تنقية وتوصيف انزيم البروتييز من نوى تمر الزهدي *Phoenix dactylifera* L.

*عصام فاضل الجميلي** *فريال حياوي محمد الشكرجي*** *مآرب نزيه رشيد**

تاريخ قبول النشر 6 /3 /2009

الخلاصة

تعد البروتييزات (E.C. 3.4.21) من الانزيمات المنتشرة انتشارا واسعا في الطبيعة إذ تتواجد في خلايا الحيوانات والنباتات والاحياء المجهرية ، ونظرا للاهمية الصناعية المتزايدة لهذه الانزيمات ولما تحتوية بذور معظم النباتات منها نوى التمور من مستوى عالي من هذه الانزيمات فقد هدفت هذه الدراسة الى :-

تنقية البروتييز المستخلص من نوى تمر الزهدي *Phoenix dactylifera* L. بطريقة تضمنت عدة خطوات شلمت التركيز بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (75%) مع اجراء عملية الديلزة باستخدام دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 80 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 وبلغت الفعالية النوعية للانزيم 407.62 وحدة / ملغم بروتين . بعد ذلك مرر الناتج خلال عمود التبادل الايوني ثنائي اثيل امينو ايثل سليلوز DEAE-cellulose ثم الترشيح الهلامي على عمود سيفاكريل S-200 ، وكانت الفعالية النوعية للانزيم المنقى 1873.49 وحدة / ملغم بروتين ، اما عدد مرات التنقية للانزيم المنقى فكانت 22.99 مرة وبحصيلة انزيمية 58.42% .

بلغ الوزن الجزيئي للبروتييز المنقى والمقدر بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود سيفاكريل S-200 (25118 دالتون) . كما تم تعيين درجة الحرارة المثلى للبروتييز المنقى من نوى تمر الزهدي ، اظهر الانزيم اعلى فعالية عند درجة حرارة 35 م ولمدة 15 دقيقة في محلول دارئ فوسفات الصوديوم ذي رقم هيدروجيني 7.5 ، كما اظهر الانزيم ثباتاً عند درجة حرارة 45 م لمدة 15 دقيقة . كذلك كان الانزيم ثباتاً عند رقم هيدروجيني 8.5 لمدة 15 دقيقة ، اما الرقم الهيدروجيني للفعالية فكان عند 7.5 .

الكلمات المفتاحية : انزيم البروتييز ، نوى تمر الزهدي ، تنقية و توصيف البروتييز النباتي

المقدمة:

تنتشر البروتينات ذات الفعالية البيولوجية كالكتينات والانزيمات ومثبطات البروتييز في الطبيعة انتشاراً واسعاً خاصة في بذور النباتات سواء ذات الفلقة الواحدة او من ذوات الفلقتين فضلاً عن وجودها في اجزاء آخرى من النباتات كالجذور ، الا انه يعتقد أن لها وظيفة دفاعية ضد الافات [1].

تم تصنيف البروتييزات (E.C.3.4.21) ضمن مجموعة انزيمات التحلل المائي (Hydrolases) ، إذ تحفز تحلل الاصرة الببتيدية للبروتينات في مواقع مختلفة وتحت ظروف مختلفة. وتوجد انزيمات البروتييز بكثرة في الطبيعة وفي مصادر مختلفة . وقد اكدت الدراسات وجود هذه الانزيمات في النباتات والحيوانات وفي الاحياء المجهرية المختلفة [3,2] . تم استخلاص وتنقية البروتييزات المعدنية من بذور نبات الحنطة السوداء (*Fagopyrum esculentum*) وبعدة مرات 1000 مرة كما قدر الوزن الجزيئي للبروتييزات بطريقتي الترحيل الكهربائي بوجود SDS فكان (34000 دالتن) و بطريقة الترشيح الهلامي فكان (39000) دالتن [4] ، لقد تم انتاج وتنقية انزيم البروتييز من فطر *A.oryzae* بخطوة واحدة وذلك بمراره على عمود مبادل ثنائي اثيل امينو اثيل سليلوز DEAE-cellulose الموازن بمحلول دارئ الترس برقم هيدروجيني 7.5 واسترداده بواسطة تدرج خطي من كلوريد الصوديوم [5]. كما تتشابه خطوات تنقية البروتييزات المنتجة من انواع مختلفة سواء كانت من النباتات او الاحياء المجهرية [6]،

