أستخلاص وتنقية انزيم اليوريز من نوى تمر الزهدي

1- غربلة نوى اصناف نخيل التمر التجارية لمحتواها من اليوريز

فريال حياوي محمد الشكرجي خالدة عبد الرحمن شاكر* عصام فاضل الجميلي**

معهد اعداد المعلمات – تربية الكرخ الثانية

*قسم علوم الاغذية والتقنية الاحيائية –كلية الزراعة – جامعة بغداد

** فرع التقنية الاحيائية – معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا–جامعة بغداد

الخلاصة

تمت غربلة نوى ثلاثة أصناف تجارية من نخيل التمر (الزهدي ، الخستاوي والخضراوي) للتحري عن محتواها من انزيم اليوريز . ولظهرت النتائج المستحصلة احتواء مستخلصات نوى ثلاثة أصناف على فعاليات متفاوتة لأنزيم اليوريز ، حيث كانت نوى تمر الزهدي هي الاعلى بفعالية نوعية 629.70 وحدة / ملغم بروتين . ونظرا لكون نوى تمر الزهدي اكثر أصناف التمور التجارية شيوعاً وامتلاكه فعالية نوعية عالية لهذا فقد اختير مصدراً لدراسة الانزيم .

حددت الظروف المثلى لاستخلاص الانزيم باستخدام محاليل ودوارئ مختلفة التركيز والرقم الهيدروجيني ، وجد أن محلول فوسفات البوتاسيوم الداريء بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 8 هو الأفضل في الاستخلاص .

المقدمة

يعد أنزيم اليوريز Urea amido hydrolase (EC.3.5.1.5) من الانزيمات المنتشرة انتشاراً واسعاً في الطبيعة إذ يوجد في خلايا الحيوانات والنباتات والاحياء المجهرية ويدخل في العديد من التفاعلات الايضية والعمليات الخلوية اثناء مراحل نمو وتطور النبات المختلفة ، إذ يحفز أنزيم اليوريز التحلل المائي لليوريا لتحرير الامونيا وجزيئة الكاربامايت (Carbamate) التي تتحلل تلقائياً لاعطاء جزيئة أخرى من الامونيا وحمض الكاربونيك ويعد حصول التوازن بين الامونيا والماء وينتج عنه هيدروكسيد الامونيا مما يؤدي الى ارتفاع سريع في الرقم الهيدروجيني [1].

أول من فصل أنزيم اليوريز من بذور الباقلاء Vicia faba بشكل بلوري هو العالم Sumner في عام 1926 . ونظراً لقلة الدراسات التي تناولت محتوى نوى تمر النخيل من البروتينات ذات الفعالية الحيوية مثل الانزيمات البروتييز واليوريز إذ كانت معظمها تركزت اهدافها على تحليل محتواها من الناحية الكيميائية وبعض الخواص الفيزيائية لهذه المكونات .

تمت دراسة بعض البروتينات ذات الفعالية الحيوية في محتوى نوى اربعة اصناف تجارية من نخيل التمر (الزهدي و الخستاوي و البريم و البرحي) ، وأظهرت النتائج تميز نوى البرحي بمحتواها من مثبطات التربسين إذ اظهرت فعالية نوعية 6309 وحدة / ملغم بروتين ونوى الزهدي بمحتواه من مثبطات الالفا- الاميليز وبلغت 14 وحدة / ملغم بروتين ، كما احتوت مستخلصات نوى الاصناف الاربعة على مادة اللكتين ذات الفعالية التلازنية تجاه كريات الدم الحمراء لفصائل الدم البشري الاربع [2] .

هدفت الدراسة الحالية الى التعرف على محتوى أصناف التمور التجارية (الزهدي والخستاوي والخضراوي) من أنزيم اليوريز وامكانية ايجاد افضل محلول لاستخلاص له .

المواد وطرائق العمل

أخذت كمية من نوى (بذور) ثلاثة أصناف من التمور العراقية والتي تمثلت في (الزهدي ، الخستاوي والخضراوي) وغسلت جيداً بالماء المقطر ، وتركت لتجف بدرجة حرارة 25 ° م ، سحقت بعدها في هاون خزفي ، ثم في مطحنة حجرية للحصول على مسحوق ناعم وحفظ في عبوات جافة ونظيفة ومحكمة الاغلاق بدرجة حرارة 4 ° م لحين الاستخدام .

