وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

توصيف أنزيم البروتييز المنقى جزئياً من ثمار نبات الحنظل *Citrullus colocynthis* وتأثيره في تثبيط بعض الاحياء المجهرية الممرضة

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم – جامعة القادسية

كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في

علوم الحياة - علم النبات

من قبل

رواء ماجد داخل الصفار

بكلوريوس علوم حياة- كلية العلوم- جامعة القادسية -2011

إشراف

ا.م.د. نزار عبد الأمير حمزة

1436 هـ 2015م

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم لصفحة
1-2	المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين بطريقة براد فورد	33
1-3	تحديد الرقم الهيدرووجيني الامثل لمحلول استخلاص انزيم البروتييز من ثمار الحنظل	51
2-3	العلاقة بين التركيز المولاري لدارئ الاستخلاص محلول فوسفات الصوديوم برقم هيدروجيني 7.5 لانزيم بروتييز ثمار الحنظل والفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	53
3-3	نسب استخلاص انزيم البروتييز بمحلول دارئ الفوسفات والفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	54
4-3	العلاقة بين وقت (دقيقة) استخلاص انزيم بروتييز من ثمار الحنظل والفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	55
5-3	نسب الاشباع لترسيب الانزيم بكبريتات الامونيوم	57
6-3	كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم البروتييز المستخلص من ثمار نبات الحنظل باستعمال عمود المبادل الايوني DEAE-Cellulose بابعاد (3.5×35) سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ (0.02 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	57
7-3	الترشيح الهلامي الاول لتنقية انزيم البروتييز المستخلص من ثمار نبات الحنظل باستعمال عمود هلام Sephacryl –S200 (1.5×85) سم تمت الموازنة والاسترداد بمحلول0.2 مولار فوسفات الصوديوم الدارئ ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 وسرعة جريان 60 مللتر / ساعة ، جمعت الاجزاء بواقع5 مللتر / جزء .	62
8-3	الترشيح الهلامي الثاني لتنقية انزيم البروتييز المستخلص من ثمار نبات الحنظل باستعمال عمود هلام Sephacryl –S200 (1.5×85) سم تمت الموازنة والاسترداد بمحلول0.2 مولار فوسفات الصوديوم الدارئ ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 وسرعة جريان 60 مللتر / ساعة ، جمعت الاجزاء بواقع5 مللتر / جزء .	62
9-3	المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم البروتييز المستخلص من ثمار نبات الحنظل بطريقة الترشيح الهلامي على عمود Sephacryl- S200 .	65
10-3	فعالية البروتييز المنقى من نبات الحنظل نحو مواد تفاعل مختلفة بدرجة حرارة 37 م لمدة نصف ساعة وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية	66
11-3	فعالية انزيم البروتييز المنقى بارقام هيدروجينية مختلفة باستخدام الكازائين محلولاً للتفاعل وبدرجة حرارة 37 م	69
12-3	تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4-9) في ثباتية البروتييز المنقى من ثمار نبات	69

	الحنظل ، حضن الانزيم لمدة نصف ساعة بارقام هيدروجينية مختلفة وبدرجة حرارة 37 م .	
13-3	تأثيردرجة الحرارة في فعالية البروتييز المنقى من ثمار نبات الحنظل اجري التفاعل بدرجات حرارية مختلفة لمدة 30 دقيقة باستخدام الكازائين محلولاً للتفاعل .	**71**
14-3	تأثير درجات الحرارة في ثبات البروتييز المنقى عند حضن الانزيم بدرجات حرارية مختلفة لمدة نصف ساعة ثم قدرت الفعالية باستخدام الكازائين مادة اساس .	**73**
15-3	الثبات الحراري لانزيم البروتييز المنقى من ثمار الحنظل عند حضنه بدرجة حرارة 35 م	**73**
16-3	**تاثير انزيم البروتييز المنقى من ثمار نبات الحنظل على العزلات الفطرية والبكتيرية .**	**84**

قائمة المحتويات

رقم الفقرة	الموضـــــوع	رقم الصفحة
	المقدمــة	1
	الفصل الاول	
1	استعراض المراجع	4
1-1	تصنيف نبات الحنظل *Citrullus colocynthis*	4
2-1	الوصف العام لنبات الحنظل	4
3-1	التسمية والانتشار لنبات الحنظل	5
4-1	المكونات الكيميائية الموجودة في نبات الحنظل	6
5-1	الاستعمالات الطبية الموجودة في نبات الحنظل	8
6-1	تصنيف البروتييزات	9
1-6-1	الببتيدات الخارجية	9
2-6-1	الببتيدات الداخلية	9
7-1	الية عمل السيرين بروتييز	12
8-1	الوضائف الفسلجية للبروتييزات	13
1-8-1	التكافل	14
2-8-1	التمايز	15
3-8-1	هظم البروتييز	15
4-8-1	الاستجابة المناعية المفرطة	16
9-1	تنقية الانزيم	16
10-1	توصيف الانزيم	18
1-10-1	الوزن الجزيئي	18
2-10-1	الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم وثباته	19
3-10-1	درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم وثباته	20
4-10-1	المواد المؤثرة في فعالية الانزيم	21
11-1	الاحياء المجهرية	22
	الفصل الثاني	
2	طرائق العمل	27
1-2	الاجهزة والمواد المستعملة	27
1-1-2	الاجهزة المستعملة والشركات المصنعة	28
2-2-2	المواد	28
2-2	الثمار	28
3-2	تقدير الفعالية البروتييز	30
1-3-2	طريقة العمل	30

2-3-2	المواد والمحاليل	31
5-5-2	طريقة العمل	31
1-2-5-2	اعداد المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري	32
2-2-5-2	تقدير تركيز البروتين في المحاليل الانزيمية	33
6-2	تعيين الظروف البيئية المثلى لاستخلاص البروتييزمن ثمار الحنظل	34
7-2	تنقية الانزيم	37
1-7-2	الترسيب بكبريتات الامونيوم	37
2-7-1-ج	كروموتوغرافيا التبادل الايوني	38
2-7-2	المواد والمحاليل المستعملة	38
3-7-2	تنشيط عمود المبادل الايوني	38
4-7-2	اضافة النموذج	39
8-2	توصيف انزيم البروتييز	39
1-8-2	تعيين الوزن الجزيئي	39
A-1-8-2	المواد والمحاليل	39
B-1-8-2	تقنية الترشيح الهلامي باستعمال هلام السيفاكرايل S-200	40
9-2	تعيين تخصص الانزيم اتجاه مواد الاساس المختلفة	42
10-2	تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم	42
11-2	تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات فعالية الانزيم	42
12-2	تعيين درجةالحرارة المثلى لفعالية الانزيم	43
13-2	تعين درجة الحرارة المثلى لثبات فعالية الانزيم	43
14-2	تاثير الايونات الفلزية والعوامل المختزلة والكلابية	43
1-14-2	طريقة العمل	43
15-2	تاثير مادة PMSF على فعالية الانزيم	44
16-2	تجفيد الانزيم	44
17-2	استعمال العدة التشخيصية للانواع البكتيرية API	44
18-2	اختبار فحص الحساسية	45
19-2	تحديد التركيز المثبط الادنى للاحياء المجهرية	45
	الفصل الثالث	
3	النتائج والمناقشة	48
1-3	التحري عن الانزيم في بعض نباتات العائلة القرعية	48
2-3	تحديد الضروف المثلى لاستخلاص الانزيم من الحنظل	50
1-2-3	تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لدارئ استخلاص الانزيم	50
2-2-3	تحديد التركيز المولاري الامثل للانزيم	53
3-2-3	تحديد نسبة الاستخلاص المثلى للانزيم	54
4-2-3	تحديد المدة الزمنية المثلى لاستخلاص الانزيم	55
4-3	تنقية الانزيم	56
1-4-3	تركيز الانزيم الخام	56
2-4-3	كروموتوغرافيا التبادل الايوني	58

3-4-3	كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي	60
5-3	توصيف انزيم البروتييز	63
1-5-3	تعيين الوزن الجزيئى	63
2-5-3	تقدير فعالية البروتييز نحو مواد تفاعل مختلفة	65
3-5-3	الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البروتييز	67
4-5-3	الرقم الهيدروجيني الامثل في ثباتية فعالية البروتييز	69
5-5-3	تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية البروتييز	71
6-5-3	تاثير درجة الحرارة في ثبات الانزيم	73
7-5-3	تاثيربعض المواد الكيميائية و الايونات المعدنية في فعالية الانزيم	76
8-5-3	اختبار فحص الحساسية للبروتييز كمضاد حيوي	79
	الاستنتاجات والتوصيات	84
	المصادر العربية	85
	المصادر الاجنبية	87

الخلاصة:

اجريت هذه الدراسة سنة 2014 في جامعة القادسية – كلية العلوم . اختيرت خمسة انواع تابعة لخمس اجناس مختلفة من الثمار العائدة للعائلة القرعية الحنظل *Citrullus colocynthis* L. البطيخ *Cucurbita melo* L. ، والخيار *Cucumis sativas* L. ، الشجر *Cucurbita pepo* L. والقرع العسلي *Cucurbita moschata* L. للتحري عن مستوى البروتييز في تلك الثمار. اظهرت النتائج امتلاك ثمار الحنظل مستوى عالٍ من الانزيم لما اثبته من فعالية نوعية عالية ، وعليه تم اختياره مصدراً لدراسة الانزيم حيث تم تعيين الظروف المثلى لاستخلاص الانزيم من تلك الثمار باستعمال محاليل و دوارئ مختلفة التراكيز والرقم الهيدروجيني، وكان محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار والرقم الهيدروجيني7.5 هو الانسب لاستخلاص الانزيم حيث سجل الانزيم فعالية نوعية بلغت 80.7 وحدة /ملغم . وان افضل نسبة استخلاص هي (1:1) (وزن:حجم) قياساً بنسبة الاستخلاص الاخرى (5:1,4:1, 3:1, 2:1)، حيث اعطى الانزيم فعالية نوعية مقدارها 80.2 (وحدة/ملغم). كما تم تعيين المدة الزمنية لاستخلاص الانزيم وكانت 5 دقيقة هي أفضل مدة زمنية لاستخلاص الانزيم ، لما اثبته الانزيم من فعالية انزيمية بلغت 80.6 وحدة/ملغم. اوجدت الدراسة ايضاً ان اضافة ماده البوليفينول بايريليدون (pvp Poly vinyl pyrrilidon) بنسبة 0.5% (وزن/حجم) الى دارئ الاستخلاص له اهمية في الحفاظ على ثبات الانزيم.نقي البروتييز بخطوات عدة شملت التركيز بكبريتات الامونيوم 50-60% وكروماتوغرافيا التبادل الايوني ثنائي اثيل امينو اثيل سليلوز DEAE-cellulose ، والترشيح الهلامي بخطوتين على عمود Sephacryl -S200، وكانت عدد مرات التنقية 15.01 وحصيلة انزيمية مقدارها 9.1 %.

اظهرت نتائج توصيف الانزيم مايلي

1.اختبـرت فعاليـة الانـزيم تجـاه اربـع مـواد تفاعـل هـي الكـازائين وآلبـومين المصـل البقـري والجيلاتـين واللبـومين البـيض لأجـل تحديـد تخصـص الانـزيم ، فوجـد ان الانـزيم امتلـك مـيلاً كبيـرا تجـاه بروتينـات الكـازائين مقارنـة مـع مـواد التفاعـل الاخـرى ، اذ بلغـت فعاليتـه المتبقيـة 100% بينمـا كانـت الفعاليـة المتبقيـة 66 % لمـادة البـومين المصـل البقـري و 49 % لمـادة الجيلاتـين و33 % لمادة اللبومين البيض.

2. قدر الوزن الجزيئي لانزيم البروتييز بطريقة الترشيح الهلامي فكان 50118 دالتون.

3. الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم هو 7.5 ، وتراوح الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بين (7– 8.5) .

4. بلغت درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم 35 م . احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه مدة 30 دقيقة في درجات الحرارة 25 – 40 م وفقد بحدود 70 % من فعاليته عند حضنه بدرجة حرارة 60 م و كان الانزيم ثابتا لمدة 50 دقيقة عند حضنه بدرجة حرارة 35 م.

5. اوضحت نتائج تأثير بعض المركبات الكيميائية في فعالية الانزيم ، عدم تأثره بوجود كلوريدات الصوديوم والبوتاسيوم الا بنسبة قليلة عند التركيزين 5 و 10 ملي مولار لكنها ازدادت قليلا عند حضن الانزيم مع كلوريد الكاليسيوم فقد بلغت 105% و112 % ،وكلوريد المغنيسيوم 110% و121% عند التراكيز 5 و10 ملي مولار على التوالي .

لم تظهر مثبطات الثايول مثل السستائين Cysteine تأثير في فعالية الانزيم إذ احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه مع التراكيز 2 و5 ملي مولار من هذه المادة ، كما تأثر قليلا بوجود العوامل الكلابية

(Chelating agents) مثل مادة Ethylen Diamin Tetra Acetic Acid (EDTA) إذ احتفظ الانزيم بـ 97% و95% من فعاليته عند التراكيز 1 و10ملي مولار على التوالي ،بينما ثبطت فعالية الانزيم بشكل كبير بمادة PMSF إذ بلغت الفعالية المتبقية 35% و5% بتراكيز 0.1 و1 ملي مولار على التوالي.

6.اختبرت فعالية انزيم البروتييز لثمار الحنظل بتحضير ثلاثة تراكيز منه 5 ,10 ,15 (ملغم/مل) واختبارها في تثبيط اربعة سلالات بكتيرية *Shigilla spp. E.coli, Staphylococcus aureus,* *Streptococcus agalactiae* وفطر *Aspergillus niger* وخميرة *Candida albicanus* هذا واعطى التركيز 15(ملغم /مل) اعلى استجابة بالنسبة للسلالات البكتيرية اما بالنسبة للفطريات فكان افضل تركيز اعطى استجابة لهذه العزلات هو 20 (ملغم /مل).