ففي تنقية البروتييز المنتج من احدى سلالات *A. niger* المطفرة ، تم ترسيب الانزيم باضافة كبريتات الامونيوم ثم اجريت خطوتان للتبادل الايوني بعدها مرر على عمود الهايدروكسيد ابتايت ثم الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Bio-gelP-150 [7]. قام Grzywnowicz and Lobarzewski [8] بتنقية البروتييز من خمسة مصادر مايكروبية ومصدر واحد نباتي باستخدام خطوة واحدة هي كروموتوغرافيا الالفة باستخدام Keration controlled-pore glass.

هدفت الدراسة الحالية الى محاولة الكشف عن محتوى نوى صنف الزهدي من الانزيمات وخصوصا انزيم البروتييز ذات الفعالية البيولوجية واستخلاصها وتنقيته.

*معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد
**معهد اعداد المعلمات / تربية الكرخ الثانية

المواد وطرائق العمل:

استخلاص انزيم البروتييز من نوى صنف الزهدي:

اتبعت الطريقة التي تم وصفها من قبل Al-Shikirhy **[9]** في استخلاص انزيم البروتييز من نوى تمر الزهدي وذلك بوزن 5 غرام من مسحوق نوى تمر الزهدي المطحون واضيف اليه 25 ملليتر من محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 8 ، تم التحريك على المحرك المغناطيسي لمدة 15 دقيقة ثم تركت مدة 4 ساعات بدون تحريك بدرجة حرارة 4 م . نبذ المزيج بسرعة 4000xg لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 4 م ورشح الرائق خلال الصوف الزجاجي . استعمل الرائق في تقدير الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين لحساب الفعالية النوعية .

تقدير فعالية البروتييز :

إتبعت الطريقة الورادة من قبل Murachi **[10]** في تقدير فعالية البروتييز وباستخدام 0.5% كازين كمادة اساس وتعرف وحدة الفعالية بانها كمية الانزيم التي تسبب زيادة في الامتصاص الضوئي على الطول الموجي 280 نانوميتر مقدارها 0.01 في الدقيقة تحت الظروف القياسية .

كما تم تقدير البروتين وفق طريقة برادفورد الموصوفة من قبل Bradford **[11]** في تعيين تركيز البروتين في المستخلص الخام والمنقاة .

تركيز الانزيم باستخدام كبريتات الامونيوم

تم ترسيب الانزيم بوساطة بلورات كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (75%) ، فصل الراسب في جهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة 10000xg ولمدة 20 دقيقة . أهمل الرائق واذيب الراسب في كمية صغيرة من محلول دارئ الفوسفات بتركيز 20 ملي مولار ورقم هيدروجيني 8 واجريت عملية الديلزة حيال دارئ الفوسفات نفسه للتخلص من بقايا كبريتات الامونيوم ، وتم تقدير الفعالية الانزيمية وقياس تركيز البروتين كما في الفقرة اعلاه ، في كل من الراسب المركز.

كروماتوغرافي التبادل الايوني

تحضير عمود التبادل الايوني :

حضر المبادل الايوني ثنائي أثيل امينواثيل سليلوز DEAE- Cellulose حسب تعليمات الشركة المجهزة (Whatman) وعبئ المبادل في عمود زجاجي ليعطي ابعاداً (3.5× 25) سم واجريت عملية الموازنة (Equilibration) لعمود المبادل بواسطة محلول دارئ الفوسفات بتركيز 20 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 حتى اليوم التالي بسرعة جريان 60 مليلتر / ساعة .

