*تنقية وتوصيف انزيم البروتييز Protease لبعض المصادر النباتية

رواء ماجد داخل الصفار

جامعة القادسية/ كلية العلوم

نزارعبد الاميرحمزة

جامعة القادسية/ كلية العلوم

nazar.hamzah@qu.eu.iq

الخلاصة

تم تنقية لانزيم البروتيز المستخلص من ثمار نبات الحنظل *Citrullus colocynthis L.* وشملت خطوات التنقية الترسيب بكبريتات الامونيوم 60% وكروماتوكرافيا التبادل الايوني باستعمال لمبادل الايوني ثنائي اثيل امينو اثيل سيليلوز DEAE-Cellulose والترشيح الهلامي بخطوتين على هلام السيفاروزSepharose-G100 6B وبلغ عدد مرات التنقية (15.01) وبحصيلة إنزيمية (9.1) % . بينت نتائج توصيف الأنزيم ان البروتييز يمتلك وزن جزيئي 50118Da . الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية الانزيمية (7.5) في حين تراوحت قيم الرقم الهيدروجيني الامثل لثباته (7-8.5) . أظهرت النتائج إن أنزيم ألبروتييز يمتلك أقصى فعالية له عند درجة حرارة (35) م اتجاه المادة الاساس الكازائين 1% بينما اثبت الانزيم ثباتا حراريا بين (25-40) م . بينت النتائج حصول زيادة في الفعالية بوجود ايونات الكاليسيوم والصوديوم والتي كانت 112% و 121% على التوالي. ثبط البروتييز بصورة كبيرة بمادة PMSF وليس بمادة EDTA مما يدل على ان الانزيم ينتمي لمجموعة البروتييزات السيرينية بينت نتائج التطبيقات العملية إمكانية إستعمال الانزيم كمضاد حيوي ضد بعض انواع الاحياء المجهرية مثل *E.coli*، *Proteus mirabillis* ، *Strep agalactiae* ، *Staph aureus* ، *Aspergiluus niger, Shigilla spp* و *Candida albicanus*.

كلمات مفتتاحية :ثمار الحنظل ،التنقية ،التوصيف ،السيرين بروتييز .

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

التجميل حيث تبين ان للبروتييزات القدرة الكبيرة على إزالة التجاعيد (21).البروتييزات القاعدية استخدمت بصورة واسعة في صناعة المنظفات لقدرتها على إزالة بقع الدم والاوساخ من الاقمشة (2) فضلا عن استعمالها في صناعة الغزل والنسيج والجلود (1). تستعمل البروتييزات في العديدة في المجال الطبي في علاج الحروق والجروح لقدرتها على إزالة الانسجة المحطمة والمصابة فضلا عن عملها كمضادات للالتهاب ايضا لها دور مهم لدى الاشخاص المصابين بعسر الهظم فضلا عن إستعمالها مع تركيبة معاجين الاسنان لإزالة التسوس . كما تستخدم في معالجة النفايات السائلة (33) وهندسة البروتين (1)

البروتييزات لها دور في عملية تضاعف وانتشار الامراض المعدية والموازنة مع فعاليته (16,25, 9) .تتواجد البروتييزات في جميع الكائنات الحية في الحيوانات والاحياء المجهرية كونها ضرورية لتنفيذ الوظائف الفسلجية المختلفة (27) وتكون واسعة الانتشار في النباتات وبالتحديد بالاعظاء التكاثرية. واشارت العديد من الدراسات الى تنقية الانزيم ودراسة صفاته من مصادر نباتية اخرى مثل دراسة (10) التي تناولت البروتييز المستخلص من بذور نبات البطيخ *cucumis melo* Var agrestis . بلإضافة الى دراسة (47) التي شملت البروتييز المستخلص من بذور نبات الخس الشوكي *Lactuca serriola*. أما (2) فقد تناولت دراسته البروتييز المستخلص من بذور نبات الجبين *Solanum dumbium* كذلك البروتييز المستخلص من اللاتكس لنبات *Euphorbia milii* (45) . البروتييز المستخلص من ثمار نبات البطيخ *Cucumis tringus* Roxburghi (23).

نظرا لقلة الدراسات المحلية حول بروتييزات من نبات الحنظل *Citrullus colocynthis* فقد هدفت الدراسة الحالية الى تنقية وتوصيف البروتييز المستخلص من الثمارالمحلية لنبات الحنظل ودراسة تأثيرات بعض

1المقدمة

البروتييزات او ببتيدات التحلل المائي هي مجموعة كبيرة من الانزيمات لها القدرة على تحليل الاصرة الببتيدية (4, 29). هذه الانزيمات لها دور كبير في العمليات الايضية لخلايا الكائنات الحية وذلك لتاثيرها في تحطيم البروتينات الفعالة حيويا وإنتاج الاحماض الامينية او تخليق البروتينات الفعالة حيويا فضلا عن توليدها انزيمات وهرمونات وببتيدات فعالة حيويا من مركبات غير فعالة (22) .هذه الانزيمات تقسم الى مجموعتين هي بروتييزات خارجية Exopeptidases(EC 3.4.11-19) وبروتييزات داخليةEndopeptidases (EC 3.4.21- 24 and EC 3.4.99). المجموعة الاولى تظهر القدرة على تحليل الاحماض الامينية بالقرب من النهاية الامينية N-terminus اوالنهاية الكاربوكسيلية C- terminus بينما المجموعة الثانية تحلل الاصرة الببتيدية في وسط السلسلة الببتيدية لذلك يطلق عليها Proteinases 29, (12) .

حسب تركيب الموقع الفعال تقسم البروتييزات الداخلية الى اربعة مجاميع رئيسية هي البروتييزات السيرينية Serine proteases ، بروتييزات الثايول Thiol proteases، بروتييزات الاسبارتية Aspartic proteases و البروتييزات المعدنية Metallo proteases (29,12).

تعتمد العمليات الفسلجية في كل اشكال الحياة البروتييزات مثل هضم بروتينات الغذاء , تنظيم تكوين وتحلل الخثرة clots, تحفيز مسار الموت المبرمج للخلية , عملية الانبات , تكوين الابواغ , تحفيز الهرمونات , الاخصاب , السيطرة على الاستجابة المناعية الممفرطة (3,12)، كذلك تمايز الخلايا والنمو(9,5,37) . فضلا عن استعمالها في الصناعات الغذائية كتطرية اللحوم وصناعة الخبز والجبن والبيرة (Walsh,2004) وصناعة المنسوجات (18) فضلا عن استخدامها في مجال مستحضرات الصيدلانية والطبية وانتاج مواد

بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 5000 دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة ، اهمل الراسب واخذ الرائق الذي يمثل المستخلص الأنزيمي الخام .

تقدير الفعالية الأنزيمية

Enzyme assay

إتبعت طريقة (7) لتقدير الفعالية الأنزيمية للبروتيز بأستخدام الكازائين كمادة اساس للأنزيم ، حيث اضيف 0.2 مل من المستخلص الخام للأنزيم الى 1.8 مل من الكازائين بتركيز 1% (المحضر بإذابة غرام واحد من الكازائين في 100 مل من دارئ ترس حامض الهيدروكلوريك (pH:7.5 ، 0.1M) ، وحضن في حمام مائي لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة 37م ، اوقف التفاعل بإضافة 3 مل من محلول 5% ثلاثي كلورو حامض الخليك (TCA) ونبذ المحلول مركزيا بسرعة 5000 دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة ، أخذ الرائق وقرأءة الأمتصاصية على الطول الموجي 280 نانومتر واستعمل إحدى الانابيب كفئ للجهاز والتي تحتوي نفس المكونات ماعدى إضافة محلول (TCA) الى محلول المادة الاساس قبل إضافة المحلول الانزيمي . وتعرف الوحدة الأنزيمية على إنها مقدار الزيادة بالامتصاصية الضوئية على طول موجي 280 نانوميتر لمحلول التفاعل تحت ضروف التفاعل القياسية .

تقدير تركيز البروتين Estimation of protein

إستخدمت طريقة برادفورد (6) لتقدير تركيز البروتين بإستخدام المنحني القياسي لألبومين المصل البقري (BSA) .

تنقية أنزيم البروتيز

التنقية باستخدام كبريتات الامونيوم

أضيفت أوزان معينة (1.06، 1.64، 2.26، 2.91، 3.16، 4.36، 5.16 ، 6.03) غرام من بلورات المنشطات والمثبطات على فعالية الانزيم وكذلك تأثيراته على بعض الاحياء المجهرية المرضية ولتحقيق هذا الهدف تم دراسة مايلي :

1-التحري عن وجود أنزيم البروتييز لبعض المصادر النباتية التابعة للعائلة القرعية

2 - دراسة تأثير بعض العوامل المؤثرة في أستخلاص ألانزيم من المصدر النباتي المنتخب .

3 - تنقية الانزيم بالطرائق الكرماتوغرافيا المتوافرة مثل كبريتات الامونيوم وتقنية التبادل الايوني والترشيح الهلامي

4 - دراسة تأثير بعض المنشطات والمثبطات والايونات المعدنية في فعالية البروتييز المنقى من المصدر النباتي المنتخب .