المقدمة

البروتييزات:

البروتييزات او ببتيدات التحلل المائي هي مجموعة كبيرة من الانزيمات لها القدرة على تحليل الاصرة الببتيدية (Rawlings *et al*.,2010; Barrrett,1997) . انزيمات 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 (Mala *et al*,1998) .هذه الانزيمات تقسم على مجموعتين هي بروتييزات خارجية Exopeptidases(EC 3.4.11-19) وبروتييزات داخلية Endopeptidases (EC 3.4.21-24). 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 (Rawlinge *et al*.,2010; Fan and Wu,2005) و بحسب تركيب الموقع الفعال تقسم البروتييزات الداخلية على اربع مجاميع رئيسية هي البروتييزات السيرينية Serine proteases و بروتييزات الثايول Thiol proteases و بروتييزات الاسبارتية Aspartic proteases و البروتييزات المعدنية Metallo proteases (Rawlings *et al*.,2010; Fan and Wu,2005).

تعتمد العمليات الفسلجية في كل اشكال الحياة على البروتييزات مثل هضم بروتينات الغذاء ، تنظيم تكوين، تحلل الخثرة ، تحفيز مسار الموت المبرمج للخلية ، عملية الانبات ، تكوين الابواغ ،تحفيز الهرمونات ، الاخصاب و السيطرة على الاستجابة المناعية الممفرطة (Antao and Maclcata,2005)،

كذلك تمايز الخلايا والنمو(Chou and Cai,2006;Bode and Huber,2000;Turk *et al*.,2000) .البروتييزات لها دور مهم في مجال الصناعات الغذائية كتطرية اللحوم وصناعة الخبز والجبن والبيرة بالإضافة الى صناعة المنسوجات (Kaneda *et al*.,1997) و استعمالها في مجال المستحضرات الصيدلانية والطبية وانتاج مواد التجميل حيث تبين ان للبروتييزات القدرة الكبيرة على إزالة التجاعيد (Liggieri *et al*.,2009). تقسم البروتييزات حسب الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليتها الى بروتييزات حامضية ومتعادلة وقاعدية ، البروتييزات القاعدية استعملت بصورة واسعة في صناعة المنظفات لقدرتها على إزالة بقع الدم والاوساخ من الاقمشة (Ahmed *et al*.,2009) بالإضافة الى استعمالها في صناعة الغزل والنسيج والجلود (Ali *and* Dahot , 2009) وتستعمل البروتييزات في المجال الطبي في علاج الحروق والجروح لقدرتها على ازالة الانسجة المحطمة والمصابة فضلا عن عملها كمضادات للالتهاب ، ايضا لها دور مهم لدى الاشخاص المصابين بعسر الهضم فضلا عن استعمالها مع تركيبة معاجين الاسنان لإزالة التسوس . كما تستعمل في معالجة النفايات السائلة وهندسة البروتين (Ali and Dahot,2009). البروتييزات لها دور في عملية تضاعف وانتشار الامراض المعدية (Chou and Cai,2006;Johansson *et al*.,2002 ;Powers *et al*.,2002). تتواجد البروتييزات في الكائنات الحية في الحيوانات والاحياء المجهرية كونها ضرورية لتنفيذ الوظائف الفسلجية المختلفة (Rani and Datte,2012) وتكون واسعة الانتشار في النباتات وبالتحديد بالاعضاء التكاثرية.

اشارت العديد من الدراسات الى تنقية الانزيم ودراسة صفاته من مصادر نباتية اخرى مثل دراسة Devi (and Hemathala,2014) التي تناولت البروتييز المستخلص من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* Var agrestis . بلإضافة الى دراسة (الصوفي،2013) التي شملت البروتييز المستخلص من بذور نبات الخس الشوكي *Lactuca serriola*. اما دراسة Ahmed واخرون (2009) فقد تناولت البروتييز

المستخلص من بذور نبات الجبين *Solanum dumbium* كذلك البروتييز المستخلص من اللاتكس لنبات *Euphorbia milii* (Yadav *et al*.,2008) . البروتييز المستخلص من ثمار نبات البطيخ *Cucumis tringus* Roxburghi (Mufti *et al*.,2006).نظرا لقلة الدراسات المحلية حول بروتييزات من نبات الحنظل *Citrullus colocynthis* فقد هدفت الدراسة الحالية الى

1- التحري عن وجود انزيم البروتييزوتوصيفه لبعض المصادر النباتية التابعة للعائلة القرعية

2 - دراسة تأثير بعض العوامل المؤثرة في استخلاص الانزيم من المصدر النباتي المنتخب .

3 - تنقية الانزيم بطرائق 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 في نمو بعض الأحياء المجهرية .

2 -1: المواد والاجهزة المستعملة:

2-1-1: الاجهزة المستعملة والشركات المجهزة:

	اسم الجهاز		الشركة المصنعة
1	منبذة مبردة	cooling centerfuge	Du pont
2	ميزان	Balance	SARTORIOUS-U.K.
3	حاضنة	Incubater	GALLENKAM-England
4	مازج	Vortex	Heidolph
5	جهاز قياس الاس الهيدروجيني	pH- meter	Henna- China
6	ثلاجة	Refrigerrator	GONGORD-Koria
7	منبذة	Centerfuge	HERMLE-Germany
8	ميزان الكتروني حساس	Sensitive electronic balance	SARTORIOUS-U.K.
9	خلاط	Blender	National
10	حمام مائي	Water bath	MEMMERT-Germany
11	مسخن ومحرك مغناطيسي	Magnatic stirrer	Scientific industeries
12	مؤصدة	Autoclave	WEBCO-GmbH
13	جهاز تقطير	Distiller	H-JURGENS-CO
14	جهاز المطياف الضوئي	Specterophotometer	SPECTRONIC 21 Bansch
15	جهاز التجفيد	Lyophilezer	Mini LyoTRAP

2-1-1-2 :المواد

المادة	الشركة المجهزة والمنشأ
كلوريد الصوديوم NaCl ، حامض الخليك CH_3COOH ، ايثانول 95 % ، البومين المصل البقري (BSA) ، كازائين Casein ، كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ ، كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ ، كلوريد البوتاسيوم KCl ،السستائين ، حامض الفسفوريك H_3PO_4 ، هيدروكسيد الصوديوم NaOH ، ثلاثي كلورو حامض الخليك TCA ، EDTA ، HCl ، كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ ، صبغة كوماسي الزرقاء Coomassi Brilliant blue .	BDH (England)
ترس حامض الهيدروكلوريك Tris- HCl .	Fluka (Switzerland)
المبادل الايوني DEAE – Cellulose ، دكستران ازرق 2000 ، سيفاكرايل - S 200 .	Pharmacia
PMSF .	Sigma (USA)
اكياس ديلزة Dialysis Sacs	Spectrum (USA)
وسط ابي لتشخيص بكتريا *S.aureus* , *Ecoli* و *Candida albicanus*	Bio merieux (France)

2-2: ثمار نباتات العائلة القرعية

تم الحصول على ثمارالنباتات العائدة الى العائلة القرعية *Cucurbitaceae* من الاسواق المحلية وللمدة من شهرتشرين الاول الى شهر تشرين الثاني وقد ضمت الثمار كل من الخيار *Cucumis sativas* و البطيخ *Cucurbita melo* و الشجر *Cucurbita pepo* والقرع العسلي *Cucurbita moschata.* اما ثمار نبات الحنظل *Citrillus colocynthis* فقد تم الحصول عليها من منطقة (الحويلة - مقاطعة 22-الكفياية - قضاء عفك)، والمنطقة الحدودية عرعربالقرب من الحدود العراقية السعودية و للمدة مابين تشرين الاول وتشرين الثاني لسنة 2013. وقد انتخبت الثمارالسليمة لغرض اجراء التجارب حيث نظفت وغسلت من الاتربة بالماء المقطر ثم جففت بدرجة حرارة المختبر مع التقليب المستمر لمنع تعفنها بعدها تم فصل البذور عن الثمار .

2- 3: اختيار المصدر النباتي

2-3-1: طرائق العمل Methodes

2-3- 2: تحضير المحاليل المستعملة

ا- المحلول داريء فوسفات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7

حضر100 مليلترمن دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار وذلك بمزج 61 مليلتر من محلول ثنائي فوسفات الصوديوم (NaH_2PO_4) بتركيز 0.1 مولار ومزجت مع 39 مليلتر من محلول ثنائي الصوديوم احادي الفوسفات (Na_2HPO_4) للحصول على رقم الهيدروجيني 7

ب- المحلول دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.5

حضر100 مليلترمن دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار وذلك بمزج 18 مليلتر من محلول ثنائي فوسفات الصوديوم (NaH_2PO_4) بتركيز 0.1 مولار ومزجت مع 62 مليلتر من محلول ثنائي الصوديوم احادي الفوسفات (Na_2HPO_4) للحصول على رقم الهيدروجيني 7.5

2-4: طريقة العمل

حضرالمستخلص الخام من ثمارالنباتات المنتخبة والعائدة للعائلة القرعية وذلك بوزن100غم من الثمار ويضاف اليه 100 مل من محلول داريء الفوسفات المبرد والمحضراستنادا الى الفقرة (2-3-1- ا) والمضاف اليه 0.5% من مادة PVP بنسبه 1:1 (وزن/حجم) لغرض المحافظة على فعالية الانزيم من الظروف المثبطة ، وضع المزيج بالخلاط blender خلط المزيج لمده 5 دقائق على السرعة المتوسطة بعدها رشح المزيج بقطعة من الشاش ثم نبذ الرائق بعملية الطرد المركزي المبرد بسرعة 5000 دورة لمدة 15 دقيقة استعمل الرائق (بوصفه مستخلص الخام) تم تقديرالفعالية الانزيمية وتركيزالبروتين بحساب الفعالية النوعية ; وذلك لاختيارالمصدرالمناسب لانتاج البروتييز.

2-5: تقديرفعالية البروتييز

قدرت الفعالية الانزيمية للبروتييز وفق الطريقة الموصوفة من قبل (Brock *et al* .,1982)

2-5-1: المواد والمحاليل المستعملة

ا- محلول 0.1 مولرترس حامض الهيدروكلوريك Tris-HCl

حضر باذابة 1.57 غم من مادة ترس حامض الهيدروكلوريك في 90 مل من الماءالمقطروعدل الرقم الهيدروجيني الى 7.5 ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

ب- محلول مادة التفاعل بتركيز1% كازائين (المادة الاساس)

حضرباذابة 1 غم من الكازائين في 100 مل من ترس حامض الهيدروكلوريك 0.1 مولاري برقم هيدروجيني 7.5.

ج – محلول حامض الخليك ثلاثي الكلور Trichloro acetic acid (TCA)

حضرباذابه 5 غم من مادة TCA في 100 مل من الماء ليعطي تركيزا نهائيا مقداره 5%.

2-5-2: طريقـــة العمـــل

قُدرت الفعالية الانزيمية على وفق الخطوات الاتية :

اخذ 1.8 مل من محلول المادة الاساس في انابيب اختبارسعة 10 مل وضعت الانابيب في حمام مائي بدرجة 37°م وتركت لمدة 5 دقائق

1- اضيف 0.2 مل من محلول الانزيمي المحلول المادة الاساس وحضنت الانابيب في ا لحمام المائي بدرجة 37°م لمدة 30 دقيقة .

2- اوقف التفاعل باضافة 3 مل من محلول 5% TCA

3- نبذ المحلول مركزيا بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة

4- حضرت نماذج السيطرة باضافة 3 مل من محلول 5% TCA الى محلول المادة الاساس ثم اضيف بعدها الانزيم ومررالنموذج بالخطوات نفسها سابقة الذكر

5- قيست الامتصاصية الضوئية للطافي عند الطول الموجي 280 نانوميتربجهازالمطياف الضوئي-UV Vis -Spectrophotometer .

6- قدرت الفعالية الانزيمية على اساس تحلل Degradation بروتين الكازائين الببتيدات صغيرة واحماض امينية ذائبة في الحامض بفعل الانزيم على وفقا لمعادلة الاتية :

الفعالية الانزيمية (وحدة / مللتر) = الامتصاصة على طول موجي 280 نانوميتر / (0.2 × 30 × 0.01)

اذ ان :

0.01: من تعريف وحدة الفعالية (وحدة الفعالية للانزيم Unit) : هي مقدار الزيادة في الامتصاصية عند طول موجي 280 نانوميتر تحت ظروف التقديرالقياسية .

0.2 : حجم محلول الانزيم المضاف (مللتر)

30 : زمن التفاعل (دقيقة) .

3-5-2: تقديرتركيزالبروتين

قُدر تركيز البروتين على وفق الطريقة الموصوفة من Bradford عام (1976) وكماياتي :

4-5-2: المواد والمحاليل

ا- محلول صبغة كوماسي الزرقاء Coomassie Brilliant blue G-250

حُضرت باذابة 0.1 غم من الصبغة في 50 مل من 95% ايثانول، ثم اضيف 100 مل من 85 % حامض الفسفوريك معا للتحريك في حمام ثلجي واكمل الحجم الى لتربالماء المقطر ثم رشحت الصبغة بورقة ترشيح واتمان رقم (1) (Whatman No.1) وحفظت بقنينة معتمة بدرجة 4°م .

ب- محلول البومين المصل البقري القياسي (Bovine Serum Albumin (BSA .

حُضرباذابة 0.1 غم من البومين المصل البقري في كمية من محلول ترس حامض الهيدروكلوريك الدارئ واكمل الحجم الى 100 مل بالمحلول نفسه .

2-5-5: طريقة العمــل

2-5-5- ا: المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري

تم اعداد المنحني القياسي على وفق الخطوات الاتية:

1- حضرت تراكيزمختلفة من البومين المصل البقري بحجم 0.1 مل مقدارها (0 ، 20 ، 40 ، 60 ، 80 ، 100) ملغرام / مل بواقع ثلاث انابيب لكل تركيزباستعمال محلول البومين المصل البقري المحظر وفق الفقرة (2-5-4-ب)

2- اضيف 0.4 مللتر من محلول ترس حامض الهيدروكلوريك الدارئ 0.1 مولرلكل انبوب اختبار .

3-اضيف لكل انبوبة اختبار 2.5 مللتر من محلول صبغة الكوماسي G-250 ، مزج الخليط بصورة جيدة وترك لمدة 5 دقائق .

4- تم قراءة الامتصاص لكل تركيز (ثلاث مكررات) عند الطول الموجي 595 نانوميتر باستعمال المطياف الضوئي بعد ان صفر الجهاز بمحلول الكفءBlank المتكون من 0.5 مللتر من محلول ترس حامض الهيدروكلوريك الدارئ و 2.5 مل من محلول صبغة الكوماسي الزرقاء G-250 .

