استخلاص انزيم البيروكسيديز الذائب من ثمرة الطماطة المحلية *Lycopersicon esculentum L.* وتنقيته جزئيا

اسماء محمد سعود

قسم التقنيات الاحيائية، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد – العراق

الخلاصة

اكدت النتائج المستحصلة للتحري عن وجود انزيم البيروكسيديز في أجزاء ثمرة الطماطة المحلية والتي اشتملت على القشور والجزء اللحمي لكل من الطماطة الخضراء ومتوسطة النضوج والحمراء والطماطة الحمراء الكاملة. وان اعلى فعالية نوعية للانزيم تركزت في المستخلص الخام لثمرة الطماطة الكاملة ، اذ بلغت 16 وحدة / ملغم . بروتين باستخدام دارئ خلات الصوديوم ذو تركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6.5. وكان محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 5.5 هو الانسب لاستخلاصه مقارنة مع محاليل الاستخلاص المختلفة ، حيث بلغت اعلى فعالية نوعية له 32 وحدة / ملغم . بروتين .

نقي انزيم البيروكسيديز بخطوتين شملت الاولى الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 85% تلتها خطوة المبادل الايوني باستعمال عمود DEAE-Sephadex A-50 حيث بلغ عدد مرات التنقية 6 مرة وبحصيلة انزيمية 53.7% .

EXTRACTION AND PARTIAL PURIFICATION OF PEROXIDASE FROM LOCAL LYCOPERSICON ESCULENTUM

Asmaa Mohammed Soud

Department of Bitechnology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad- Iraq.

Abstract

An investigation was conducted to evaluate the peroxidase enzyme in local tomato included tomato's skin and flesh for each green, semi ripe, ripe and whole tomato fruit. The results indicated the highest peroxidase specific activity was in the whole tomato fruit 16 unit / mg protein . The sodium acetate 0.1M buffer was the best extraction solution of peroxidase from tomato fruit and specific activity was 32 unit \ mg protein protein. The enzyme was purified in to two steps including precipitation by ammonium sulfate with 85 % saturation followed by ion exchange chromatography on DEAE – Sephadex – A 50 which showed 6 as fold of purification and 53.7 % as enzymatic yield .

المقدمة

يعد أنزيم البيروكسيديز Peroxidase من الأنزيمات الواسعة الإنتشار في المملكة النباتية فضلاً عن تواجده في المملكة الحيوانية والأحياء المجهرية (1) ، إذ يتواجد تقريباً في كل الأجزاء النباتية (2)،و يعمل على تنظيم نمو الثمار كما في ثمرة الطماطة اثناء وجوده في قشرة الثمرة دون التأثير على الخواص الميكانيكية لنسيج الثمرة (3) .

يحفز أنزيم البيروكسيديز أكسدة العديد من مواد الأساس Substrates المانحة للهيدروجين Hydrogen doner مثل

المركبات الفينولية والأمينات الأروماتية aromatic amines والهيدروكوينون hydroqinones وأمينات الهيدروكوينـون hydroqinones amines ومشتقات البنزدين و بوجود بيرو كسيد الهيدروجين H_2O_2 كمادة أساس مستقبلة للهيدروجين Hydrogen accepter (4)، حيث ينتقل الهيدروجين من المادة المانحة للهيدروجين الى المادة المستقبلة للهيدروجين(5) .

يمتلك الأنزيم كثير من الصفات التي أكسبته أهمية خاصة كسهولة الحصول عليه من مصادر متنوعة وتنقيته بطرائق بسيطة وثباتيته العالية تجاه الخزن فضلاً عن امتلاكه رقم تحول عالي (Turnover number) ، وقد اشترك الأنزيم في استخدامات متنوعة في التحاليل الأنزيمية والمناعية بصورة مفردة أو مشتركة مع أنزيمات أخرى (Bi-enzymes) فقد أدخل أنزيم البيروكسيديز في الفحوصات المناعية الأيلايزا Enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) لإمتلاكه ثباتية عالية عند إرتباطه بالأجسام المضادة Antibodies إذ تؤدي تفاعلاته الى تكوين نواتج ملونة يستدل منها على كمية المستضدات Antigenes في العينة المراد تحليلها وبدرجة عالية من الدقة (5)، كما إستعمل الأنزيم في تحديد كمية حامض اليوريك Uric asid والكلوكوز Glucose والكالكتوزGalactose في السوائل الحيوية باستعمال الطرائق الأعتيادية(6) أو بوساطة المتحسسات الحيوية Biosensors (7) ، فضلاً عن ذلك فقد أمكن إستخدامه في تعليم مجسات الدنا DNA (Probes) والتي تستخدم في تقنيات الهندسة الوراثية (8).

