استخلاص وتنقية اليوريز من حبوب الحنطة *Triticum aestivum* L.

عصام فاضل الجميلي* ليلى عثمان الكرخي** بشرى فارس حسن**

الملخص

تم تحديد الظروف المثلى لأستخلاص اليوريز من الحنطة *Triticum aestivum* L. الصنف المحلي cultivar بأستخدام دوارىء مختلفة التراكيز والارقام الهيدروجينية. وجد أن افضل دارئ لاستخلاص الانزيم هو دارىء فوسفات البوتاسيوم الاحادي الهيدروجين بتركيز 20 ملي مولر وبرقم هيدروجني 7.5 مضاف اليه 1 ملي مولر EDTA و1 ملي مولر PMSF و1 ملي مولر β-mercaptoethanol وبمدة استخلاص 4 ساعات تحت ظروف مبردة (4°م) اذ بلغت الفعالية النوعية 961.75 وحده/مليغرام بروتين. اما عند استخدام الدارئ نفسه بمدة استخلاص 24 ساعة فقد انخفضت الفعالية النوعية الى 843.09 وحده/مليغرام بروتين.

نقي اليوريز المستخلص من حبوب الحنطة بخطوات تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة أشباع 40–60% مع اجراء عملية الديلزه باستخدام محلول دارىء الفوسفات بتركيز 20 ملي مول ورقم هيدروجيني 7.5, بعد ذلك مرر الناتج خلال عمود يحتوي على مبادل ايوني ثنائي أثيل أمينو أثيل سليلوز DEAE-Cellulose, ثم الترشيح الهلامي باستخدام عمود هلام السيفاكريل S-200 وكان عدد مرات تنقية المستخلص الانزيمي 41.93 مرة وبحصيلة أنزيمية 36.67%.

المقدمة

يعد اليوريز من الانزيمات التابعة للمجموعة المتميئة Urea amido hydrolyase ذات الرقم التصنيفي EC.3.5.1.5 ويقوم اليوريز بتحفيز تحلل اليوريا مائياً لينتج الامونيا وثنائي أوكسيد الكربون (30).

على الرغم من وجود اليوريز في العديد من الكائنات الحية من النباتات والبكتريا والأعفان لكن افضل توصيف للأنزيم تم الحصول عليه من خلال استخلاص ودراسة يوريز الباقلاء Jack bean (*Canavalia) ensiformis* (15، 17), لكن افضل المعلومات الجينية المتوفرة عن اليوريز النباتي هي التي حصل عليها من خلال دراسة وتوصيف اليوريز المستخلص من فول الصويا (*Glycine max*) (25) حيث وجد بأن هناك نوعين من المتناظرات الانزيميه isoenzymes لليوريز هي tissue-ubiqutous وembryo–specific (20، 31)، المتناظر الاول لليوريز (embryo–specific) يوجد في بروتينات معظم النباتات مثل فول الصويا والباقلاء (25، 32). بينما المتناظر الثاني tissue-ubiqutous يوجد بكميات قليلة في الانسجة الخضرية لمعظم النباتات (26). اما يوريز الشعير Barley *Hordeum (vulgare)* فانه يحتوي على خمسة متناظرات انزيمية (9).

جرت تنقية الانزيم جزيئياً بأستخدام خطوة الترسيب بالأحماض العضوية والمعاملة بالايثانول والحرارة (23). كما تمت تنقية اليوريز من حبوب نبات *Cucurbit apepo* بطريقتي التجزئة بكبريتات الامونيوم والتبادل الايوني DEAE-Cellulose (14).

نظراً الى تطور تقنيات الفصل والمواد المستخدمة فيها والتي شملت العديد من أنواع الراتنجات resins وبالنسبة لليوريز من المصادر المايكروبية يحمل الشحنة السالبة عند الرقم الهيدروجيني المتعادل فيفضل الفصل على

جزء من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

* معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا – جامعة بغداد، بغداد، العراق.

** كلية العلوم للنبات– جامعة بغداد، بغداد، العراق.

الراتنج ذي التبادل الايوني السالب **Anion-exchange resin**, وقد أمكن فصله في أعمدة **DEAE-Sepharose** و**Phenyl-Sepharase** كما استخدم **Mono-Q-resin** لتنقية الانزيم من بكتريا ***Proteus mirabilis***، ***Proteus stuartii*** و***Selenomons ruminantium*** (**16**، **18**).

هدفت الدراسة الحالية الى أستخلاص اليوريز من حبوب نبات الحنطة بأستخدام معاملات مختلفة وتنقيته من حبوب الحنطة المحلية.

المواد وطرائق البحث

أخذت كمية من حبوب الحنطة .***Triticum aestivum* L**, الحنطة الخبازة الصنف الزراعي **cultivar** وطحنت بطاحونة كهربائية, وحفظت في عبوات جافة ونظيفة ومحكمة الاغلاق بدرجة حرارة **4**ᵒم لحين الاستخدام.

المحاليل المستخدمة في استخلاص اليوريز

شلمت الدوارئ كل من دارئ الفوسفات بتركيز **0.1** مولر وبارقام هيدروجينية **6**، **7**، **7.5** و**8** ودارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز **20** ملي مولر وبرقم هيدروجيني **7.5** والمحتوي على **1**ملي مولر **EDTA-Na2** و**1**ملي مولر **B-mercaptoethanol** و**1** ملي مولر **PMSF**، ودارئ الترس القاعدي بتراكيز (**0.01**، **0.1**، **0.15**، **0.2** و**0.25**) مولر وبرقم هيدروجيني **8**، ودارئ خلات الصوديوم بتركيز **0.1** مولر وبرقم هيدروجيني **5**، دارئ الترس القاعدي بتركيز **0.1** مولر وبرقم هيدروجيني **9**.