المحاليل المستخدمة في استخلاص انزيم اليوريز

محلول داريء خلات الصوديوم بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 5 ومحاليل دوارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.25 مولار وبارقام هيدروجيني 7.0 و 8.0 و 10 .

طريقة العمل

حضر المستخلص الخام لنوى للأصناف الثلاثة بوزن 5 غرام من المسحوق نوى التمر واضيف اليه 25 مليلتر من محاليل الاستخلاص المذكورة اعلاه بنسبة 5:1 (وزن/ حجم) ، تم التحريك على المحرك المغناطيسي لمدة 15 دقيقة ثم تركت مدة 4 ساعات بدون تحريك بدرجة حرارة 4 ° م . نبذ مزيج مستخلصات الاصناف الثلاثة 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 ، وكذلك اجريت عملية الاستخلاص للاصناف الثلاثة بالطريقة نفسها بعد ترك المزيج لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 4 ° م ، قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في الرائق وحسبت الفعالية النوعية للانزيم .

تقدير فعالية اليوريز بطريقة الاندوفينول

تم تقدير انزيم اليوريز وفق الطريقة الموصوفة من قبل Mobley وجماعته [2] وباستخدام اليوريا كمادة اساس إذ تعرف وحدة فعالية الانزيم (Enzyme unit) : بأنها كمية الانزيم اللازمة لتحويل مايكرومول من اليوريا الى الامونيا في دقيقة واحدة وتحت درجة حرارة 37 ° م [3] . اما تقدير تركيز البروتين في المستخلص الخام والمنقى فقد تم وفق الطريقة الموصوفة من قبل Bradford [4].

تعيين الظروف المثلى لاستخلاص أنزيم اليوريز من نوى صنف الزهدي أختبرت كفاءة عدة محاليل لاستخلاص أنزيم اليوريز من نوى صنف الزهدي وكما يأتي :-

محلول كلوريد الصوديوم بتركيزين (0.15 و 0.25 مولار) ومحلول فوسفات البوتاسيوم الداري K_2HPO_4 بتركيزين 0.15 و 0.25 مولار) ورقم هيدروجيني 8 و محلول حامض الاسكوربيك بتركيز 0.06 مولار ورقم هيدروجيني 8 ومحلول بولي فنيل بايروليدون (PVP) بنسبة 1% (وزن / حجم) ورقم هيدروجيني 8 ومحلول EDTA بتركيز 50 ملي مولار ومحلول داري الخلات بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 5 ومحاول داري للفوسفات 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 8 وحاوي على 10% كليسرول والماء المقطر والماء الحنفية . أضيف 5 غرام من مسحوق نوى صنف الزهدي الى 25 مليلتر من الماء المقطر وكل من محاليل الاستخلاص المذكورة في الفقرة اعلاه وبنسبة 5:1 (وزن : حجم) في حمام ثلجي ، ومزجت جيدا باستخدام المحرك المغناطيسي (Magnetic stirrer) لمدة 15 دقيقة ، ثم تركت لمدة 4 ساعات من دون تحريك . وبعد النبذ بسرعة 4000xg لمدة 15 دقيقة بدرجة 4 م ، اخذ الرائق ورشح خلال الصوف الزجاجي ، وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين .

الاستخلاص من مسحوق الاسيتون

وزن 5 غرام من مسحوق نوى صنف الزهدي ، واضيف الى 25 مليلتر من الاسيتون المبرد بدرجة (-40) م بنسبة 5:1 (وزن : حجم) في حمام ثلجي ، وبعد المزج الجيد ، رشح الخليط خلال ورقة الترشيح وقمع بخنر تحت التفريغ ، غسل الراسب بـ(25) مليلتر أخرى من الاسيتون المبرد ، ورفعت بعدها ورق الترشيح وعليها الراسب، وتركت بدرجة حرارة الغرفة للتخلص من بقايا الاسيتون. ثم تمت عملية الاستخلاص باستخدام محلول داري فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 8 وبنسبة 5:1 (وزن : حجم) ، وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين .

غمر النوى باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 عياري):

جمعت كمية من نوى صنف الزهدي ، وبعد غسلها بالماء المقطر وتجفيفها ، تم نقها بقطعة من شاش ، وغمرت بمحلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز (1 عياري) لمدة 10 ثانية ثم غسلت تحت ماء الحنفية الجاري ثم بالماء المقطر ، وتركت لتجف تمهيداً لسحقها حسب الطريقة المذكور اعلاه وحضر المستخلص الخام من المسحوق وفقا للطريقة المذكورة اعلاه باستخدام محاليل الاستخلاص اعلاه ، وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين .

تاثير المعاملات الحرارية المختلفة في فعالية أنزيم اليوريز المستخلص من نوى الزهدي :-

تم تعريض تمر الزهدي الى معاملات حرارية مختلفة ، إذ تم سلق الثمار بالماء المقطر وبنسبة (10:1) وبدرجة حرارة 95 ° م ، وعلى مدد زمنية مختلفة ، وأخذت عينات من الثمار المسلوقة في اوقات مختلفة (30 و 60 و 90 و120) دقيقة ، بعدها تم فصل النوى من الثمار وغسلت بالماء المقطر وتم تجفيفها وطحنها . استخلص الانزيم بداري الفوسفات بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 8 ، قدرت الفعالية الانزيمية و تركيز البروتين. كما تم تعريض نوى تمر الزهدي الى درجات حرارة مباشرة (التحميص) باستخدام محمصة ولمدة 10 دقائق مع التقليب ولحين تغير لون النوى (اللون البني) ، بعدها بردت

الى درجة حرارة المختبر ثم طحنت ، استخلص الانزيم باستخدام دارئ الفوسفات بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 8 ، وتم تقدير الفعالية الانزيمية وقياس تركيز البروتين .

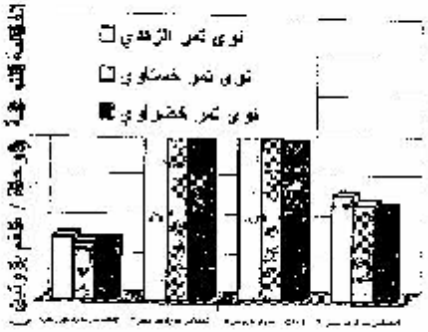
النتائج والمناقشة

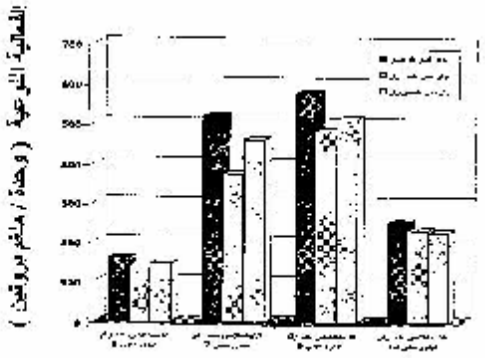
غربلة نوى (بذور) أصناف نخيل التمر المختارة :-

تمت غربلة نوى (بذور) ثلاثة أصناف نخيل التمر المختارة وهي (الزهدي و خضراوي وخستاوي) وفقاً لفعالية أنزيم اليوريز الموجودة فيها . يشير الشكل (1) الى وجود أنزيم اليوريز في مستخلصات نوى الاصناف الثلاثة ، وعند مقارنة قيم الفعالية النوعية لتلك المستخلصات ، وجد بأن مستخلص نوى الصنف الزهدي بوساطة المحلول الدارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 8 قد أعطى أعلى فعالية نوعية إذ بلغت 629.70 وحدة / ملغم بروتين، في حين أعطت كل من نوى صنف خضراوي والخستاوي فعالية نوعية بلغت 540.50 و 537.73 وحدة / ملغم بروتين على التوالي . وعند مقارنة الفعالية النوعية لمستخلصات نوى الانواع الثلاثة باستخدام محلولي دارئ خلات الصوديوم وفوسفات البوتاسيوم برقم هيدروجيني 5 و 10 على التوالي ، وجد بأنها تنخفض بشدة (الشكل 1) ، إذ بلغت الفعالية النوعية لمستخلص نوى تمر الزهدي وعند رقم هيدروجيني (5) 165 وحدة / ملغرام بروتين اما صنفي خضراوي والخستاوي فقد كانت 155 و 150.6 وحدة / ملغم بروتين على التوالي . في حين كانت الفعالية النوعية للاصناف الثلاثة (الزهدي والخضراوي والخستاوي) 273.58 و240.06 و252.73 وحدة / ملغرام بروتين على التوالي عند الاستخلاص بمحلول دارئ برقم هيدروجيني 10 ، مما يدل على تأثر فعالية وثباتية الانزيم في المحاليل ذات الارقام الهيدروجينية المتطرفة (الحامضية والقاعدية) [5].