أما في مجال الصناعات الغذائية فيعد الأنزيم مؤشراً لكفاءة عمليات السلق Blanching بما يتمتع به من ثبات حراري تجاه المعاملات الحرارية خلال العمليات التصنيعية (9) اضافة الى ذلك فقد أستعمل في أكسدة كحول البنزيل Benzylalcohol لإنتاج الألديهايدات Aldehydes التي تستخدم في عمل مواد النكهة Flaver والمواد العطريةFragrance material ، كما أمكن أستعمال الأنزيم المقيد لتحديد نسبة المركبات الفينولية في المشروبات المنبهة والكحولية (10) .

ونظراً لأهمية الأنزيم الحيوية وإستعمالاته الواسعة في المجالات الصناعية والطبية والمختبرية ، فقد هدفت هذه الدراسة الى التحري عن مصادر محلية متوفرة لإستخلاص وتنقية الأنزيم باستخدام بعض الطرائق الكروماتوغرافية المتوفرة محليا .

المواد وطرائق العمل

1. محاليل الاستخلاص

A - دارئ خلات الصوديوم بتركيز0.1 و0.2 مولار ورقم هيدروجيني 4.5 و 5 و 5.5 و 6.5 .

B- دارئ فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين بتركيز 0.1 و 0.2 مولار وارقام هيدروجينية 7 و 7.5 و 8 . حضر دارئ فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين بتركيز 0.1 مولار وارقام هيدروجينية 7 و 7.5 و 8 من تخفيف دارئ الفوسفات بتركيز 0.2 مولار بالماء المقطر .

C- دارىء الترس Tris-Base بتركيز 0.1 و 0.2 مولار وارقام هيدروجينية 8.5 و 9 . حضر دارئ Tris-Base بتركيز 0.1 مولار وبالارقام 8.5 و 9 من تخفيف دارئ الترس بتركيز 0.2 مولار بالماء المقطر بنسبة 1:1 (حجم : حجم) .

طريقة العمل

1- تهيئة النماذج الخاصة بمصادر الانزيم (الطماطة المحلية) حيث شملت

- القشور (غلاف الثمرة) لكل من الطماطة الخضراء ومتوسطة النضوج والناضجة . حيث تم تقطيع القشور الى قطع صغيرة .

- الثمرة (الجزء اللحمي للثمرة) لكل من الطماطة الخضراء ومتوسطة النضوج والناضجة ، حيث تم تقطيع الثمرة الى قطع صغيرة . وحفظت النماذج في ظروف مبردة لحين الاستعمال .

2- التحري عن وجود الانزيم في اجزاء مختلفة من الثمرة (قشور الطماطة والثمرة) خلال مراحل الانضاج .

-حضر المستخلص الخام للانزيم من مصادر الثمرة (القشور،الجزء اللحمي الثمرة) بنسبة استخلاص 1:1 (وزن : حجم) اذ سحق 50 غرام من النموذج المعد للاستخلاص باستعمال خلاط مبرد مدة 5 دقائق ثم اضيف 50 مل من دارئ الفوسفات بتركيز 0.1 مولار والمضاف له مادة PVP بتركيز2% برقم هيدروجيني6.5 و رشح المستخلص في قطعة شاش نظيفة و نبذ الراشح بسرعة 6000 دورة / دقيقة مدة 15 دقيقة ، ثم رشح الرائق خلال ورق ترشيح رقم 1وبدرجة4 م° .

3- تحديد الطريقة المثلى لاستخلاص الانزيم .

- اختبار الدارئ الامثل لاستخلاص الانزيم :

اختبرت كفاءة ثلاثة دوارئ متساوية التركيز ومختلفة الارقام الهيدروجينية لاستخلاص الانزيم من المصدر المنتخب والتي

اشتملت على (دارئ خلات الصوديوم ودارئ فوسفات البوتاسيوم ودارئ الترس (Tris-Base)، كما اختبر تأثيرتركيزين من دارىء الاستخلاص (0.1و0.2) مولار على الفعالية الانزيمية .