5- دراسة تأثير الانزيم نموا بعض الأحياء المجهرية

2-المواد وطرق العمل

Materials &Method

إجريت الدراسة في مختبرات كلية العلوم /جامعة القادسية

تحضير المستخلص الأنزيمي الخام

Enzyme preporation

تم الحصول على ثمار الحنظل من (منطقة الحويلة - مقاطعة 22-الكفياية - قضاء عفك) والمنطقة الحدودية عرعربين الحدود العراقية السعودية و لمدة مابين شهر تشرين الاول وتشرين الثاني وقد انتخبت ألثمارالسليمة لغرض إجراء التجارب إذ نظفت وغسلت من الاتربة بالماء المقطر ثم جففت بدرجة حرارة المختبر مع ألتقليب ألمستمر لمنع تعفنها بعدها إزيلت البذور وإستعمل الجزء اللحمي للثمار وتم هرسها بضروف مبردة ، وزن 100 غم من الثمار ووضعت في 100 مل من دارئ فوسفات الصوديوم (pH 7.5، 0.1M) ومزجت لمدة 5 دقائق بجهاز blender في ظروف مبردة ، ورشح بعد ذلك بطبقتين من الشاش ونبذ الراشح

مولار ورقم هيدروجيني 7.5 المحتوي على 1 مولارمن كلوريد ا لصوديوم تم متابعة البروتين في الاجزاءالمستردة ورسمت العلاقة بين الامتصاص الضوئي للاجزاء المستردة بعدها جمعت الاجزاء ألفعالة وقدرت لها ألفعالية ألانزيمية وتركيزألبروتين لإستخراج ألفعالية ألنوعية.

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم

Optimum pH

إستخدم دارئ خلات الصوديوم (pH 5.5-4) ، دارئ فوسفات الصوديوم (pH8-6) ودارئ Tris-Hcl (pH 9-8.5) وسطا للتفاعل لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم ، كذلك استخدمت الدوارئ المذكورة لحفظ الانزيم لمدة 30 دقيقة لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم.

درجة الحرارة المثلى لفعالية وثباتية الانزيم

Optimum temperature

اجري التفاعل بدرجات حرارية (25-60) م لتحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم وحضن الانزيم بدرجات الحرارة (25-60) م لمدة 30 دقيقة لتحديد درجة الحرارة المثلى لثباتية الانزيم .

3 النتائج والمناقشة

Results &Discussion

تنقية الانزيم

Enzyme purification

اتبعت عدة طرق لتنقية البروتييز المستخلص من ثمار الحنظل لأجل تحديد صفاته الكيموحيوية والحركيات الأنزيمية ، وشملت التركيز بكبريتات الامونيوم بنسبة أشباع 60% كخطوة اولى للتنقية وتم الحصول على عدد مرات تنقية 1.7 وبحصيلة انزيمية 36.5% . ان الاساس في ترسيب وتركيز الانزيم بفعل كبريتات الامونيوم يعتمد على التمليح الخارجي (Salting كبريتات الامونيوم تدريجيا الى10مل من المستخلص الخام معا لتحريك المستمرعلى المحرك المغناطيسي ولمدة نصف ساعة وتحت ظروف التبريد (حمام ثلجي) ، للحصول على نسب اشباع ,40, 50, (20 30, 60, 80,70, 90) %على التوالي جمع المستخلص بعد كل أضافة ونقل الى اناء زجاجي ذي غطاء محكم وحفظ في الثلاجة لمدة ساعة ، بعدها أجري ألنبذ ألمركزي بسرعة (5000 دورة/ دقيقة) لمدة 15 دقيقة ، أهمل ألرائق وقدرت ألفعالية ألانزيمية وتركيزألبروتين في الرواسب كل خطوة بعد إذابتها في حجم صغيرمن محلول فوسفات ألصوديوم ألدارئ بتركيز 0.1 مولاروبرقم هيدروجيني 7.5 لتحديد نسبة الاشباع المثلى لتركيزألانزيم وضع الانزيم في اكياس الديلزة ثم وضعت اكياس الديلزة في محلول الدارئ لمدة 24 ساعة مع مراعاة تبديل المحلول الدارئ اربع مرات أي كل ستة ساعات لغرض التخلص من كبريتات الامونيوم الموجودة في الانزيم .

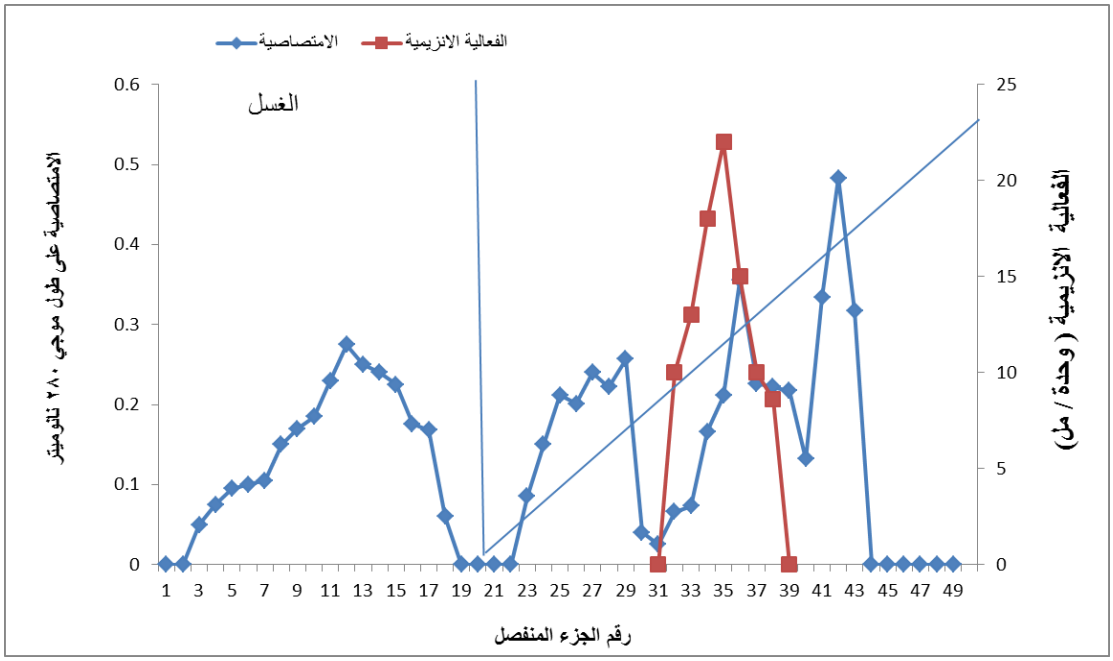
تقنية كروماتوغرافي التبادل الايوني

إضافة النموذج

تمت موازنة أ لعمود مرر6 مل من المحلول الانزيمي الناتج من خطوة الديلزة وغسل العمود بالمحلول الدارئ لإنزال البروتينات غيرالمرتبطة وجمعت ألاجزاء المفصولة من العمود بمعدل 5ملیلتر/ انبوب وسرعة جريان 30 مل / ساعة ، وتم قياس ألامتصاص ألضوئي للأجزاء ألمفصولة عند 280 نانومتر كما وتم قياس الفعالية الانزيمية (وحدة/ ملیلتر) للأجزاء غيرالمرتبطة أسترد ألانزيم من ألعمود بواسطة التدرج الخطي للملح باستعمال دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز0.1

وسعة عالية لربط البروتينات ، فضلاً عن تعدد استعمالاتها وسهولة انجازها. إذ ان مبدأ الفصل في هذه الطريقة دقيق ومباشر، حيث تتم عملية التداخل بين البروتين والمبادل الايوني بالاعتماد على صافي الشحنة والقوة الايونية ، وتوزيع الشحنة على سطح البروتين ، وكذلك على الرقم الهيدروجيني. وقد استخدمت المبادلات الايونية الطبيعية التي هي عبارة عن مشتقات السليلوز بسبب ملائمتها لفصل البروتينات ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة فضلاً عن الاحتمالات القليلة لمسخ البروتين (15). ومن الامور المهمة التي يجدر الاشارة اليها ان القمة التي لم ترتبط بالمبادل الايوني الموجب وتم ضهورها في جزء الغسل تعود الى بروتينات تحمل محصلة شحنة موجبة منعتها من الارتباط بالمبادل الايوني الموجب المشابه لها بالشحنة في حين ان البروتينات التي تحمل على سطحها شحنات مخالفة لشحنة المبادل الايوني تزداد قدرتها على الارتباط ايونيا مع المبادل المخالف لها بالشحنة وقد يكون الارتباط شديد بحيث يصعب فصلها لذا فان زيادة تركيز الملح في دارئ الاسترداد يساعد في عملية فصل البروتينات .

out) الذي يتضمن معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والاخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئة البروتين، ويؤدي ذلك الى انخفاض ذائبية البروتين وترسبه (43 ,15). اعقب الترسيب بكبريتات الامونيوم خطوة إزالة الاملاح بالديلزة لمدة 24 ساعة للتخلص من كبريتات الامونيوم تلتها خطوة كروماتوكرافيا التبادل الايوني بأستخدام ثنائي اثيل امينو مثيل سيليلوز DEAE-cellulose وتمخض عن عملية التبادل الايوني ضهور قمة بروتينية واحدة في مرحلة الغسل كما في الشكل (1) تم استرداد البروتينات المرتبطة التي تحمل شحنة مخالفة لشحنة المبادل باستخدام تدرج ملحي خطي من كلوريد الصوديوم (0-1) مولار ولوحظ ظهور ثلاثة قمم بروتينية مع قمة واحدة للفعالية تركزت في الاجزاء المنفصلة 32-39 ، وكان عدد مرات التنقية لهذه الخطوة 1.7 وبحصيلة انزيمية36.5%. هذا يعني ان الانزيم يحمل شحنة سالبة تحت هذه الظروف. جمعت الانابيب الخاصة بكل قمة لغرض حساب حجمها وتقدير الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين . تعد طريقة التبادل الايوني من الطرائق الشائعة الاستعمال ؛ وذلك لما تمتلكه من قوة فصل عالية



شكل (1): كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم البروتييز المستخلص من ثمار الحنظل *Citrillus colocynthis* باستعمال عمود المبادل الايوني DEAE-Cellulose بابعاد (3.5×35) سم الموازن

بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ (0.1 مولار ، pH= 7.5) تم الاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتدرج ملحي خطي من (0.1-1) مولار وسرعة جريان 30 مللتر / ساعة وبواقع 5 مللتر /جزء.

