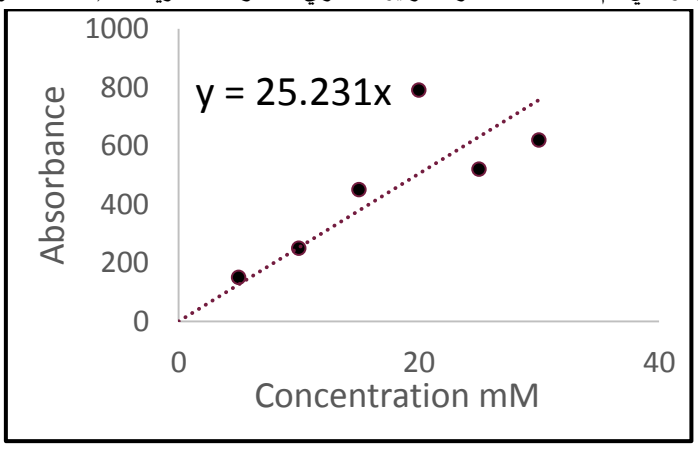
نوع التمر	كشف مولش	كشف بندكت	كشف بارفويد	كشف سلفانوف	كشف خلات النحاس
الزهدي	+	-	+	+	+
الاشرسي	+	-	+	+	+
البرحي	+	-	+	+	+
الخستاوي	+	+	+	+	+

المنحني القياسي للسكر

جدول رقم (3) امتصاصيه المحاليل القياسيه

تركيز المحلول القياسي الفاعل mM	الامتصاصية
30	620
25	520
20	790
15	450
10	250
5	150

يوضح جدول رقم 3 قيم الامتصاصية لسلسله تراكيز المحلول القياسى من ٥ الى ٣٠ ملي مول، كما يوضح شكل رقم (8) المنحني القياسي لسكر الكلكوز والذي تم استخدامه لمعرفة تركيز السكر في المحلول السكري بعد إضافة الانزيم.



شكل رقم (8) المنحنى القياسى لسكر الكلكوز

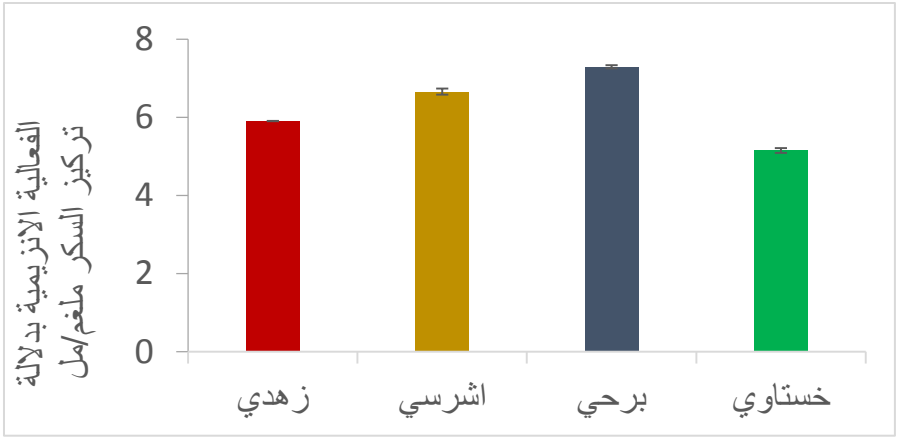
الفعالية الانزيمية

دلت النتائج المبينة في جدول رقم 4 و شكل رقم 9 على فعاليات انزيمية مختلفة اذ تراوح تركيز سكر الكلوكوز من – 0.051 0.072 ملغم/ مل حسب نوع التمر تحت الدراسة. ظهرت اعلى فعالية انزيمية بنوع التمر برحي، لذلك تم اختيار المحلول الانزيمي المستخلص من ثمرة البرحي لتحضير الشراب المحلى. يبين الشكل (9) فعالية إنزيم الانفرتيز في اربع أنواع من ثمار النخيل العراقية، إذ يلاحظ إن أعلى فعالية إنزيمية ظهرت في ثمرة البرحي ، والتي تفوقت على بقية انواع التمور . ان من أهم أسباب زيادة نشاط هذا الإنزيم هو ارتفاع تركيز السكروز الذي يعد المادة الاساس التي يعمل عليها إنزيم الانفرتيز ، ومن المعروف إن زيادة تركيز المادة الاساس يؤدي إلى زيادة فعالية ونشاط الانزيم . يوضح الجدول رقم (3) الكشف عن وجود السكروز في ثمرة البرحي وتحللها الى سكر كلوكوز و فركتور بسبب نشاط الانزيم . دراسات سابقة تناولت قياس فعالية الانزيم في منطقة مستخلص تمور من البصرة جنوب العراق حيث تم دراسة ثلاث انواع من التمور وعلى ثلاث مراحل من النمور والنضج وكانت الفعالية المدروسة أعلى من الفعالية الناتجة لدينا وبنفس خطوات الدراسة . بشكل عام نلاحظ إن فعالية إنزيم فعاليته في بقية الأصناف وهذا يفسر إلى حد ما تأخر نضج ثمار حيث يعد إنزيم الانفرتيز من إنزيمات النضج [23] .