طريقة الاستخلاص

حضر المستخلص الخام لحبوب الحنطة بوزن **10**غرام من مسحوق الحنطة المحضر سابقاً وأضيف أليه **50** مليلتر من الدوارىء المذكورة بنسبة **5:1** (وزن/حجم) جرى تحريك المحلول بأستخدام المازج المغناطيسي لمدة **4** ساعات بدرجة حرارة **4**ᵒم ثم نبذ المزيج بسرعة **4000Xg** لمدة **30** دقيقة في جهاز النبذ المركزي وأخذ الرائق وقدرت فيه الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين وحسبت الفعالية النوعية. أجريت عملية الاستخلاص بعد ترك المزيج لمدة **24** ساعة وبدرجة حرارة **4**م ثم تم تقدير الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في الرائق وحسبت الفعالية النوعية. قدرت فعالية اليوريز بطريقة الاندوفينول وفق الطريقة التي وصفها **Mobley** وجماعته (**22**).

تعرف وحدة فعالية الانزيم **Enzyme activity unit** بانها كمية الانزيم اللازمة لتحويل مايكرومول من اليوريا الى أمونيا في دقيقة واحدة وعند درجة حرارة **37**م (**30**). أستخدمت طريقة **Bradford** (**7**) في تعيين تراكيز البروتين في المستخلص الخام والمنقاة.

تنقية الانزيم

تم ترسيب الانزيم بوساطة بلورات كبريتات الامونيوم بنسبة أشباع **40–60%**، وفصل الراسب في جهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة **6000Xg** مدة **30** دقيقة, أهمل الرائق وأذيب الراسب في كمية صغيرة (**10** مليليتر) من محلول دارئ الفوسفات بتركيز **20**ملي مولر برقم هيدروجيني **7.5** وأجريت عملية الديلزة حيال محلول دارىء الفوسفات للتخلص من بقايا كبريتات الامونيوم وتم تقدير الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين للراسب.

عبِّأ المبادل الايوني **DEAE-Cellulsoe** في عمود زجاجي ليعطي ابعاد **3.5×20** سم وأجريت عملية الموازنة **(Equilibration)** لعمود المبادل بوساطة محلول دارئ الفوسفات بتركيز **20** ملي مولر برقم هيدروجيني **7.5** حتى اليوم التالي بسرعة جريان **40** مليلتر/ساعة.

مرر المحلول الانزيمي المديلز على سطح العمود بهدوء وغسل العمود بالمحلول دارئ الفوسفات بتركيز **20** ملي مولر برقم هيدروجيني **7.5** لأنزال البروتينات غير المرتبطة وجمعت الاجزاء المفصولة من العمود بمعدل **5** مليلتر/ انبوب,

وقدرت الامتصاصية في الاجزاء المتجمعة عند طول موجي 280 نانومتر بأستخدام جهاز المطياف الضوئي كما تم قياس الفعالية الانزيمية (وحدة/ملليلتر) للأجزاء غير المرتبطة كانت قراءة الامتصاصية مقارنة مع خط الأساس (Base line) مؤشراً واضحاً الى انتهاء عملية الغسل.

تم استرداد الانزيم من العمود بأستخدام تدرج ملحي من محلول دارئ الفوسفات بتركيز 20 ملي مولار مضاف له 1مولر من كلوريد الصوديوم برقم هيدروجيني 7.5 وقدر البروتين في الاجزاء التي جمعت وذلك بقياس الامتصاصية لكل انبوب عند طول موجي 280 نانوميتر.

قيست الفعالية الانزيمية في الأجزاء ورسم المنحني لعدد الاجزاء المنفصلة مقابل كل من البروتين (280 نانومتر) والفعالية الانزيمية (وحدة لكل ملليلتر) وجمعت الاجزاء القريبة من قمة منحنى الفعالية وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين فيها.

تم تحضير عمود الترشيح الهلامي حسب تعليمات الشركة Pharmacia Fine Chemical المجهزة لهلام Sephacryl S-200, تم غسل 70 مليلتر من الهلام عدة مرات بمحلول دارىء الموازنة، محلول الفوسفات 20 ملي مولر وبرقم هيدروجيني 7.5, وأزيل الهواء بأستخدام مضخة تفريغ. ثم عبِّأَ في عمود زجاجي ليعطي هلاماً بأبعاد 2.5×70 سم. تمت الموازنة بمحلول دارىء الموازنة الى اليوم التالي وبسرعة جريان 60 مليلتر/ساعة. مرر محلول الانموذج الانزيمي على سطح العمود بمقدار 2 مليلتر من المحلول الانزيمي المركز, جمعت الاجزاء 5 مليلتر لكل أنبوب بسرعة جريان 60 مليلتر/ساعة, قيست الامتصاصية للأجزاء المستردة على طول موجي 280 نانوميتر, وتمت متابعة الاجزاء التي أعطى فعالية أنزيمية ضمن القمة الواحدة وحسبت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين للأنزيم المنقى, ثم رسمت العلاقة بين رقم الانبوب مقابل كل من الامتصاصية والفعالية النوعية للأنزيم.