البروتييز بعد خطوة التبادل الايوني وذلك لغرض التأكد من زيادة نقاوة الانزيم حيث تم تنقية البروتيز المنقى من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis باستخدام عمود هلام Sephadex G-100 بحصيلة انزيمية 29.8% وعدد مرات تنقية 3.03 (10) . دراسة اخرى نقي فيها البروتييز من بذور الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris L.* بأستخدام عمود Sephacryl S-200 (46) كذلك اخرى اجريت لتنقية البروتييز المستخلص من سويداء نبات جوز الهند حيث تم استعمال عمود Sephadex G-200 لغرض التنقية (40) نفس عمود الترشيح الهلامي وإستخدام Sephadex G-200 لغرض تنقية البروتييز المستخلص من نبات شوكة المسيح *Euphorbia milii* (45) . اما البروتييز المستخلص من اللاتكس لنبات *Wrightia tinctoria* فقد استخدم عمود Sephadex G-200 في مرحلة الترشيح الهلامي (36) . بينما استخدم عمود Sephadex G-75 في خطوة بالترشيح الهلامي للبروتييز المستخلص من بذور نبات الكاكاو *Theoroma cacao* (13) اما البروتييز المستخلص من جذور نبات البطاطة الحلوة *Ipomoea batatas* فقد استخدم عمود Superdex 75 وSuperdex HR (8) بعد خطوة التبادل الايوني . بينما استخدم عمود Sephadex G-75 في خطوة الترشيح الهلامي للبروتييز المستخلص من ثمار الطماطة Mill *Lycoperiscon esculentum* (17) . لذا يمكن

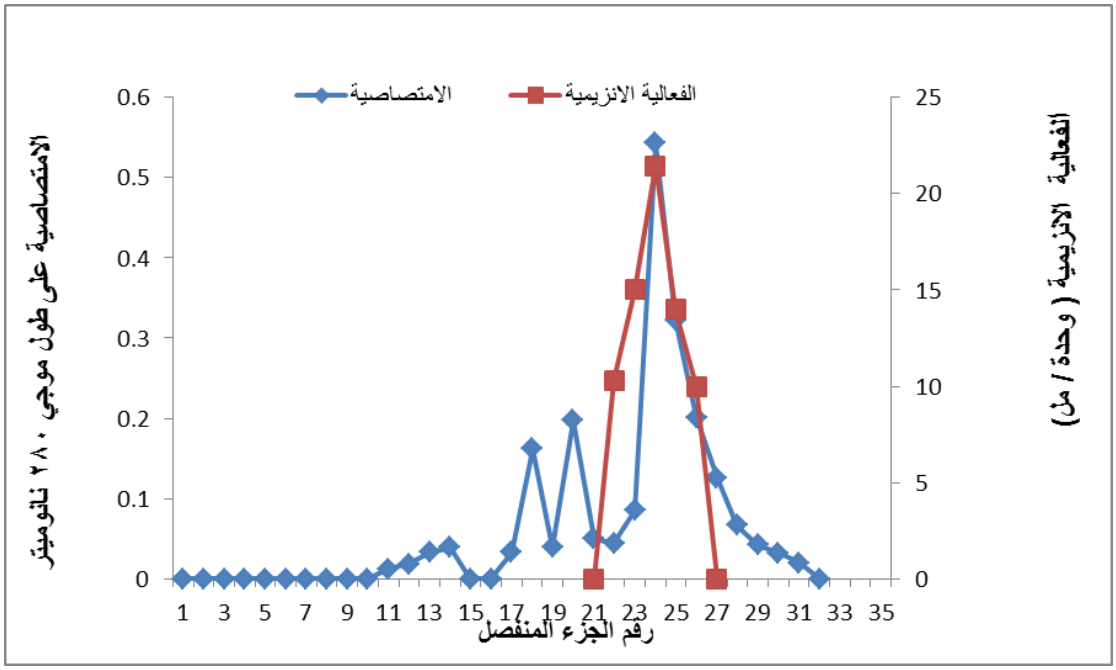
الترشيح الهلامي Gel filtration

اعقبت خطوة التبادل الايوني خطوة الترشيح الهلامي بمرحلتين باستعمال هلام Sepharose-6B في المرحلتين كليتهما ؛ لما يتمتع به من خصائص جيدة فهو يحتوي على الاكريل امايد فضلاً عن الدكستران مما يعطيه صلابة ومقاومة للانضغاط. ويمتاز كذلك بالفصل الجيد والسريع فضلاً عدم تلوثه بالبكتريا و سهولة الاستخدام والتحضير اذ يبقى ثابتاً مدة طويلة كونه محضر سلفاً من الشركة المنتجة Pharmacia fine chemical.

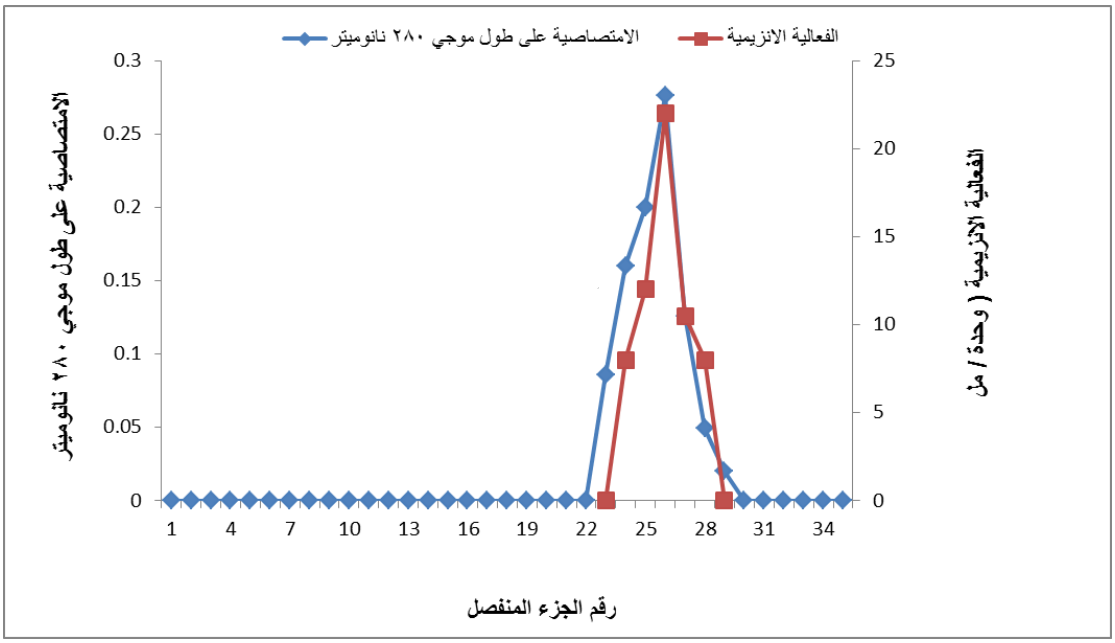
لوحظ انفصال ثلاث قمم بروتينية وتركزت الفعالية الانزيمية في قمة واحدة عند الثالثه في الاجزاء (22_26) شكل (2) مع الحصول على عدد مرات تنقية 5.41 وحصيلة انزيمية مقدارها 26.7%. بعدها جمعت الاجزاء الفعالة وركزت مرة اخرى بعمود الترشيح الهلامي تحت الظروف ذاتها ، وتظهر النتائج في الشكل (3) انفصال قمة واحدة للبروتين مع ظهور قمة واحدة للفعالية الانزيمية مطابقة تقريباً مع القمة البروتينية ، وتم لحصول على عدد مرات تنقية 15.01 وبحصيلة انزيمية 9.1%. ويعد تطابق قمتي البروتين والفعالية احد ادلة النقاوة للانزيم (42). تشير الادبيات الى ان خطوة الترشيح الهلامي هي خطوة كأحدى خطوات التنقية لانزيم

رخص ثمنه لانه من النباتات التي تنمو بشكل طبيعي في بلدنا .

عد ثمار الحنظل من المصادر الغنية جداً بانزيم البروتييز التي يمكن استغلاله على النطاق التجاري لما يتميز به من الصفات المذكورة سابقاً فضلاً عن



الشكل (2): كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي (الاول) للبروتييز المستخلص من ثمارالحنظل باستخدام عمود Sepharose-6B بأبعاد (1.5 ×85) سم والذي تمت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات 0.1 مولار وبرقم هيدروجيني 7.5وبسرعة جريان 60 مليلتر/ساعة وبواقع 3 مليلتر/جزء.