5- تم رسم المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري من العلاقة بين تركيز BSA وقيم الامتصاص لكل تركيز عند الطول الموجي 595 نانوميتر كما هو مبين في الشكل (2 -1).

2-5-5-ب: تقدير تركيز البروتين في المحاليل الانزيمية

تم تقدير تركيز البروتين للمحاليل الانزيمية باضافة 0.1 مللتر من المحلول الانزيمي و0.4 مل من محلول ترس حامض الهيدروكلوريك الدارئ ذو التركيز0.1 مولر بواقع ثلاثة مكررات الى انابيب الاختبار واضيف لكل منها 2.5 مل من محلول صبغة الكوماسي الزرقاء G-250 ، مزج الخليط جيدا وترك مدة 5 دقائق وتم قراءة الامتصاصية على طول موجي 595 نانوميتر ، وصفر الجهاز بمحلول الكفء المذكور سابقا ، وتم حساب تركيز البروتين في المحاليل الانزيمية بالرجوع الى المنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري (Whitaker and Bernard, 1972).

قدرت الفعالية النوعية Specific activity وفق المعادلة الاتية :

فعاليه الانزيم (وحده /مل)

الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين) = ----------

تركيز البروتين (ملغم / مل)

شكل (2-1) : المنحنى القياسي لتقدير البروتين باستعمال طريقة برادفورد

2-6: تعيين الظروف المثلى لاستخلاص الانزيم من ثمار الحنظل

اختبرت قدرة طرائق عدة لاستخلاص الانزيم من ثمار الحنظل وكما ياتي:-

2-6-1: المحاليل المستعملة

حضرت المحاليل المنظمة وفقا لـ (Chandra,2003)

2-6-1- أ: محلول الخلات الدارئ بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 4 و4.5 و5 و5.5

*حضر بمزج 41 مل بتركيز 0.1 مولار من حامض الخليك الثلجي مع 9 مل من خلات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار، ثم عدل الى الرقم الهيدروجيني 4 باضافة بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم واكمل الحجم الى 100 مل.

*مزج 30.5 مل بتركيز 0.1 مولار من حامض الخليك الثلجي مع 19.5مل من خلات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار، ثم عدل الى الرقم الهيدروجيني الى 4.5 باضافة بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم واكمل الحجم الى 100 مل.

* مزج 14.8 مل بتركيز 0.1 مولار من حامض الخليك الثلجي مع 32.2 مل من خلات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار، ثم عدل الى الرقم الهيدروجيني الى 5 باضافة بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم واكمل الحجم الى 100 مل.

* مزج 4.8 مل بتركيز 0.1 مولار من حامض الخليك الثلجي مع 45.2 مل من خلات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار، ثم عدل الى الرقم الهيدروجيني الى 5.5 باضافة بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم واكمل الحجم الى 100 مل.

2-6-2-ب: محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6 ، 6.5 ، 7 ،7.5 و8.

حضرباذابة 13.7 غم من مادة NaH_2PO_4 في لترمن الماء المقطر واذابة 14.1 غم من مادة Na_2HPO_4 في لتر من الماء ثم حضرت منه بقية الارقام الهيدروجينية

*مزج 81.5 مل من المادة الاولى مع 18.5 مل من المادة الثانية واكمل الحجم الى 200 مل من الماء المقطر بعدما عدل الرقم الهيدروجيني الى 6 وذلك بضع قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم الى المحلول .

*مزج 73.5 مل من المادة الاولى مع 62.5 مل من المادة الثانية واكمل الحجم الى 200 مل من الماء المقطر بعدما عدل الرقم الهيدروجيني الى 6.5 وذلك بضع قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم الى المحلول .

* مزج 93 مل من المادة الاولى مع 61 مل من المادة الثانية واكمل الحجم الى 200 مل من الماء المقطر بعدما عدل الرقم الهيدروجيني الى 7 وذلك بضع قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم الى المحلول .

*مزج 19 مل من المادة الاولى مع 81 مل من المادة الثانية واكمل الحجم الى 200 مل من الماء المقطر بعدما عدل الرقم الهيدروجيني الى7.5 وذلك بإضافة بضع قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم الى المحلول .

* مزج 5.3 مل من المادة الاولى مع 94.7 مل من المادة الثانية واكمل الحجم الى 200 مل من الماء المقطر بعدما عدل الرقم الهيدروجيني الى 8 وذلك بضع قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم الى المحلول .

2-6-1-ج: محلول Tris-Hcl الدارئ ذي الرقم الهيدروجيني 8.5 و9

1- محلول Tris-hydroxy methel amino methan بتركيز 0.1 مولار

تم اذابة 15.7 غم من المادة في لتر من الماء المقطر.

2- حامض الهيدروكلوريك بتركيز0.1 مولار

*مزج 50 مل من المادة الاولى مع 21.9 مل من المادة الثانية ثم اكمل الى 200 مل من الماء المقطر بعدما عدل الرقم الهيدروجيني الى 8.5 باضافة بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم الى المحلول.

*مزج 50 مل من المادة الاولى مع 5 مل من المادة الثانية ثم اكمل الى 200 مل من الماء المقطر بعدما عدل الرقم الهيدروجيني الى 9 باضافة بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم الى المحلول.

2-6-2: تحديد نسبة الاستخلاص المثلى للانزيم

بعد تحديد دارئ الاستخلاص الامثل ذي الرقم الهيدروجيني الامثل ، استخلص الانزيم بنسب استخلاص مختلفة شملت (5:1,4:1,3:1,2:1,1:1) (وزن/ حجم) ، ثم قدرت الفعالية الانزيمية وتركيزالبروتين لتحديد نسبة الاستخلاص المثلى .

2-6-3: تحديد زمن الاستخلاص الامثل

بعد تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لداريء الاستخلاص الامثل وبالنسبة المثلى المنتخبة من الخطوة اعلاه في مدة زمنية مختلفة شملت (45,30,20,15,10,5) دقيقة بعدها تم تقديرالفعالية الانزيمية وتركيز البروتين كما ورد في الفقرة (2-5- 5 - A) ، (2-5-5- B) على التوالي لتحديد الزمن الامثل لاستخلاص الانزيم .

2-6-4: تحديد التركيزالامثل لداريء الاستخلاص

بعد تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل بنسبة الاستخلاص المثلى وبالمده الزمنيه المناسبة استخلص الانزيم بتراكيزمختلفة من داريء الاستخلاص شملت (0.05 ، 0.1 ، 0.2 ، 0.4) مولر وقدرت كل من الفعالية

الانزيمية وفق الفقرة (2-5- 5 -A) وتركيزالبروتين وفق الفقره (2-5-5- B) لتحديد التركيزالامثل لداريء الاستخلاص .

2-7: تنقية الانزيم

2-7-1التنقية بإستعمال كبريتات الامونيوم

2-7-1-ا: المواد

2-7-1-ب: طرائق العمل

اضيفت اوزان معينة (1.06، 1.64، 2.26، 2.91، 3.16 ،4.36 ، 5.16 ، 6.03) غم من بلورات كبريتات الامونيوم تدريجيا الى10مل من المستخلص الخام مع التحريك المستمرعلى المحرك المغناطيسي ولمدة نصف ساعة وتحت ظروف التبريد (حمام ثلجي) ، للحصول على نسب اشباع (20 ,30 ,40, ,50 ,60 ,70, 80 , 90) %على التوالي جمع المستخلص بعد كل اضافة ونقل الى اناء زجاجي ذي غطاء محكم وحفظ في الثلاجة لمدة ساعة ، بعدها اجري النبذ المركزي بسرعة (5000 دورة/ دقيقة) لمدة 15 دقيقة ، اهمل الرائق وقدرت الفعالية الانزيمية كما في فقرة (2-5-5- ا) وتركيزالبروتين كما في فقرة (2-5-5-ب) في الرواسب لكل خطوة بعد اذابتها في حجم صغيرمن محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولاروبرقم هيدروجيني 7.5 لتحديد نسبة الاشباع المثلى لتركيزالانزيم وضع الانزيم في اكياس الديلزة ثم وضعت اكياس الديلزة في محلول الدارئ لمدة 24 ساعة مع مراعاة تبديل المحلول الدارئ اربع مرات اي كل ستة ساعات لغرض التخلص من كبريتات الامونيوم الموجودة في الانزيم .

2-7-1-ج : تقنيـــة كرومـــاتوغرافي التبـــادل الايـــوني Ion Exchange Chromatography

2-7-2-أ: المحاليل والمواد المستعملة

2-7-2-أ-1: محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.25 مولار- كلوريد الصوديوم 0.25 مولار

حضرباذابة (5) غرام من هيدروكسيد الصوديوم NaOH و(7.309) غرام من كلوريد الصوديوم NaCl في كمية من الماء المقطر، واكمل الحجم الى 500 مل .

2-7-2-أ- 2: محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.25 مولار

حضرباضافة 10.45 مليلترمن HCl الى 500 مليلترماء مقطر

2-7-2-أ-3: محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 1 مولار

حضرباذابة 58.44غرام من NaCl في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى 1000 مل بالماءالمقطر.

2-7-3: تحضير المبادل الايوني ثنائي اثيل امين واثيل سليلوزDEAE-Cellulose

حضر بالطريقة الموصوفة من Whitaker (1972) اضيف 20 غراماً من المبادل الى لتر من الماء المقطر في اسطوانة مدرجة وترك ليركد ، ثم سكب السائل العلوي وغسل المبادل بالماء المقطر مرات عدة الى ان اصبح السائل العلوي رائقا ورشح في قمع بخنر تحت التفريغ ، ثم علق الراسب في محلول 0.25 مولر هيدروكسيد الصوديوم – 0.25 مولار

كلوريد الصوديوم ورشح وغسل عدة مرات بالماء المقطر ثم بمحلول 0.25 مولار حامض الهيدروكلوريك ، ثم غسل بالماء المقطر مرات عدة ثم بعد ذلك علق بدارئ فوسفات الصوديوم دارئ الموازنة ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 و 0.02 مولاروجرت عملية ازالة الهواء Degassing بوساطة مضخة تفريغ Vacuum pump . عبىء بعدها المبادل في العمود ليعطي مبادل بابعاد (3.5× 35) سم واجريت موازنة العمود بدارئ فوسفات الصوديوم .

2-7-4: اضافة النموذج

بعد موازنة ا لعمود مرر6 مل من المحلول الانزيمي الناتج من خطوة الديلزة وغسل العمود بالمحلول الدارئ لانزال البروتينات غيرالمرتبطة وجمعت الاجزاء المفصولة من العمود بمعدل5 مليلتر/ انبوب وسرعة جريان 30 مل / ساعة ، وتم قياس الامتصاص الضوئي للاجزاء المفصولة عند 280 نانومتر كما وتم قياس الفعالية الانزيمية (وحدة/ مليلتر) للاجزاء غيرالمرتبطة استرد الانزيم من العمود بواسطة التدرج الخطي للملح باستعمال دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز0.02 مولار ورقم هيدروجيني 7.5 المحتوي على 1 مولارمن كلوريد الصوديوم (2-7-2-ا-3)

تم متابعة البروتين في الاجزاءالمستردة ورسمت العلاقة بين الامتصاص الضوئي للاجزاء المستردة بعدها جمعت الاجزاء الفعالة وتمت ديلزتها وتركيزها وقدرت لها الفعالية الانزيمية (وحدة/مل) وتركيزالبروتين لاستخراج الفعالية النوعية (وحدة /ملغم) .

2-8: توصيف الانزيم

2-8-1: تعيين الوزن الجزيئي للانزيم

عين الوزن الجزيئي للانزيم بإستعمال تقنية الترشيح الهلامي

2-8-1-أ: المواد والمحاليل

استخدمت المواد والمحاليل الاتية

*** محلول الدكستران الازرق Blue Dextron 2000**

حضربتركيز 2 ملغم / مللترمن الدكستران الازرق 2000 مذابا في محلول فوسفات الصوديوم الداريء 0.2 مولار، ورقم هيدروجيني 7.5.

البروتينات القياسية

استعملت خمسة بروتينات قياسية لتقدير الوزن الجزيئي للانزيم المنقى من نبات الحنظل المحضرة بتراكيز 2 ملغم / مللتر المذابة في محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7.5، على وفق الجدول الاتي :

جدول (2-1): البروتينات القياسية

ت	البروتين القياسي	الوزن الجزيئي (دالتون)
1	Bovin Serum Albumin	67000
2	Ova Albumin	43000
3	Lysozyme	14400
4	Trypsin	23000
5	phosphatase	80000

2-8-1-ب:تقنية كروموتوغرافي الترشيح الهلامي على عمود السيفاكرايل Sephacryl S200

2-8-1-ب-1: تهيئة العمود

علق الهلام المجهزمن الشركة المصنعة Pharmacia Fine Chemical بكمية من دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7.5، وازيلت منها الفقاعات (Degassing) بمضخة مفرغة الهواء.

2-B-1-8-2: تعبئة العمود

عبئ ا لعمود الزجاجي بابعاد 1.5×85 سم بالهلام وذلك بسكب محلول الهلام المتجانس المفرغ من الهواء بشكل مائل ولتجنب تكون فقاعات هوائية اجريت العملية ببطء وبصورة مستمرة ثم استمرارامرارمحلول دارئ الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 وتركيز 0.2 مولاروبسرعة جريان 60 (مل/ساعة) للموازنة ، وهي السرعة ذاتها التي تم فيها جمع الاجزاءعند تنقية الانزيم .