النتائج والمناقشة

يوضح الجدول (1) بأن داريء الفوسفات بتركيز 20 ملي مولر ورقم هيدروجيني 7.5 و1ملي مولر EDTA و1 ملي مولر بيتا مركبتوايثانول و1 ملي مولر PMSF ورقم هيدروجيني 7.5 قد أعطى أعلى فعالية نوعية بلغت 961.57 وحدة/مليغرام بروتين بعد مدة أستخلاص 4 ساعات و843.09 وحدة/ مليغرام بروتين بعد مدة أستخلاص 24ساعة بالمقارنة مع بقية محاليل الاستخلاص, أما عند الاستخلاص لمدتي 4 و24 ساعة بدارى الفوسفات بتركيز 0.1 مولر وبرقم هيدروجيني 8 فقد بلغت الفعالية النوعية 561.01 و 435.48 وحدة/ مليغرام على التوالي. وهذه القيمة أنخفضت عند الاستخلاص بالدارىء نفسه ولكن برقم هيدروجيني أقل وهو 6 حيث أعطى الانزيم فعالية نوعية بلغت 524.7 و429.57 وحدة/مليغرام بروتين على التوالي. أما دارىء الترس فقد تم الاستخلاص فيه لمدة 4 و24 ساعة وكانت قيم الفعالية النوعية عند تركيز 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 8 هي 818.62 و689.30 وحدة/مليغرام بروتين على التوالي، بينما قلت الفعالية النوعية عند التركيز نفسه لكن برقم هيدروجيني 7 حتى بلغت 762.5 و 582.99 وحدة/ مليغرام بروتين على التوالي.

ان ارتفاع الفعالية النوعية للمستخلصات الانزيمية عند زيادة القوة الايونية بوساطة المحاليل الدارئه قد يعود الى طبيعة ترابطات بعض الانزيمات بمكونات الخلية والتي تتطلب زيادة القوة الايونية لمحاليل الاستخلاص للتخلص من تلك الترابطات الناشئة بين الانزيم والمواد البكتينيه والنشويه (6).

أما عند الاستخلاص بالدارىء نفسه وبرقم هيدروجيني 9 فقد بلغت الفعالية النوعية 703.9 و567.16 وحدة/ مليغرام بروتين على التوالي, وعند الاستخلاص بالمحلول الدارىء الترس وبرقم هيدروجيني 8 ولكن بتراكيز مختلفة فان الفعالية النوعية عند التركيز 0.01 مولر كانت 353.9 و292.23 وحدة/ مليغرام بروتين على التوالي, 743.0

و689.39 وحدة/ مليغرام بروتين على التوالي عند الاستخلاص بدارىء الترس بتركيز 0.15 مولر، بينما عند الاستخلاص بالدارىء نفسه وبتركيز 0.2 مولر فأن الفعالية النوعية تصبح 775.60 و721.52 وحدة/ مليغرام بروتين على التوالي. ولكن هذه الفعالية ترتفع حتى تبلغ 800 و756.15 وحدة/مليغرام بروتين على التوالي عند أستخدام الدارىء نفسه وبتركيز 0.25 مولر وبرقم هيدروجيني 8.

أما الاستخلاص بدارىء خلات الصوديوم بتركيز 0.1 مولر وبرقم هيدروجيني 5 فكانت الفعالية النوعية منخفضة جداً إذ بلغت 272.85 و100 وحدة/ مليغرام بروتين على التوالي, في هذه الدراسة تم الاستخلاص بالماء المقطر وماء الحنفية وبرقم هيدروجيني 7.5, فكانت الفعالية النوعية عند الاستخلاص بالماء المقطر تساوي 492 و20.72 وحدة/ مليغرام بروتين على التوالي، هي أقل من الفعالية النوعية عند الاستخلاص بماء الحنفية والتي بلغت 616.98 و 477.57 وحدة/ مليغرام بروتين على التوالي وذلك لقلة وجود الايونات في الماء المقطر.

يلاحظ ايضاً من الجدول (1) ان الفعالية النوعية التي شهدت أنخفاضاً واضحاً عند الاستخلاص بالمحاليل الدارائة بعد 24 ساعة قد يعود السبب الى زيادة استخلاص المركبات الذائبه بالماء كالسكريات المختزلة والمركبات الفينولية التي تتداخل مع الانزيم وتؤثر بالتالي في طريقة تقدير الفعالية الانزيمية والبروتين فضلاً عن انها تجعل المستخلص الانزيمي اقل ثباتاً او يمكن ان تعود الى عمل بعض البروتيزات على اليوريز خلال المدة الطويلة للاستخلاص والبالغة 24 ساعة (6).

في هذه الدراسة يلاحظ أن أعلى فعالية نوعية هي بأستخدام دارىء الاستخلاص الفوسفات بتركيز 20 ملي مولر وبرقم هيدروجيني 7.5 و1 ملي مولر EDTA, 1ملي مولر β-mercaptoethanol, 1ملي مولر PMSF ولمدة أستخلاص 4 ساعات, ويعزى تفوق الفعالية النوعية بهذا المحلول الدارىء الى أحتواءه على EDTA وهو عاملاً مخلبياً يرتبط بالعناصر المعدنية الثقيلة أن وجدت في محلول الاستخلاص ويمنع تداخلها في عمل الانزيم (27), ويضاف عادة مابين 0.1– 1 ملي مولر منه ويعد EDTA أيضاً مثبط للبروتيزات القاعدية ضمن هذه التراكيز, أيضاً لوحظ عدم تأثيره في النيكل الموجود عند الموقع الفعال لليوريز (21)، وكذلك احتواؤه على 2- مركبتو أيثانول الذي يعد مادة مختزلة. كما أشار Dellano و Gravolanes (11) الى أن محلول الاستخلاص الذي يحتوي على 2 -مركبتو أيثانول يحدث فيه فقدان بطيء للفعالية الانزيمية أبطأ بكثير مما لو أستخدم محلول الاستخلاص دون 2 -مركبتو أيثانول. كما يحتوي على PMSF وهو يعد مثبطاً للبروتيزات السيرينية.