أضافة الأنموذج :

مرر المحلول الانزيمي المديلز (20) مللیلتر على سطح العمود بهدوء وغسل العمود بالمحلول الدارئ فوسفات بتركيز 20 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 لانزال البروتينات غير المرتبطة وجمعت الاجزاء المتدفقة من العمود بمعدل 5 مليلتر/ أنبوب ، تم استرداد الانزيم من العمود باستخدام تدرج ملحي خطي من محلول منظم الفوسفات بتركيز 20 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 مضاف له 0.5 مولار من كلوريد الصوديوم برقم هيدروجيني 7.5 وتم متابعة البروتين في الاجزاء التي جمعت وذلك بقياس الامتصاص الضوئي لها عند طول موجي 280 نانومتر . قيست الفعالية الانزيمية في الاجزاء ورسم منحنى لعدد الاجزاء المنفصلة ازاء كل من الامتصاصية للبروتين (280 نانو متر) والفعالية الانزيمية (وحدة / مليلتر) ، ثم جمعت الاجزاء القريبة من ذروة منحنى الفعالية وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين فيها.

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي على عمود السيفاكريل Sephacryl S-200:

تم تحضير عمود الترشيح الهلامي حسب التعليمات المبينة من شركة Pharmacia Fine Chemical المجهزة لهلام Sephacryl S-200، ثم عبئ في عمود زجاجي ليعطي هلاما بابعاد (70 × 2.5 سم) وتمت موازنة بمحلول دارئ فوسفات بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7.5 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة .

اضافة الأنموذج :

مرر محلول الأنموذج الانزيمي المركز بواسطة السكروز الجاف الذي تم الحصول علية بالخطوة السابقة على سطح العمود بمقدار 2 مليلتر من المحلول الانزيمي المركز، وبشكل تدريجي على جدار العمود الداخلي بالقرب من سطح الهلام، ثم أجريت عملية الاسترداد بمحلول الموازنة نفسه ثم جمعت الاجزاء بواقع 3 مليلتر/ انبوب بسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة، قيس أمتصاص الضوء على طول موجي 280 مانوميتر للاجزاء المستردة ، وتمت متابعة الاجزاء التي اعطت فعالية انزيمية ضمن القمة الواحدة وحسبت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين للانزيم المنقى كما جاء في الفقرة اعلاه ، ثم رسمت العلاقة بين رقم الانبوب ازاء كل من الامتصاصية والفعالية النوعية للانزيم بعدها تم تجميع محتويات الانابيب التي تظهر فعالية نوعية عالية تم تركيزها واضافتها على عمود السيفاكريل S-200 مرة ثانية وأستخدمت لاجزاء الاختبارات الخاصة لتوصيف الانزيم المنقى .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم:

حضن 200 مايكرولتر من دارئ الفوسفات بتركيز 20 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 و100 مايكرولتر محلول التفاعل الكازين بدرجات حرارية مختلفة تراوحت من 20-90 م لمدة 15 دقيقة ثم أضيف له 10 مايكرولتر من محلول الانزيم المنقى

وترك لمدة 15 دقيقة أخرى بالدرجات الحرارية نفسها ثم اوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية.

تعيين الثبات الحراري للانزيم :

حضن محلول الانزيم المنقى في حمام مائي بدرجات حرارية مختلفة تراوحت من (20-90) ° م ولمدة 15 دقيقة ثم نقلت الانابيب الحاوية على محلول الانزيم الى حمام ثلجي بعدها نقلت الى حمام مائي بدرجة حرارة 37 ° م واضيف اليها محلول التفاعل الكازين وداريء الفوسفات بتركيز 20 ملي مولار المحضرة وحضنت لمدة 15 دقيقة ثم أوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية.

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم

استعمل محلول داريء خلات الصوديوم بتركيز 0.2 مولار بالارقام الهيدروجينية 4 و 4.5 و 5و 5.5 و 6 ومحلول داريء الفوسفات بتركيز 0.2 مولار وارقام هيدروجينية 6.5 -9 ، ثم قدرت فعالية البروتييز المتبقية . اما تقدير الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية فقد قدرت الفعالية الانزيم المنقى في ارقام هيدروجينية (4-9) بدرجة حرارة 30 ه م لمدة 15 دقيقة باستخدام محلول مادة الاساس الكازين .

