Isolation, purification and partial characterization of ficin from Ficus carica latex

† Abdul Aal F., Alquraishy, * Ahmed D., Jabbar.

† College of Agriculture/ Wassit University, * College of Science / Wassit University

Abstract

This study aimed at the isolation, purification and characterization of fig latex ficin. Samples were collected from fruit joint with the fig tree. Supernatant was decanted from fig latex after centrifugation at 3000 rpm which represents crude enzyme extract. Latex content was concentrated by sucrose powder. Purification steps were carried out with ion-exchange and gel filtration using DEAE- cellulose and sephadex G-50 columns respectively. Enzyme yield and purification folds were 51.688% and 15.635 respectively with specific activity 148.336 U/mg. By using gel filtration, molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 22.725 Da. The pH at which ficin showing activity ranged between 6-8.5. Ficin showed a good stability in pH ranging between 6-8. Optimum temperature for activity and stability were 50 C° and 25-40 C° respectively. Activation energy for substrate conversion of this enzyme was calculated to be 10.22 Kca/mol.

فصل انزيم الـفايسين من الحليب النباتي للتين *Ficus carica* latex وتنقيته ودراسة بعض صفاته.

[١]عبد العال فرحان القريشي، [٢]احمد درويش جبار ـ [١] كلية الزراعة / جامعة واسط، [٢] كلية / العلوم جامعة واسط

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة فصل انزيم الفايسين من الحليب النباتي لنبات التين وتنقيته ودراسة بعض صفاته، حيث جمعت عينة من الحليب النباتي من منطقة اتصال الثمار بالشجرة بعدها اجريت لها عملية النبذ المركزي، اهمل الراسب واعتمد الراشح مصدرا للانزيم الخام، ركز محتوى الحليب النباتي (الراشح) باستخدام السكروز ثم تمت عملية تنقية الانزيم بخطوتين متتاليتين تضمنت التبادل الايوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose والترشيح الهلامي خلال عمود Sephadex G-50 فكانت الحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية ٥١.٦٨٨% ، ١٥.٦٣٥ مرة على التوالي وبفعالية نوعية ١٤٨.٣٣٦ وحدة/ملغم بعدها درست بعض صفات الانزيم وقد اشارت النتائج الى ان الوزن الجزيئي للانزيم بلغ ٢٢.٧٢٥ كيلو دالتون عند تقديره بطريقة الترشيح الهلامي ووجد ان الانزيم يكون فعالا بمدى من الارقام الهايدروجينية تراوحت بين ٦-٨.٥ واظهر الانزيم ثباتا ضمن ارقام هايدروجينية تراوحت بين ٦-٨ . وكانت درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم ٥٠ م° اما الثبات الحراري للانزيم فقد تراوح بين ٢٥-٤٥ م°، وقد بلغت طاقة التنشيط لتحويل المادة الاساس (الكازين) الى ناتج كانت ١٠.٢٢ كيلو سعرة/مول.

المقدمة

تعرف الانزيمات بانها مواد مساعده حيوية Biocatalysis تكون عالية التخصص في عملها، بروتينية التكوين (الغالبية العظمى منها) تنتجها الخلايا الحية، تعمل على الإسراع في التفاعلات الكيميائية التي تشترك فيها حال توافر الظروف الملائمة لعملها كما أنها لا تظهر في المواد الناتجة من التفاعل ولا تستهلك ولها القدرة على العمل خارج الخلايا التي تنتجها [٢،١]

استعملت الانزيمات في مجالات تطبيقية واسعة، طبية وغذائية وصناعية وهي تستعمل بصور متعددة سواء أكانت بشكل سائل او على هيئة مسحوق او على شكل بلوري او محبب. وتتميز الانزيمات بتعدد مصادرها الطبيعية، حيث يمكن الحصول عليها من الانسجة النباتية او الحيوانية ومن الاحياء الدقيقة. ومن اهم المجالات التي تستعمل فيها الانزيمات استعمالها من قبل مصنعي الاغذية لغرض انتاج العديد من المنتجات الغذائية المهمة، كإنتاج عصائر الفاكهة بمختلف انواعها وفي صناعة الزيوت والدهون وتصنيع منتجات الألبان والصناعات النشوية وتطرية اللحوم وفي تحسين اللون والنكهة والقوام وإطالة العمر التخزيني وتحسين القابلية الهضمية للعديد من الأغذية [٣، ٤، ٥]

تحتل عائلة البروتييزات (proteases family)، موقعا مهما ومتميزا بين الانزيمات من حيث اهميتها واتساع مجالاتها التطبيقية [٦] ومن هذه الانزيمات المحللة للبروتين انزيم الفايسين (او الفيسين) Ficin (E.C: 3.4.22.3) الذي يتميز بأهمية تجارية بالغة، والذي امتلك هذه التسمية من مصدره الرئيس التين Fig حيث يتواجد الانزيم بوفره في حليب التين Fig latex. ينتمي التين الى العائلة (التوتية) ويمتاز

بسرعة نموه وكثرة تفرعاته ويصل ارتفاعه الى (٢-٣) امتار، تحوي جميع أنسجته العصارة اللبنية. ينتشر هذا النبات في قارتي آسيا وأفريقيا، وينتشر في العراق وخصوصا في مناطق الوسط والجنوب.