هذه المواد أضيفت الى محلول الاستخلاص من قبل العديد من الباحثين حيث قام Dixan وجماعته (12) بأضافة EDTA وبيتا مركبتوأيثانول بتراكيز 1 ملي مولر, 0.05 ملي مولر على التوالي, الى محلول أستخلاص دارىء الفوسفات عند أستخلاص اليوريز من بذور نبات الباقلاء. أما Sung وجماعته (28) فقد اضافوا لمحلول الاستخلاص 1 ملي مولر من كل من EDTA وبيتا مركبتوايثانول للحفاظ على ثبات الانزيم عند أستخلاصه من بذور نبات الباقلاء.

ترسيب الانزيم الخام بأستخدام نسب أشباع مختلفة من كبريتات الامونيوم الصلبة

أن عمليات ترسيب الإنزيمات تجري في خطوات التنقية والغرض منها التخلص من الماء وبعض انواع البروتينات غيرالمرغوب فيها والحصول على درجة من النقاوة ولمعرفة نسبة التشبع الأفضل لترسيب الإنزيم المستخلص من حبوب نبات الحنطة .*Triticum aestivum* L, فقد استخدمت كبريتات الامونيوم الصلبة وبنسب أشباع متدرجة تراوحت من 0–100%, بينت النتائج (الشكل 1) أن الفعالية النوعية للانزيم عند نسبة أشباع 0–20% بلغت 3000 وحدة/مليغرام بروتين وأما عند نسبة أشباع 20–40 و40–60% فقد بلغت الفعالية النوعية للانزيم 4452 و15140 وحدة/مليغرام بروتين على التوالي, بينما أنخفضت الفعالية النوعية للانزيم عند نسبة أشباع 60–80 و80–

100% أذ بلغت 8500 و8000 وحدة/ مليغرام بروتين على التوالي. لذا فقد أعتمدت نسبة الاشباع 40–60% بأنها افضل نسبة أشباع في المراحل اللاحقة للتنقية (الشكل 1).

جدول 1: فعالية أنزيم اليوريزالمستخلص من حبوب نبات الحنطة *Triticum aestivum* L. بأستخدام محاليل ودوارىء مختلفة مدتي أستخلاص 4 و24 ساعة

ت	طريقة الاستخلاص	مدة الاستخلاص (ساعة)	الفعالية الانزيمية وحدة/ملليتر	البروتين مليغرام/ ملليتر	الفعالية النوعية وحدة/مليغرام بروتين
1	دارىء الفوسفات (20 ملي مولر)برقم هيدروجيني 7.5 والمحتوي على 1ملي مولر EDTA و1 ملي مولر β-mercaptoethanol , 1ملي مولر PMSF	4	942.34	0.98	961.57
		24	826.23	0.98	843.09
2	دارىء الترس– القاعدي بتركيز 0.1 مولر برقم هيدروجيني 8 .	4	925.04	1.13	818.62
		24	778.92	1.13	689.30
3	دارئ الترس – القاعدي بتركيز0.1 مولر وبرقم هيدروجيني 7	4	815.90	1.07	762.5
		24	623.8	1.07	582.99
4	دارىء الترس القاعدي بتركيز 0.1 مولر وبرقم هيدروجيني 9	4	746.15	1.06	703.9
		24	601.2	1.06	567.16
5	دارئ الفوسفات بتركيز 0.1 مولر برقم هيدروجيني 8	4	746.15	1.33	561.01
		24	579.2	1.33	435.48
6	دارىء الترس القاعدي بتركيز 0.15 مولر برقم هيدروجيني 8	4	676.13	0.91	743.0
		24	627.35	0.91	689.39
7	دارىء الترس – القاعدي بتركيز 0.2 مولر برقم هيدروجيني 8	4	798.86	1.03	775.60
		24	743.14	1.03	721.52
8	دارىء الفوسفات بتركيز 0.1 مولر وبرقم هيدروجيني 6	4	613.99	1.17	524.7
		24	502.5	1.17	429.57
9	دارئ الترس- القاعدي بتركيز 0.25 مولر وبرقم هيدروجيني 8	4	584.0	0.73	800.0
		24	551.99	0.73	756.15
10	دارىء الترس - القاعدي بتركيز 0.01 مولر برقم هيدروجيني 8	4	332.75	0.94	353.9
		24	274.69	0.94	292.23
11	دارىء الخلات بتركيز 0.1 مولر وبرقم هيدروجيني 5	4	272.85	1.00	272.85
		24	100	1.00	100
12	ماء حنفية برقم هيدروجيني 7.5	4	660.17	1.07	616.98
		24	511.0	1.07	477.57
13	ماء مقطر برقم هيدروجيني 7.5	4	615.0	1.25	492.0
		24	275.9	1.25	220.72

أستخدمت كبريتات الامونيوم بنسب أشباع مختلفة في معظم الدراسات التي أهتمت بتركيز وتنقية أنزيمات اليوريز من مصادر مختلفة. أن أضافة كبريتات الامونيوم بنسب أشباع 40–60 % في الخطوات الاولى من التنقية لأنزيم اليوريز المستخلص من نوى تمر الزهدي، اعطت اعلى فعالية نوعية بلغت 3592.49 وحدة/مليغرام بروتين (3).

كما أستخدمت كبريتات الامونيوم الصلبة بنسبة أشباع 75% كخطوة من خطوات تنقية أنزيم اليوريز من حبوب ثمار الرقي *Citrullus vulgaris* (2)، كذلك أشارت دراسات أخرى الى أستخدام كبريتات الامونيوم الصلبة ونسبة أشباع مختلفة 50–65% لتنقية أنزيم اليوريز من مصادر مختلفة (10، 19).