النتائج والمناقشة:

اجريت سلسلة من التجارب لتحديد التسلسل الامثل لخطوات تنقية انزيم اليوريز من نوى تمر الزهدي بغية تنقيته ودراسة صفاته .

بينت النتائج بان افضل نسبة اشباع بكبريتات الامونيوم كانت 75% ، إذ اعطت اعلى فعالية نوعية 407.62 وحدة / ملغم بروتين (جدول 1) ، وقد اهتمت الدراسات باستخدام كبريتات الامونيوم او المذيبات العضوية في عملية ترسيب الانزيم وتعد خطوة من خطوات التنقية لما لها دور في تركيز النموذج والتخلص من بعض البروتينات الملوثة للانزيم المراد تنقيته .

سبقت عملية التبادل الايوني عملية التنافذ الغشائي (الديلزة) للمستخلص الانزيمي المركز حيال المحلول داريء فوسفات البوتاسيوم بتركيز 80 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.5 .

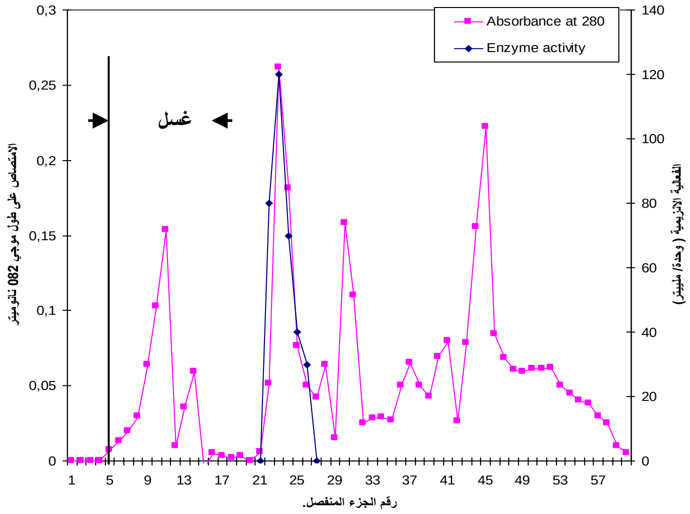
أجريت كروماتوغرافيا التبادل الايوني كخطوة ثانية في عملية التنقية باستخدام المبادل الايوني DEAE-Cellulose وهو من المبادلات السالبة الشحنة (Anion-exchanger). يثبت الرقم الهيدروجيني والتركيز الايوني الامثل لداريء فوسفات البوتاسيوم بتركيز 80 ملي مولار وبرقم هيدروجيني 7.5 ، وعند هذا الرقم يتم ارتباط بروتين انزيم البروتييز مع هلام العمود ويسترد الانزيم بعد ذلك بفعل محلول متدرج ملحي ، ومن المعروف ان البروتينات التي تحمل شحنات على سطحها تزداد قدرتها على الادمصاص على الاسطح ذات الشحنة المعاكسة وقد تكون من الشد بحيث يصعب فصلها **[12]** . لذا فان زيادة تركيز الملح في داريء الاسترداد يساعد في عملية فصل البروتين. تعد طريقة المبادل الايوني من الطرائق الملائمة في الفصل إذ يمكن بواسطتها تميز نوعين من البروتينات .

أضيف محلول الانزيم المديلز الى عمود المبادل الايوني واستردت البروتينات باستخدام تدرج ملحي لكلوريد الصوديوم بتركيز (0-0.5 مولار) ، تم تحديد الاجزاء الحاوية على انزيم اليوريز واستبعدت الاجزاء البروتينية الاخرى .

أظهرت النتائج الموضحة في (الشكل 1) أن هنالك عدة قمم بروتينية في الاجزاء المستردة من المبادل ، ألا أن الفعالية الانزيمية تركزت في قمة واحدة فقط والتي تمثلت في الانابيب (21- 25) والمستردة بتدرج ملحي خطي من كلوريد الصوديوم (0-0.5) مولار ، ونستنتج من ذلك ان معظم فعالية انزيم اليوريز تقع في الاجزاء المستردة مما يدل على انه يحمل شحنة سالبة في الظروف المستخدمة جعله يرتبط بالمبادل.