2-8-1-ب-3: توصيف الانزيم

2-8-1-4 : تقدير الوزن الجزيئي للانزيم

استعمل عمود Sephacryl-S200 بابعاد 1.5× 85 سم في تقديرالوزن الجزيئي واستعمل فوسفات الصوديوم الدارئ ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 و0.2 مولار في موازنة العمود للعمود قدر حجم الفراغ (Void Volume, V_o) باستخدام محلول الدكستران الازرق بتركيز 2 ملغم/مليلتر المحضر على وفق الفقرة(2-8-1-أ) تم امرار 2 مليلتر من هذا المحلول على الجدار الداخلي للعمود الزجاجي بالقرب من سطح الهلام وبشكل تدريجي، واجريت عملية الاسترداد لمحلول الدكستران الازرق بمحلول دارئ الفوسفات بتركيز (0.2) مولار ورقم هيدروجيني 7.5 وبسرعة جريان ثابتة 60 مليلتر/ساعة وبواقع 2 مليلترات للجزء الواحد، وتمت قراءة الامتصاصية في جهاز المطياف الضوئي للاجزاء المنفصلة على الطول الموجي 600 نانومتر، وقدر حجم الفراغ للعمود اما حجوم الاسترداد (Ve) للبروتينات القياسية والانزيم فقد قدرت بحساب عدد المليلترات النازلة من عمود الترشيح الهلامي و إلى منتصف قمة المادة المفصولة بعد قراءة الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانومتر استخرج الوزن الجزيئي للانزيم من خلال رسم العلاقة الخطية بين نسبة حجم استرداد كل بروتين قياسي إلى حجم الفراغ (Ve/Vo) مقابل لوغاريتم وزنه الجزيئي.

2-8 -1 -ب - 4: طريقة العمل

مُرر المحلول الانزيمي المديلز و المركز من خطوة المبادل الايوني على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S200 واجريت عملية الاسترداد بوساطة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ (0.2 مولار، pH = 7.5) وبسرعة جريان مقدارها 60 (مل/ ساعة) ، تمت متابعة البروتين في الاجزاء التي جمعت بقياس الامتصاص لكل منها على الطول الموجي 280 نانومتر، ثم قيست الفعالية الانزيمية . جمعت الاجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين ، ثم وزعت في انابيب مناسبة لهذا الغرض بواقع 1 مل لكل انبوب ثم حفظت بالتجميد لاجراء التجارب اللاحقة .

2- 9: تحديد المادة الاساس الافضل للانزيم

حضرت المحاليل، الكازائين والبومين المصل البقري واللبومين البيض والجيلاتين (محاليل التفاعل) بتركيز 1% باذابة البروتينات المذكورة بمحلول الترس الدارئ ذي رقم هيدروجيني 7.5 وتركيز 0.1 مولار . وزعت محاليل التفاعل (مواد الاساس) على انابيب بواقع 1.8 مللتر لكل انبوب وبواقع ثلاثة مكررات لكل مادة تفاعل. اضيف 0.2 مللتر من محلول الانزيم المنقى الى الانابيب السابقة وحضنت لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37°م ، ثم اوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية.

2-10: تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم

حضرمحلول مادة التفاعل (الكازائين) بتركيز 1% بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 4-9 وزع على انابيب بواقع (1.8) مل من المادة الاساس (الكازائين) وحضنت الانابيب بدرجة 37 °م . ثم

اضيف 0.2 مل من محلول الانزيم المنقى الى الانابيب وحضنت لمدة 30 دقيقة ،ثم اوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية

2-11: تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم

اضيف 0.2 مل من محلول الانزيم المنقى الى انابيب حاوية على 0.2 مل من المحاليل الدارئة المحضرة بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 4-9 وحضنت لمدة 30 دقيقة ، ثم وضعت في حمام ثلجي وسحب 0.2 مل من محلول الانزيم واضيف الى 1.8 مل من محلول 1% كازائين برقم هيدروجيني 7.5 بوصفها مادة تفاعل، ثم حضن بدرجة حرارية 37°م لمدة30 دقيقة ثم اوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية % .

2-12: تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم

اضيف 0.2 مل من محلول الانزيم الى محلول 1.8 مل من 1% كازائين برقم هيدروجيني 7.5 كمادة للتفاعل ثم حضن بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25-60) °م لمدة30 دقيقة، ثم اوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية %.

2-13: تعيين الثبات الحراري للانزيم

حضن 0.4 مل من محلول الانزيم المنقى بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25-60) °م لمدة 30 دقيقة بعدها مباشرة وضعت الانابيب في حمام ثلجي وسحب 0.2 مللتر من محلول الانزيم واضيف الى محلول مادة التفاعل 1% كازائين برقم هيدروجيني 7.5 وحضنت بدرجة 37°م لمدة 30 دقيقة ، ثم اوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية % .

لأجل تعيين ثبات الانزيم لمدد زمنية مختلفة فقد حضن المحلول الانزيمي في حمام مائي بدرجة حرارة 35 م ولمدة تراوحت من 0-90 دقيقة، وسحبت كمية من الانزيم المعامل حراريا كل 10 دقائق ومباشرة نقلت الى حمام ثلجي للتبريد. ثم قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية على وفق الفقرة (2-5-2) ورسمت العلاقة بين المديات الزمنية المختلفة والفعالية المتبقية للانزيم%.

2-14: تاثير الايونات الفلزية والمواد المثبطة

2-14-1: المواد

حضرت محاليل كلوريدات الفلزات الاتية بتركيزين 5 و 10 ملي مولار بصورة منفصلة لكل ملح من الاملاح المستعملة KCl و $MgCl_2$ و $CaCl_2$ و NaCl حضرت المحاليل السابقة باذابتها بمحلول الترس Tris-HCl الدارئ بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.5 .

* حضرت محاليل كل من الستائين Cysteine بتركيزين (1 و 10) ملي مولار و EDTA بتركيزين (2 و 5) ملي مولار .

2-14-1: طريقة العمـــل

اضيف 0.2 مل من الانزيم مع 0.2 مللتر من محاليل كلوريدات الفلزات والمواد المثبطة كلا على حدة والمحضرة على وفق الفقرات السابقة وحضنت بدرجة 35 °م لمدة 30 دقيقة ثم سحب 0.2 مل من محلول الانزيم واضيف الى محلول مادة التفاعل 1% كازائين برقم هيدروجيني 7.5 وحضنت بدرجة 37 °م لمدة 30 دقيقة ، ثم اوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية % ، تم تحضير معاملة السيطرة باضافة المحلول الانزيمي غير المعامل الى محلول مادة التفاعل 1% كازائين مذابا في محلول الترس الدارئ بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.5.

2-15: تاثير مادة PMSF في فعالية الانزيم

2-15-1: المواد

حضرت مادة PMSF بتركيز نهائي (0.1 ، 1) ملي مولار باذابتها في الكحول المثيلي.

*حضن الانزيم مع محلول PMSF بنسبة 1:1 بدرجة حرارة 35 °م لمدة 30 دقيقة ثم اضيف 0.2 مل من المزيج السابق الى محلول التفاعل 1% كازائين وترك لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 °م ثم اوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية % بمقارنتها مع المحلول الانزيمي غير المعامل (معاملة السيطرة) .

2-16: تجفيد الانزيم

تم تجفيد الانزيم المنقى من ثمار الحنظل بإستعمال الجهاز الخاص بالتجفيد(المجفد) المصنع من قبل شركة Mini LyoTRAP لغرض اجراء التجارب اللاحقة.

2-17: استخدام العدة التشخيصية للانواع البكتيرية API

استخدمت اشرطة نظام جاهزة API-E20 ومصنعة من قبل شركة BioMerieux بالنسبة للبكتريا المعوية و API Staph بالنسبة لبكتريا *Staphylococcus aureas* و API Candida لغرض التاكد من التشخيص النهائي للاحياء المجهرية المستعملة في الدراسة و تم اتباع تعليمات الاستعمال على وفق الشركة المصنعة ، اذ حضن الشريط بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة بالنسبة للبكتريا و28 °م لمدة 72 ساعة بالنسبة للفطر والخميرة وتمت قراءة النتائج بعد اضافة الكواشف الخاصة به . اما بالنسبة لفطر *Aspergillus niger* فقد تم تشخيصه بإستعمال المفاتيح التصنيفية الواردة في المصادر التي تناولت تصنيف ودراسة الفطريات (Barrett and Hunter,1972; Domsch *et*

(*al*.,1980;Moustafa,1982;Moubasher and AL-Subai,1987. شخص الفطر المعزول الى مستوى النوع بمساعدة ا.م.د عبد الامير سمير سعدون .

جدول (2-2): العزلات البكتيرية ومصادر عزلها

اسم البكتريا	عدد العزلات	مصدر الاصابة	مصدر التجهيز
Staphylococcus aureus	1	اصابة الاذن	مختبرات مستشفى عفك العام
Escherichia coli	1	Urinary Tract Infection	مختبرات مستشفى عفك العام
Shigella.spp	1	قياسية	مختبرات مستشفى عفك العام
Streptococcus agalatciae	1	قياسية	مختبرات مستشفى عفك العام

جدول(2-3): العزلات الفطرية ومصادر عزلها

إسم الفطر	**عدد العزلات**	**مصدر ألاصابة**	**مصدر ألتجهيز**
Candida albicans	1	عينة ادرار	مختبرات مستشفى عفك العام
Aspergillus niger	1	ملوث للمختبرات	مختبرات كلية العلوم جامعة القادسية

2-18: إختبار الحساسية لمضادات الحياتية

نشطت الاحياء المجهرية المستعملة في الدراسة باخذ مستعمرات قليلة من الاطباق الحاوية عليها باستعمال حامل معقم وزرعت في انابيب حاوية على3 مل من وسط Brain heart – Infusion وحضنت بدرجة حرارة 37 ºم لمدة 24 ساعة بالنسبة للبكتريا و بدرجة حرارة 28 ºم و 72 ساعة للفطر والخميرة ثم حفظت بدرجة 4 ºم مئوية لحين الاستعمال والتي عدت العزلات الاصلية (Stock Culture) ثم زرعت على وسط غراء مولرهنتن بإستعمال ممسحة قطنية معقمة بغمر الممسحة في العالق الميكروبي و زرعت على الوسط باتجاهات عدة للحصول على نمو متجانس . يترك الطبق مدة 3-5 دقائق ليجف بدرجة حرارة الغرفة ، بعدها تم عمل حفر على الوسط بقطر 0.6 سم بمقدار اربعة حفر لكل طبق . اضيف الانزيم في كل حفره المخصصة لكل تركيز بالاضافه الى حفرة السيطرة ثم حضنت الاطباق الخاصة بالبكتريا بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة ، بينما الفطريات فقد تم حضن الاطباق بدرجة حرارة 28 ºم لمدة 72 ساعة وسجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط (بالملمتر) حول كل حفرة.

2-19-2: تهيئة محلول ثابت العكورة القياسي محلول مكفرلاند

(Standard Mcfarland)

تم تحضيره على وفق ما ورد في (Baron and Finegold , 1990) وكالاتي :

أ- اذيب (1.175) غم من كلوريد الباريوم (BaCl2) في (100) مل من الماء المقطر .

ب- مزج (9.5) مل من حامض الكبريتيك بتركيز1 (%) مع (0.5) مل من المحلول (أ) في انبوبة زجاجية ذات غطاء محكم لمنع التبخر ، وحفظ في مكان مظلم لحين الاستعمال في تقدير نسبة نمو السلالات البكتيرية الذي يعطي عدد تقريبي للخلايا 1.5×10^{8} (خلية / مل).

2-19 -3: تحضير التراكيز المختلفة للانزيم.

حضرت تراكيز مختلفة من الانزيم النقي المستخلص من ثمار نبات الحنظل حيث حضر محلول الخزين Stock solution بتركيز 128 (ملغم /مل) ، بالنسبة للمذيب الذي تم استعماله لإذابة الانزيم المجفد هومحلول فوسفات الصوديوم الدرائ بتركيز0.1 ورقم هيدروجيني 7.5 بعد ذلك حضرت منه باقي التراكيز المستعملة في الاختبار (0.1 ، 0.25 ، 1 ، 2 ، 4 ،8 ، 16 ، 32 ، 64 ، 128) (ملغم / مل).

2-19-4:اختبار التركيز المثبط الادنى MIC

1-اضيف 2 مل من المحلول الانزيمي النقي والمجفد بتركيز 128 (ملغم / مل) الى انبوبة اختبار حاوية على 2 مل من وسط Brain heart infusion ومنه حضرت باقي التخافيف بصورة متسلسلة

2- اضيف 0.1 مل من اللقاح الميكروبي بتركيز1.5×10^{8}(خلية / مل) الى انابيب الاختبار المعقمة والمحضرة بعدد التراكيز المطلوبة لغرض تحديد التركيز المثبط الادنى .

3- حضنت انابيب الاختباربدرجة حرارة 37 ^{o}م م لمدة 24 ساعة بالنسبة للبكتريا ، ودرجة حرارة 28 ^{o}م لمدة 72 ساعة بالنسبة للفطروالخميرة ، مزجت الانابيب بالرج ، ولوحظ النموا وذلك بمقارنة الانابيب مع انبوب السيطرة ماكفرلاند ، سجلت قيم MIC وهو التركيز المثبط الادنى الذي لم يظهر به النمو .

1-1 المراتب التصنيفية لنبات الحنظل

يصنف نبات الحنظل كالاتي :- (الموسوي ،1987 ; الكاتب 1988)

الشعبة	Phylum	Tracheophyta
الصنف	Class	Gymnospermae
الرتبة	Order	Cucurbitales
العائلة	Family	Cucurbitaceae
الجنس	Genus	*Citrullus*
النوع	Species	*Colocynthis*

2-1: الوصف العام

الحنظل نبات عشبي حولي زاحف ينتمي للعائلة القرعية cucurbitaceae يمتلك جذر وتدي ينمو عميقا في التربة وساقه رفيعة متسلقة طولها 180 سم يحمل اوراقا بيضوية قلبية متبادلة عديمة الاذينات خشنة الملمس ذات تفصص عميق يبلغ فروعه الخضرتفترش سطح الارض كنبات الرقي , واوراقه راحية الشكل عميقة التفصص , الازهار مفردة ابطية الموقع صفراء اللون الثمار . (Townsend and Guest,1980; Chakravarty, 1976;Charkravarty, 1968) طرية كروية ملساء ذات لونا اخضر يتحول الى الاصفر عند النضج يبلغ قطرها (7-10) سم عندما تنمو في التربة الخصبة (Yaniv *et al*.,1999) .

البذور صغيرة ذات شكل بيضوي وتاخذ لون اسود قاتما وتحاط بغلاف سميك وصلب (Havery and John,1998).يبدأ النبات بالتزهير خلال شهر اذار ونيسان وحتى تشرين الاول (AL-

Khalifa,1996). ويتميز الحنظل بطعم شديد المرارة في جميع اجزائه و يعود في ذلك الى احتوائه على نسبة عالية من مركبات الكيوكربتسين Cucurbitacin (Rizk,1986).