كما تمت دراسة الفعالية النوعية لمستخلصات نوى الاصناف الثلاثة المختارة بعد مرور اربعة وعشرين ساعة (الشكل 2) ، فقد وجد بان الفعالية النوعية قد انخفضت إذ بلغت عند استخدام محلول دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني 8 في مستخلصات نوى الاصناف (الزهدي والخضراوي والخستاوي) 576.32 و 512.77 و 482.76 وحدة / ملغرام بروتين على التوالي . وانخفضت أكثر عند استخدام محلول خلات الصوديوم ذي الرقم الهيدروجيني 5 إذ بلغت الفعالية النوعية لمستخلص نوى تمر الزهدي 160 وحدة / ملغرام بروتين ،

الشكل (1) : استخلاص أنزيم اليوريز من نوى التمر للاصناف الثلاثة (الزهدي والخضراوي والخستاوي) باستخدام دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.25 مولار وبالارقام هيدروجيني مختلفة ولمدة اربع ساعات.





الشكل (2) : استخلاص أنزيم اليوريز من نوى التمر للاصناف الثلاثة (الزهدي والخضراوي والخستاوي) باستخدام دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.25 مولار وبالارقام هيدروجيني مختلفة ولمدة اربع وعشرين ساعة

أما المستخلصان لنوى تمر الخضراوي والخستاوي فقد كانا 145 و 140 وحدة / ملغرام بروتين على التوالي ، أما عند استخدام محلول دارئ الفوسفات عند رقم هيدروجيني 10 فقد اعطى مستخلص نوى تمر الزهدي فعالية نوعية 251.49 وحدة / ملغرام بروتين ، واعطى كل من مستخلص نوى تمر الخضراوي والخستاوي فعالية نوعية 225.12 و 231.97 وحدة/ ملغرام بروتين ، وقد يعزى هذا الانخفاض الى وجود أنزيمات البروتيزات في المستخلصات والذي أدى إلى مهاجمة انزيم اليوريز وكذلك فان عامل الرقم الهيدروجيني (الحامضي والقاعدي) للمستخلص له الأثر الكبير في خفض الفعالية الانزيمية في المستخلصات الثلاثة . هنالك دراسات مماثلة تمت لاستخلاص أنزيم اليوريز من مصادر نباتية أخرى تتمتع بفعالية أنزيمية عالية منها بذور الرقي (Water melon seeds) جنس (Citrullus vulgaris) ، والذي سجل نشاطاً أنزيمياً 395

وحدة / مليلتر أما بذور القرع العسلي Cucurbita maxima والذي سجل نشاط انزيمي مقداره 140.9 وحدة / مليلتر وبذور اللبلاب جنس Dolichos biflorus 90 وحدة / مليلتر [6].

قد يعزى تباين الفعالية الانزيمية في مستخلصات نوى الاصناف الثلاثة الى دور الانزيم في كل من الاصناف الثلاثة قيد الدراسة واهميته في حياة النبات خصوصاً في مرحلة الانبات . إذ يدخل في عمليات الانبات الاولى لشجرة التمر (نخيل) خلال تحليل المركبات النتروجينية الموجودة في التربة واعادة استخدامها في عمليات تصنيع البروتين عن طريق مسار إنحلال مركبات اليوريدو (Ureido) في أنسجة النبات [7].