تقدير الفعالية الانزيمية

استخدمت طريقة Bernhard & Whitaker (11) في تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز المستخلص من ثمار الطماطة وحسب الخطوات الاتية .

المحاليل المستعملة

1- محلول الكوايكول بتركيز 0.05 مولار

2- محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 0.02 مولار.

3- دارئ خلات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار ذو الرقم الهيدروجيني 5.5.

4- مزيج مادة التفاعل

حضر انياً من مزج المحاليل (1 و 2 و 3) مع الماء المقطر بنسبة (7:1:1:1) . تم تقدير الفعالية الانزيمية للبيروكسيديز باستخدام الطريقة اللونية من اضافة 6 مللتر من مزيج التفاعل المحضر سابقاً في خلية المطياف الضوئي بطول موجي436 نانوميتر ، اذ تم تصفير الجهاز ثم اضافة 200 مايكروليتر من المستخلص الانزيمي الخام ومزج جيداً بالتقليب السريع للخلية الضوئية ومتابعة التغيير في الامتصاصية الضوئية لمدة 3 دقائق على الاقل ، وحسبت الفعالية وفقاً لمعادلة Sadasivam & Manickam, (12).

وحدة الفعالية :- كمية الانزيم التي تؤكسد مايكرومول من الكوايكول في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة .

تقدير تركيز البروتين

قدر البروتين على وفق الطريقة الموصوفة من قبل Bradford (13) .

خطوات تنقية الانزيم جزئيا

نقي انزيم البيروكسيديز جزئيا من ثمرة الطماطة بخطوات اشتملت على ترسيب الانزيم باملاح كبريتات الامونيوم اعقبتها خطوة المبادل الايوني DEAE-Sephadex A-50.

- **ترسيب الانزيم** : رسب انزيم البيروكسيديز باضافة املاح كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 85% .

- **كروموتوغرافيا التبادل الايوني** : حضر المبادل الايوني DEAE-Sephadex A-50. واجري تنشيطه وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل الشركة المجهزة Whatman.

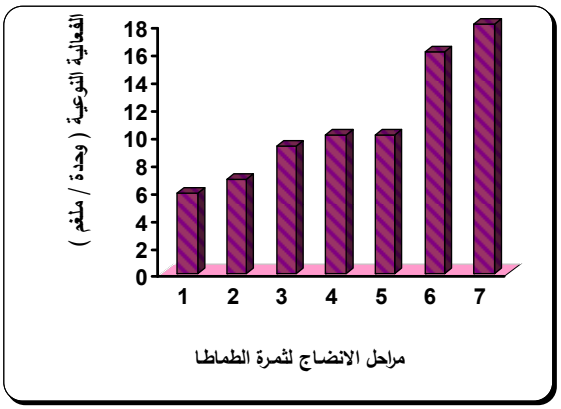
اضيف 5 مللتر من المحلول الانزيمي على عمود المبادل الايوني بأبعاد(15×3) سم الذي تم موازنته بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 5 ملي مولار ورقم هيدروجيني 6.5 وبسرعة جريات 30 مللتر / ساعة ، اذ تمت متابعة الامتصاصية الضوئية للاجزاء المفصولة على طول موجي 280 نانوميتر لحين الوصول الى الخط الصفري ، بعدها جرى استرداد البروتينات المرتبطة بالمبادل الايوني بمحلول التدرج الملحي بكلوريد الصوديوم بتركيز 0-1 مولار ، ثم قيست الامتصاصية الضوئية على طول موجي 280 نانوميتر للاجزاء المستردة . ثم قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين للاجزاء المنفصلة في خطوتي الغسل والاسترداد بعدها جمعت الاجزاء الفعالة وقيس حجمها ، ثم قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين ، ثم حفظت في ظروف مبردة لحين الاستخدام .

النتائج والمناقشة

1- التحري عن وجود أنزيم البيروكسيديز في أجزاء مختلفة من ثمرة الطماطة وخلال مراحل الأنضاج .