هناك علاقة مابين التركيز المستخدم في هذه الطريقة وكثافة الشحنة وتوزيعها والمجموعات غير الايونية على سطح جزيئة البروتين, وتعتمد أيضاً على عدد وتوزيع النهايات الامينية المعرضة للوسط وحجم جزيئة البروتين وشكلها (13) كما أن عملية المزج في أثناء أضافة بلورات كبريتات الامونيوم مع المستخلص يجب ان تتسم ببطء في أثناء أذابتها تجنباً للرغوة

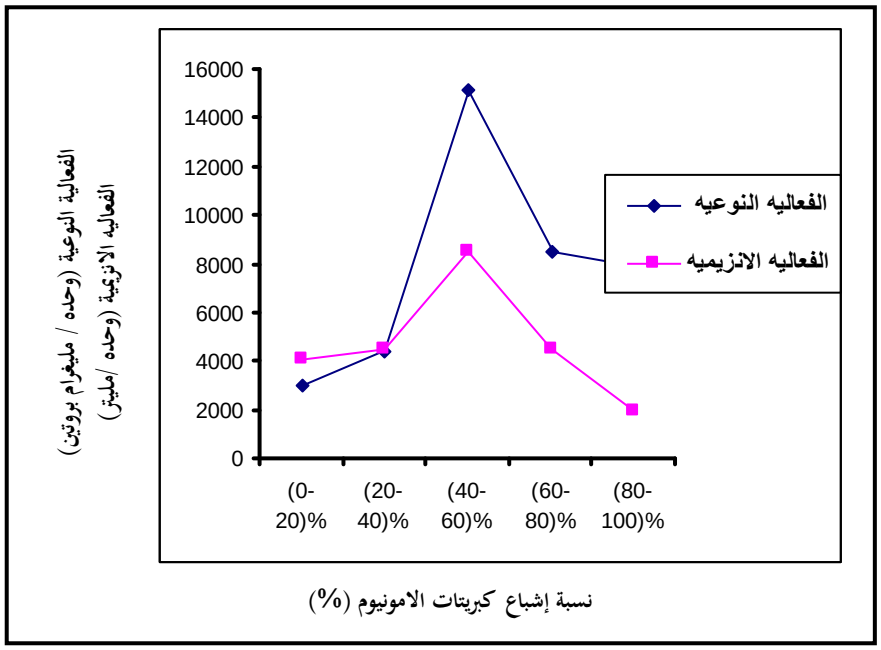
التي تسمح بدخول الاوكسجين ومن ثم أكسدة المجموعات الكبريتية الموجودة على أسطح البروتين مما يسبب مسخه (دنترتة).

تنقية اليوريز المنقى من حبوب نبات الحنطة *Triticum aestivum* L.

تم أستخدام بلورات كبريتات الامونيوم وبنسبة أشباع **40–60%**,والتي اعطت اعلى فعالية نوعية، وأذيب الراسب بمحلول دارىء الفوسفات بتركيز **20** ملي مولر وبرقم هيدروجيني **7.5** وبوجود **1** ملي مولر من **PMSF**. وتم الحصول على فعالية نوعية **15211.42** وحدة/ مليغرام وعدد مرات تنقيته **15.82** مره وبحصيلة أنزيمية **96.85%** (الجدول **2** والشكل **1**)، استخدمت العديد من الدراسات بلورات الامونيوم في ترسيب اليوريز من مصادر مختلفة, اذ اوضح الشكرجي (**4**) بان نسبة الاشباع **40–60%** كانت افضل نسبه اشباع يمكن استخدامها عند ترسيب اليوريز من نوى تمر الزهدي فقد اعطت عدد مرات تنقية **32.17** وبحصيلة أنزيمية **63.90%**.

اما شكر (**5**) فقد اعتمدت هذه الطريقه في تنقية اليوريز من بكتريا ***Proteus mirabilis*** **M3** وكان عدد مرات تنقية **2.6** مرة وبحصيلة أنزيمية **66.6%** .

أما أسماعيل (**4**) فقد استخدم كبريتات الامونيوم بنسبة أشباع **20–40 %** في تنقية أنزيم اليوريز المنتج من قبل بكتريا المتقلبات ***P. Mirabilis*** وقد حصل على عدد مرات تنقية **1.95** مره وبحصيلة أنزيمية **66%**.



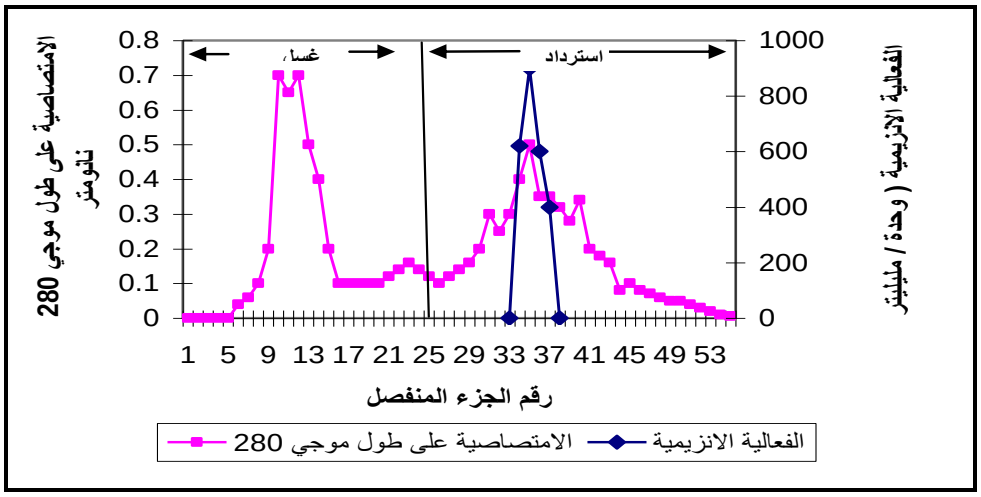
الشكل **1**: الفعالية الأنزيمية والنوعية لليوريز المستخلص من حبوب نبات الحنطة ***Triticum aestivum*** **L.** باستخدام نسب إشباع مختلفة من كبريتات الامونيوم

سبقت عملية التبادل الايوني عملية التنافذ الغشائي (الديلزة) للمستخلص الانزيمي المركز حيال المحلول الدارىء فوسفات البوتاسيوم بتركيز **20** ملي مولر ورقم هيدروجيني **7.5**.