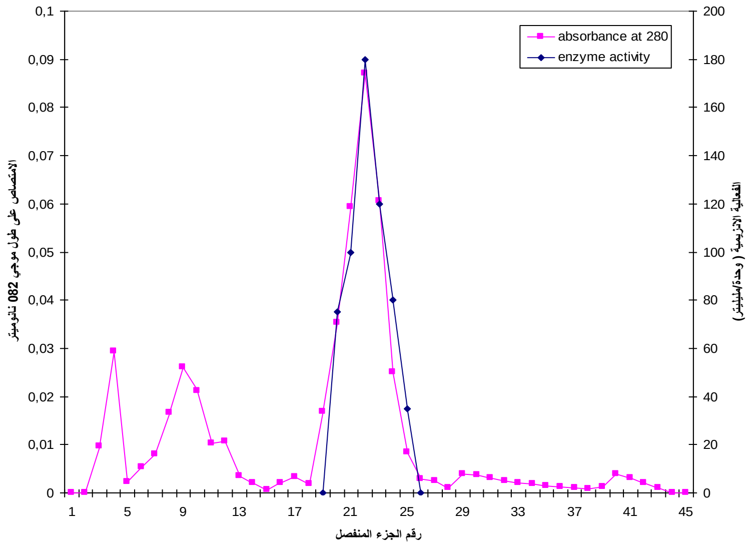
جدول (1) : تنقية انزيم البروتييز المستخلص من نوى تمر الزهدي .

الخطوة	الحجم (مليليتر)	الفعالية الانزيمية (وحدة / مل)	البروتين (ملغم / مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية (%)
المستخلص الخام	25	275.80	3.384	81.50	6895	1	100
الترسيب كبرتيات الامونيوم (نسبة الاشباع 75%)	15	342.4	0.840	407.62	5136	5	74.49
التبادل الايوني بعمود ثنائي اثيل امينو اثيل سليلوز	25	188.35	0.205	918.78	4708.75	11.33	68.29
الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل أس - 200	25	161.12	0.086	1873.49	4028.0	22.99	58.42



الشكل (1): كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم البروتييز المستخلص من نوى تمر الزهدي باستخدام عمود DEAE-Cellulose بابعاد(25×3.5)سم والذي تم موازنته بمحلول دارئ الفوسفات بنركيز 20 ملي مولار وبرقم هيدروجيني 7.5 ، والذي تم استرداه بمحلول ملحي خطي من كلوريد الصوديوم (0-0.5) مولار وسرعة الجريان 60 ملييتر / ساعة (حجم الجزء المنفصل 5 مليليتر) .

وبعد جمع اجزاء قمة الفعالية واجراء التنافذ الغشائي له (الديلزة)، كان الفعالية النوعية 918.78 وحدة / ملغم بروتين وبحصلية انزيمية 68.29% (جدول 1) . جاءت خطوة الترشيح الهلامي للاجزاء المحتوية على الفعالية بعمود السيفاكريل S-200 بعد خطوة التبادل الايوني لاستكمال خطوة تنقية الانزيم (الشكل 2) وقد حققت عدد مرات تنقية 22.99 مرة وحصيلة انزيمية 58.42% (الجدول 1) .