الشكل (3): كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي (الثاني) للبروتييز المستخلص من ثمار الحنظل باستخدام عمود Sepharose 6B بأبعاد (1.5×85) سم والذي تمت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات 0.1 مولار وبرقم هيدروجيني 7.5 وبسرعة جريان 60 مليلتر/ساعة وبواقع 2 مليلتر/جزء.

جدول (1) خطوات تنقية الانزيم المستخلص من ثمار الحنظل *Citrullus colocynthis L.*

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	تركيز البروتين(ملغم)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة 100%
المستخلص الانزيمي الخام	100	13.2	0.176	80.6	1320	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم 60%	20	36.7	0.283	129.6	734	1.6	55.5
التبادل الايوني بعمود DEAE-Cellulose	35	13.8	0.13	138	483	1.7	36.5
الترشيح الهلامي بإستعمال عمود Sepharose 6B- الخطوة الاولى	25	13.1	0.03	436.6	353.7	5.41	26.7
الترشيح الهلامي بإستعمال عمود Sepharose 6B- الخطوة الثانية	10	12.1	0.01	1210	121	15.01	9.1

توصيف الانزيم

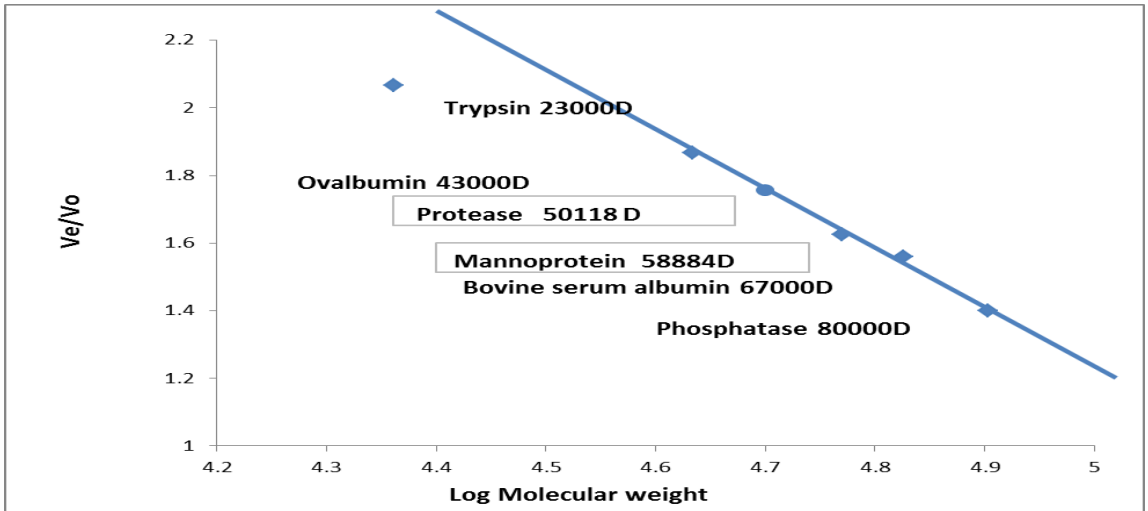
Enzyme characterization

تعيين الوزن الجزيئي

جمعت الاجزاء الفعالة من خطوة الترشيح الهلامي بعد تركيزها ومررت مرة ثانية خلال عمود الترشيح الهلامي باستعمال هلامSepharose- 6B

فـي تقـدير الـوزن الجزيئـي لانـزيم البروتييـز قيـد الدراسـة ويوضـح شـكل (4) المنحنـى القياسـي للوغـارتيم الـوزن الجزيئـي مقابـل نسـبة حجـم الاسـترداد / حجـم الفـراغ (Ve/Vo) للبروتينـات القياسـية المسـتعملة وعـن طريـق هـذه العلاقـة قـدر الوزن الجزيئي للانزم بـ 50118 kDa .

جاءت هذه النتيجة مقاربة مع احدى الدراسات التي تناولت تعيين الوزن الجزيئي لبروتييز بعض نباتات العائلة القرعية كالبروتييزالمستخلص من بذورنبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis فقد بلغ الوزن الجزيئي للبروتيز 54 kDa بأستخدام عمود Sephadex G-100 (10) ، بينما بلغ الوزن الجزيئي للبروتيز المستخلص من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi باستخدام عمود Sephadex G-200 بلغ 67 kDa (23) فقد اكد ان الوزن الجزيئي للبروتييزالمستخلص من نبات *Cucumis melo* var prince باستخدام طريقة الترشيح الهلامي باستخدام sephadex G-75 قدر بـ 54 kDa (19) . بينما الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من مصادر نباتية اخرى بلغ الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من نبات حشيشة العسل او *Euphorbia hirta* 34 kDa باستخدام SDS-PAGE (26) . دراسة اخرى اكدت ان الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من نبات *Euphorbia cotinifolia* يساوي 79.76 kDa باستخدام SDS-PAGE (20). الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من نبات *Wrightia tinctoria* هو 57.9 kDa باستخدام عمود Sephadex G-200 (36) .بينما الوزن الجزيئي للبروتييز المنقى من نبات *Holaerrhena antidysenterica* بلغ 25 kDa بإستخدام عمود Sephadex G-75 ثم SDS-PAGE (14) . كذلك الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من نبات *Euphorbia Milii* بلغ 54.4 kDa باستخدام عمود Sephadex G-200 ثم SDS-PAGE (45) . اما الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من بذور نبات *Solanum dumbium* بلغ 66 kDa بأستخدام SDS-PAGE (2). اما الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من بذور نبات الكاكاو *Theoroma cacao* بلغ 50kDa بأستخدام عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 (13) . الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من جذور البطاطة الحلوة *Ipomoea batatas* بلغ 82 kDa باستخدام عمود Superdex 75 وعمود Superdex 200 HR ثم SDS-PAGE (9) .

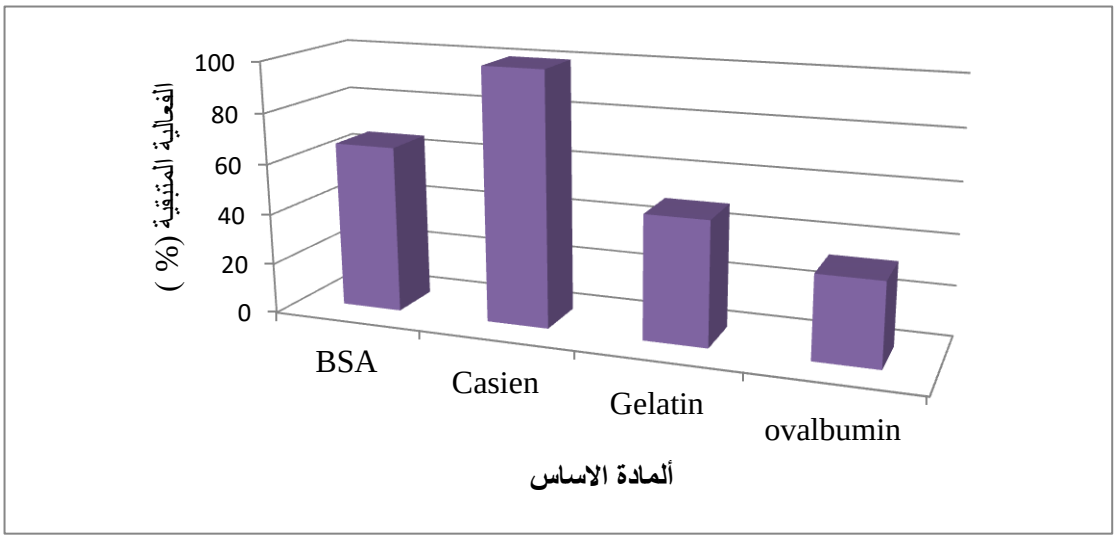


شكل (4): المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم البروتييز المستخلص من ثمار الحنظل *Citrullus colocynthis* بطريقة الترشيح الهلامي على عمود Sepharose –6B

تقدير فعالية البروتييز تجاه مواد تفاعل مختلفة

اختبرت فعالية البروتييز المستخلص من ثمار الحنظل *Citrullus colocynthis* المحلية تجاه اربعة مواد تفاعل مختلفة هي الجيلاتين والبومين المصل البقري (BSA) والكازائين والبومين البيض بتركيز 1% واظهر البروتييز المستخلص من الثمار فعالية تجاه الكازائين كمادة أساس اعلى من البروتينات الاخرى المستخدمة ، اذ بلغت فعالية الانزيم المتبقية تجاه الكازائين 100 % وكانت فعالية الانزيم المتبقية تجاه البومين المصل البقري 66% ، بينما كانت فعاليته المتبقية تجاه الجيلاتين49% ، اما البومين البيض (Ovalbumin) فكانت الفعالية النوعية للانزيم 33%مما يشير الى ان الكازائين هي المادة الاساس Substrate والمتخصص في عمل الانزيم هذه النتائج جاءت متفقة مع نتائج دراسة اخرى بينت ان البروتييز المنقى من بذورالبطيخ *Cucumis melo* Var agrestis اذ تضمنت مواد التفاعل الكازائين والجيلاتين والبومين المصل البقري BSA والبومين البيض . واظهرت النتائج ان الكازائين هو افضل مادة للتفاعل من البروتينات الاخرى ، اذ بلغت الفعالية الانزيم 100%بينما كانت فعالية الانزيم تجاه الجيلاتين كمادة تفاعل 33.5% بينما بلغت الفعاليه للانزيم اتجاه اللبومين المصل البقري 51% بينما بلغت الفعاليه 24.7% اتجاه البومين البيض ovalbumin (10) . دراسة اخرى اكدت ان البروتييز المنقى من نبات *Euphorbia cotinifolia* اظهر الافضلية للكازائين كمادة اساس للتفاعل بحتفاظه بفعاليته مقارنة مع الهيموغلوبين والآيزوالبومين (20). بينما دراسة اخرى اجريت من قبل (14) اذ بينت ان افضل مادة تفاعل للبروتييز المنقى من بذور *Halorrhena antidysentrica* هي الكازائين حيث انتج اعلى فعالية للانزيم مقارنة ببقية مواد التفاعل التفاعل الأخرى مثل الجيلاتين و البومين المصل البقري اذ بلغت فعالية الانزيم فيها 60% و70% على التوالي . دراسة اخرى اكدت ان البروتييز المنقى من اللاتكس لنبات *Wrightia tincoria* قد احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه مع المادة الاساس الكازائين مقارنة مع الهيموغلوبين والآيزوكازائين (35) .وجدت دراسة اجريت من قبل (10) ان افضل مادة اساس كانت الكازائين ثم الالبومين ثم الجيلاتين الذي سجل اقل فعالية انزيمية للبروتييز المستخلص من نبات التين *Ficus racemosa* .اوضحت دراسة اخرى ان المادة الاساس الامثل للبروتييز المستخلص من بذور الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris L.*