تاثير ظروف الاستخلاص في فعالية أنزيم اليوريز المنتج من نوى صنف الزهدي

تم أختيار صنف الزهدي لاستخلاص أنزيم اليوريز منه وذلك بعد الغربلة التي تمت للاصناف الثلاثة ولكونه من الاصناف التجارية ، اذ تم أستخدام دوارئ ومحاليل مختلفة من اجل الحصول على أعلى فعالية نوعية لانزيم اليوريز (الجدول 1) .

وعند مقارنة الفعالية النوعية محسوبة على أساس وحدة النشاط الانزيمي لكل ملغرام بروتين مع طرائق الاستخلاص الاخرى ، تفوق محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.25 مولار وبرقم هيدروجيني 8 إذ بلغت الفعالية النوعية 629.70 وحدة / ملغم بروتين في حين أنخفضت الفعالية النوعية عند استخدام محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم مضاف اليه 10% كليسرول الى 53.05 وحدة / ملغم بروتين ، وقد انحصرت الفعالية النوعية لبقية المحاليل بين هاتين القيمتين ماعدا محلولي الاستخلاص من مسحوق الاسيتون بمحلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 8 والماء المقطر فقد اعطى 17.07 و33.85 وحدة / ملغم بروتين على التوالي . لذلك فقد أختير محلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.25 مولار وبرقم هيدروجيني 8 في التجارب اللاحقة .

وقد يعزى تفوق دارئ الفوسفات الى السعة البفرية التي يتمتع بها عند الرقم الهيدروجيني 8 ، والقوة الايونية العالية التي تسهم في انتزاع الانزيم من المعقدات الناشئة عن ارتباطه بالمكونات غير الذائبة كالمواد البكتينية دون التأثير في تركيبه وفعاليته . جاءت نتائج هذه الدراسة مطابقة لبعض الدراسات المتعلقة بمحاليل الاستخلاص لأنزيم اليوريز فقد تم استخدام محلول دارئ الفوسفات 0.1 مولار وبرقم هيدروجيني 7.6 [8].(الجدول 1)، كذلك فقد استخدم محلول دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 20 ملي مولار لاستخلاص انزيم اليوريز من بكتريا (K. aerogenosa) [3]، أما القيسي [6] فقد استخدمت دارئ الفوسفات الصوديوم بتركيز 50 ملي مولار وبرقم هيدروجيني 7.5، إذ أعطى أعلى فعالية انزيمية بلغت 220 وحدة/ مليلتر .

جدول (1) : استخلاص انزيم اليوريز من نوى تمر الزهدي باستخدام محاليل ودوارئ مختلفة .

ت	نوع معاملة الاستخلاص	الفعالية الانزيمية (وحدة/مليلتر)	البروتين (ملغم / مليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين)
1	نوى تمر الزهدي معاملة بـ هيدروكسيد الصوديوم (1) عياري ثم الاستخلاص بمحلول دارئ الفوسفات 0.25 مولار ورقم هيدروجيني(8) .	2677.36	5.19	513.94
2	الاستخلاص بمحلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.15 مولار ورقم هيدروجيني(8)	2248.67	5.11	440.05
3	الاستخلاص بمحلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني (8)	2852.52	4.53	629.70
4	الاستخلاص بمحلول كلوريد الصوديوم بتركيز 0.15 مولار	2061.05	4.43	465.25
5	الاستخلاص بمحلول كلوريد الصوديوم بتركيز 0.25 مولار	1280.79	5.05	253.62
6	الاستخلاص بمحلول EDTA بتركيز 50 ملي مولار	568.63	5.19	109.56
7	الاستخلاص بمحلول حامض الاسكوربيك بتركيز 0.06 مولار ورقم هيدروجيني (8)	721.93	5.01	144.09
8	الاستخلاص بمحلول بولي فنيل بايروليدون (PVP) بنسبة 1% (وزن / حجم) ورقم هيدروجيني (8) .	424.24	3.88	109.34
9	الاستخلاص بمحلول دارئ الخلات بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني (5)	398.10	2.40	165.88
10	الاستخلاص بمحلول دارئ للفوسفات 0.25 مولار ورقم هيدروجيني (8) وحاوي على 10% كليسرول	155.97	2.94	53.05
11	الاستخلاص من مسحوق الاسيتون بمحلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني (8)	57.53	3.37	17.07
12	الاستخلاص بالماء المقطر	114.08	3.37	33.85
13	الاستخلاص بماء الحنفية الجاري	245.99	2.21	111.31