شكل (1-1): ثمرة نبات الحنظل *Citrullus colocynthis*

1-3: التسمية والانتشار.

الاسم العلمي لنبات الحنظل هو *Citrullus colocynthis* كلمة Citrullus مشتقة من اللاتينية بمعنى ثمرة تشبه البرتقالة (Claus *et al*.,1967) اما كلمة Colocynthis فهي كلمة اغريقية الاصل تعني يقطينة (Afifi *et al*.,1967).

اطلق عليه قدماء العرب عدة تسميات كالعلقم وحدج والتفاح المر وقثاء النعام ومرارة الصحراء والشري والخيار المر والقرع البري (حسين , 1979 ;الموسوي , 1987). اما في العراق ومصر والاردن فيعرف باسم الحنظل Handal (Daoud ,1984) ويدعى بالانكليزية Colocynth (Yaniv *et al* .,1999) وفي الايطالية يطلق علية Coloquntide كما يطلق علية في التركية حاجي قاووغ Haji QAWGH وايضا يسمى Kozalk (AL-Rawi and Chakravarty,1988) . ينمو نبات الحنظل بشكل طبيعي في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية

(Wasfi,1994)، اذ يتحمل الجفاف ، ينمو ويزدهر عندما تكون درجة الحرارة المئوية (23-37) ومعدل الامطارالسنوية (25-37) سم و الـ pH =5-8 (Duke,1978).الموطن الاصلي لهذا النوع من النبات حوض البحر المتوسط وينتشر في الهند كما ينمو بريا في اغلب مناطق افريقيا والصحراء الكبرى وشبه الجزيرة العربية والخليج العربي والسودان (دار الكتاب الحديث ، 1988; المنظمة العربية للتنمية الزراعية ،1988). اما في العراق فهو ينمو بغزارة في مناطق مختلفة في شماله ووسطه وجنوبه (الراوي ، 1988 ; Chakravarty,1976) .يزرع نبات الحنظل في بعض البلدان مثل اسبانيا وقبرص وايطاليا واليابان لغرض الحصول على ثماره التي يستفاد منها لاغراض طبية (حسين ، 1979)، فضلا عن استعمالها لاغراض تجارية بعد ازالة قشرتها اذ تجهز الولايات المتحدة الامريكية بثمار الحنظل من موانئ البحر المتوسط (Havery and John,1998) . يعد نبات الحنظل من محاصيل البذور الزيتية التي تستعمل للاغراض الصناعية والطبية ، اذ تحتوي بذوره على نسبة عالية من من الزيت (17-19%) واستعمل قديما للإضاءة (Palivitch and Yaniv, 1991) فضلا عن استعماله لاغراض الطبخ في بعض اجزاء افريقيا واقطار الشرق الاوسط (EL-Magoli *et al*.,1979)، وكذلك البذور بعد تحميصها (Havery and John ,1998)، كما اثبت ان ثماره لها فعالية مضادة للمايكروبات (Nmila *et al*.,2000) .

1-4: المكونات الكيميائية الموجودة في ثمار الحنظل

تتميز ثمار الحنظل بإحتوائها على عدد كبير من البذور بين اللب الاسفنجي ويحتوي هذا اللب على مواد راتنجية ومن اهم (Elatrein , Elatricin B and Dihydro-Elatericin B (الشماع،1989) كما تحتوي الثمرة على مكونات فعالة مثل القلويدات والصابونينات وبكتين ذات تاثير مسهل وكولين Choline ، كما تحتوي على مواد كلايكوسيدية مثل الكولوسنثيتين Colocynthitin التي تمتاز بطعمها المر (السعدي،2006; بابوجيان والقاضي،2010). وجد كل من (Power and Moore ,1910) ان الكلايكوسيدات عند تحللها تعطي جزءا سكريا glycone

وجزءا غير سكري aglycone اطلقا عليه اسم elaterin. ان التحليل الكيميائي لثمرة نبات الحنظل وباستعمال مزيج المذيب العضوي الايثر والكلوروفورم وجد Duke واخرون (1978) انها تحتوي على الراتنجيات Resins والقلويدات Alkaloids ومواد صمغية Gum وبكتين pectin وكلايكوسيد فايتوستيرول Aphytosterol Glycoside (Ctirullol) وكلايكوسيدات اخرى تشمل ومواد مرة قلويدية وكلايكوسيدية ومادة كحولية تسمى Ctirullol (حسين ، 1979) يمكن ان تتحولا بفعل الحوامض المخففة الى مادة Colocynthein و Aresinous body وSugar (Havery *et al*.,1998). تحتوي بذور الحنظل على زيوت ثابتة fixed oils واحماض دهنية Fatty acids وتانينات Tannins وهيدروكاربونات Hydrocarbonates وسكريات متعددة Polysaccharides وفايتوستيرول Phytosterol وقلويدات Alkaloids وصابونينات Saponins و ان هاتين المادتين لهما فعالية مسهلة قوية (ALRawi and Chakravarty,1988 Duke,1978) .

اشار Sawaya واخرون (1983) الى الزيوت غير مشبعة تشكل نسبة 75 % من زيت بذور الحنظل وخاصة الاحماض الامينية Linoleic and Oleic acids واستعملت بذور الحنظل لانتاج الزيت لاسيما في نيجيريا (Girgis and Said,1968) يحتوي الزيت المستخرج من بذور نبات الحنظل على Linoleic and Oleic acids بنسبة 83.2 % بينما يشكل كل من حامضي البالمتيك والستريك 16.8 % من المجموع الكلي للزيت (AL-khalifa,1996; ;Huang *et al*.,1994; Udayasekhara,1994;Akoh and Nwosus ,1992) . كما ان الزيت المستخرج من بذوره يفيد في علاج بعض الامراض الجلدية (لبنية ، 2002) واستعمل لاغراض الطبخ في بعض بلدان العالم (Bankole *et al*., 2005; Girgis and Said, 1968)

ذكر Sawaya وجماعته (1983) ان بذور نبات الحنظل تحتوي على زيت 13.5 %, بروتين 26.6, رماد 52.9, %الياف 4.9 % نايتروجين حر اضافة الى احتوائها على كميات من البوتاسيوم

والفسفور والحديد ويحتوي على الاحماض الامينية الاساسية المحتواة فهي اللايسين والمثيونين والسستين . كما يحتوي نبات الحنظل على مركبات كيميائية عديدة مثل Hydroxbenzyl و Cucurbitacin B,C,D,I التي تمتلك فعالية مضادة للفيروسات ومادة Colocynthin التي تمتلك فعالية مضادة للاورام antitumour (Chakaravarty,1968).كما تعطي الكلايكوسيدات عند تحللها مركب Elaterin A المعروف باسم Cucubitacin E ومركب Elatericin B الذي يطلق علية Cucurbitacin I ومركبB Dihydroelatericin المعروف باسم Cucurbitacin L (حسين ،1979).

اما دراسة Hatam وجماعته (1990) فقد عزل الدهون الموجودة في لب ثمرة الحنظل النامي في العراق والتعرف على مكوناتها الكيميائية التي هي Hexacosandiol –1,26 و Hentriacontan وN-Octacosanol اما بالنسبة الى اوراق نبات الحنظل وجذوره فانها تحتوي على الكلايكوسيدات والصابونينات (AL-Rawi and Chakravarty.1988). شخص Duke وجماعته (1978) a- Elaterinو hentriacontane و Saponins في الجذر .تعرف كل من Rehm and Wessels (1957) على انواع اخرى من Cucubitacin مثل E وB في اجزاء اخرى من النبات .

1-5: الاستعمالات الطبية لنبات الحنظل

الحنظل له اهمية طبية فهو مسهل قوي بسبب احتوائه على الكلايكوسيدات ذات مذاق مر مثل Colocynthin والذي يؤدي دورا مهما جدا بوصفه مضادا لنشاط الخلايا الخبيثة (Dafni *et al* .,1984; Burkill,1985) وهو مركب غير ذائب بالماء (Bankol and Jola,2004) كذلك يحتوي النبات على مواد راتنجية (Dafni *et al* .,1984;Burkill,1985) .

يستفاد من ثمار نبات الحنظل في معالجة داء السكر والام المعدة والصفراء والحمى والتوقف البولي Anuria (Diwan *et al* .,2003) وفي قتل الطفيليات المعوية وطردها (Hatam *et al*.,1990) Duke,1978 ; AL-Rawi and Chakravarty,1988 .

يدخل لب الثمار في تركيب معظم الادوية المستعملة في علاج الامراض البولية والروماتيزم والاستقاء وامراض العيون لقتل الفطريات والبكتريا المصابة بها و استعماله في حفظ الملابس الصوفية من العث (حسين , 1979 ; صفر ،1984) . تعد الثمار هي الجزء السام من النبات اذا ما اخذت بكميات كبيرة بسبب احتوائها على مادة سامة تعرف بـ Tetracyclic Triterpenes Cucurbitacines (James and Duke,1983).

يستعمل النقوع المائي للبذور للب الثمار مشروبا شعبيا لإزالة حالات الامساك المزمن وتنشيط حركة الامعاء والمعدة ممايساعد على سهولة الهضم وتقليل الغازات الناتجة ، ويستعمل الزيت المستخرج من البذور في معالجة بعض الامراض الجلدية ومنها مرض الجرب (لبنية ، 2002) ، كذلك يستعمل في طرد القراد العالق بجلد الحيوانات والمواشي الزراعية والطيور المنزلية فضلا عن استعماله في معالجة الام الكبد (حسين , 1979 ; دار الكتاب الحديث ،1988) . يفيد نبات الحنظل في معالجة امراض الجهاز البولي والتناسلي وخاصة مرض السيلان Gonorrhea كما يستعمل في علاج مسامير القدم Corns ويعمل على تقوية ألانسجة الليفية في الكبد (Duke, 1978) .يستخدم الزيت المستخرج من بذور الحنظل للتخفيف اللام العضلية ولاسيما الام الراس فضلا عن استعماله في معالجة انتفاخ البطن عندما توضع منه مسحة على موضع الالم (Havery and John, 1998).

يستعمل المنقوع المائي لاوراق نبات الحنظل وجذوره بعد مزجه مع نبات Ajowan في معالجة حالات الاصابة بالكوليرا ومع نبات الراوند Rhubarb في معالجة انقطاع البول وداء النقرس والام الراس والشلل وداء الفيل والمغص المعوي والتهاب الثدي ويستعمله الناس في معالجة لدغة الثعبان في بعض المناطق بعد ان يضاف الثوم الى مغلي الجذور بالاضافة استعمالة في علاج الجروح لاحتوائه على مواد مطهرة (المنظمة العربية للتنمية الزراعية Chakravarty,1976;1988) .

6-1 : تصنيف البروتييزات

تصنف البروتييزات إستنادا الى نظام الانزيمات ضمن المجموعة الثالثة لانزيمات التحلل المائي Hydrolases (E.C.3.4) وهي بدورها تقسم على قسمين اساسيين (Fan and Wu,2005;Rawlings *et al*.,2010) منها :

1-6-1: الببتيديزات الخارجية Exopeptidases :

البروتييزات تشطر الحوامض الامينية الموجودة في اطراف السلاسل الببتيدية اما من قرب النهايه الامينيه فتسمى Aminopeptidase او قرب النهايه الكاربوكسيليه فتسمى عندها Carboxyl peptidase اذ تقوم بتحليل الاواصر الببتيدية الطرفية لجزيئة البروتين محررة بالتعاقب الاحماض الامينية الحرة الى وسط التفاعل (Ryan and Walker,1981).

2-6-1 : الببتيديزات الداخلية Endopeptidases:

بروتييزات تعمل على شطر الاواصر الببتيدية الواقعة في داخل السلاسل الببتيدية وتسمى Proteinases (Smith and Berry, 1978) وهي بدورها تقسم على اربع مجاميع إعتماداً على نوع الاحماض الامينية الموجودة في الموقع الفعال (Site active) الذي يقوم البروتييز بتحليله (Rawlings *et al*.,2010; Fan and Wu,2005) كما موضح في جدول (**2-1**).

1-2-6-1: البروتييزات السيرينية Serine proteases

انزيمات الحاوية على الاحماض الامينية (السيرين والهستدين والاسبارتيك) في موقعها الفعال (Fan and Wu, 2005) تعمل معا لتحليل الاصره الببتيديه (Hedstrom, 2002) . فصل هذا النوع من البروتييزات من العديد من النباتات قبل 30 سنة (Antao and Malcata,2005) .

تثبط هذه المجموعة من الانزيمات ببعض المركبات مثل مركبين Diisopropyl Floro Phosphate (DFP) و Phenyl Methyl Sulfonyl Fluride (PMSF) و ويتراوح الرقم

الهيدروجيني الامثل لفعاليتها بين 7- 11 .اما الوزن الجزيئي لهذا النوع من البروتييزات فانه يتراوح بين 19-110 كيلودالتون (Fan and Wu,2005) .

يعد السيرين بروتييز واحدا من اهم البروتييزات واوسعها انتشاراذ تم فصله وتنقيتة من انواع واجزاء نباتية مختلفة ابتداء من البذور الى الثمار يتواجد هذا البروتييز في بذورنبات الشعير L *Hordeum vulgare* واللاتكس لنبات *Euphorbia supina* ومن ازهار وسيقان واوراق وجذور نباتات *Arabidopsis thaliana* ومن الجذور الخازنة لنبات البطاطا الحلوة *Ipomoea batatas* L واوراق نبات التبغ *Nicotiana tabacum* L و ثمار نبات البطيخ *Cucumis melo* L كذلك فصل من سبورات نبات الخيزران *Pleioblastus hindsii* (Arima *et al*.,2000) Nakai .