الكـازائين ثـم الالبـومين والجيلاتـين علـى التـوالي (46) .

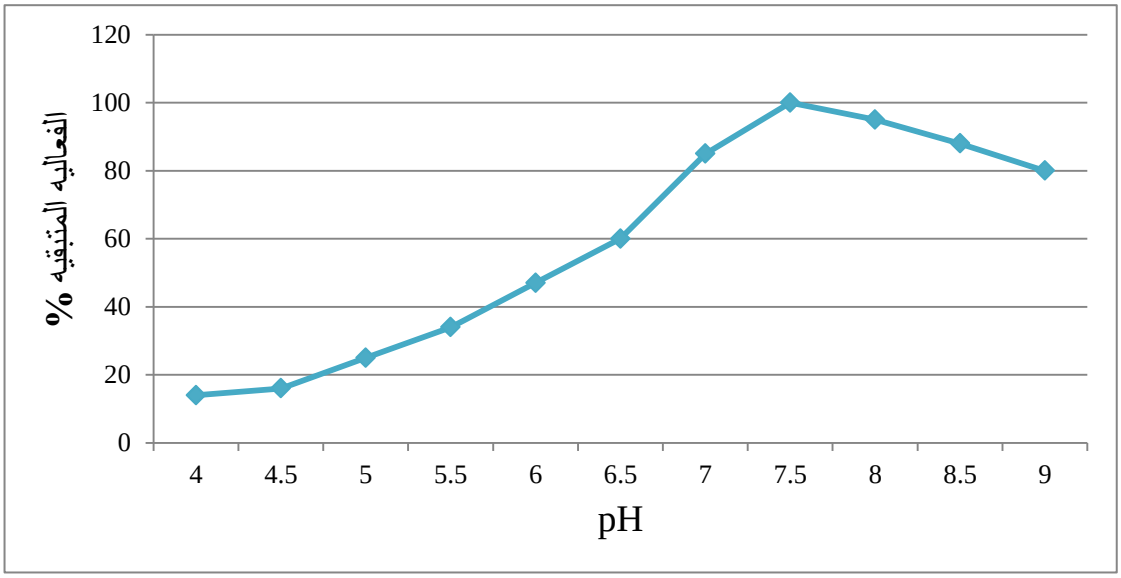


شكل (4): فعالية البروتييز المنقى من ثمار نبات الحنظل تجاه مواد تفاعل مختلفة ، حضن الانزيم بدرجة 37 °م لمدة 30 دقيقة وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية

الرقم الهيدروجيني الامثل للانزيم المنقى من ثمار الحنظل Optimum pH

درس تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية البروتييز المنقى عند أرقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (4- 9) أظهرت النتائج ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفـعالية البروتييز هـو 7.5 اذ أعـطى أعـلى فـعالـية الشكل (5). ولوحظ انخفاض في الفعالية الانزيمية عند الأرقام الهيدروجينية الحامضية اذ بلغت الفعالية المتبقية حوالي 14% عند الرقم الهيدروجيني 4. تشير هذه النتائج الى ان الفعالية المثلى لانزيم البروتييز تقع ضمن الارقام الهيدروجينية المتعادلة الى القاعدية. يؤثرالرقم الهيدروجيني في الحالة الايونية لسلاسل الاحماض الامينية المكونه لجزيئة الانزيم التي تكون ضرورية للمحافظة على التركيب الثلاثي الأبعاد للانزيم المنقى او تأثيره في الحالة الايونية لمادة التفاعل أو في معقد الانزيم ومادة التفاعل (31) . اشار (10) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البروتيز المنقى من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis بينما اكد (23) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البروتييز المنقى من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi هو 11، في حين اكـد(39) امتلاك البروتييز المستخلص من نبات *Cucurbita metuliferus* رقم هيدروجيني امثل بلغ 8 ، في مايخص البروتييز المنقى من مصادر نباتية اخرى كان الرقم الهيدروجيني للبروتييز المنقى من اللاتكس لنبات *Euphorbia hirta* بلغ 7.2 (27) ، بينما دراسة اخرى بينت ان الرقم الهيدروجيني الامثل لصورتي انزيم البروتييز

المنقى من بذور نبات الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris L.* كانت 8 و8.5 على التوالي (46) . اما الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من نبات *Euphorb cotinifolin* هو 7 (20). دراسة اخرى بينت ان الرقم الهيددروجيني الامثل للبروتييز المنقى من نبات *Wrightia tincoria* هو 7.5-11 (35) و اخرى اكدت ان الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من سويداء نبات جوز الهند coconut كان 9 (40) . بينما اكدت دراسة ان الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من بذور نبات *Solanum dubium* كان 11 (2) . اظهرت دراسة اخرى ان البروتييز الذي تمت تنقيته من بذور نبات *Holarrhena antidysenterica* الرقم الهيدروجيني الامثل له 7.5 (14) ..البروتييز المنقى من نبات *Euphorbia milii* كان افضل رقم هيدروجيني لفعاليته 8 (44) .



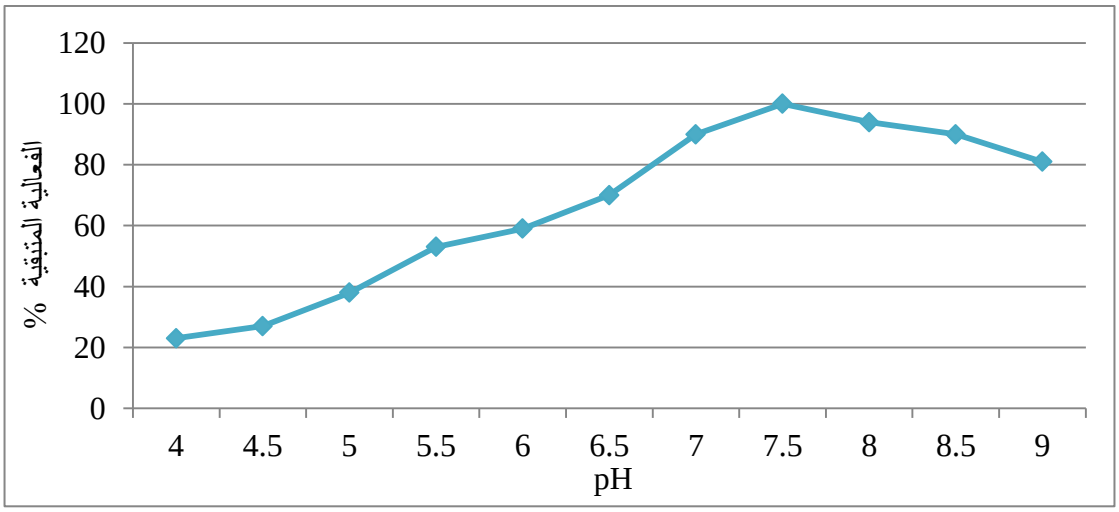
شكل(5) : الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم المنقى من ثمار الحنظل *Citrullus colocynthis*

الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم pH of enzyme stability

بينت نتائج هذه الدراسة ان البروتييز المنقى من الحنظل *Citrullus colocynthis* يمتلك ثباتاً تجاه الرقم الهيدروجيني عند القيم المتعادلة الى القاعدية (7 -8.5) اذ احتفظ الانزيم 90 % من فعاليته الا انه يفقد بحدود 77 % من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 4 ، بينما احتفظ بـ 81 % من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 9 ، ويمكن ان يعود سبب انخفاض فعالية البروتييز في الارقام الهيدروجينية الحامضية القليلة الى تأثير حموضة الوسط في تركيب بروتين الانزيم وتأين المجاميع الموجودة في الموقع الفعال ، وان زيادة الرقم الهيدروجيني عن الحد الامثل يؤدي الى مسخ البروتين وتغير تركيب الموقع الفعال وفقدان فعالية

الانزيم (31) ، وقد يحدث مسخ لا عكسي في المحاليل الشديدة الحامضية او القاعدية مما يؤدي الى تغير في الموقع الفعال وفقدان فعاليته (41) ، ويمكن الاستدلال من النتائج ان الانزيم له مدى ثبات واسع يمتد من القيم المتعادلة الى القيم القاعدية ، اذ يمكن خزنه ضمن هذا المدى مع ضمان احتفاظه بقيمة جيدة من فعاليته ، وهناك بعض الدراسات التي تناولت الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات البروتييز المنتج من بعض نباتات العائله القرعية دراسة اجريت من قبل (10) اظهرت ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات البروتييز المنقى من بذور نبات *Cucumis melo* Var agrestis يتراوح من 8-10. اما الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات فعالية البروتييز المنقى من ثمارنبات *Cucumis trigonus* Roxburghi هو 4-11 (23) ،وفي دراسه اخرى اجريت من قبل (18) االكدت ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات البروتييز المستخلص من نبات *Cucumis melo L.*var Inodorus naud هو11.