تم التحري عن وجود أنزيم البيروكسيديز في أجزاء ثمرة الطماطة المحلية التي شملت (قشور الطماطة الخضراء ومتوسطة النضوج والحمراء الناضجة) و (والجزء اللحمي لثمرة الطماطة الخضراء ومتوسطة النضوج والحمراء الناضجة) والثمرة كاملة (القشور + الجزء اللحمي للثمرة). يوضح الشكل 1 أمتلاك المصادر المذكورة قيد الدراسة فعالية أنزيم البيروكسيديز وبدرجات متباينة وقد تميز المستخلص الخام للجزء اللحمي للثمرة الحمراء باعطائه أعلى فعالية نوعية مقارنة مع بقية المصادر , اذ بلغت 18 وحدة / ملغم. بروتين ثم الثمرة كاملة , اذ بلغت الفعالية النوعية 16 وحدة / ملغم . بروتين ،اما في بقية الاجزاء فقد تراوحت الفعالية النوعية بين 5.8 – 10 وحدة / ملغم بروتين . استنادا الى النتائج التي تم التوصل اليها جرى اعتماد الثمرة كاملة النضوج (قشور + الجزء اللحمي للثمرة) كمصدر لأستخلاص وتنقية الأنزيم جزئيا باعتبارها من المصادر النباتية الرخيصة غير المدروسة في قطرنا ، فضلاً عن محتواه العالي للأنزيم ، بالأضافة الى تقليل

الكلفة الأقتصادية والجهد الصناعي عن استعمال الثمرة الحمراء لوحدها بدون قشور.



الشكل 1 : الفعالية النوعية لانزيم البيروكسيديز في اجزاء مختلفة من ثمرة الطماطة .

1-الجزء اللحمي للثمرة خضراء 2- قشور متوسطة النضوج 3- قشور خضراء 4- قشور حمراء 5- الجزء اللحمي لثمرة متوسطة النضوج 6-الثمرة كاملة 7-الجزء اللحمي للثمرة ا لحمراء

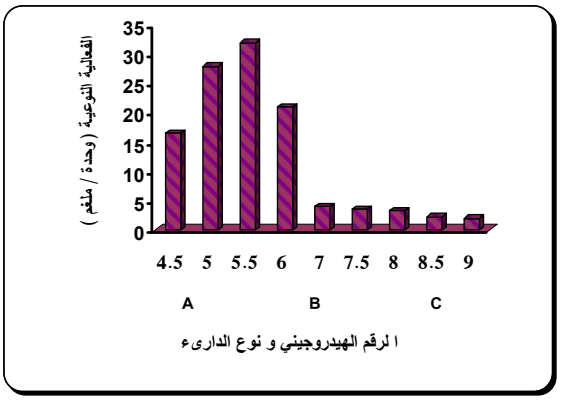
وفي دراسة اخرى حول انتاج انزيم البيروكسيديز من ثمار الطماطة في مختلف مراحل الانضاج ، لوحظ ان كمية الانزيم تزداد ثلاث مرات مع زيادة نضج الثمرة (3) .

2- تحديد الطريقة المثلى للاستخلاص الانزيم

-الدارئ الأمثل للأستخلاص

درست كفاءة ثلاث دوارئ مختلفة بتراكيز وارقام هيدروجينية مختلفة لكل منهما ، والارقام الهيدروجينية تقع ضمن مدى يتراوح بين 4.5- 9 في استخلاص أنزيم البيروكسيديز من ثمرة الطماطة الكاملة.

اذ أظهرت النتائج المبينة في الشكل 2 إختلاف الفعالية النوعية للأنزيم باختلاف نوعية المحاليل الدارئة والتركيز والرقم الهيدروجيني المستخدم فقد اعتبر دارئ خلات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 5.5 أفضل الدوارئ المستعملة للأستخلاص ، اذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 32 وحدة / ملغم . بروتين .

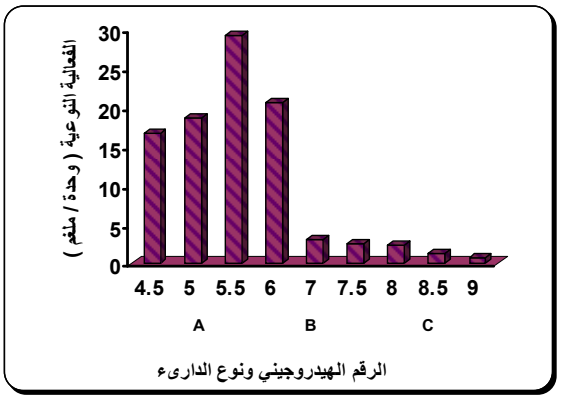


الشكل 2 : تأثير الرقم الهيدروجيني ونوع الدارئ لمحلول الاستخلاص بتركيز 0.1 مولار في استخلاص انزيم البيروكسيديز المستخلص من ثمرة الطماطة الكاملة .