قد تم استعمال البذور (النوى) المطحونة حيث أن عملية طحن النوى ساعدت في تحرير الانزيم من الاغشية بعد تحرره من الخلايا بسبب وجود الانزيم في السايتوبلازم أو قد يكون مرتبطاً بأغشية البذرة نفسها مثلما يكون في معظم خلايا النباتات [9] ، وخلايا البكتريا والخمائر المنتجة لانزيم اليوريز [10] . يستخدم محلول (Polyvinyl pyrrolidone (PVP في أستخلاص الانزيمات من الانسجة النباتية وذلك للامتصاص المركبات الفينولية والتقليل من تأثيرها في ثبات البروتينات وفعاليتها[11] ، وفي هذه الدراسة لم يلاحظ أي تأثير للمحلول بولي فنيل بايروليدون (PVP) في زيادة الفعالية النوعية إذ بلغت 109.35 وحدة / ملغم بروتين وهي كمية منخفضة مقارنة بالمحلول الفوسفات 0.25 مولار وبرقم هيدروجيني 8 ، أما محلول حامض الاسكوربيك بتركيز 0.06 مولار فهو يستخدم في استخلاص الانزيمات النباتية وذلك عمله كمضاد للاكسدة ، إذ يثبط انزيم بولي فينول اوكسيديز والذي يؤكسد المواد الفينولية بوجود الاوكسجين الى مواد بنية اللون (methyl O- -4 benzoquinone) فيعمل حامض الاسكوربيك على ارجاع هذه المادة الى المركب الاول (methyl Catechol -4) [12]، بيد أن انخفاض الفعالية النوعية للأنزيم اليوريز المستخلص ، جعلنا نستبعده من عملية الاستخلاص ، أن أختيار الداري المناسب له أهمية كبرى في المحافظة على الرقم الهيدروجيني دون التداخل مع وظيفة الانزيم او البروتين موضوع البحث أو التداخل مع طريقة تقدير الفعالية [12].

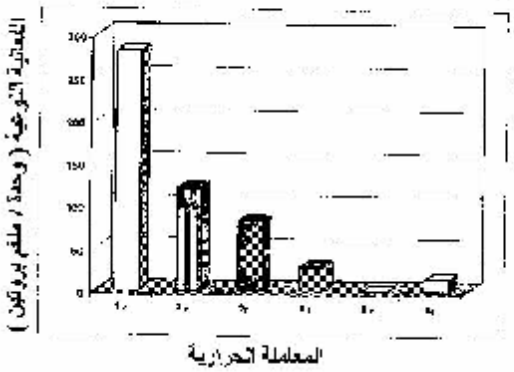
يلاحظ من الجدول أيضاً بان الاستخلاص بمحلول كلوريد الصوديوم بتركيز 0.25 مولار قد أعطى فعالية انزيمية ونوعية بلغت 1280.79 وحدة / مليلتر و 253.48 وحدة / ملغم بروتين . في حين أنخفضت الفعالية النوعية الى 223.82 وحدة / ملغم بروتين عند أستخدام محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 0.15 مولار قد يعود السبب الى أنخفاض القوة الايونية للمحلول الثاني بما يؤثر في كفاءته في استخلاص الانزيم من خلايا نوى التمر وكذلك يمكن ان تؤثر الحوامض العضوية المتحررة من الفجوات بعد طحن النوى في خفض الرقم الهيدروجيني للمحلول الاستخلاص مما يؤدي الى دنترة جزء من الانزيم المتحررة وبذلك يقل نشاط الانزيم [13 ، 11] .