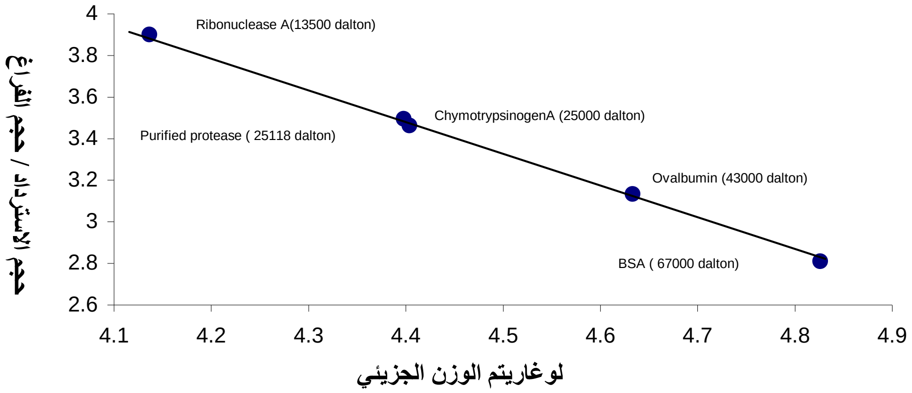


الشكل (2): كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي لانزيم البروتييز المستخلص من نوى تمر الزهدي باستخدام عمود السيفاكريل اس - 200 (2.5× 70)سم والذي تمت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7.5 . 0 حجم الجزء المنفصل 5 مليليتر) .

يمكن عد النتائج التي تم الحصول عليها في خطوات التبادل الايوني والترشيح الهلامي لتنقية البروتييز المنقى من نوى تمر الزهدي بانه تم ازالة البروتينات ذات الاوزان الجزيئية المنخفضة ونتج عنها انزيم عالي النقاوة نظر للتطابق قمتين البروتين والفعالية (الشكل 2) .

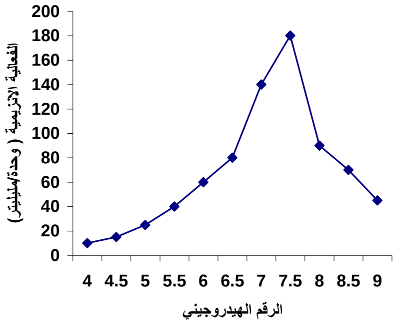
عين الوزن الجزيئي للبروتييز بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفاكريل اس -200 في تعيين حجم استرداد للصبغة الدكستران الازرق

(Blue Dextrane 2000) لكونه يمثل حجم الفـراغ (Vo) ، كمـا تـم تعيـين حجـوم اسـترداد البروتينـات القياسـية المستخدم (Ve) والتـي شـملت البــومين المصـــل البقــري والالبــومين البــيض والكيموتربسـين (A) ورايبونيوكليسـيز . وحسـبت نسبة حجم الاسترداد لكل منهما الى حجم استرداد الدكستران الازرق (الشكل 3) كانت قيمة الـوزن الجزيئـي لليوربيز 25118 دالتن . ويختلف الـوزن الجزيئي وفق النوع وجنس النبات ففي بذور نبات الحنطة السوداء وجد بان الوزن الجزيئي البروتييز المعـدني والمقدر بطريقـة الترشـيح الهلامـي كـان 39000 دالتن **[4]**.



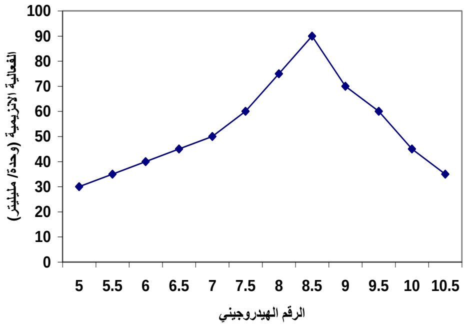
الشكل (3): تعيين الوزن الجزيئي للبروتييز (المنقى) المستخلص من نوى تمر الزهدي بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفاكريل S-200 .

ومـن الصـفات المهمـة لانـزيم البروتييـز التـي تمـت دراسـتها هـي تحديـد الـرقم الهيـدروجيني الامثـل لفعاليـة البروتييـز فكـان 7.5 (الشـكل 4) ومـن خلال هذه النتائج يتضح بان البروتييز يكون مقاربة للرقم الهيدروجيني من مصادر آخرى حيث تشير معظم المصادر على ان الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية هو 7.5 عند استخدام مـادة الكـازين كمـادة اساس **[13و14]**. اما البروتنيز المعدني المنقى من بذور الحنطـة السـوداء فقـد كـان الـرقم الهيـدروجيني الامثـل 8.0-8.2 عنـد اسـتخدام كلوبيـولين كمـادة اساس **[4]** .