A: دارئ خلات الصوديوم بارقام هيدروجينية 4.5 و 5 و 5.5 و 6

B: دارئ فوسفات البوتاسيوم بارقام هيدروجينية 7 و7.5 و 8

C: دارىء الترس بارقام هيدروجينية 8.5 و 9



الشكل 3 : تاثير الرقم الهيدروجيني ونوع الدارئ لمحلول الاستخلاص بتركيز 0.2 مولار في استخلاص انزيم البيروكسيديز المستخلص من ثمرة الطماطة .

A : دارئ خلات الصوديوم بارقام هيدروجينية 4.5 ، 5 ، 5.5 ، 6

B : دارئ فوسفات البوتاسيوم بارقام هيدروجينية 7 ، 7.5 ، 8

C: دارئ الترس بارقام هيدروجينية 8.5 ، 9

ولوحظ انخفاض في الفعالية النوعية للانزيم اذ بلغت 16.6 وحدة / ملغم . بروتين عند الرقم الهيدروجيني 4.5 . بينما شهدت الفعالية النوعية انخفاظاً قليلاً عند التركيز 0.2 مولار لنفس الدارئ كما موضح في الشكل 3 .

كما شهدت الفعالية النوعية انخفاضا ملحوظا عند استعمال كل من دارئ فوسفات البوتاسيوم والترس بكلا التركيزين 0.1 و 0.2 مولار ، اذ شملت اقل فعالية نوعية عند التركيز 0.2 مولار

لدارئ الترس اذ بلغت 0.73 وحدة / ملغم . بروتين عند الرقم الهيدروجيني 9 كما موضح في الشكل 2 و3.

يتضح من النتائج ان الارقام الهيدروجينية الحامضية القريبة من التعادل والمتعادلة كانت افضل في استخلاص الانزيم من المصدر النباتي المنتخب (ثمرة الطماطة) وان تباين قيم الفعالية للانزيم يرجع سببه الى تأثير طبيعة الدارئ المستعمل والرقم الهيدروجيني له ، اذ تعود قابلية وتأثير هذه المحاليل الدارئة على الاستخلاص الى قدرتها على فك الترابطات الموجودة بين الانزيم والمواد الخلوية الاخرى ، اذ كانت القوة الايونية 0.1 مولار لدارئ خلات الصوديوم كافية الى فك هذه الترابطات بين الانزيم والمواد الخلوية الاخرى ، مما ادى الى ذائبية الانزيم في محلول الاستخلاص وبالتالي الى زيادة الفعالية النوعية للانزيم . وفي دراسة اخرى بينت وجود فعالية البيروكسيديز في الجزء الذائب من ثمار الطماطة حيث استخلص بمحلول فوسفات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار الحاوي على مادة بولي فينيل بايروليدون Polyvinyl) pyrrodidone) PVP بنسبة 1% ذي الرقم الهيدروجيني 6 (14).

وكانت النتائج مقاربة لما توصل اليه Andrews وجماعته (3) من افضلية دارئ خلات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار لاستخلاص الانزيم من ثمرة الطماطة ، بينما في دراسة اخرى استخلاص الانزيم من ثمار الطماطة بدارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.1 مولار كأفضل دارئ برقم هيدروجيني 6.5 المحتوي على مادة الـ PVP (15). و استعملت محاليل دارئة مختلفة تراوحت من 0.05 – 0.4 مولار من محلول فوسفات الصوديوم والبوتاسيوم الدارئة لاستخلاص البيروكسيديز من ثمار الطماطة (14) .