تم تحضير الشراب المحلى من مزج المحلول الانزيمي ذو الفعالية الأعلى مع محلول سكر السكروز غير المختزل، وللتاكد من دور المحلول الانزيمي بهذا الشراب، تم الكشف عن وجود السكريات مختزلة بالمحلول قبل وبعد إضافة المحلول الانزيمي، كانت النتيجة عدم ظهور كشف موجب لبندكت قبل إضافة المحلول الانزيمي في حين ظهور راسب محمر نتيجة موجبة للكاشف بعد الإضافة، مما يدل على تحلل سكر السكروز غير المختزل الى سكريات أحادية مختزلة. اما نوع السكريات المختزلة الموجودة بالمحلول المحلى فقد تم الكشف عنها بكشف سلفانوف المسؤول عن السكريات الكيتونية.

جدول رقم (4). الفعالية الانزيمية بدلالة تركيز السكر المتحرر، حسب نوع التمر المستخدم

نوع التمر	تركيز السكر (ملغم/ مل)
الزهدي	5.9±0.003
اشرسي	6.6±0.08
برحي	7.2±0.04
خستاوي	5.1±0.06



الشكل رقم (9). مستوى الفعالية الانزيمية حسب نوع التمر تحت الاختبار. الشريط الأسود دلالة على الانحراف المعياري للقراءة.

بينت النتائج عدم وجود سكر الفركتور قبل إضافة المحلول الانزيمي و لكن ظهور نتيجة إيجابية بعد إضافة المحلول الانزيمي مما يشير الى تحرر سكر الفركتور من تحلل السكروز، جدول رقم 5.

جدول رقم (5) تأثير الكشف على محلول السكروز قبل وبعد اضافة المحلول الانزيمي المستخلص من ثمرة البرحي الى محلول السكروز.

	قبل إضافة محلول الانزيم	بعد إضافة محلول الانزيم
الكشف	النتيجة	النتيجة
بندكت	(-ve)	(+ve)
سلفانوف	(-ve)	(+ve)

الاستنتاجات

ان مستخلص التمر محلول ذو قيمه كاربوهيدراتيه ودهنيه جيده ويحتوى على نسبه من انزيم الانفرتيز تتغير حسب نوع التمر بناءا على اختلاف فعاليته باختلاف انواع التمور. بالإضافة الى ذلك يحتوي مستخلص التمر على فيتامينات نوع أ، ب٢، بايوتين، وحامض الفلوليك بالإضافة الى الكالسيوم المرتبط. فعالية انزيم الانفرتيز متفاوتة اعتمادا على نوع التمر ونسبة السكر. هناك تمور تحتوي على سكريات احادية مختزلة ،واخرى ثنائية غير مختزلة . تمكنت الدراسة بنجاح الحصول على شراب محلى باستخدام انزيم الانفرتيز المستخلص من تمر البرحي ونقترح متابعة الدراسة وزيادة من التحقيقات في تصنيع الشراب المحلى ودراسته.

شكر وتقدير

يتقدم الباحثون بالشكر والتقدير لقسم الكيمياء في الجامعة المستنصرية لادراج البحث ضمن الخطة السنوية للبحوث العلمية، الشكر والتقدير للأستاذ مساعد الدكتور عامر صالح مهدي لمساعدته في تحاليل كروموتوغرافيا السائل عالي الأداء والشكر الجزيل للمدرس الست نداء إبراهيم لمساعدتها بتحضير الكشوفات اللونية.