الشكل (4) : الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البروتييز المستخلص من نوى تمر الزهدي .

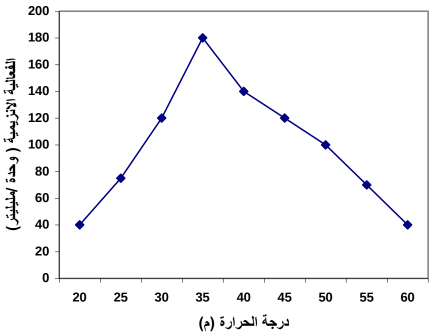
تمت دراسة تاثير الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات البروتتيز المستخلص من نوى تمر الزهدي والذي يعـد مـن الصـفات المهمـة فـي تحديـد ظـروف تنقيـة البروتييـز حيـث تبـين مـن الشـكل (5) بـان الـرقم الهيدروجيني الامثل للثبات هو (8.5) وانخفضت الفعاليـة عنـد الارقـام 7 و 8 ويمكـن ان يعـود هـذا الانخفـاض الـى تـاثير الـرقم الهيـدروجيني فـي التركيب الثلثي والثانوي لجزيئة الانزيم وتغيير في شكل مواقعه الفعال كما يحدث مسخ للانزيم في المحاليل الحامضية والقاعدية المتطرفة **[15]** .



الشكل (5) : الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات البروتييز المستخلص من نوى تمر الزهدي .

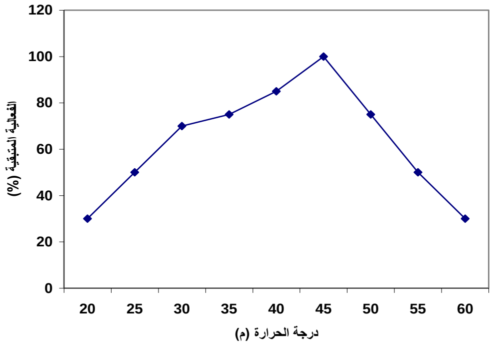
تمت دراسة تاثير درجات حرارية مختلفة في فعالية بروتييز المستخلص من نـوى تمـر الزهـدي ولـوحظ زيـادة الفعاليـة عنـد درجـة حـرارة 35 م ولمـدة 15 دقيقـة (الشـكل 6) ويعـزى ذلـك الـى ان سـرعة التفاعل الانزيمي تزداد بزيادة درجة الحرارة ضمن

مدى معين بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات ، وان سبب انخفاض الفعالية عند زيادة درجة الحرارة يعود الى مسخ الانزيم نتيجة تاثير الحرارة على التركيب الثلثي للبروتين وتغير تركيب الموقع الفعال **[16]** . جاءت هذه النتائج متفق مع ماورده عدد من الباحثيين من ان الدرجة الحرارية المثلى للبروتييز هي 35 م **[3،5]** .



الشكل (6) الثبات الحراري لبروتييز المستخلص من نوى التمر الزهدي

كما تمت دراسة الدرجة الحرارية المثلى لثبات البروتييز المستخلص من نوى تمر الزهدي وقد اتضح من النتائج بان الانزيم احتفظ بكامل فعاليته عند درجة حرارة 45 م ولمدة 15 دقيقة بعدها انخفضت الفعالية المتبقية الى 70% عند درجة حرارة 50 م (الشكل 7) ، ان حساسية الانزيم تجاه الحرارة لها علاقة ببعض صفات الانزيم كوزنه الجزيئي ومدى احتوائه على اواصر ثنائية الكبريت ويسهم تركيب الوسط المحيط في زيادة او قلة حساسية الانزيمات تجاه الحرارة كالرقم الهيدروجيني والقوة الايونية **[16و17]**.



الشكل (7) : الثبات الحراري لبروتييز المستخلص من نوى تمر الزهدي ، حضن بدرجات حرارة مختلفة (20-60) م لمدة 15 دقيقة.