هناك العديد من الدراسات التي تناولت استخدام محاليل استخلاص بقيم مختلفة من الارقام الهيدروجينية في استخلاص انزيم البيروكسيديز من مصادر مختلفة ، فقد اشار Harco وجماعته (16) الى استخلاص انزيم البيروكسيديز من اوراق التبغ Nicotiana tabacum بواسطة دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 50 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 مضافاً اليه 1 ملي مولار من الاسكوربيت و DTT و EDTA و 3% من Triton –X-100 و 0.8 من NaCl . كما استخدم Goldberg وجماعته (17) دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 2 ملي مولار ورقم هيدروجيني 6 لاستخلاص الانزيم من السويقة الجنينية للماش ، في حين قام Robinson و Nclehhan (18) باستخلاص الانزيم الذائب من ثمار البرتقال بواسطة دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.01 مولار وبرقم هيدروجيني 6 ، واستخلص الانزيم من ساق ورد البوري بوساطة دارئ خلات الصوديوم بتركيز 0.05 مولار ذو رقم هيدروجيني 5 (19) .

3- تنقية الانزيم جزئيا

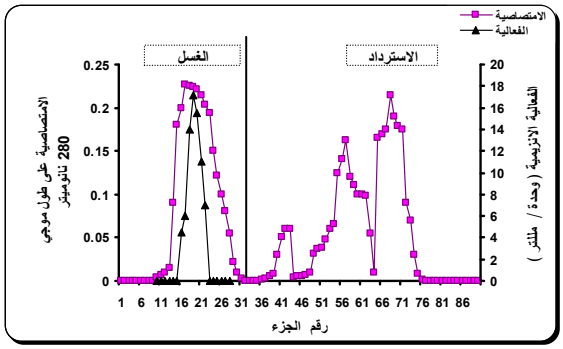
أجريت عدة خطوات لتنقية الانزيم جزئيا المستخلص من ثمرة الطماطة شملت هذه الخطوات ترسيب المستخلص الخام للأنزيم بوساطة أملاح كبريتات الأمونيوم . اعقبتها خطوة التبادل الايوني بالمبادل DEAE – Sephadex A-50 .

***تركيز الانزيم الخام**

استخدمت كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 85 % لترسيب انزيم البيروكسيديز ، حققت هذه الخطوة تنقية جزئية للانزيم بلغت 1.6 مرة وبحصيلة انزيمية مقدارها 71.9 % مع ارتفاع الفعالية النوعية لتصل 48.5 وحدة / ملغم. بروتين . كما مبين في جدول (1) . وفي دراسة اخرى استعملت كبريتات الامونيوم في ترسيب الانزيم الذائب المستخلص من ثمار الطماطة بعدد مرات تنقية 3.35 وحصيلة انزيمية قدرت بـ 64.4 % (15).

***كروموتوغرافيا التبادل الايوني**

مرر الانزيم المرسب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 85% على عمود المبادل الايوني DEAE- Sephadex- A50 التي تمت موازنته بدارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 5 ملي مولار ورقم هيدروجيني 6.5 ، اظهرت النتائج في الشكل 4 التي حصل عليها من خطوة الغسل wash بظهور قمة واحدة من البروتين والفعالية الانزيمية بشكل متطابق تقريباً مما يدل على ان هذه الفعالية قد تركزت في اجزاء الغسل وان الانزيم يحمل محصلة شحنة موجبة مشابهة لشحنة المبادل الايوني ضمن الظروف المستخدمة قيد التجربة جعلته لا يرتبط بالمبادل ، وقد تم الحصول بهذه الخطوة على عدد مرات تنقية 6 وبحصيلة انزيمية 53.7 % مع ارتفاع الفعالية النوعية مقدارها 181.3 كما موضح في الجدول (1) ، اما خطوة الاسترداد فقد لوحظ ظهور ثلاث قمم للبروتين بعد استردادها بالتدرج الملحي الخطي مع ظهور فعالية انزيمية منخفضة جداً في القمة الاولى قدرت بعد التركيز 4 وحدة / مللتر لذلك تم اهمالها ولم تستكمل الدراسة عليها شكل(4) .



الشكل 4 : كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني DEAE-Sephadex –A50 بابعاد (15× 3)سم وبسرعة جريان 30مللتر / ساعة وبحجم 3 مل / جزء .