ان استخدام EDTA بتركيز (0.05 مولار) أدى الى انخفاض الفعالية النوعية إذ بلغت 109.56 وحدة / ملغم بروتين . أشارت بعض الدراسات الى ان أستخدام مركب EDTA بالتركيز 5 مللي مولار في محلول استخلاص اليوريز من السلالة Bacillus sp. TB-90 أدى الى تثبيط عمل الانزيم [14] . أن زيادة تركيز المواد الكلابية الى اكثر من 10 مللي مولار يثبط فعالية الانزيم وذلك لوجود النيكل (Ni^{+2}) في الموقع الفعال للانزيم واحتواء هذه المركبات المختزلة على مجموعة الثايول (SH) حيث يتم التفاعل بين النيكل والكبريت لتكوين أصرة (Nikel-sulfer) مما يؤدي الى قلة ارتباط اليوريا (كمادة أساس) في الموقع الفعال مع النيكل كأحد الخطوات للتحلل المائي لعمل الانزيم [15]. كما يعد مركب EDTA من العوامل المخلبية ويعمل على منع تداخل المعادن الثقيلة الملوثة للداري اثناء عمل الانزيم لذلك يحافظ على ثبات الانزيم اذا ما استخدم بتراكيز منخفضة [12] . كما أن الاستخلاص بمحلول داري الخلات بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 5 ، أعطت فعالية نوعية منخفضة بلغت 165.88 وحدة / ملغم بروتين ويعتقد بان محلول الداري قد استخلص أنزيم اليوريز فضلاً عن السكريات والمركبات الفينولية الذائبة بالماء الامر الذي يعكس قوة ارتباط الانزيم بالمكونات غير الذائبة عند الاستخلاص بمحاليل ذات قوة ايونية ضعيفة ، أما الاستخلاص بالماء المقطر والماء العادي فكانت الفعالية النوعية منخفضة وخصوصا الاستخلاص بالماء المقطر وذلك لقلة وجود الايونات . أما معاملة نوى التمر بمحلول هيدروكسيد الصوديوم 1 عياري لمدة قصيرة جداً (10 ثوان) فقد اعطت فعالية نوعية اقل من ذلك غير المعاملة وذلك لان محلول هيدروكسيد الصوديوم يعد من القواعد القوية المسخة للبروتين حيث يقوم بكسر الاواصر الايونية والهيدروجينية ، مما يقلل من ثباتية التركيب الثلاثي للبروتين وعند استخلاصه بمحلول داري الفوسفات فانه يترسب مما يؤدي الى انخفاض في الفعالية النوعية لانزيم اليوريز [5].

تحديد أفضل معاملة حرارية لاستخلاص أنزيم اليوريز من النوى للتمر الزهدي :-

تم دراسة تأثير المعاملات الحرارية المختلفة (السماق والتحميص) على التمر الزهدي وبعدها تم استخلاص انزيم اليوريز من النوى لهذه المعاملات وذلك لتحديد افضل فعالية نوعية ممكن الحصول عليها من نوى تمر الزهدي بمعاملة التمر بدرجة حرارة 95 °م اثناء عملية الطبخ المكشوف عند صناعة الدبس بالطريقة الحارة .من الشكل (3) يلاحظ بان الفعالية النوعية لمستخلص نوى تمر الزهدي الخام غير المعامل بالحرارة قد اعطى فعالية نوعية 280.85 وحدة / ملغم بروتين ، في حين أعطى نوى التمر الزهدي المسلوق بدرجة حرارة 95 °م

ولمدد زمنية مختلفة (30 و60 و 90 و 120) دقيقة فعالية نوعية بلغت 120.53 و 82.41 و 29.44 و 0 وحدة / ملغم بروتين على التوالي . أن إجراء عملية التحميص ادى الى فقد الانزيم لاكثر من 95% من فعاليته النوعية إذ بلغت 15 وحدة / ملغم بروتين .



الشكل (3) : تاثير نوع المعاملة الحرارية في الفعالية النوعية لانزيم اليوريز المستخلص من نوى تمر الزهدي باستخدام دارئ الفوسفات بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 8 ولمدة اربع ساعات .

المعاملات :

1 : مستخلص نوى التمر الخام غير معامل

2 : مستخلص النوى لتمر المعامل بدرجة حرارة 95 م لمدة 30 دقيقة .