هدفت الدراسة الى إمكانية استخدام العصاره اللبنية (الحليب النباتي) لنبات التين (المنتج للثمار ذات اللون الاسود) في عزل انزيم الفايسين Ficin منها وتنقيته ودراسة بعض صفاته.

المواد وطرائق العمل

١- جمع العينات

تم جمع العينات من احد بساتين مدينة النعمانية، حيث اختيرت أماكن اتصال الثمار بالشجرة لغرض جمع الحليب النباتي منها حيث تمتاز بغزارة الحليب فيها مقارنة بباقي اجزاء الشجرة. استخدمت انابيب الاختبار بخطوة جمع العينة، وبعد جمع الكمية المطلوبة من العينة أجريت لها عملية النبذ المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة\دقيقة مدة ٣ دقائق ثم فصل الراسب عن الراشح واهمل الراسب واعتمد الراشح مصدرا للانزيم الخام ثم ركز المستخلص الأنزيمي الخام باستخدام السكروز وقيست فيه الفعالية الانزيمية تجاه مادة التفاعل الكازين بمتابعة الزيادة الحاصلة بالامتصاصية على طول موجي ٢٨٠ نانومتر نتيجة التحلل المائي للكازين بفعل الانزيم وبحسب الطريقة الموصوفة من قبل (٧) وقدر تركيز البروتين بطريقة Lowry [٨]، حضرت مادة التفاعل الكازين بتركيز ١% حيث تمت اذابة ٠.٥ غم منها بحجم من داريء فوسفات الصوديوم المحضر بتركيز ٠.٢ مولار وبرقم هايدروجيني ٧ واكمل الحجم الى ٥٠ مل باستعمال الداريء ذاته، وقيست الفعالية الانزيمية باضافة ٠.١ مل من المستخلص الانزيمي الى انبوبة اختبار تحتوي على ٠.٩ مل من مادة التفاعل وحضن المزيج مدة ٢٠ دقيقة بدرجة ٣٥ م بعدها اوقف التفاعل باضافة ٣ مل من حامض الخليك ثلاثي الكلورالمحضر بتركيز ٥% ثم ترك المزيج لمدة ساعة ثم اجريت لة عملية نبذ مركزي بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة مدة ٢٠ دقيقة، فصل الرائق واستخدم لقياس الامتصاصية عند ٢٨٠ نانومتر، عرفت وحدة الفعالية الانزيمية بانها كمية الانزيم التي تزيد قيمة الامتصاصية وحدة واحدة عند طول موجي ٢٨٠ نانومتر وتحت ظروف التجربة. [٣]

٢- التبادل الايوني

مرر الإنزيم المركز بالسكروز من الخطوة السابقة على عمود المبادل الايوني DEAE-cellulose المحضر بابعاد ٢.٥×٣٥ سم الذي سبقت موازنته بمحلول داريء فوسفات الصوديوم بتركيز ٠.٠٢ مولار وبرقم هيدروجيني ٧. غسل العمود بعدها بمحلول الموازنة ذاته وبسرعة جريان ٨٠ مل/ساعة بمعدل ٤ مل للجزء الواحد. قيست الامتصاصية للاجزاء الناتجة من مرحلة غسل المبادل على طول موجي ٢٨٠

نانومتر، ثم قيست الفعالية الانزيمية (وحدة/مل) لهذه الأجزاء وبعد وصول الامتصاصية للطول الموجي ٢٨٠ نانومتر الى الخط الصفري basal line، جرت مرحلة الاسترداد للبروتينات المرتبطة باستخدام تدرج ملحي خطي باستعمال محلولين، محلول فوسفات الصوديوم الداريء ٠.٠٢ مولر برقم هيدروجيني ٧ حاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز ١ مولر ومحلول فوسفات الصوديوم الداريء ٠.٠٢ مولر وبرقم هيدروجيني ٧. قيست الامتصاصية للاجزاء المفصولة من مرحلة الاسترداد على طول موجي ٢٨٠ نانومتر ثم قيست الفعالية الانزيمية ورسم منحنى لعدد الاجزاء المفصولة الناتجة من مرحلة الغسل ومرحلة الاسترداد مقابل كل من الامتصاصية والفعالية الانزيمية وحدة/مل. جمعت اجزاء قمة الفعالية الانزيمية وقدرت فعاليتها وقيس تركيز البروتين فيها ثم تم تركيزها بالسكروز باستعمال انبوب النضح الغشائي.

٣- الترشيح الهلامي

مرر الانزيم المركز الناتج من الخطوة السابقة على عمود الفصل Sephadex G-50 المحضر بابعاد (١.٩×٨٠ سم) الذي سبقت موازنته بمحلول داريء فوسفات الصوديوم بتركيز ٠.٢ مولار وبرقم هيدروجيني ٧، واسترد الانزيم بمحلول الموازنة ذاته بسرعة جريان ٣٠مل/ساعة بواقع ٣ مل للجزء الواحد ثم قيست الامتصاصية للأجزاء المفصولة على طول موجي ٢٨٠ نانومتر مع تقدير الفعالية الانزيمية لكل جزء، بعدها جمعت الاجزاء الفعالة وتم تقدير الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين فيها.