المصادر

1. عباس ، وداد عبد1999 . دراسة بعض البروتينات ذات الفعالية البيولوجية في بذور الاصناف التجارية لنخيل التمر *Phoenix dactylifers L.* . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد.

2. Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S.and Deshpande, V.V.1998. Molecular and biotechnology aspects of microbial proteases.Microbiol. Molecul.Biol. Rev.62(3): 597-635.

3. Al-Jumaily , E.F. and Welad, I. 2005.Purification of Protease Enzyme from *B. stearothermophilus* by Solid State Fermentation .Al-Nahairn J.University. 8 (1) P.12-18**.**

4. Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E. and Voskoboynikova, N.E. 1990. Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat (*Fagopyrum esculentum)* seeds. Biochem. J. 15;272(3):677-82.

5. Klapper,B.F.; Jameson, D.M. and Mayer,R.M. 1973. The purification and properties of an extracellular protease from *Aspergillus oryzae* NRrL 2160. Biochem. Biophys. Acta.34:505-512.

6. Simoes , I. and Faro, C. 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. Eur. J. Biochem. 271, 2067-2075.

7. Sakka , K.; Shimada,K. and Matsu shima, K. 1985. Purification and some properties of serine protease from mutant of *A.niger .Ferment.Technol. 63(5):749-483.*

8. Grzywniwicz,K. and Lobarzewski, J. 1994. A purification method from specific serine proteases using one-step affinity chromatography. J.Chem. Tech. Biotechnol. 60: 153-160.

9. Al-Shikirhy, F.H.M.; Shikir,K.A. and Al-Jumaily, E.F.2006. Extraction and Purification of Urease from Zahdi date plam seeds (*Phoenix dactylifera L.).* 1. Screening of commercial varieties date seeds for urease enzymes.

13. Yang, J. Shih, I.; Tzeng,Y. and Wang,S.2000. Production and purification of protease from a *B.subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme. Microbial. Tecnol.26: 406-413.
14. Chopra, A.K. and Mathur, D.K. 1985. Purification and characterization of heat -stable protease from *B. stearothermophilus* RM-67.J.Dairy Sci. 68:3202-3211.
15. Ikeda, K. and Kusano, T. 1978. Isolation and some properties of a trypsin inhibitor from Bruckwheat grain. Agric .Biol. Chem. 42. 307.
16. Segel, J.J. 2000. Biochemical calculation. John wiley and Sons.
17. Whitaker,J.R. 1972. Principle of Enzymology for the Food Science.pp.481-501. New York.

Purification and Characterization of protease from Zahdi dates plam seeds (*Phoenix dactylifera* L.)

Essam F. Al-Jumaily* ***Firial H. Al-Shikirhy***** ***Maareb N. Rasheed****

*Genetic Engineering and Biotechnology Institute for post graduate studies, Baghdad University, Iraq.
**Teacher Training Institute, Second –Karkh, Baghdad, Iraq

Key Words: Protease, Zahdi dates plam seeds, purification and characterization plant proteases

Abstract

Proteinases (E.C.3.4.21) family are widely distributed in the nature; it was present in animals tissues , plants and microbial cell .

Protease was purified from Zahdi seed (*Phoenix dactylifera* L.) by several steps included ammonium sulphite ppt (75%) saturation and dialyzed against the 80mM sodium phosphate buffer at pH 7.5 . The enzyme specific activity was 407.62 unit/mg protein. The obtained extract was purified by DEAE-Cellulose column followed by gel filtration through Sephacyl S-200 column .The enzyme specific activity ,yield and purification fold were 1873.49 unit/mg protein, 22.99 and 58.42% respectively.

The results of protease characterization showed that the molecular weight was 25118 daltons as determined by gel filtration. The optimum temperature of the enzyme activity 35 C for 15 minutes and that for stability was 45 C for 15 minutes, using sodium phosphate buffer at pH 7.5, The optimum pH for the enzyme stability and activity were 8.5 for 15 minute and 7.5 respectively.