تعتمد كروماتوغرافيا التبادل الايوني على فصل البروتينات على أساس ونوع ومحصلة شحنتها, أذ يتم أستخدام مواد تمتلك شحنة معينة تتجاذب مع شحنتها المعاكسة الموجودة ضمن محيط الوسط (**24**) في هذه الدراسة تم أستخدام المبادل الايوني **DEAE-Celluose** وهو مبادل أيوني يبادل الجزيئات ذات الشحنة السالبة **Anion-exchanger**. وقد تم أختياره لكون بروتين اليوريز يحمل شحنة سالبة عند الرقم الهيدروجيني المتعادل (**8**).

أستخدم محلول الاسترداد الدارىء الفوسفات بتركيز 20 ملي مولر, أضيف محلول الانزيم المديلز الى عمود التبادل الايوني وأستردت البروتينات باستخدام تدرج ملحي لكلوريد الصوديوم بتركيز 0– 1 مولر, وتم تحديد الاجزاء التي احتوت على أنزيم اليوريز وأستبعدت الاجزاء البروتينية الاخرى (الشكل 2), عند أسترداد أنزيم اليوريز وقياس الامتصاصية للأجزاء المستردة على طول موجي 280 نانومتر لوحظ ظهور أكثر من قمة بروتينية, تم التحري عن اليوريز وذلك بتقدير الفعالية الانزيمية.

وبعد جمع أجزاء قمة الفعالية, كان عدد مرات التنقية 23.62 مرة وبحصيلة أنزيمية 55.09 %. هناك العديد من الدراسات السابقة التي استخدمت هذا المبادل, أذ فصل الانزيم المنقى من نوى التمر الزهدي باستخدام هذا المبادل الايوني وبحصيلة أنزيمية 51.89 % وعدد مرات تنقية 32.65 مرة (3). كما فصل أنزيم اليوريز من حبوب الرقي بأستخدام المبادل الايوني DEAE-cellulose وبحصيلة أنزيمية مقدارها 32.9 % وبعدد مرات تنقية 110.09 (5) كذلك أستخدم هذا المبادل في تنقية اليوريز من بكتريا المتقلبات *P.mirabilis* وتم الحصول على حصيلة أنزيمية 56.8% وبعدد مرات تنقية 49.73 مرة (4).



الشكل 2: كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية اليوريز المستخلص من حبوب نبات الحنطة ***Triticum aestivum L.*** بأستخدام عمود DEAE-Cellulose بأبعاد 25×3.5 والذي تمت موازنته بمحلول دارىء الفوسفات 20 ملي مولر وبرقم هيدروجيني 7.5 والذي تم أسترداده بمحلول ملحي خطي من كلوريد الصوديوم 0–1 مولاري وبسرعة جريان 60 ملليلتر/ساعة (حجم الجزء المنفصل 5 ملليلتر)

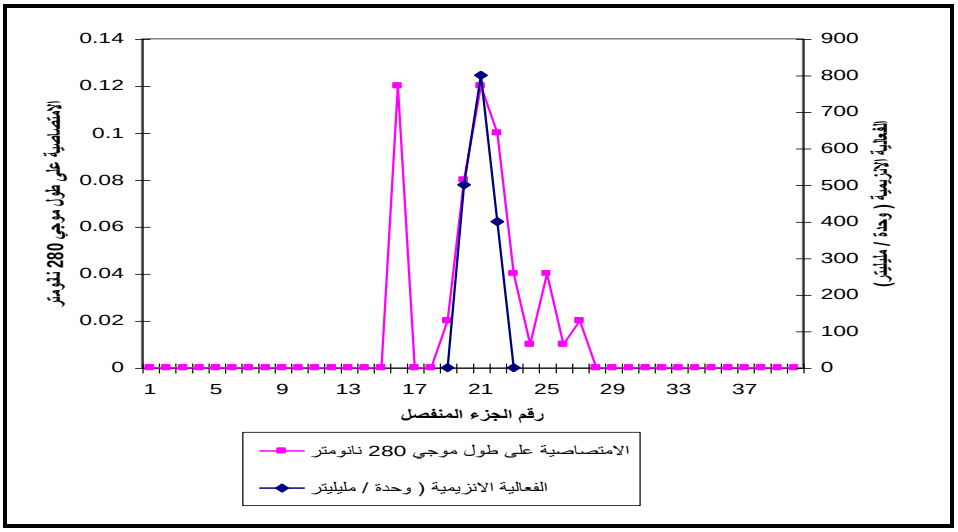
في هذه الدراسة تم أستخدام الترشيح الهلامي لزيادة نقاوة الانزيم أذ أعطى عدد مرات تنقية 41.93 مرة وحصيلة أنزيمية 36.67 % (جدول 2). حيث ظهر أكثر من قمة بروتينية لكن الفعالية الانزيمية تركزت في الاجزاء (20، 21، 22) (الشكل 3). تناولت دراسات أخرى تنقية اليوريز المستخلص من الاجزاء النباتية بأستخدام الترشيح الهلامي كخطوه للتنقية, فقد تمت تنقية اليوريز من نوى تمر الزهدي بطريقة الترشيح الهلامي بأستخدام السيفاكريل S-200, بعد خطوة التبادل الايوني وبخطوتين وكان عدد مرات التنقية 68.69 مرة تنقية والحصيلة الانزيمية 94.26% (3).