دراسة بعض صفات الانزيم المنقى

عين الوزن الجزيئي لانزيم الفايسين المنقى باستخدام تقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفاكريل Sephadex G-50 بابعاد (١.٨×68 سم) حيث تم تقدير حجم الفراغ للعمود بامرار محلول الدكستران الازرق، اما حجم الاسترداد للبروتينات القياسية فقد حسب بإمرار محاليلها كل على انفراد خلال العمود وتضمنت (Bovine Serum Albumine, Ovalbumine, trypsine, lysozyme) حيث ان سرعة الجريان ثابتة وهي ٣٠ مل/ساعة، عين الرقم الهايدروجيني الامثل لفعالية انزيم الفايسين المنقى بتقدير فعالية الانزيم على حدة في كل محلول من محاليل المادة الاساس المحضرة بمدى من الارقام الهيدروجينية تتراوح بين (٣.٥-١٠.٥) وبفارق مقداره ٠.٥ درجة. عين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الفايسين المنقى بإضافة حجم معلوم من الانزيم المنقى على حدة الى حجم مساو لكل محلول من المحاليل الدارئة المحضرة بارقام هايدروجينية تراوحت بين (٣.٥-١٠.٥) وبفارق مقداره ٠.٥ درجة في الرقم الهيدروجيني من محلول لاخر، وحضن بدرجة حرارة ٣٧م مدة نصف ساعة ثم نقلت مباشرة الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية، كذلك قدرت درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم المنقى بمدى من درجات الحرارة تراوحت بين ٢٠-٨٠م وبفارق ٥ درجات ثم رسمت العلاقة بين الفعالية الانزيمية مقابل درجة الحرارة المستخدمة بالتفاعل. كما قدرت طاقة التنشيط للانزيم المنقى [Ea] لتحويل المادة الاساس الى ناتج بمدى من درجات الحرارة تراوحت بين ٢٠-٨٠ م° بفارق ٥ درجات بتطبيق معادلة ارينوس المذكورة من قبل 8]. كذلك تم تعيين الثبات الحراري لانزيم الفايسين المنقى وذلك بمعاملتة بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين ٢٠-٧٠ م° بفارق ٥ درجات مدة ١٥ دقيقة ثم نقل الى حمام ثلجي ثم بعد ذلك قدرت الفعالية الانزيمية. [٦]

النتائج والمناقشة:

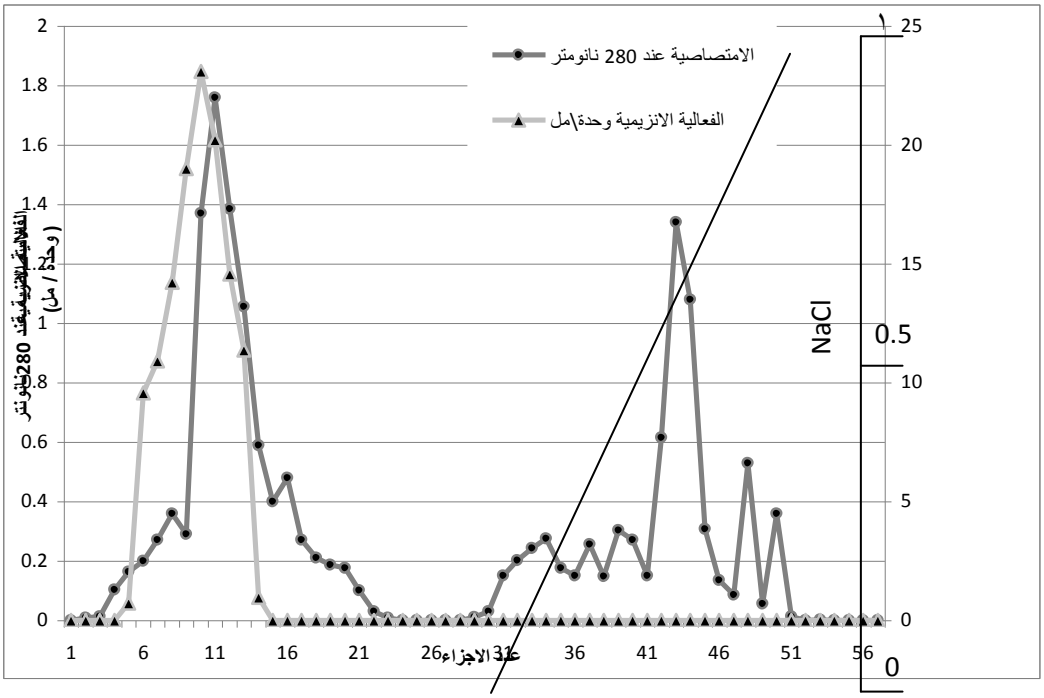
١- عزل الانزيم:

أجريت عملية عزل الانزيم الخام من الحليب النباتي من شجرة التين (المنتجة للثمار ذات اللون الاسود). اجري اختبار عدة أجزاء من الشجرة لمعرفة اكثرها إنتاجا للحليب ووقع الاختيار على منطقة اتصال الثمار بالشجرة (الجزء السفلي للثمرة) حيث تميز هذا الجزء بغزارة الحليب فيه وتم استخدامه مصدر لجمع العينه. بعد جمع الكمية المطلوبة من الحليب النباتي، أجريت لها عملية النبذ المركزي بعدها اهمل الراسب واعتمد الراشح كانزيم خام اعتمادا على نتائج اختبار الفعالية الانزيمية حيث تركزت معظم فعالية الإنزيم بالراشح الذي أجريت عليه عمليات التنقية اللاحقة.

٢- كروماتوغرافيا التبادل الايوني

تبين النتائج الموضحة بالشكل [١] خطوة التنقية الاولى خلال عمود المبادل الايوني DEAE-Cellulose لانزيم الفايسين حيث ظهر الانزيم بالاجزاء الناتجة من غسل المبادل (بقمة فعالية مطابقة لقمة البروتين الرئيسة) مما يدل على ان الانزيم يحمل شحنة موجبة مشابهة لشحنة المبادل الايوني، وكانت الأنابيب من ٦-١٤ ممثلة لفعالية الانزيم كذلك اشارت النتائج الموضحة في الشكل ذاته الى خلو الاجزاء المستردة من المبادل من اي فعاليه للانزيم

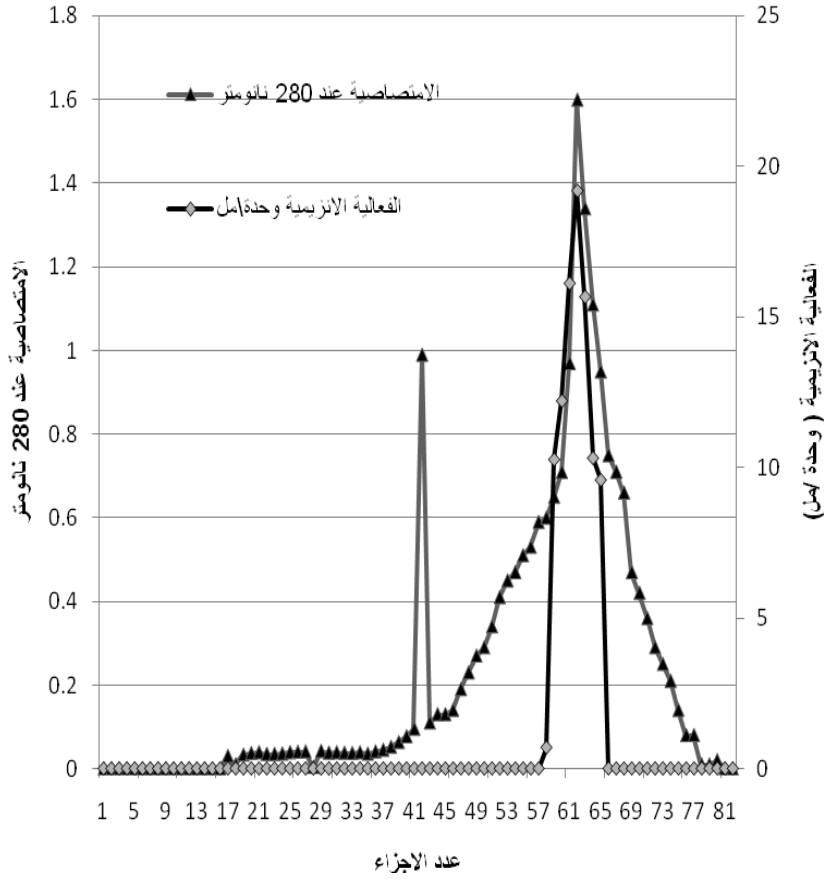
وقد حققت هذه الخطوة فعالية نوعية ٥٤.٣٣٨ وحدةاملغم بروتين بحصيلة انزيمية ٨٧.٨٣٧ % وعدد مرات تنقية بلغت ٥.٧٢٧ مرة



شكل (1) كروموتوغرافيا التبادل الايوني لأنزيم الفايسين من الحليب النباتي لنبات التين باستعمال المبادل الأيوني DEAE-cellulose بابعاد ٢.٥ × ٣٥ سم اجريت مرحلة الغسل باستعمال داريء فوسفات الصوديوم واجريت مرحلة الاسترداد باستعمال الداريء ذاته مع محلول كلوريد الصوديوم بتركيز ١ مولار وبسرعة جريان ٨٠ مل/ساعة بمعدل ٤مل للجزء الواحد

٣- كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

يبين الشكل (٢) نتائج خطوة التنقية الثانية لانزيم الفايسين خلال عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-50 حيث ظهر ان فعالية الانزيم كانت محصورة بالاجزاء من ٥٩ الى ٦٥ وقد تمثلت بقمة واحدة تطابقت مع قمة البروتين الرئيسة وقد حققت هذه الخطوه فعالية نوعية بلغت ١٤٨.٣٣٦% بحصيلة انزيمية بلغت ٥١.٦٨% وعدد مرات تنقية ١٥.٦٣٥ مرة. الجدول (١)