تضارب المصالح

لايوجد تضارب مصالح مع أي جهة أخرى

التمويل المالي

لم يستلم البحث أي دعم مادي

المراجع

- Maciel Ma´ rcia Jaqueline Mendonc, Silva Ademir , Castro,,Ribeiro Helena, Camara˜o Telles. "Industrial and Biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the Basidiomycota" a review Electron J Biotechnol. 2010;13(6):14_15
- Du¨ sseldorf, Enzymatic Production of Invert Sugar, Germany Enzyme Company; 2007:1_10.
- J Biol Res."Plant invertases: structure, function and regulation of a Diverse enzyme family Vasileiosfotopoulus" 2005;4:127_137.
- Enhancement of Inulinase and Invertase Production from a Newly Isolated Candida Guilliermondii. TISTR 5844.45. 2011:675e685
- Romero-Gomez S, Augur C, Viniegra-Gonzalez G. Invertase production by Aspergillus nı´ger in submerged and solid-state fermentation Biotechnol Lett. 2000;22:1255_1258
- purification and characterization of invertase by Aspergillus flavus using fruit peel waste as substrate Advan Biol Res. 2010;4(1):31_36
- ASEAN Food J. "Biochemical studies on the immobilization Of the enzyme invertase (EC.3.2.1.26) in alginate gel and its
- Ali S, Haq I, "Kinetics of improved extracellular b-D-fructofuranosidase fructohydrolase production by a Derepressed Saccharomyces cerevisiae Lett, Appl Microbiol Kinetics" 2008;15(1):73_788... 2007;45:160_167
- Workman Wesley E, Way Donal F. "Purification and properties Of the b-fructofuranosidase from Kluyveromyces fragilis" FEBS Letters. 1983 August;160(1-2):16_20
- Lahiri Sagar, Basu Avghya ،Sengupta Shinjinee, et al. "Purification and characterization of a trehalase-invertase Enzyme with dual activity from Candida utilis" Arch Biochem Biophys. 2012;522:90_99
- W. Pang, A. Ramli, Nur Dini Johari Published, Structural Properties, Production, and Commercialisation of Invertase 31 March 2019 Biology Sains Malaysiana.
- Kim Donggiun, Gunsuplee, Chang Man, et al. "Purification And biochemical characterization of insoluble acid Invertase from pea seedlings" J Agric Food Chem. 2011;59:11228_11233.
- Belcarz A, Ginalska G, Penel C." The novel non glycosylated Invertase from Candida utilis" J Biochem Biophys Acta 2002;1594:40_53
- Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese peer fruit. Phytochemistry. 2003;63:125_129.
- Friedrich Micscher Institute, Switzerland. "Invertases, primary Structure, function and roles in plant development and Sucrose partitioning" Plant Physiol .September, 1999;121
- Ji X, Vander Ende W, Van Laaere A, Cheng S, Bunnett J. "Structure, evolution and expression of the two invertase gene Families of rice" J Mol Evol. 2005 May;60(5):615_634
- Li Z, PalmerW M. "High invertase activity in tomato Reproductive organs correlates with the enhanced sucrose Import into and heat tolerance of young fruit" J Exp Bot. 2012 Feb;63(3):1155_1166 .
- Kaur H, Gupta AK, Kaur N, Sandhu JS. "High invertase activity For a prolonged period in developing seeds/podwell of wild Chick pea is detrimental to seed filling".Indian، J Exp Bot. 2012 Feb;63(3):1155_1166
- Nizar Chaira, Issam smaali, Samaher Besbes,, Abdessalem Mrabet1, Belgacem lachiheb and Ali Ferchichi, Production of fructose-rich syrups using invertase from date palm fruits Article in Journal of Food Biochemistry · October 2010.
- Automated Vitamins A and E in Serum/Plasma – HPLC https://chromsystems.com/en/automated-vitamins-a-and-e-in-serum-plasma-hplc-34700-f.html.
- HPLC Analysis of Water-Soluble B-Vitamins on Ascentis Express C18, https://www.sigmaaldrich.com/IQ/en/technical-documents/chromatograms/hplc/hplc-analysis-of-water-soluble-b-vitamins-on-ascentis-express-c18/supelco/g005625
- د.زهراء سالم ، د.حسنين كامل . الكشوفات اللونية في كتاب الكيمياء الحياتية المرحلة الثالثة الجامعة المستنصرية ،كلية العلوم ، قسم الكيمياء.March,2023
- خير الله موسى عواد الجابري،دراسة فعالية إنزيم الانفرتيز ومحتوى السكريات في ثمار نخيل التمر.مركز أبحاث النخيل -جامعة البصرة-البصرة-العراق. المجلد:4،العدد:1-2 السنة: 2005 .