كما قام القيسي (2) باستخدام الترشيح الهلامي خطوة للتنقية فقد تمت تنقية أنزيم اليوريز المستخلص من حبوب الرقي المحلي *C-Vulguns* بطريقة الترشيح الهلامي بأستخدام السيفادكس جي –200. بعد خطوة التبادل الايوني تم الحصول على عدد مرات تنقية 83.14 مره وبحصيله أنزيمية 27.48%.

أما الكناني (1) فقد أستخدمت هلام السيفاكريل S-300 كخطوة تنقية اليوريز المنقى من بكتريا *Staphylococcus saprophyticus* وكانت الحصيلة الانزيمية 7.166% وكان عدد مرات التنقية 46.251 مرة.

أما اسماعيل (4) فقد أستخدم عمود السيفاكريل S-200 في تنقية اليوريز المعزول من بكتريا المتقلبات وكانت الحصيلة الانزيمية 23.96 % وعدد مرات التنقية 245.23 مره.

أما شكر (5) فقد أستخدمت هلام السيفاكريل أس– 300 كأحد خطوات تنقية اليوريز من بكتريا *P.Mirabilis* فكانت الحصيلة الانزيمية 18.3 وعدد مرات التنقية 26 مرة.



الشكل 3: كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي لليوريز المستخلص من حبوب نبات الحنطة *Triticum aestivum* L. بأستخدام عمود السيفاكريل (أس– 200) (2.5–70) سم والذي تم استرداده بمحلول دارىء الفوسفات بتركيز 20 ملي مولر ورقم هيدروجيني 7.5 (حجم الجزء المنفصل 5 ملليتر).

يمكن الاستفادة من اليوريز النقي في دراسة الصفات الكيميائية والفيزيائية له وتأثير المثبطات خاصة مثبط الثايويوريا على عمله والذي له دور في تثبيط اليوريز مما يؤدي الى تقليل استهلاك النايتروجين المضاف للتربة خلال عملية التسميد وتساعد بذلك المحافظة على الاسمدة الكيميائية (اليوريا) لاطول مدة ممكنة خلال زراعة الحنطة.

جدول (2) خطوات تنقية أنزيم اليوريز المستخلص من حبوب نبات الحنطة *Triticum aestivum* L.

خطوة التنقية	الحجم (ملليتر)	الفعالية (وحده /ملليتر)	البروتين (ملليغرام /ملليتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ ملليغرام بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية (%)
المستخلص الإنزيمي الخام	35	942.34	0.98	961.57	32981.9	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم (40–60) %	10	3194.4	0.21	15211.42	31944	15.82	96.85
التبادل الايوني بعمود ثنائي أثيل أمينوأثيل سليلوز	20	908.54	0.04	22713.5	18170.81	23.62	55.09
الترشيح الهلامي بعمود السيفاكريل S-200	15	806.4	0.02	40320	12096	41.93	36.67

المصادر

1– الكناني، نسرين هادي عودة (2005). أستخلاص و توصيف أنزيم اليوريز المنتج من بكتريا *Staphylococcus saprophticus* ودراسة تاثيراته النسيجية في كلية والمثانة الفار الابيض. رسالة ماجستير– كلية العلوم– جامعة بغداد، العراق.

2- القيسي، فيحاء مقداد خليل (2001). تنقية وتوصيف انزيم اليوريز المستخلص من بذور الرقي ***Citrullus vulgaris***. رسالة ماجستير– كلية العلوم للبنات– جامعة بغداد، العراق.

3- الشكرجي، فريال حياوي محمد (2004). أستخلاص وتنقية وتوصيف انزيم اليوريز من نوى تمر الزهدي. رسالة ماجستير– كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

4- إسماعيل، سعيد محمد عوض (2005). دراسة بكتريولوجية وكيموحيوية على انزيم اليوريز من.***Proteus*** **spp** من بكتريا المتقلبات مرضى الحصى البولية في اليمن. اطروحة دكتوراه– كلية العلوم–الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق.

5- شكر، ياسمين ناهل (2004). توصيف انزيم اليوريز المنتج من عزلة محلية لبكتريا ***Proteus mirabilis***. رسالة ماجستير-كلية العلوم – جامعة بغداد، العراق.

6- **Al-Bakir, A.Y. and J.R. Whitaker (1978). Purfication and Characterization of invertase from date (*Phoenix dactylifera* L. var Zahdi). J.Food Chemistry, 2:133-160.**

7- **Bradford, M.W. (1976). A rapid and sensitive method for the quantative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem, 72: 248-255.**

8- **Brayman, T.G. and R.P. Hausinger (1996). Purification, Characterization and functional analysis of truncated *Klebsiella aerogenes* UreE urease assessory protein lacking the histideine. Rich carboxyl terminus. J. of Bacteriology, 178(18): 5410-5416.**

9- **Chen, Y. G. and T. M. Ching (1988). Induction of barley leaf urase. Plant Physiol., 86:941-945.**

10- **Creaser, E.H. and R.L. Porter (1985). The purification of urease from *Aspergillus nidulans*. Int. J. Biochem., 17:1339-1341.**

11- **Dellano, J.J. and J.G. Gravolanes (1992). Increased electrophoretic mobility of sodium sulfite treated Jack bean urease. Electrophoresis, 13:300-304.**