2-2-6-2: بروتييزات السيستين Cysteine Proteases

تسمى ايضا بالبروتيزات الثايول (Thiol Proteases) او بروتييزات السلفاهيدريل Sulfhydryl Proteases ، تحوي هذه المجموعة على الحامض الاميني السستين) (والهستدين في موقعها الفعال (Fan and Wu, 2005) وتكون حساسة لمركبات Sulfhydryl Reagents مثل Iodoacet Amide و Iodoacetic Acid والفلزات الثقيلة وتنشط بعوامل المختزلة كسيانيد البوتاسيوم والسستين والمواد الكلابية (Chelating agents) مثل Ethylene Diamino Tetra Acetic (Acid) EDTA، والرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية معظم انزيمات هذه المجموعة يتراوح بين 4- 6.5 (Fan and Wu, 2005) . الوزن الجزيئي لهذا النوع من البروتييزات فيتراوح من 30- 21 كيلودالتون (Turk *et al*., 2000; Rawling and Barret and Hunter ,1972) . بروتييزات السستين تشمل مجموعة من من البروتييزات النباتية من البابين Papin (النوع الاكثر دراسة)، البروملين bromelin و الفيسين ficin و caricain والكيموبابين Chymopapin فضلا عن انواع بروتييزات سيستينية اخرى مثل Calpain و Caspases الذي يؤدي دورا اساسياً

في عملية الموت المبرمج للخلية Apoptosis (Fan *et al* .,2005; Xu and Chye,1999) . بالاضافة الى النباتات وجدت البروتييزات السستينية في الفيروسات والطفيليات (Otto and Schirmeister,1997; Turk *et al*.,2000; Fan and Wu,2005;Rawling *et al* .,2010) كما يوجد هذا النوع من البروتييزات في الكثير من الحشرات مثل الحشرات نصفية الاجنحة hemipteran (Cristofoletti *et al*.,2005) .

1-6-2-3: البروتييزات الاسبارتية Aspartic Proteases

تسمى ايضا بالبروتييزات الكاربوكسيلية Carboxylic Proteases اوالبروتييزات الحامضية Acid Proteases هذا النوع من البروتييزات تعمل في وسط حامضي وتحتوي على الحامض الاسبارتيك والتايروسين في مواقعها الفعالة (Fan and Wu, 2005) وتعمل على تحليل الاصره الببتيديه التي تربط بين الحامضين الامينين Simoes and Faro,2004). يثبط هذا النوع من البروتييزات بمادة الببستاتين Pepstatein والرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليتها يكون واطئا اقل من5 (Fan and Wu, 2005) ويتواجد هذا النوع من البروتييزات في الحيوانات ،الخمائر ،النباتات والفايروسات وتودي مختلف الوضائف (Pearl, 1987 Fan and Wu, 2005) ، في الفقريات هذا النوع مهم في هضم البروتينات مثل الببسين والكيموتربسين .

1-6-2-4: البروتييزات المعدنية Metallo Proteases

تسمى بالبروتييزات الفلزيه حيث تحتوي على فلز في موقعها الفعال مثل الزنك او النحاس Fan and Wu,2005) لذلك تكون حساسة للمواد الكلابية EDTA ويقع الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليتها (7-9) ويوجد هذا النوع من البروتييزات في الانسان والحيوان والبكتريا والفطريات (Fan and Wu,2005) بسبب قدرة هذه البروتييزات على تحليل الغضروف لذلك يعد اهم مسبب لإلتهاب المفاصل والروماتيزم (Zhen *et al*,2008) . استخلص هذا البروتييز من نبات *Euphorbia cotinifolia* (Kumar *et al*.,2011) .

7-1: قســمت انزيمــات البروتييــز بحســب الــرقم الهيــدروجيني الامثــل لفعاليتــه : (Borriss,1987)

1-**البروتييـزات الحامضـية** Acid protease : يشـمل البروتييـات ذات الاصـل الحيـواني وهـي الببسين pepsin والرنين renein و الكيموتربسين chemotrypsin و التربسين Trypsin والبروتييزات ذات الاصل النباتي مثل البروملين bromelain والبابين papain والفسينficin

2-**البروتييـزات المتعادلـة** Neutral protease: تنـتج بصـورة واسـعة مـن البكتريـا والفطريـات الاسبارجيلوبيبســين Aspergillopepsin الســبتيلزين subtilisin والباســيلوبيبتيديز bacillopeptidases .

3- البروتييزات القاعدية Alkaline protease : تنـتج مـن الفطريـات والبكتيريـا والنباتـات ولبعضـها تشابه بالتربسين والكيموتربسين للمصادر الحيوانية وتنتج من بعض الفطريـات مثـل *Aspergillus oryzae* و *Streptomyces rimosus* .

جدول **(2-1)**: التقسيم العام لانزيمات البروتييز على وفق تصنيف (Fan and Wu,2005)

Class	Proteinases	Amino acid or metal in active site	Optimum pH
Serine proteinase (EC 3.4.21)	trypsin ,chemotrypsin ,elastate, thrompin	Ser,His,Asp	**7-9**
Cysteine proteinase (EC3.4.22)	Papin, bromelain, cathepsins	Cys	**4-7**
Aspartic proteinase (EC 3.4.23)	Pepsin rennin,cathepsins D&E	Asp,Try	**Below 5**
Metallo proteinase (EC 3.4.24)	Carboxipeptidases A &B, aminopeptidases, thermolysin	Metal ion (usually Zn)	**7-9**

1-8: الية عمل بروتييز السيرين

تتلخص الية عمل بروتييز السيرين في إنتزاع بروتون الهيدروجين من مجموعة الهيدروكسيل للسيرين وغالبا مايكون الحامض الاميني الهستدين في السلسلة الببتيدية الرئيسية الأنزيم هو المسؤول عن هذه العملية .الخطوة الثانية فتتضمن مهاجمة ذرة الاوكسجين سالبة الشحنة للسيرين ذرة الكاربون في مجموعة الكاربونيل للاصرة الببتيدية في جزيئة المادة الاساس هنا يأتي دور الماء الذي يقوم بمهاجمة اصرة الاستر المتكونه بين ذرة الاوكسجين سالبة الشحنة للسيرين بروتييز وبين الببتيد وفي النهاية يتحرر ببتيد مع طرف كاربوكسيلي طبيعي وتتخذ مجموعة الكاربوكسيل للسيرين بروتييز شكلها المستقر بعد نهاية التفاعل (Dunn,2001) .

تؤي البروتييزات دورا مهم جدا في تنظيم مستوى البروتين في الخلية فضلا عن ازالة كل الاضرار التي تحدث في الخلية اي انها تلعب دورمراقب البيت house keper حيث ان النبات يستطيع الدفاع عن نفسة ضد الاحياء المجهرية الممرضة من خلال مجموعة من البروتينات التي تستطيع التخلص من هذه الممرضات من دون ان تسبب اي اذى للخلايا (Hancock and Lehrer,1998;Levy,2004;Brogden,2005) .كما تكون مسؤوله عن تضاعف وانتشار العديد من العدوى والامراض مثل الالتهابات Inflamation والاصابات الطفيلية parasitic infection .

1-9-1: التكافل Symbosis

الدور الذي يؤديه البروتييز في عمليه التكافل تم دراسته من خلال عدد قليل من الباحثين من خلال نبات *Alnus glutinosa* وهي شجرة شائعة تسمى بـ European alder في العقد الجذرية لها حيث عزل البروتييز واستعمل لغرض التهجين Hyperdizaion ظهر انه اثنان من العقد الجذرية cDNA حيث اظهر تعبيرا عاليا في الخلايا المصابة احدهما ag12 الذي يشفر سيرين بروتييز والذي يعود لعائلة السبتليز (Ribeiro *et al*.,1995) هذا الجين العقدي اظهر تشابها كبيرا مع الجين المشفر للبروتييز المعزول والمشخص من شجرة الكازورينا *Casurarina glauca* لذلك ان هذه البروتييزات تشارك في عملية اصابة الخلية النباتية خلال التكافل (Laplaze *et al*.,2000).

2-9-1: التمايز Differentiation

يؤدي البروتييز دورا مهما في تمايز الاعضاء والانسجه النباتيه فالدور الذي يؤديه البروتييز في النسيج الوعائي vasecular tissue درس من خلال نباتين هما *Arabidopsis spp* و Zinnia وتحديدا من خلال نوع . *Zinnia elegans L* (Groover and *Jones*,1999) تمايز العناصر القصبية يحدث خلال انطلاق اشارة متعلقة بتكوين الجدار الثانوي . وان موت الخلايا مرتبط بإنتاج انزيم Serine protease ذو الوزن الجزيئي kDa40 والذي يحفز موت الخلية . ان موت الخلية

يتطلب تدفق ايونات Ca^{++} الذي يؤدي الى تحلل الفجوة مسببا اندماج محتوياتها مع محتويات السايتوبلازم ومن ثم موت الخليه لذلك هذا النموذج يشرح حدوث موت الخلية المرتبط مع موت الجدار الخلية الثانوي المصاحب لافراز السيرين بروتييز، حيث الفعالية الانزيمية سوف تزداد مع التكوين المبكر لجدار الخلية الثانوي الى ان يصل الى نقطة حرجة للمادة البينية للخلية والتي تكون اشارة اولى لموت الخلية ومنع تكوين الجدار الخلوي. السستين والسيرين بروتييز يشاركان في العملية النهائية للتحلل في نبات *Zinnia.elehans* (Ye and Varner,1996) . السيرين بروتييز ذو الوزن الجزيئي 60kDa يحفز داخل العناصر القصيبية، تمايز الجدار السميك للخلايا البرنكيمية في نبات فول الصويا ينظم بواسطة جين خاص موجود في غلاف البذرة يسمى (*scs1*) هذا الجين يعد من الجينات التي لها تشابة كبير مع جينات السبتيليزن من خلال تحليل لطخة northern (Batchelor *et al*.,2000) حيث ان هذا الجين scs1RNA يتجمع في غلاف البذرة تدريجيا الى ان يصل الى اقصى تركيز له قبل الخطوة النهائية لتمايز غلاف البذرة .

3-9-1: الشروع في حركة البروتين المخزن خلال المراحل الاولى للإنبات Protein degradation

بداية خزن البروتين يحدث خلال الانبات المبكر هذه العملية التي من خلالها البروتييزات تتضاعف اهميتها (Müntz,2001) .في بذور النباتات ذوات الفلقتين بروتينات الخزن هي الكلوبيولينات globulins مثل هذه البروتينات تتراكم خلال المراحل المتوسطة والمتأخرة من النضج في اجسام بروتينية والتي تتكون في معظم الانواع النباتية من البروتين المخزن في الفجوات . خلال فترة الانبات تهضم من خلال البروتييزات التي يتم تنشيطها من اسلافها التي تكون موجودة في النبات بصورتها الغير نشطة وهذه العملية تحدث في الشبكة البلازمية الخشنة والتي تنتقل من خلالها الى مواقع تصنيع البروتين هنا يبدأ نشاط الانزيمات وعملية هضم البروتين . خلال عملية الانبات تحدد كميات من البروتين المخزون وتهضم في مواقعها الخاصة وعملية الخزن هذه تنظم من خلال البروتييزات في

المحور الجنيني Embryonic axes والانسجة الخازنة حيث تقوم البروتييزات بهضم البروتينات وتحرر الاحماض الامينية التي بدورها تخزن في المواقع المخصصه لها.

1-9-4: الاستجابة المناعية المفرطة Hypersensitive Respond

البروتييز يحفز بعد مهاجمة الممرضات للخلايا النباتية حيث يقود الى (HR) عملية دفاعية مبكرة تسبب necrosis من الخلايا وموت يحدد من نمو الممرضات حيث يفرز البروتييز تحت تاثير الـ (HR) حيث يعطي اشارة الى البروتييز لتحفيز الاستجابة المناعية من خلال مايسمى Pathogensis related protein_ هذه الاليه درست (Torenero and Conejero.,1996) من خلال استجابة نبات الطماطة للاصابات الفايروسية اظهرت الدراسة ان احد هذا البروتييز له فعالية تحليلية ويمتلك وزن جزيئي 69 kDa سمي PR-P69 هذا الانزيم يشبه بروتييزات السبتيليزن الى حد كبير من حيث تتابع الاحماض الامينية . تزداد فعالية هذا الانزيم بوجود ايونات الكاليسيوم Ca^{+2} ،يتجمع هذا النوع من البروتييزات في المسافات البينية لأوراق النباتات المصابة بالفيروسات حيث يحفز النبات إتجاه الممرضات النباتية كالفطريات والديدان وغيرها.

1-10: تنقية الانزيم

يقصد بتنقية الانزيم هو الحصول على انزيم منفرد Individual من خليط معقد من البروتينات والتخلص من المكونات الخلوية الاخرى غيرالمرغوب بها والتي تتواجد مع الانزيم في المستخلص الخام مع ضرورة مراعاة المحافظة على تركيبه و فعاليته الحيوية ؛ لان فقدان الانزيم لفعاليته الحيوية يسبب عمليه مسخ Denaturation للانزيم و التي تعد بانها احد مساوىء عملية التنقية التي تؤدي الى ضياع الجهود المبذولة من قبل الباحث في سبيل تنقيه الانزيم حيث انه من السهولة مراقبة الفعالية الانزيمية ولكن الصعوبة تكمن في كيفية المحافظة على تلك الفعالية ، اذ توجد علاقة بين فعالية الانزيم وعملية التنقية والقاعدة عامة يجب ان تزداد الفعالية النوعية للانزيم خلال عمليات تنقية