دراسات عدة بينت الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات البروتييز المنقى من مصادر نباتية مختلفة اهمها التي بينت ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات متناظرات (isomer) البروتييز المنقى بذور نبات الفاصوليا المنبته *Phaseolus vulgaris L.* كان عند الارقام الهيدروجينية (8.5-7) و (6.5-5) على التوالي (46) . بينما دراسة اخرى اكدت ان الرقم الهيدروجيني لثبات البروتييز المنقى من نبات *Euphorbia cotinifolia* كان 7-8 (20) اما البروتييز المنقى من اللاتكس لجويزاء نبات جوز الهند كان الرقم الهيدروجيني الامثل لثباتية كان يتراوح 7-11 (40). اما البروتييز المنقى من بذور نبات *Solanum dubium* فكان الرقم الهيدروجيني الامثل لثباته يتراوح مابين 3-12 (2) .بينما البروتييز المنقى من نبات *Wrightia tinctoria* ثباتيته كانت في الرقم الهيدروجيني تتراوح 5-11.5 (35) .اما البروتييز المنقى من بذور نبات *Holarrhena antidysenterica* فكان الرقم الهيدروجيني الامثل لثباته يتراوح 7-8 (14) . في دراسة اخرى بينت ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات فعالية البروتييز المنقى من نبات الصبار *Euphorbia milii* كان 5.5-12 (44).

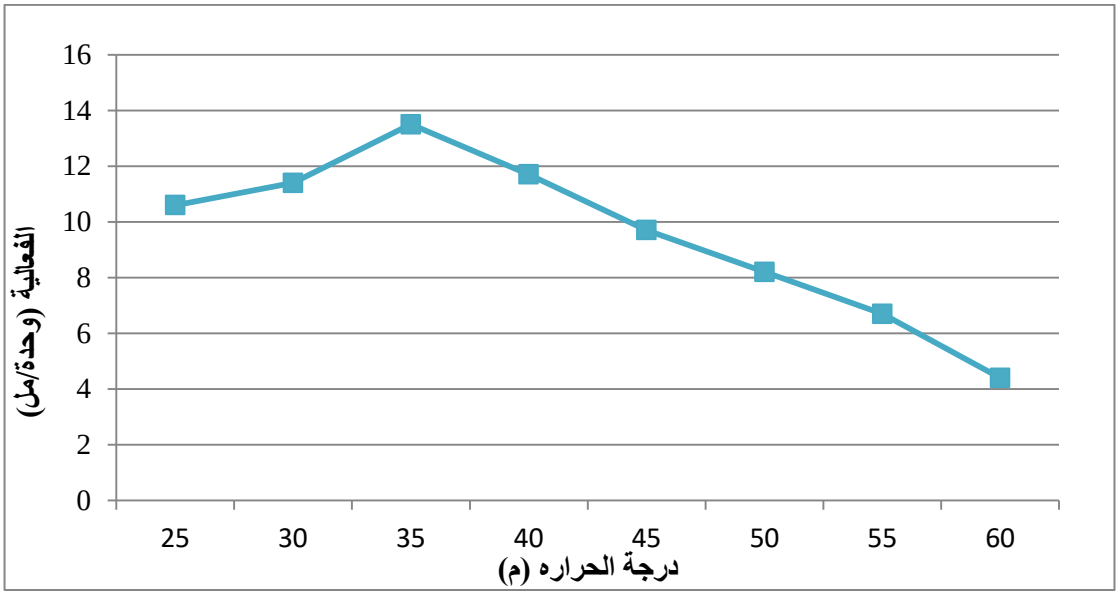


شكل (5): الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات فعالية الانزيم المنقى من ثمار الحنظل *Citrullus colocynthis L.*

درجة الحرارة المثلى لفعالية البروتييز

Temperature of enzyme activity

بينت نتائج تأثير درجات الحرارة المختلفة (25-60) درجة المئوية في فعالية البروتييز من ثمار نبات الحنظل ان فعالية البروتييز تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة لغاية 35 م حتى بلغت اقصاها 13.5 (وحدة /مل) ، ثم انخفضت مع زيادة درجة الحرارة حتى وصلت الى 4.4 عند درجة 60 درجة مئوية شكل (6) ، ويعود ذلك الى ان سرعة التفاعل الانزيمي تزداد بزيادة درجة الحرارة ضمن مدى معين بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات وزيادة التصادمات بين جزيئات الانزيم والمادة الاساس نتيجة زيادة الطاقة الحركية للجزيئات بفعل زيادة درجة الحرارة ، الا ان ارتفاع درجات الحرارة عن حدود معينة يؤدي الى مسخ الانزيم وتلف التركيب الثلاثي له وبالتالي انخفاض فعاليته (24 ,31). درجة الحرارة المثلى للبروتييزات السيرينية النباتية تتراوح (20-50) درجة مئوية (3). عدة دراسات تناولت البروتييزات المنقاة من اجناس اخرى من نفس العائلة وعوائل نباتية اخرى فقد وجد البروتييز المنقى من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis كانت فعاليته المثلى عند درجة حرارة 40 درجة مؤية ، دراسة اخرى اجريت من قبل (23) اكد فيها ان البروتييز المنقى من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi فعاليته المثلى كانت عند درجة حرارة 70 درجة مؤية دراسات اخرى تخص البروتييز المنقلى من مصادر نباتية اخرى مثل للبروتييز المنقى من اللاتكس لنبات *Euphorbia hirta* كانت الدرجة الحرارية المثلى لفعاليته 50 درجة مؤية (26) . اما البروتييز المنقى من نبات *Euphorbia cotinifolia* كانت افضل فعالية له عند درجة حرارة 50 درجة مؤية (20) . البروتييز المنقى من نبات جوز الهند coconut كانت افضل درجة حرارية لفعاليته 40 درجة مؤية (40) . البروتييز المنقى من بذور نبات *Solanium dubium* بلغ افضل فعالية له عند الدرجة الحرارية 70 درجة مؤية (2) . بينما دراسة اخرى اكدت ان للبروتييز المنقى من بذور نبات *Holarrhena antidysenterica* درجة حرارية مثلى لفعاليته بلغت 35 درجة مؤية (14) . البروتييز المنقى من جذور الطماطة الحلوة *Ipomoea batatas* كانت الدرجة الحرارة المثلى لفعاليته 40 درجة مؤية (8).

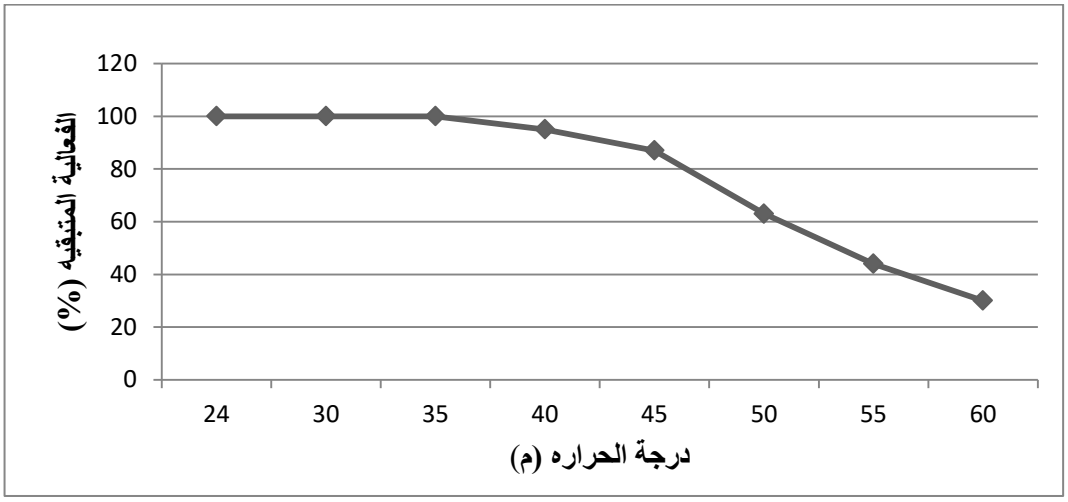


شكل (6): درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم المنقى من ثمار الحنظل

درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم
Temperature of enzyme stability