3: مستخلص النوى لتمر المعامل بدرجة حرارة 95 م لمدة 60 دقيقة.

4: مستخلص النوى لتمر المعامل بدرجة حرارة 95 م لمدة 90 دقيقة .

5 : مستخلص النوى لتمر المعامل بدرجة حرارة 95 م لمدة 120 دقيقة .

6 : مستخلص نوى التمر الزهدي المحمص .

من النتائج اعلاه يمكن الاستنتاج بان النوى المستحصل عليه من عمليات التصنيع يختلف من حيث كمية الانزيم ويفضل ان تأخذ النوى غير المعاملة بالحرارة مطلقاً وذلك لغرض الحصول على كميات كبيرة من الانزيم المستخلص وكذلك فان المعاملة الحرارية تؤثر في تركيب جزيئة الانزيم وتؤدي الى مسخه كما تتأثر حساسية الانزيمات عند المعاملات الحرارية بالرقم الهيدروجيني والقوة الايونية ووجود المواد المضافة الاخرى [16، 11] .

المصادر

1. Mobley, H.L.T. ; Jones, B.D. and Penner, J.L. (1987). Urease activity of Proteus penneri. J. of Clinical Microbiology, 25 (12): 2302-2305.
2. عباس ، وداد عبد (1999) . دراسة بعض البروتينات ذات الفعالية البيولوجية في بذور الاصناف التجارية لنخيل التمر Phoenix dactylifera L. رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .
3. 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.
4. Bradford, M. (1976).A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantites of protein utilizing the principle protein -dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
5. Scopes, R.K. (1987). Protein purification principles and practice. 2nd edition Springer-Verlage. New York.
6. القيسي ، فيحاء مقداد خليل. (2001) . تنقية وتوصيف انزيم اليوريز المستخلص من بذور الرقي Citrullus vulgaris.رسالة ماجستير . كلية العلوم للبنات. جامعة بغداد.
7. Shelp, B.J. and Ireland, R.J. (1985). Ureid metabolism in leaves of nitrogen fixing soybean plants. Plant Physiol. 77: 779-783.
8. http://www. Worthington-biochem com./URC/default html. Charateristics of urease from JackBean. 26/02/2001.
9. Reithel, F.J. (1971). Ureases in " The Enzymes in Food Processing " P. 176-196. Academic Press. New York.
10. Mobley, H.L.T. and Hausinger, R.P. (1989). Microbial ureases significance, regulation and molecular characterization. Microbiol. Rev. 53: 85-108.
11. Whitaker, J.R. (1972). Principles of Enzymology for the Food Science. pp: 481-501. New York.
12. Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. (1990). Buffers: Principles and practice . p: 24-38. In: Dentscher, M.P. (ed.) Methods in Enzymology. Vol. 182: Guide to Protein Prification . Academic Press. San.Diego.
13. Lis, H. and Sharon, N. (1972). Soybean (Clycin max) Agglutinin." In: Methods in Enzymology

(ed. Ginsburg, V.) Vol. XXVII: 360-365, Academic Press.New York.

14. Maeda, M.; Hridake, M.; Nakamura, A.; Masaki, H. and Quzumi, T. (1994). Cloning sequencing and Expression of thermophilic Bacillus sp. TB-90 urease gene complex in Escherichia coli , J. of Bacteriology , 176(2): 432-442.

15. Andrews , R.K. ; Blackeley, R.L. and Zerner, B. (1984). Urea and Urease .In " Advances in inorganic Biochemistry " (Ed. By Eichhorn, G.L. and Marzilli, L.G.J. Vol. 6, pp. 245-283. Elsevier Science Publishing Inc. New York.

16. Segel, J.J. (1976). Biochemical Calculation , John wiley and Sons.

Abstract

Date seeds of three commerical varieties (Zahdi and Khadrawi and Khistawii) were tested for urease enzyme content. Results showed the occurrence of the enzyme in all tested varieties with different specific activities. Zahdi seeds showed highest specific activity(629.70 unit/mg protein), therefore it was selected as a rich source of the enzyme. Optimum extraction conditions were determined using solution and buffers with different concentrations and pH. Phosphate buffer 0.25M at pH 8.0 was the best.