الانـزيم عن طريـق خطـوات متسلسلـة تـؤدي فـي النهايـه الـى تنقيـة الانـزيم الخـام وايصـاله الـى احـد مستويات التنقيـة المتقدمـة (Gupta, 1998;Kornberg,1990) . بوصـفه خطـوة اولـى مـن خطـوات تنقيـة الانـزيم هـي تقليص حجـم المسـتخلص الانزيمـي مـن خـلال تخليصـه مـن اكبـر كميـة مـن المـاء باسـتعمال وسـائل مختلفـة منهـا الترسـيب بـالاملاح اللاعضـوية مثـل: كبريتـات الامونيـوم المائيـة اللاعضوية والمذيبات العضوية مثل الكحـول الاثيلـي ايضـا الاسيتون والتجفيد والترشيح الفـائق ثـم تليها خطوات التنقية الاخرى باستعمال الطرائق الكروموتوغرافية (Volesky and Luong, 1985) .كما في دراسة اخرى (Devi and Hemalatha,2014) تمت تنقية البروتييز المستخلص من بـذور نبـات البطـيخ *Cucumis melo* Var agrestis باسـتعمال كبريتـات الامونيـوم بنسـبة اشـباع بلغـت 60% ثـم تلتهـا خطـوة التنقيـة بالمبـادل الايـوني DEAE-cellulose ثـم خطـوة الترشـيح الهلامـي بإستعمال عمـود Sephadex G-100، (Mufti *et al*.,2006) فقد قـام بتنقيـة الانـزيم المسـتخلص مـن ثمـار نبـات *Cucumis trigonus* Roxburghi بكبريتـات الامونيـوم بنسـبة اشـباع 60% تلتهـا خطـوة التنقيـة بالمبـادل الايـوني DEAE-Sepharose ثـم عمـود CM-Sepharose . وفـي دراسـة اخرى تناولت موضوع تنقية الانزيم رسب الانزيم المستخلص من ثمرة*Cucumis melo* Hiroshi *et al*.,1994)) باستعملت كبريتات الامونيوم بنسبة إشباع30-60% ثـم تلتهـا خطـوة التنقيـة بالمبـادل الايوني DEAE- Cellulose كمرحله اوليه من التنقيه ثم تلتها المرحلة الثانية مـن التنقيـة بإسـتعمال عمـود Sephadex G-100 كمرحلـة ثانيـة مـن التنقيـة تـم تنقيـة البروتييز مـن مصـادر نباتيـة اخـرى حيث نقي الانـزيم المسـتخلص مـن بـذور *Holarrhena antidysentrica* (Hidayatullah *et al*.,2008) حيـث رسـب بكبريتـات الامونيـوم بنسـبة اشـباع 70% ثـم التنقيـة بالمبـادل الايـوني DEAE- Sepharose- CI-6B ثم خطوة الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-75 . في دراسة اخـرى نقـي الانـزيم فيهـا مـن نبـات *Lantana camara* بترسـيب الانـزيم بنسـبة اشـباع 30% مـن كبريتات الامونيوم ثـم استخدام عمـود Sephadex G-250 (Tomar *et al*.,2008).امـا البروتييز المسـتخلص مـن ثمـار نبـات الطماطـة *Lycopersicon esculentum* Mill تـم ترسـيبه بكبريتـات

الامونيــوم بنســبة اشــباع 75 % ثــم تلتــه عمليــات تنقيــة بإســتعمال DEAE-Cellulose ثــم عمود Sephadex G-75 (Karim *et al* .,1999) . دراسة اخرى تمت من خلالها تنقية البروتييز المستخلص من اوراق نبات الخس الشوكي *Lactuca serriola L.* حيث تم ترسيب البروتييز بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 40-80 % ثم تلتها خطوة التنقية في الترشيح الهلامي بإستعمال عمود Sephacryl S-200 (الصوفي،2013) كذلك تمت تنقية البروتييز المستخلص من جذور نبات *Synadenium granti* Hook*i* بالترسيب بكبريتات الامونيوم تلها خطوة الترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephacryl S-200 (Menon *et al* .,2002) ، كذلك تمت تنقية البروتييز المستخلص من اوراق نبات الحنطة Wheat leaf بإستعمال كبريتات الامونيوم تلته التنقية بإستعمال المبادل الايوني DEAE-Cellulose تلاه استعمال عمود الهلام Sephadex G-25 في خطوة الترشيح الهلامي (Roberts *et al* .,2003) .

11-1 : توصيف الانزيم

1-11-1:الوزن الجزيئي

البروتييزات لها اوزان جزيئية مختلفه تبعا لإختلاف المصادر المستخلصة منها وتستعمل عادة تقنيات عدة لتعيين الاوزان الجزيئية وهي الترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة SDSوالترشيح الهلامي والنبذ الفائق السرعة . ان اكثر الطرائق استعمالا" هي الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي بوجــود مــادة مــاسخة SDS فقــد وجد ان الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* Var agrestis هو 54 KDa باستعمال الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-200 (Devi and Hemalatha ,2014) . اما بالنسبة للانزيم المستخلص من ثمره *Cucumis trigonus* Roxburghi يبلغ 67KDa باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي SDS-PAGE بوجود ماده ماسخه للبروتين (Mufti *et al* .,2006). والوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من القشرة الخارجية لثمارنبات *Cucumis melo*. Var Reticulatus بلغ

الوزن الجزيئي 62 kDa (Kaneda *al*.,1997). بينما البروتييز المستخلص من ثمار نبات البطيخ *Cucumis melo* هو 67 KDa باستعمال عمود الترشيح الهلامي Sepharose 4B (Hiroshi *et al*.,1994). كذلك البروتييزالمستخلص من نبات *Cucumisn melo* بلغ الوزن الجزيئي 54 KDa بإستعمال الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-75 (Kaneda *et al*.,1975) . في دراسة اخرى بينت ان البروتييزالمنقى جزئيا والمستخلص من نبات *Cucurbita ficifolia* الوزن الجزيئي له 60kDa باستعمال تقنيه الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl S-300 (Curotto *et al*.,1989) ، البروتييز المستخلص من نبات *Cucumis metuliferus* الجزيئي له 78KDa بإستعمال الترحيل الكهربائي بوجود الماده الماسخه للبروتين SDS-PAGE (Uchikoba *et al*.,2001) .

اما البروتييزات المستخلصة من مصادر نباتية اخرى مثل البروتيز االمنقى من بذور نبات *Solanum dubium* الوزن الجزيئي له بلغ 66 *kDa* (Ahmed *et al* .,2009) . بينما البروتييز المنقى من بذور *Holarrhena antidysenterica* فقد وجد انه يساوي 25kDa Hidayatullah *et al*.,2008) ،كما وجد ان الوزن الجزيئي للبروتييزالمستخلص من نبات *Synadenium grantii* Hook 54kDa باستعمال تقنية الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl S-200 (Menon *et al*.,2002) .

2-11-1: الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم وثباته

الرقم الهيدروجيني له تاثير مهم في طبيعة بروتين الانزيم ، حيث يؤثر في ثباته بسبب حدوث مسخ Denaturation لتركيب البروتين protein structure وقد يكون تاثيره غير عكسي irreversibleمما يسبب فقدانا في النشاط الانزيمي ، اذ يؤثر الرقم الهيدروجيني في الحالة الايونية للاحماض الامينية الموجودة ضمن تركيب الانزيم ومن ثم تتاثر الفعالية الانزيمية الكلية نتيجة التاثير على الفة المادة الاساس والعامل المتمم لأرتباط الانزيم بالموقع الفعال (Fullbrook , 1983)

وتعرف القيمة المثلى للرقم الهيدروجيني لفعالية الانزيم Optimum pH بانها الرقم الذي يعمل فيه الانزيم على تحلل مادة التفاعل (substrate) بالسرعه القصوى لذلك يتضح ان لكل انزيم رقما هيدروجينيا امثل يكون فيه باعلى نشاط له ويعتمد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم على مصدر الانزيم وعلى تخصصه تجاه مواد التفاعل المختلفة ويعتمد على نوع الانزيم (فودة وجماعته، 1998) فالرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البروتييزات الحامضية بين(2-5) في حين ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثباتها يتراوح بين (5-6) وهذا ينتشر بصورة واسعة بين الفطريات . بينما يتراوح الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البروتييزات المتعادلة بين و(7-9) اما ثباتها فهو (6-7). بينما البروتييزات القاعدية يتراوح الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالياتها بين (8-12) وان الرقم الامثل لثبات فعاليتها يكون بين (5 -10) (Borris, 1987) .

في دراسة بينت ان البروتييز المستخلص من بذور نبات *Cucumis melo* var agrestis ان فعاليته المثلى تكون عند الرقم الهيدروجيني 9 اما الرقم الهيدروجيني الامثل لثباتيته فبينت الدراسة انه يتراوح 7-11 (Devi and Hemalatha,2014) ، وفي دراسة اخرى بينت ان البروتييز المستخلص من نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi هو11 و يكون فعالا في الارقام الهيدروجينية 4- 11.5 (Mufti *et al* .,2006). كما وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييزات المستخلصة من مصادر نباتية اخرى مثل المستخلص من نبات *Euphorbia hirta* فقد كان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليته 7.2 (Patel *et al*.,2012) . دراسة اخرى بينت ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البروتييز المستخلص من نبات *Ficus religiosa* هو 8 والثباتية تراوحت 8- 8.5 (Kumari *et al*.,2010) .بينما البروتييز المستخلص من نبات *Euphorbia cotinifolia* فان الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية كان 7وثباته عند 7- 8 (Kumar *et al*.,2011) . البروتييز المستخلص من بذور نبات *Solanu dubium* فان 11 هو الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية اما الرقم الهيدروجيني الامثل لثباتيته فقد كانت 3-12 (Ahmed *et al*., 2009).

دراسة اخرى بينت ان الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المستخلص من اوراق نبات *Cryptolepis buchanan* و سويداء نبات جوز الهند واللاتكس *Euphorbia neriifolia* 9 الرقم الهيدروجيني الامثل لثباته تراوح بين 7-11 (Pandy *et al*., 2006 Usha *et al*.,2009;Ravi *et al*.,2011) . بينما اظهرت دراسة اخرى ان البروتييز المنقى من بذورنبات *Holarrhena antidysenterica* ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليته هو 7.5 اما ثباته فكان 11-7 (Hidayatullah *et al*.,2008) . البروتييز المستخلص من اللاتكس لنبات *Wrightia tinctoria* بلغ اعلى فعالية له عند الرقم الهيدروجيني 7.5-11 اما ثبات تلك الفعالية فقد كان عند الرقم الهيدروجيني 5-11.5 (Tomar *et al*.,2008) .

1-11-3: درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم وثباته

يتاثرعمل الانزيمات عند ارتفاع درجة الحرارة عن الدرجة الحرارية المثلى وتتغير بنية الانزيم مما يؤدي الى فقدان فعاليته (Segal , 1976) حيث تؤثر درجة الحرارة في تاين المجاميع الفعالة لكل من الانزيم والمادة الاساس ومن ثم ينعكس هذا على سرعة التفاعل الانزيمي . ولايوجد هناك مايسمى درجة حرارة مثلى للانزيمات جميعها بل ان لكل انزيم درجة حرارة يصل فيها نشاطه الى اقصاه (فودة وجماعته ، 1998) . يعتمد تاثير درجة الحرارة في فعالية الانزيمات على طبيعة بروتين الانزيم وثباته وتركيز المادة الاساس وثباتها والفة الانزيم للاقتران مع المادة الاساس والرقم الهيدروجيني للمحلول ووجود المنشطات والمثبطات والقوة الايونية وتركيز البروتينات في مستخلص الانزيم (Fullbrook , 1983) .ان وجود مواد اخرى مع الانزيم كالبروتينات والكاربوهيدرات يعطي حماية للانزيم ، فالانزيمات غير النقية تستطيع المقاومة عند ارتفاع درجة الحرارة . بينما الانزيمات النقية غير قادرة على ذلك (Whitaker and Bernhard , 1972; Segal , 1976) . بينت دراسة ان الحرارة المثلى للبروتييز المستخلص من بذور *Cucumis melo* Var agrestis كانت عند 40 م اما ثباته فكان عند 40-60 م (Devi and Hemalatha.,2014). بينت دراسة

اخرى اجريت من قبل Mufti وجماعته (2006) ان افضل فعالية للبروتييز المستخلص من ثمارنبات Roxburrgi *Cucumis trigonus* كانت عند درجة حرارة 70م بينما ثباته كان عند 20-70م. كذلك الحال بالنسبة للبروتييز المستخلص من نبات *Euphorbia hirta* فقد كانت 50 م هي الدرجة الحرارية المثلى لفعاليته (Patel *et al.*,2012). اما البروتييز المستخلص من نبات من سويداء نبات جوز الهند فبلغ الانزيم اعلى فعالية له عند درجة حرارة 40 م بينما كان ثباته عند الدرجات الحرارية 40-60 (Usha *et al.*,2009) بينما البروتييز المستخلص من اللاتكس لنبات *Wrighte tinctoria* درجة الحرارة المثلى للفعالية كانت 70 م اما الثباتية فقد كانت 80 م (Tomar *et al.*,2008) .دراسة اخرى من بذور *Solanum dubium* قد سجل البروتييز فيها اعلى فعالية له عند درجة حرارة 60 م وثباته كان عند درجة حرارة 70 م (Ahmed *et al.*,2009) .بينما (Devaraj *et al.*,2007) بينت دراستهم ان البروتييزالمستخلص من اللاتكس لنبات التين *Ficus racemosa L.* ان درجة الحرارة المثلى لفعاليته 60 م اما درجة الحرارة المثلى لثبات الفعالية فقد كانت 70 م.