اشارت نتائج هذه الدراسة الى ان البروتييز المنتج من ثمار نبات الحنظل احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارية (25-40) درجة مئوية لمدة نصف ساعة . ثم بدأت الفعالية الانزيمية بالانخفاض مع ارتفاع درجة الحرارة وفقد نسبة عالية من فعاليته بحدود 70% عند حضنه بدرجة حرارة 60 درجة مؤية شكل (7) دراسات اخرى لاجناس مختلفة ، بينت ان البروتييزالمستخلص من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis كان ثابت الفعالية عند درجة حرارة 40-60 درجة مئوية (10). البروتييز المستخلص من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi كان ثابت الفعالية عند درجة حرارة 80 درجة مئوية (23) بينما البروتييز المستخلص من نبات *Cucurbita metuliferus* احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة (20 - 40) درجة مئوية (39) . فيما يخص البروتييز المنقى من مصادر اخرى اكدت دراسة انت البروتييز المستخلص من اللاتكس لسويداء نبات جوز الهند coconut ان البروتييز كان ثابت الفعالية عند درجة حرارة 60- 40 درجة مؤية (40) . بينما البروتييز المنقى من اللاتكس لنبات *Wrightia tinctoria* كان ذو فعالية ثابتة عند 80 درجة مؤية (35) . بينما دراسة اخرى وضحت ان البروتييز المستخلص من بذور نبات*Solanum dobium* كان يمتلك ثباتية عند درجات الحرارة 70 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة (2) . اما البروتييز المنقى من بذور نبات الكاكاو *Theobroma cacao* كانت فعاليته ثابته عند الدرجات الحرارية 47-52 درجة مئوية (13) .ان الانزيمات معظمها تكون اكثر ثباتاً بدرجات الحرارة المنخفضة ولكي يتم الاحتفاض بفعالية الانزيمات كاملة يفضل حفضها بدرجات حرارة

واطئة . ان انخفاض فعالية الانزيم قيد الدراسة عند حضنه بدرجات حرارة اعلى من 40 درجة مئوية يأتي نتيجة تأثير الحرارة في التركيب الثلاثي للبروتين وقد يؤدي الى مسخ البروتين وفقدان فعاليته (49) وهو مالوحظ عند حضن الانزيم بدرجة حرارة 60 درجة مئوية اذ فقد نسبة عالية من فعاليته. كما ان حضن الانزيم بدرجة حرارة 35 درجة مئوية وعلى اوقات مختلفة بقي الانزيم محتفظاً بفعاليته لحد 50 دقيقة شكل (7). وبعدها لوحظ ان الانزيم يفقد 41.6% من فعاليته بعد 100 دقيقة من الحضن بينما اكدت دراسة ان البروتييز المنقى من ثمار نبات البطيخ *Cucumis trigonus* Roxburghi بقي محافظا على اكثر من 90% من فعاليته بعدفترة زمنية مقدارها 24 ساعة (23).



شكل (7): تأثير درجة الانزيم على ثبات الانزيم البروتييز المنقى من ثمار الحنظل *Citrullus colocynyhis L.*

تأثير بعض المواد الكيمياوية وألايونات المعدنية في فعالية البروتييز

درس تأثير الايونات المعدنية في فعالية انزيم البروتييز المستخلص من ثمار الحنظل وذلك بحضن الانزيم مع محاليل كلوريدات المعادن بدرجة 35 م لمدة 30 دقيقة ولوحظ احتفاظ الانزيم بكامل فعاليته تقريبا عند معاملته بايونات البوتاسيوم 98 % و 95 % وازدادت قليلا عند حضنه مع ايونات المغنيسيوم 110% و 121 % بتركيز 5 و 10 ملي مولار على التوالي جدول (1) . كما بلغت الفعالية المتبقية للانزيم عند حضنه مع ايونات الصوديوم 97% و93% ، والكاليسيوم 105% و112% على التوالي ،اشارت بعض الدراسات الى دور ايونات الكالسيوم والمغنسيوم في زيادة فعالية الانزيم ولها دور في تحفيز الانزيم وثباته تجاه التحلل الذاتي (Autolysis) والمسخ الحراري (37) .

لوحظ ايضا عدم تاثير المركبات المختزلة مثل cysteine بتركيز 5 ، 10 ملي مولار في الفعالية الانزيمية اذ بقيت ثابتة دون تغير 100 % على التوالي ، مما يدل على ان الانزيم لايمتلك الاواصر من النوع S-S الضرورية لفعاليته

كذلك الحال مع ماده الـ EDTA لم تثبط فعالية الانزيم عند حضنه مع هذه الماده وهي من العوامل الكلابية ، اذ بلغت الفعالية المتبقية للانزيم عند معاملته بتركيز1 و10 ملي مولار من EDTA حوالي 97% و 95 %على التوالي ، في حين ثبطت الفعاليه المتبقيه الانزيم بصوره كامله حضنه مع PMSF ، اذ احتفظ الانزيم بحوالي 35% و 5 % من فعاليته عند حضن الانزيم مع 0.1 و1 ملي مولار من PMSF على التوالي . تظهر نتائج هذه الدراسة ان انزيم البروتييز المنقى من ثمار الحنظل من نوع البروتييز السيرين (Serine Protease).

جدول (1): تأثير الايونات المعدنية والمواد المثبطة والمختزلة على الانزيم المنقى من الحنظل

المادة	التركيز (ملي مولار)	الفعالية المتبقية (%)
معاملة السيطرة	-	100
كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$	5	105
	10	112
كلوريد الصوديوم NaCl	5	110
	10	121
كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$	5	97
	10	93
كلوريد البوتاسيوم KCl	5	98
	10	95
PMSF	0.1	35
	1	5
Cystein	2	100
	5	100
EDTA	1	97
	10	95

باختلاف نوعها وتركيزها. اذ بينت دراسة ان البروتييز المنقى من نبات البطيخ Roxburghi *Cucumis trigonus* قد ثبط تثبيطا كاملا عند معاملته مع الـ PMSF بتركيز 5 ملي مولار ، بينما لم تتاثر فعاليته عند حظنه مع ايونات الكاليسيوم والمغنيسيوم (22). دراسة اخرى بينت بأن البروتييز المنقى من بذور نبات *Holarrehena antidysenterica* ثبطت فعاليته بصورة كاملة عند حضنه مع مادة PMSF بتركيز 5 ملي مولار وانخفضت فعاليته قليلا عند حضنه مع 5 ملي مولار من مادة EDTA وازدات فعاليته بحضنه مع ايونات الكاليسيوم والمغنيسيوم والصوديوم ولم تتاثر تلك الفعالية عند حضنه مع ايونات البوتاسيوم (13) . كذلك ثبط البروتييز المنقى من لاتكس جوز الهند coconut عند حضنه 5 ملي مولار من مادةPMSF (41) . كذلك البروتييز المنقى من بذور نبات *Solanum dubium* كانت قد ثبطت فعاليته بصورة كامله عند حضنه مع مادة PMSF (2) . ايضا بينت اخرى البروتييز المنقى من جذور نبات البطاطة الحلوة *Ipomoea batatas* ثبطت فعاليته عند حضن الانزيم مع مادة PMSF (7) ممايدل على ان البروتييز المنقى يعود الى مجموعة البروتييزات السيرينية .

ويثبط بوجود PMSF اشارت العديد من الادبيات العلمية الى تاثير بعض المركبات في فعالية انزيم البروتييز المنقى من بذور نبات *Cucumis melo* var agrestis قد ثبطت فعاليته بصورة كاملة عند حضن الانزيم مع مادة PMSF بتركيز 5 ملي مولار بينما احتفظ بكامل فعاليته تقريبا عند حضنه مع 5 ملي مولار من مادة EDTA كذلك لم تتاثر فعاليه الانزيم عند حضنه مع ايونات المغنيسيوم والصوديوم بتركيز 5 ملي مولار حيث بلغت الفعاليه المتبقية للانزيم 93 % ،91%،93% على التوالي. (9) بينما البروتييز المنقى من ثمار الطماطة *Lycoperiscon esculentum* Mill فقد ثبطت فعاليته بصوره كاملة عند حضن الانزيم مع 5 ملي مولار من مادة DFP ومادة PMSF حيث بلغت الفعالية المتبقية عند حضن الانزيم مع المادة الاخيرة بتركيز 5 ملي مولار بلغت 25% بينما بقي الانزيم محافضا على فعاليته عند حضنه مع ايونات المغنيسيوم 97% و96% بتركيز 1و10 ملي مولار على التوالي لكنه فقد فعاليته قليلا عند حضنه مع ايونات الكاليسيوم بتركيز 1 و10 ملي مولار حيث كانت فعاليته 84% و60% على التوالي ولم تأثر مادة EDTA ومادة Cysteinعلى الفعالية حيث احتفظ بها بصوره كاملة (16) . ومن هذا يستدل ان الايونات المعدنية لها تأثير في فعالية الانزيم يختلف

Refrences:

1.Ali,A .and Dahot, M.U.(2009).Characterization of crude alkaline protease of soybean *Glycine max* seeds. Sindh Univ. Reserach.J.,41(2):7-14.

2.Ahmed, M.;Morishima I.;Babiker E.;Nobuhiro M.(2009). Dumbiumin ,achymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen.*Phytochem*, (70): 483-491.

3.Barrett, A J. (1997). Nomenclature Committee of the International Union

of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature

4.Bode, W and Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinases-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477(1-2) : 241-252.

5.Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.

6.Brock, F.M.; Forsberg, C.W and Buchanan, S.G. (1982). Proteolytic activity ofrumen microorganisms and effec of proteinase inhibitors. J. Appl. Environ. Microbiol. (44) : 561-569.

7.Chen, T. E.; Huang,D. J.; Lin,Y.H. (2004) . Isolation and characterization of a serine protease from the storage roots of sweet potato *Ipomoe batatas* [L.] Lam, Plant Sci. 166: 1019–1026.