12- **Dixan, N. E.; C.G. azzola; C.J. Asher; D.S. W. Lee; R.L. Blakeley and B. Zerner (1980). Jackbean urease (EC. 3.1.5.15) II. The relationship between nikel, enzymetic activity and the "abnormal ultraviolet" spectrum. The nickel content of jack bean urease. Can. J. Biochem., 58:474-480.**

13- **Englard, S. and S. Seifter (1990). Precipition Techniques. "In: Methods in Enzymology (ed Deurscher M.P.) vol 182: 285-300. Academic Press. New York.**

14- **Hargreaves, A.B.; G.O. Rego and A. Zahner (1983). Isolation and molecular properties of urease from cucurbita pepo seeds. Rev. Brasil Biol., 43:395-400.**

15- **Hiari, M.; T. Kawai-Hirai and T. Ueki (1993).Structural change of Jack bean urease induced by addition of surfactants studies with synchrotron radition small–angle X-ray scattering. Eur. J. Biochem., 215 (1):55-61.**

16- **Hu, L.T.; P.A. Foxall; R. Russel and H.L. Mobley (1992). Purification of Recombimant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by Ure A and Ure B. Infection and Immunity, 60 (7): 2657-2667.**

17- **Karmali, A. and A. Domingos (1993). Monoclonal antibodies against urease from *Conavalia ensiformis.* Biochimie, 75:1001-1006.**

18- Kornbery, A. (1990). Why purify enzymes. In:Methods in Enzymology (ed. Deutscher, N. P.) vol.182, 1.5. Academic press. New York.

19- Larson, A.D. and R.E. Kallio (1954). Purification and Properties bacterial urease. J. Bact., 68:67-73.

20- Meyer-Bothling, L. E.; J. C. Polacco and S. R. Cianzio (1987). Pleiotropic soybean mutants defective in both urease isoenzymes. Mol. Gen. Genet., 209:432-438.

21- Mobley, H.L.T.; M.D. Island and R.P. Hausinger (1995). Molecular Biology of Microbial ureases. Microbiological Reviews, 59(3):451-480.

22- Mobley, H.L.T.; B. D.Jones and J.L. Penner (1987). Urease activity of *Proteus penneri.* J. of Clinical Microbiology, 25 (12): 2302-2305.

23- Mobley, H.L.T. and R.P. Hausinger (1989). Microbial ureases significance, regulation and molecular characterization. Microbiol. Rev., 53:85-108.

24- Plummer, D.T. (1978). An Introduction to practical Biochemistry (3rd ed.) Pub. MeGraw-Hill Book Company U.K. Limited Maidenhead Berkshire. England.

25- Polacco, J.C. and M.A. Holland (1994). Genetic control of plant ureases. In:JK Setlow. (Ed.), Genetic Engineering, 16 .plenum press, New York, 33-48.

26- Sharyn, K. and G. Brian (1999).Nucleotide sequence of a cDNA encoding an arab doosis urease accessory protein –plant. Phys., 119:364.

27- Stoll, V.S. and J.S. Blanchard (1990). Buffers: principles and Practice. p:24-28. In: Dentscher, M. P. (ed.) Methods in Enzymology vol.182: Guide to protein Purification. Academic Press. San. Diego. USA.

28- Sung. H.Y.; W.M. Lee; M.J. Chion and C.T. Chang (1989). A procedure for purifying Jackbean urease for clinical use. Proc, Notl. Sci. counc. Repub.China.B., 13(4): 250-257.

29- Tanaka,T.; M. Kawase and S. Tani (2004).–Hydroxyketones as inhibitors of urease Bioorganic and Medicinal Chemistry, 12: 501-5.

30- Todd, M.J. and Hausinger, R.P. (1987). Purification and Characterization of the nickel-containing multicomponent ureae from *Klebsiella aerugines*. J. Biol. Chem., 262:5963-5967.

31- Torisky, R.S. Griffin, J. D. Yenofosky, R. L. and Polacco, J. C. (1994). Asin glegene (Eu4) encodes the tissue-ubigutons urease of soybean.Mol.Gen.Genel., 242:404-414.

32- Zonia, L.E.; Stebbins, N.E. and Polacco, J.C. (1995). Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabdopsis thaliana* seeds. Plant Physiol., 107:1097-1103.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF UREASE IN THE SEEDS OF WHEAT *Triticium aestivum* L.

E. F. A. Al-Jumaily L. O. F. Al-Karky B. F. Hassan

ABSTRACT

The optimum extraction conditions were determined to extract Urease from Wheat seeds *Triticum aestivum*L. (Local variety cultivar) using different solvent and buffers with different concentrations and pHs values. It was found that phosphate buffer (20 mM) at pH 7.5 with 1m M EDTA; 1m M β-mercaptoethanol; 1m M PMSF under cooling conditions (4ºC) and 4 hours extraction time yielded an enzyme extract with specific activity of 961.57 unit/mg protein; while using the same buffer solution under cooling conditions (4ºC) and for 24 hours extraction resulted a value of 843.09 unit/mg protein.

Urease extracted from Wheat seeds was purified by the following steps:precipitation by ammonium sulphite (40-60)% Saturation and dialyzed against phosphate buffer 20 m M at pH 7.5. The obtained extract was introduced DEAE–Cellulose column followed by gel Filtration through Sephacryl S-200 column. The enzyme purification fold and yield were 41.93 and 36.67% respectively.

Part of M.Sc., thesis of the second author.

*** Genetic Engineering and Biotechnology Instutite for post graduate studies, Baghdad Univ., Baghdad, Iraq.**

****College of Sci. for Women, Baghdad Univ., Baghdad, Iraq.**