شكل(٢) الترشيح الهلامي لانزيم الفايسين المعزول من الحليب النباتي لنبات التين باستعمال المرشح Sephadex-G- 50 المحضر بابعاد (١.٩×٨٠ سم) الذي سبقت موازنته بمحلول داريء فوسفات الصوديوم بتركيز ٠.٢ مولار وبرقم هيدروجيني ٧، واسترد الانزيم بمحلول الموازنة ذاته بسرعة جريان ٣٠مل/ساعة بواقع ٣ مل للجزء الواحد

جدول (١) خطوات تنقية انزيم الفايسين من الحليب النباتي لنبات التين

الفعالية الأنزيمية (وحده\مل)	تركيز البروتين ملغم\مل	الفعالية النوعية* وحدة\ملغم بروتين	الفعالية الكلية© وحدة	عدد مرات التنقية (مره)	الحصيلة الانزيمية %
١٠.٣٦٠	١.٠٩٢	٩.٤٨٧	٥١٨	١	١٠٠
٢٠.٧٠٣	٠.٣٨١	٥٤.٣٣٨	٤٥٥.٤٦٦	٥.٧٢٧	٨٧.٩٢٧
١٤.٠٩٢	٠.٠٩٥	١٤٨.٣٣٦	٢٦٧.٧٤٨	١٥.٦٣٥	٥١.٦٨٨

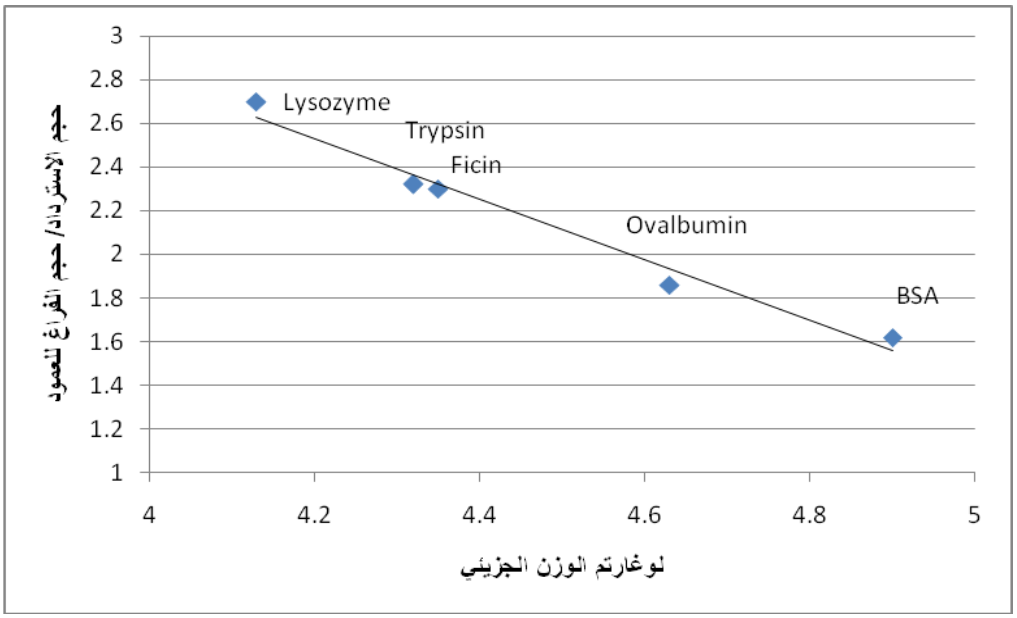
* الفعالية النوعية=الفعالية الانزيمية/تركيز البروتين

© الغعالية الكلية= الفعالية الانزيمية×الحجم

دراسة بعض صفات الانزيم المنقى:

تعيين الوزن الجزيئي للانزيم:

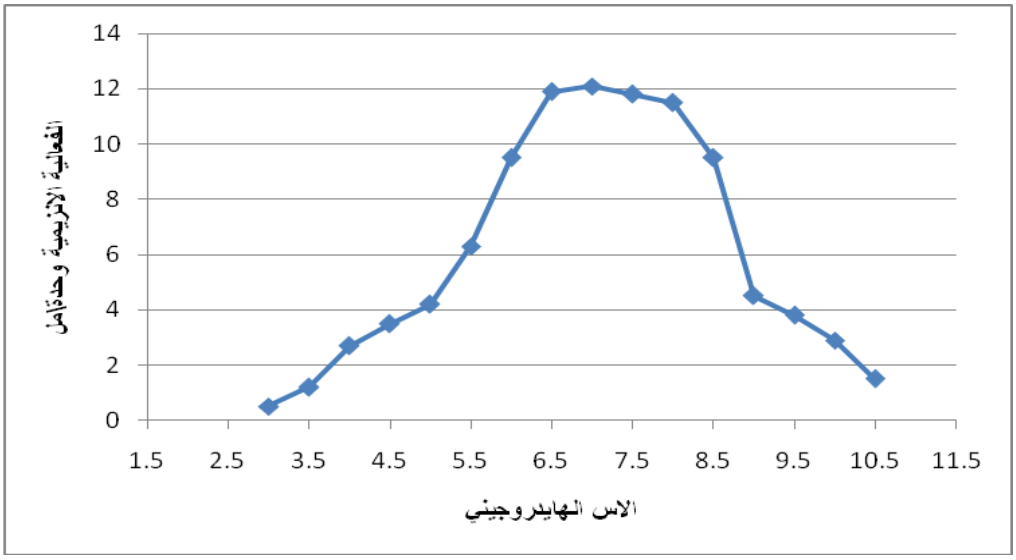
عين الوزن الجزيئي لانزيم الفايسين المنقى باستعمال الترشيح الهلامي خلال عمود Sephadex G-50 المحضر بابعاد (١.٨×٦٨ سم)، وبالاستعانة بمجموعة من البروتينات القياسية ومن خلال رسم العلاقة بين نسبة حجم الاسترداد الى حجم الفراغ (Ve/Vo) للبروتينات القياسية مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي كانت القيمة المستخلصة التي تمثل الوزن الجزيئي للفايسين المنقى تساوي ٢٢.٧٢٥ دالتون (الشكل ٣).



شكل (٣) تعيين الوزن الجزيئي لانزيم الفايسين المنقى من الحليب النباتي لنبات التين باستعمال تقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephadex G-50 المحضر بابعاد (١.٩ × ٨٠ سم)

تعيين الرقم الهيدروجيني الافضل لفعالية الانزيم:

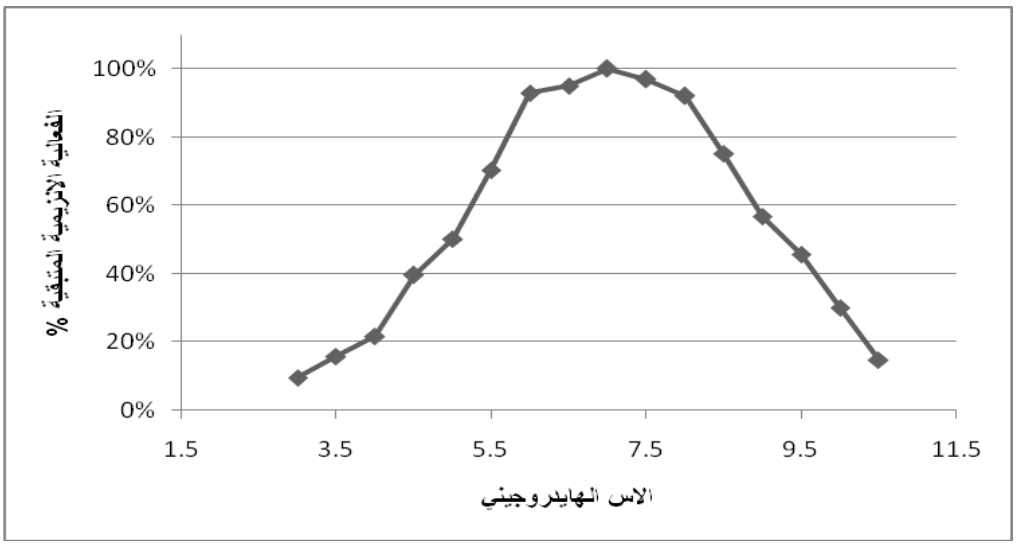
بينت النتائج المبينة في الشكل (٤) ان الانزيم يكون فعالا بمدى من الارقام الهيدروجينية من ٦-٨.٥ ولوحظ حصول انخفاض بالفعالية الانزيمية عند الارقام الهيدروجينية المتطرفة الحامضية والقاعدية حيث انه على قيم متطرفة من الارقام الهيدروجينية يحدث انخفاض بفعالية الانزيمات بسبب حدوث تغير في الحاله الطبيعية للانزيم [١٠، ١١].



شكل (٤) تعيين الرقم الهايدروجيني الافضل لفعالية انزيم الفايسين المنقى من الحليب النباتي لنبات التين

تعيين الرقم الهيدروجين الامثل لثبات الانزيم:

يبين شكل رقم (٥) نتائج دراسة ثبات انزيم الفايسين المنقى بمدى من الارقام الهيدروجينية حيث ظهر ان الانزيم ثابت بمدى من الارقام الهايدروجينيه تتروح بين ٦-٨