8.Chou, K. C and Cai, Y. D. (2006). Prediction of protease types in a hybridization space. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 339(3): 1015-1020.

9.Devi, B.G and Hemilatha,K.P.J.(2014). Isolation ,partial purification and characterization of alkaline serine protease from seeds of *Cucumis melo* Var agrestis.International journal of research in Engineering and Technology , 3(6):2319-2321.

10.Devaraj , K. B.; Lalitha,R.G. and Prakash, V. (2007). An unusual thermostable aspartic protease from latex of *Ficus racemosa*(L.). journal phytochem 10:1016-1025.

11.Fan, S. and Wu, G. (2005). Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects Botanical Bulletin of Academia Sinica, 46(4): 273-292.

12.Guilloteau,M.; Laloi,M.; Michaux,S.; Bucheli,P and McCarthy,J. **(**2005). Identification and characterisation of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* seeds. *J Sci Food Agric*, 85:549-562.

13.Hidayatullah, K.; Subhan M. F. Durrani M.; Saira, A and Sanaullah K.(2008).Purification and characterization of serine protease from seeds of Holarrhena antidysenterica. Biotechnology ,7 (1): 94-99.

14.Janson, J. C. and Ryden, L. (1998). Protein purification principles, high-resolution methods, and application. 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc, pp. 695. in early stages of actinorhizal nodule development.

15.Johansson, S.; Gransson, U.; Luijendijk, T.; Backlund, A.; Claeson, P. and Bohlin L. (2002). Neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *Journal of Natural Products*, 65(1) : 32-41.

16.Karim, R.M .; Islam, M.A.; Absar,N and Hashinaga,F .(1999). partial Purifacation and Charactarizaion of aprotease from Tomato *Lycopersicon esculentum* Mill Pakistan Journal of Biological Sciences, 2 (3) : 955-959.

17.Kaneda, M.;Yonezawa, H. and Uchikoba,T. (1997).Purification and some properties of aprotease from the sarcocarp of Musk melon fruit.Biosci.Biochem,61(12):2100.

18.Kanida,M.,Tominaga,N.(1975).Isolation and characterization of aprotease from sacrocapeof melon fruit, Jourinal Biochem .78:1287-1296.

19.Kumar, R.; Singha K.A.; Tomar, R and Jagannadham, M.V. (2011). Biochemical and spectroscopic characterization of anovel metallo protease, cotifolin from an antiviral plant sharb . *Euphorbia cotinifolia* . Plant physio Biochem, 49(7):721-8.

20.Liggieri, C.;Obregon, W.,Trejo,S.and Priolo,N.(2009).Biochemical analysis of apapin-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica L*. J. BioChem.41(2): 154-62.

21.Mala,B.R.;Aparna ,M; Tasnkala , Mohini ; s.Ghatge ,and Vadanti ,V.D .(1998). Molecular and Biotechnological aspects of Microbial proteases .Microbiolo .and Molcular Biology Reviews , 62(3) :597 -635 .

22.Mufti Asif-Ullah, Key -sun kim, Yeon Gyu Yu , (2006). Rumaisase anovel serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi. Phytochemistry(67): 870-875.

23.Muro , T.; Tominaga, Y. and Okada, S. (1984) . Agric . Biol . Chem ., 48 (5) : 1223 – 1230

24.Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D. and James, K. E. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemistry* Reviews, 102 (12):4639-4750.

25.Patel, G.K., Kawale, A.A and Sharma, A. K . (2012) .Purification and physicochemical characterization of serine protease with fibrinolytic activity from latex of amedicinal herb *Euphorbia hirta* .Plant physiol Biochem, pp. 104–111.

26.Rani, K. R and Datte, S. (2012).Review on latest overview of protease. *International Journal of Current life Sciences*.,2(1): 12-18.

27.Rani,**K.;**Rana And Datte. S.(2012).Review on latest overview of protease. *International Journal of Current life Sciences*.,2(1):12-18.

28.Rascovik, R.; Bosovic ,O.; Prodanovic,R.;Nicetic,V. and Polovic, N.(2014). Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 118 *:* 622-627.

29.Rawlings, N. D., Barrett, A. J and Bateman, A. (2010). Merops: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 38(13): 227–233.

30.Salas, C. E.; Gomes, M. T.; Hernandez, M. and Lopes, M. T. (2008). Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. Phytochemistry, 69(12): 2263-2269.

31.Segal, I.H.(1976). Biochemical Calculation (2^{nd} ed). John Wiley and Sons, Inc. New York.

32.Sharma, A.; Kumari, M., and Jagannadham, M.V**.**(2009). Benghlensin, ahighly stable serine protease from latex of medicinal plant *Ficus benghalensis*. J. Agric food chem . Dec 9;57(23):11120-6.

33.Sharmila, S.;Jeyanthi,L.R.; Das,M.P and Saduzzaman. M.D.(2012). Isolation and partial purification of protease from plant leaves. Journal of Chemical and Pharmaceutical Reseaech.

34.Sharmila, S.;Jeyanthi,L.R.; Das,M.P. and Saduzzaman. M.D.(2012). Isolation and partial purification of protease from plant leaves. Journal of Chemical and Pharmaceutical Reseaech.

35.Simoes, I. and Faro, C.(2004). Structure and function of plant aspartic proteinases.European journal of biochemistry .271(11):pp.2067-2075.

36.Tomar R., Kumar R, Jagannadham M.V.,(2008). Stable serine protease from latex of *Wrightia tinctoria* J.Agric .Food Chem , 27(4): 1479-87 .

37. Xiubao , Q . and Xiulan, C . (1984) . A study of the purification and some properties of alkaline proteinase from *Bacillus pumillus* strain 209 Acta , Microbiol Sic ., 24 (1) : 66 – 73 . Cited from Biol . Abst ., 78 : 94766 .

.

38.Turk, B., Turk, D and Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477 (1-2) : 98-111.

39.Tzeng, E. C.; Dong,J. H. and Yaw,H. L. (2004). Isolation and characterization of aserine protease roots of sweet potato. Plant Science, 166:1019-1026.

40.Uchikoba, T. H.; Yonezawa, K.; Arima, M. and Kaneda, (2001). Isolation characterization of a serine protease from the a serine protease from the sarcocarp of *Cucumis metuliferus* , J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. 5: 251–259.

41.Usha, R.; Leelamma M.; Panicker, S.; roy and Chabinath mandal.(2009) . Purification and characterization of aserine protease (CESP) from mature coconut endosperm .BMC Reseach Notes,2:81

42.Whitaker , J . R .(1980) . Changes occurring in proteins in alkaline solution . In : Chemical determination of proteins ,(eds . J. R. Whitaker and M. Fujimoki) pp. 115 – 155 . American Chemical Society . Washington .

43.Whitaker, J.R and Bernhard, R.A. (1972). Experiments for: An Introduction to Enzymology. The Whiber Press.

44.White , A . ; Handler , P and Smith , E . (1973) . Principles of Bio-chemistry, Mc Grow – Hill Book Company Ablakiston publication . New York .

45.Yadav S.C., Pande M., Jagannadham M.V.(2006). Purification , Biochemical and functional characterization of Milin

from latex of *Euphorbia milii.* Phytochemistry 64(14):1414-1426.

46.Yadav,S.C.,Pande,M.,Jagannadham ,M.V.(2008).Purification Biochemical and functional characterization of Milin from latex of Euphorbia milii. Phytochemistry, 64(14):1414-26.

47.المعموري ،محمد فوزي شعلان.(2011). تنقية وتوصيف وتقييد انزيم البروتييز المستخلص من بذور نبات الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris* وإستخدامه في المجالات الصناعية والطبية .رسالة ماجستير .كلية العلوم .جامعة بابل .

48.الصوفي،محمد عبد الرزاق.(2013) .تنقية انزيم البروتييز جزئيا من اوراق نبات الخس الشوكي *Lactuca serriola L.* وتحديد بعض صفاته واستعماله في بعض التطبيقات العملية مجلة التقنيات الاحيائية-جامعة بغداد. 12(2):1-18 الصفحة.

49.Neito,T.and Ellis,A.(1986).Characterization and distribution of extracellular protease of *Aeromonas hydrophila* strain 1351.J.Gen.Microbial,1321:1975-1979.

*Purification and Charactrization of protease for some plants sources.

Rawaa majid dakhil AL-Sefar *

University Of AL-Qadisiya

College of Sciencet

Nazar abid Al- Amer Hamza

University Of AL-Qadisiya

College of Sciencet

r-alsefar@yahoo.com

Abstract

The protease extract from *Citrullus colocynthis L*. was purified by several steps ,including precipitation with ammonium sulfate 60%, ion exchange chromatograghy using DEAE- Cellulose and gel filtration on Sepharose-6B column. The result showed purification fold and recovery (15.01) and (9.1)% respectively .Its molecular weight was estimated to be 50118kDa.The optimum pH for protease was(7.5) and stable in the pH range of (7-8.5) .The protease showed maximum activity at 35 C.using 1% as a substrate ,and showed heat stability at (25-40) C . The results showed in crease in the activity with Ca^{++} and Na^{+} It was 112% and 121% respectively. The enzyme strongly inhibited by PMSF but not by EDTA.The results indicate that the protease is aserine protease.

Key word: *Citrullus colocynthis,* Purification, Characterization, Serine protease .

Microbiology Classification QR75-99.5

***The research is apart of on Msc.thesis in the case of the first research**