استخدمت المبادلات الايونية في تنقية انزيم البيروكسيديز من مصادر نباتية مختلفة ، فقد نقي الانزيم الذائب المستخلص من ثمار الطماطة بعد خطوة ترسيب بكبريتات الامونيوم بالمبادل الايوني QAE-Sephadex A50 بعدد مرات تنقية 6.37 مرة وحصيلة انزيمية 73.3 % (15) بينما في دراسة اخرى استخدمت مادة Bentonite لتنقية انزيم البيروكسيديز من ثمرة الطماطة ، فكانت عدد مرات التنقية 12.6 مرة وحصيلة انزيمية 22.4 % مع ارتفاع ملحوظ بالفعالية النوعية قدرت بـ 33.4 وحدة / ملغم بروتين (3) .

خطوات تنقية انزيم البيروكسيديز من ثمرة الطماطة

الفعالية وحدة /مللتر	البروتين ملغم /مللتر	الفعالية النوعية وحدة /ملغم	الفعالية الكلية وحدة	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
1.8	0.06	30	270	1	100
19.4	0.4	48.5	194	1.6	71.9

References

1. Reed.g**. 1975.** Oxidoreductase in " *enzymes in processing*".P.216.Academic press.New York.
2. Florence,B**.1977.** "*Peroxidase and it's relationship to Food Flavor and Quality. Areview*". Journal of Food Science, 42:1-5.
3. Andrew S.J., Adams SR, Burton KS, Evered CE. **2002.** "*Partial purification of tomato fruit peroxidase and its effect on the mechanical properties of Tomato fruit stin*". Journal of Experimental Botany 53, 2393-2399
4. Putter , **1974 .** " *Peroxidase. Mothods Enzymatic Analysis"*. 1 :685-690.
5. Fagain, Orlaith Ryan, Malcolm R.Smyth **1994 ."***Horseradish Peroxidase the analysts Friend*".Essay in Biochemistry,28:129-146.
6. *Sander, G.T. B. Pasman, A.J. and Hoek, F.J.* **1980.**"*Peroxides horseradish root*". J.Biochem. 101 : 299.
7. Blum, L.J. **1993**." *Chemilumine Scence flow injection analysis of Glucose in drinks with abienzyme fiber optic biosensor Enzyme*". Microb. Technol, 15: 407-411.
8. Enda Miland ,Malcolm R.Smyth and ciaran O.Fagain.**1996**."*Phenol Removal by modified Peroxidase*" . J . Cgem . Tech .Biotechnol .,67:227-236.
9. Wang, L.W., Showatter, A.M. and ungar I.A. **1997."** *Effect of salinity on Growth, Ion content, and cell wall chemistry in Atriplex prostrata (Chenopodiaceae ")*. American. J. Botany 84(9) : 1247 (Abstract)
10. Young-Tae Kong, Shin-inchiro.**2001.** "*Peroxidase-Based Amperometric sensor for the determination of total phenols using tow-stage peroxidase reaction. Am*". J. Enol. Vitic, 52(4) : 381-385.(Abstract)
11. Whitaker , J.R.and Bernhard , R.A. **1972** . "*Experiments for an Introduction of Enzymology the Wibber press*".Davis,Galif .
12. Sadasivam, S. and A. Manickam.**1988** . "*Peroxidase. Biochemical Method* " p.108.New Age international (p) limited publisher.
13. Bradford, M. **1976**. "*A rapid and sensitive method for the quantitation. of microgram quantities of protein using the principle of protein –dye bindig*". Anal. Biochem. 72:248-254.
14. Heidrich, E.; Lorenz, C. Schreier,P. **1983.**"*Ultrathion layar Isoelectric Focusing of Paratially Purified Peroxidase From Tomato fruit* ". Food Chemistry 10: 285-296.
15. Kokkinakis and L. Brooks.**1979.** *'Tomato Peroxidase and Plant Physiol"*.,63:93-99.
16. Harco. A.S. Jon-K.L.Lorenzo. F.P.**1999.** "*Isolator and purification peroxidase from Nicotiana tabacum*". J. Biochim., 23: 567-569.
17. Goldberg, R; Kevers, C. and Gaspar, T. **1989.** "*Guaiacol and ascorbate peroxidase compatmentation and gradient along the growing Hang bean hypocotyl. Biochem. Physiol*". Pflanzen, 184:155-161.
18. Robinson, D.S. and Mclellan, K.M. **1984.** "*Heat stability of peroxidase from orange food chemistry*". 13 : 139-147.
19. Van den Berg and Van Huystee**.1984.** "*Rapid isolation of plant peroxidase. Purification of Peroxidase from petunia*". Physiol. Plant. 60 : 299-304.