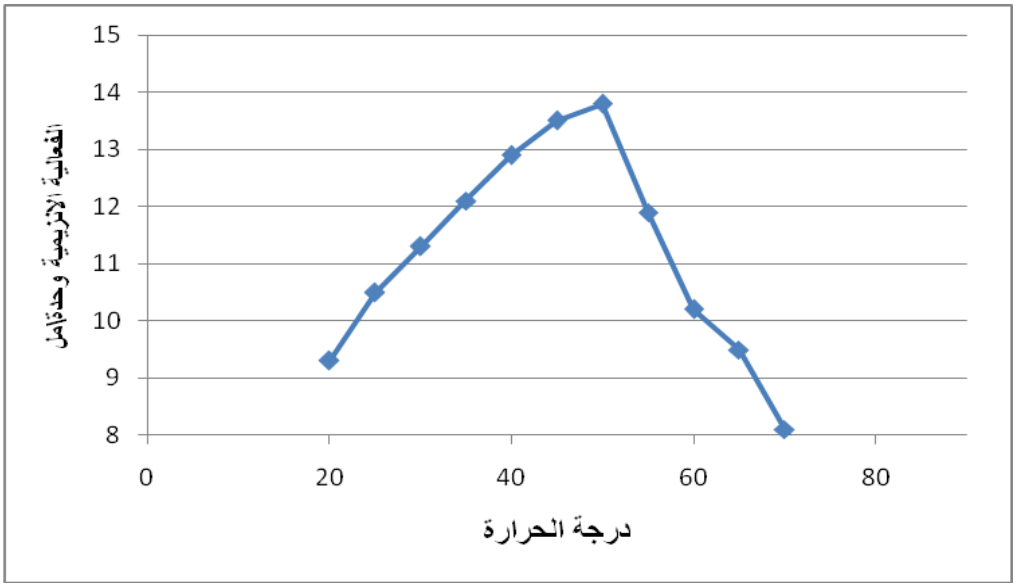


شكل (٥) الرقم الهيدروجين الامثل لثبات انزيم الفايسين المنقى

ويبقى الانزيم محتفظا بما بما يقرب من ٧٥.٢%،٧٠.٣%من فعاليته عند الارقام الهايدروجيني ٨.٥، ٥.٥ على التوالي ويفقد الانزيم ما يقرب من ٧٠% و ٩٠% من فعاليته عند الارقام الهايدروجينية المتطرفه ١٠ و ٣ على التوالي. ففي المحاليل الشديدة الحامضية والقاعدية يحدث مسخ لا عكسي مما يؤدي الى حدوث تغير طبيعة الموقع الفعال وبالتالي فقدان الانزيم لفعاليته بالكامل [11]

تعين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم:

يظهر الشكل (٦) تاثير درجه الحراره في فعاليه انزيم الفايسين المنقى حيث اظهر النتائج التى تم الحصول عليها، حدوث زياده بالفعاليه الانزيميه مع زياده درجه الحراره من ٢٠م° وتبلغ الفعاليه الانزيميه اعلى مستوياتها عند ٥٠ م° بعدها تبدأ الفعاليه الانزيميه بالانخفاض مع زياده درجه الحراره ويعود السب في ذلك الى ان سرعه التفاعل الانزيمي تزداد بزياد درجات الحرارة ضمن مدى معين بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات الا ان ارتفاع درجة الحرارة عند حدود معينة يؤدي الى مسخ الانزيم وتلف التركيب الثلاثي له وبالتالي انخفاض فعاليته .

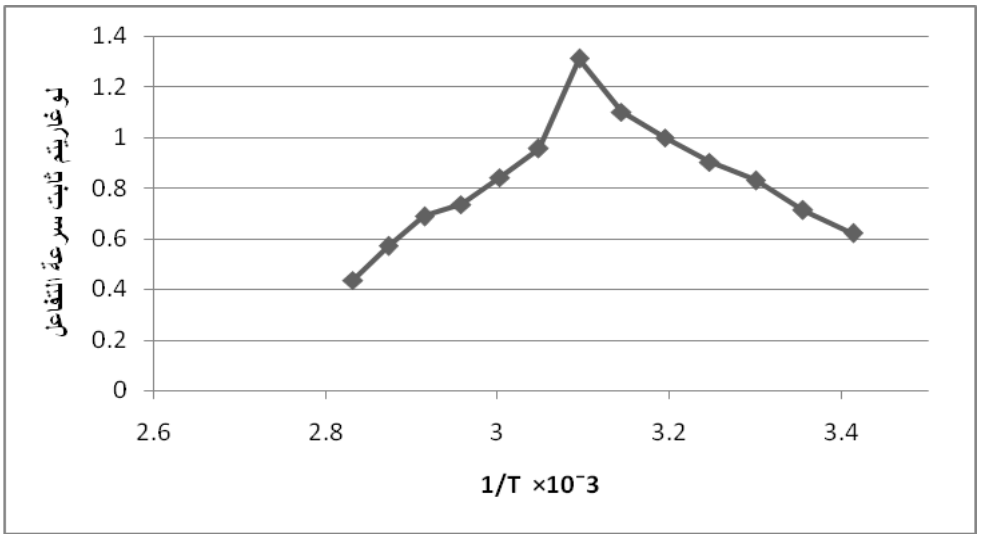


شكل (٦) درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم الفايسين المنقى من الحليب النباتي للتين

تعيين طاقة التنشيط:

يظهر الشكل (٧) العلاقة بين لوغاريتم ثابت السرعة للتفاعل لانزيم الفايسين مقابل مقلوب درجة الحرارة المطلقة وطبقا لمعادلة ارينوس، حيث بلغت قيمة طاقة التنشيط المستحصل عليها اللازمة لتحويل المادة الاساس الى ناتج حوالي ١٠.٢٢ كيلو سعرة\مول، وتقع هذه القيمة ضمن المدى المعروف لقيم طاقة التنشيط لتفاعلات تحويل المواد الاساس التي تقع بين ٦-١٥ كيلو سعرة\مول [٣]. ولابد من الاشارة الى ان التفاعلات التي تشترك فيها الانزيمات كونها عاملا مساعدا، تكون طاقة

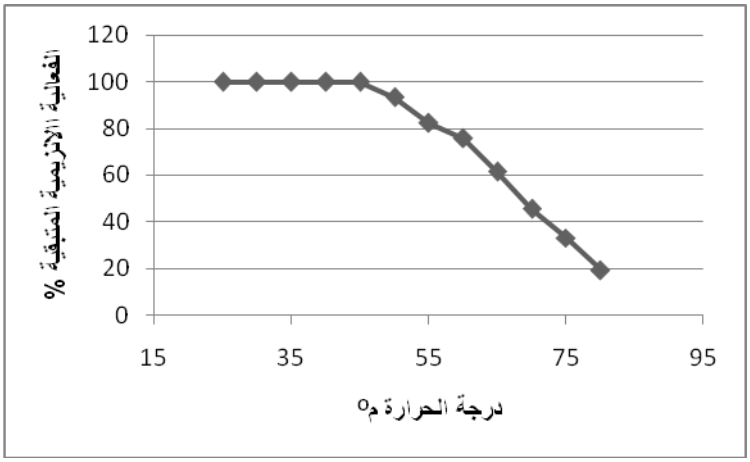
التنشيط لها اقل من التفاعلات ذاتها فيما لو تشترك فيها المواد الكيميائية اللاعضوية من حيث كونها عوامل مساعدة [5].



شكل (٧) منحنى ارينوس لتعيين طاقة التنشيط لانزيم الفايسين المنقى من الحليب للنباتي

تعيين درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم.

تبين النتائج الموضحة بالشكل (٨) الثبات الحراري لانزيم الفايسين المنقى، اذ احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة ٢٥-٥٤ م° لمدة ١٥ دقيقة وبما يقرب من ٩٣.٣%، ٨٢.٢١% عند درجات حرارة ٥٠ م°، ٥٥ م° على التوالي واستمرت الفعالية الانزيمية بالانخفاض مع ارتفاع درجات الحرارة حيث لم يحتفظ الإنزيم الا بما يقرب من ٣٣.١٢ م°، ١٩.٢٢ م° من فعاليتة عند ٧٥ م°، ٨٠ م° على التوالي. قد يعزى السبب في ذلك الى اختلاف المحتوى الكاربوهيدراتي للانزيمين باعتبار ان وجود الكاربوهيدرات يعزز الثبات الحراري للانزيم [12 ،13]



شكل (٨) درجة الحرارة المثلى لثبات انزيم الفايسن المنقى من الحليب النباتي لنبات التين.

المصادر

١. دلالي، باسل كامل والركابي، كامل (١٩٨١). كيمياء الاغذية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

٢. حسن، عمر فؤاد احمد (٢٠٠٢). استخدام بروتييز اوراق نبات الديباج *Calotropis procera* في تطرية لحوم النعاج المسنة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

3. Whitaker, J. R. (1972). Principles of enzymology, for the food sciences. Mercel Dekker, Inc.,USA
4. Reed, G. (1975). Carbohydrates, In: Enzymes in Food processing, 2nd Ed. Academic press. New York.
5. Shanani, khem-M., and A. B. Friend (1980). Enzyme enhancing foods Nutrition. J. Professional- Nutritionist. 13(U) P. 1-4. USA. (Arevi).
6. Huang, G., T. Ying. P. Huo, and J. Jing (2006). Purification and characterization of a protease from therophilic bacillus strain HSO8. African Journal of Biotechnology. Vol.5 (24). Pp3433-2438.

7. الطويل، سعد ضياء وديع (٢٠٠٠). فصل وتنقية وتوصيف انزيم البروتييز من اوراق نبات Calotrpis procera الديباج واستخداماتة التطبيقية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد

8. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Far and R. J. Randall (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 139: 265-275.

٩. دلالي، باسل كامل. (١٩٨٣). فهم الانزيمات. مطابع جامعة الموصل. ترجمة.

١٠. القريشي، عبد العال فرحان (٢٠٠٥). استخلاص انزيم الفا-اميليز من البنكرياس الكبدي لسمك الكارب العادي *Cyprinus carpio L* وتنقيتة ودراسة بعض صفاته واستخداماته التطبيقية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

11. Whitaker, G. R., and P. K. Granum. (1980). An absolute method of protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. Analatic. Biochemist, 190: 156-159.

12. Muro, T., T. Tominaga and S. Okada. (1984). Agric. Biol. Chem. 48(5): 1223-1230.

13. Segel, I. H. (1976). Biochemical calculation, 2nd ed. Jhon Wiley and sons, New York.