1-11-4: المواد المؤثرة في فعالية الانزيم

العديد من المركبات والمواد الكيمياوية تؤثر في فعالية الانزيمات ، فبعض المركبات قد ترتبط بالانزيم وتثبط فعاليته وتسمى بالمثبطات Inhibitor واخرى ترتبط بالانزيم ويزيد فعاليته وتسمى بالمنشطات Activators وهناك العديد من المركبات العضوية واللاعضوية التي تعمل مثبطات عكسية او غير عكسية للبروتييز ويستفاد من هذه المركبات في التعرف على الاحماض الامينية الموجودة في المراكز الفعالة لهذا فالهدف من دراسة تاثير المركبات والمواد الكيمياوية في الانزيمات هو تحديد المواد المنشطة والمثبطة للانزيم ومعرفة المجاميع الخاصة التي تشارك في الفعالية التحفيزية وتحديد المراكز الفعالة للانزيم ومعرفة المجموعة التي تنتمي لها الانزيمات Brummer (and Gunzer, 1987 ; North, 1982) . بينت دراسات عدة تاثير مركبات كيمياوية مختلفة في

فعالية البروتييز اولها المواد المثبطة للفعالية . ففي دراسة Devi andHemalatha (2014) ان البروتييز المنقى من بذور *Cucumis melo* Var agrestis قد ثبطت فعاليته بشكل كامل عند حضنه مع 5 ملي مولارمن مادة PMSF حيث فقد 95 % من فعاليته اتجاه هذه المادة لكنه تتاثر قليلا عند حضنه مع EDTA مما يعني ان هذا البروتييز ينتمي لمجموعة البروتييزات السيرينية (Drapeau *et al.*, 1972) . وفي دراسة اخرى بينت البروتييز المنقى من ثمار *Cucumis trigonus* Roxburghi كان حساسا ايضا لمادة PMSF بتركيز 5ملي مولار من هذه المادة بالوقت الذي لم يتاثر بمثبطات السستائينية والاسبارتية والمعدنية (Mufti *at al.*, 2006) . اما في مايخص الدراسات التي تخص مصادر نباتية اخرى وجد ان البروتييز المستخلص من بذور *Solanum dubiumm* ثبط عند حضنه مع مادة PMSF (Ahmed *et al.*,2007) . وفي دراسة اخرى بينت ان البروتييز المستخلص من بذور *Holarrhea antidysenterica* قد ثبط عند حضنه مع مادة PMSF بشكل كبير (Hidayatullah *et al.*,2008). بينما بينت دراسة (Ashok *et al.*,2007) ان البروتييز المستخلص من اللاتكس لـ *Ipomea carnea* ثبط هو الاخر وبشكل كبير بمادة PMSF .كما وجد Baeyens واخرون (2015) البروتييز المستخلص من لاتكس نبات التين *Ficus carica* هو من البروتييزات المعدنية Metall proteases اذ كان حساسا تجاه مادة Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) او O- phenanthroline (Drapeau *et al.* , 1972). بالنسبة لتاثير بعض العناصر المعدنية بينت الدراسة التي اجريت من قبل (Devi and Hemalatha,2014) البروتييز المستخلص من بذورنبات *Cucumis melo* Var agrestis قد احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه مع كلوريد الخارصين بشكل اكثر مقارنة مع كلوريد الصوديوم والبوتاسيوم المغنيسيوم والكاليسيوم والليثيوم والكوبلت . بينما البروتييز المنقى من ثمار *Cucumis trigonus* Roxburghi لم تتاثر فعاليته عند حضنه مع كلوريد الكاليسيوم والمغنيسيوم (Mufti *et al.*,2006) . كذلك البروتييز المستخلص من بذورنبات *Holarrhena antidysenterica* قد ازدادت فعاليته قليلا مع كلوريد الصوديوم والكوبلت والبوتاسيوم والليثيوم وازدادت بشكل اكثر عند

حضنه مع كلوريد الكاليسيوم والمغنيسيوم حيث بلغت فعاليته 131 % و121 % على التوالي لكن هذه الفعالية انخفضت حتى وصلت الى 60% عند حضنه مع كلوريد الخارصين (Hidayatullah *et al*.,2008) .

12-1: الاحياء المجهريه

E.coli: وهي بكتريا سالبة لصبغة كرام ، عصوية الشكل صغيرة ، غير مكونة للابواغ و لاهوائية اختيارية ومتحركة و بعض سلالاتها لها القدرة على تكوين المحفظة كما انها سالبة لفحص اليوريز والاوكسيديز (Yah *et al*.,2006) . تستوطن الايشريشيا القولونية بشكل طبيعي في القناة المعوية للانسان و الحيوانات ذوات الدم الحار . وهي غير ممرضة ولكن بمقدورها احداث العديد من الاخماج الانتهازية (opportunistic infection) فهي بامكانها ان تصيب اي عضو من جسم الانسان عندما تكون دفاعات الجسم ضعيفة لذلك غالبا ما تصيب الاطفال حديثي الولادة والمتقدمين بالعمر (Jawetz *et al*., 2001) . هذه البكتريا تسبب اخماج المعدة والامعاء الحاد (acute gastroenteritis) في الاطفال الرضع وكبار السن والمرضى المثبطين مناعيا (الجبوري ، 1990) .وتعد احد المسببات الرئيسية لالتهاب المجاري البولية الذي يحدث في النساء اكثر من الرجال (Todar ,2007) .

Shigella spp. : بكتريا سالبة لصبغة غرام تنتمي للعائلة المعوية ،عصوية الشكل وقصيرة غير متحركة،غير مكبسلة ،لاهوائية اختيارية ،تنمو عادة في درجة حرارة 37 م في مدى PH يتراوح بين (6.4-4.8) وتقسم هذه البكتريا على اربعة انواع *Sh.dysenteriae, Sh.. Flexneri, Sh.boydii, Sh.sonnei* . توجد هذه البكتريا طبيعيا في الجسم لكن تسبب العدوى اعتمادا على عمر والضروف المحيطة للمضيف وان 100 خلية من هذه البكتريا تكون كافية لاحداث الاصابة (Levinson and Warren,2006) ،وبعض من انواع هذه البكتريا تفرز سموم معوية مثل Shiga toxin ، يسبب اعضاء هذا الجنس مرض الدزنتري الباسيلاري Shigellosis حيث يصيب الجهاز

الهضمي وعادة تتضاعف البكتريا داخل الامعاء وتؤدي الى تحطم الانسجة الطلائية للامعاء وتسبب القرحة في المعدة ونادرا ماتهاجم الدم وتكون سببا في تحلله (Krischner and Black,1998) .

Staphyloccocus aureus : تم وصف المكورات العنقودية لاول مرة من الكسندر اوغسطين Alexander Ogsten عام 1881 عندما وجدها في قيح بعض الاصابات الحادة والمزمنة للانسان (Lowy, 1998) .

ينتمي جنس المكورات العنقودية الى عائلة Micrococcaceae ويضم هذا الجنس انواعا مهمة *S. aureus* و *S. epidermidis* و *S. saprophyticus* النوع الرئيس المسبب للخمج هو *S. aureus* (Baron *et al*., 1994). تمتاز بكتريا *S. aureus* بكونها كروية الشكل يتراوح قطرها بين (0.8-1) مايكروميتر. موجبة لصبغة كرام ،وغير متحركة، وغيرمكونة للسبورات (Collee,1996) . مستعمراتها كبيرة صفراء حيث تظهر مستعمراتها دائرية رقيقة ذات سطوح لماعة يصل قطر المستعمرة الواحدة (2-3) مليمتر وتصطبغ بلون ذهبي مصفر تنمو بظروف هوائية ولاهوائية اختيارية او بواسطة التخمر منتجة حامض اللاكتيك لكنها تنمو افضل في الظروف الهوائية ، بعض سلالاتها تكوّن المحفظة Capsule عند العزل الاولي لها (Wilkinson , 1997) . تنقسم خلايا بكتريا *S. aureus* في اكثر من مستوى لتعطي تجمعات ثنائية ورباعية او قد تكون على هيئة تجمعات عنقودية غير منتظمة او على شكل سلاسل قصيرة في الاوساط الزرعية السائلة (Collee *et al*., 1996) .تخمر معظم سلالاتها السكريات واهمها المانيتول و الكلوكوز و المالتوز و الفركتوز و السكروز وغيرها ، وتنتج انزيم مخثر البلازما Coagulase والانزيم المحلل للحامض النووي الدنا DNase ، موجبة لفحص الكاتاليز Catalase وسالبة لفحص الاوكسيديز Oxidase (Macfaddin, 2000) .

Streptococcus agalactiae : تنتمي هذه البكتريا الى مجموعة Streptococcus -B مكورات موجبة لصبغة غرام، هوائية اختيارية ، تظهر بشكل سلسلة او ازواج ، توجد في القناة الهضمية والتناسلية وبنسبه 30% في الاصحاء البالغين ، سالبة لفحص الكاتليز سالبة لفحص الاوكسيديز مخمرة مكونه حامض اللاكتيك كناتجاً نهائياً (whiley and Hardie,2009) .

Candida albicanus **:** يعود جنس المبيضات *Candida* الى عائلة Cryptococcoceae المنتشرة بصورة واسعة في الطبيعة (Nolt, 1982) وقد عزل جنس المبيضات من مصادر حيوانية مختلفة فضلا عن عزله من مصادر بيئية كالتربة والخضروات، وكذلك بيئة المستشفيات (Fraser,*et al*., 1992) وتُعد المبيضات من الاحياء المجهرية الموجودة بصورة طبيعية في جسم الانسان Normal Human Flora ، إذ توجد بصورة تعايشية Commensal او رمية Saprophytic في جسم المضيف (Odds, 1988). جذبت الانواع العائدة لجنس المبيضات *Candida spp.* انتباه كثير من الباحثين بسبب وجودها باعداد كبيرة ولكونها من المسببات المرضية المنتهزة للفرص Opportunistic Pathogen (MacFarlane and Smaranayake, 1989) التي لها القدرة على احداث الاصابات السطحية Superficial Infection فضلا عن قدرتها على احداث اصابات عميقة وخطيرة كالاصابات الجهازية Systemic Infection (Nolt, 1982).كما بينت دراسة ان الاشخاص المصابين بامراض خبيثة ان هذا الفطر هو الاكثر انتشاراً حيث شخص 53% من الحالات (AL-Doorky,2005) .عُرف اكثر من 150 نوعا يعود لجنس المبيضات اكثرها انتشارا واخطرها في احداث المرض في الانسان هو ***Candida albicans*** (Dismukes, 1992) تليه انواع اخرى منها *C. tropicalis*

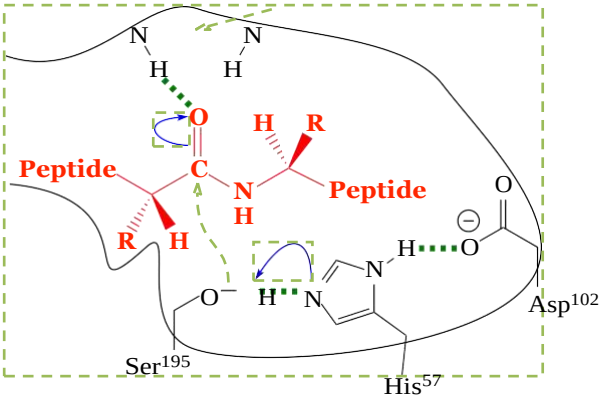
C.parapsilosis ، *C.kruzi* ، *C.pseudotropicalis* ، *C.guilliermondi* *et* (Wu *al*.,1999) .

:Aspergillus niger

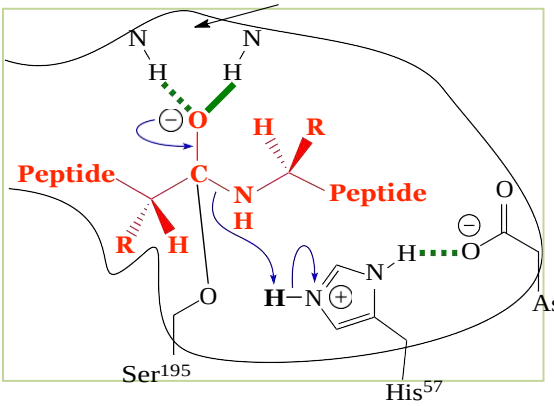
يعد هذا النوع من الفطريات الرمية ذات الانتشار الواسع في الترب المختلفة (Hillocks and Waller,1997). يعود الجنس الى فصيلة اليورويشية التابعة للفطريات الكيسية Ascomycota والتي تتميز بوجود الاكياس داخل اجسام ثمرية كروية الشكل حيث يوجد للثمرة الكيسية غلافان خارجي سميك يتكون من خيوط غير متماسكة وغلاف داخلي يتكون من خلايا ذات جدارين رقيقين حيث كثيرا مايذوب الجدار الداخلي للثمرة فتتبعثر الابواغ (الرحمة ،2005) . تتميز مستعمراته بانها تبدو ناعمة او صوفية قليلا ذات لون اسود بسبب الكميات الضخمة من الابواغ السود التي تنتجها والتي تكون على شكل سلاسل منفرجة عمودية على سطح الحوصلة ، وتكون الحوامل الكونيدية سميكة شفافة قد تتلون بلون بني وتكون ناعمة تنتهي بحوصلة ذات شكل كروي بابعاد (40-80) مايكروميتر محاطة بصف واحد من التراكيب القارورية وبتقدم العمر تحاط بصف ثاني من التراكيب القارورية وتتولد في قمتها كونيدات كروية ذات لون اسود يتراوح قطرها من (4-5) ماكروميتر (Zhao *et al* .,2009). يكون الراس الكونيدي بشكل كروي في المراحل الاولى من النمو مع قطر يتراوح بين (50-500) مايكروميتر ويتحول تدريجيا الى شكل اسطواني بقطر (800) مايكروميتر او اكبر في المراحل الاخيرة (Zhao *et al*.,2009). يصل قطر المستعمرة بين (5-6) سم بعد مرور اسبوعين من النمو (Pitt and Hocking,1997). وتكون بعض العزلات اجساماً حجرية كروية الشكل او شبه كروية يتراوح قطرها بين (0.8-1.2) ملم ذات لون كريمي في بداية تكوينها ثم تتلون بلون اصفر او برتقالي بعد مدة من الزمن (ابوهيلة ، 1987) . يعد هذا الفطر من اهم الاحياء المجهرية التي تحدث التلوث

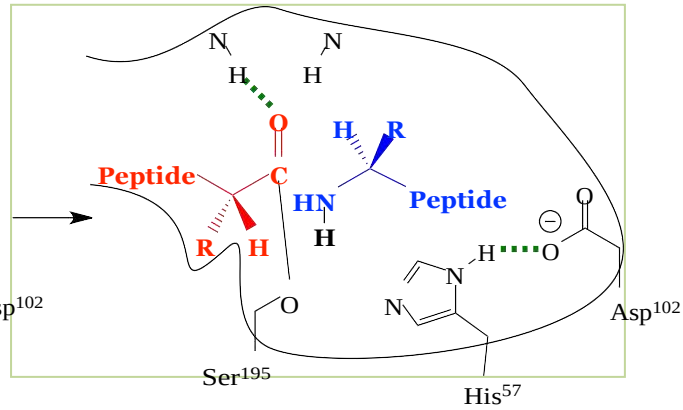
فـي المستشـفيات واغلـب الامـراض شـيوعا هـو التـي يسـببها هـذا النـوع مـن الفطريـات هـي امـراض الرئـة (Mellado *et al* ,2000) فـاول خطـوات الاصـابة تحـدث باستنشـاق سـبورات الفطـر التـي تـؤدي الـى حـدوث Systemic aspergillus ، بوجـود عوامـل تمهـد للعـدوى كالازمـات وانخفـاض الاسـتجابة المناعيـة والمرافقـة الامـراض الرئويـة المزمنـة مثـل السـل الرئوي وخراجات الرئة Lung abcesse وذات الرئة القصبي والربو Asthma .

وبـين الببتيـد وفـي النهايـة يتحـرر ببتيـد مـع طـرف كاربوكسـيلي طبيعـي وتتخـذ مجموعـة الهايدروكسـيل للسيرين بروتييز شكلها المستقر بعد نهاية التفاعل (Dunn,2001).

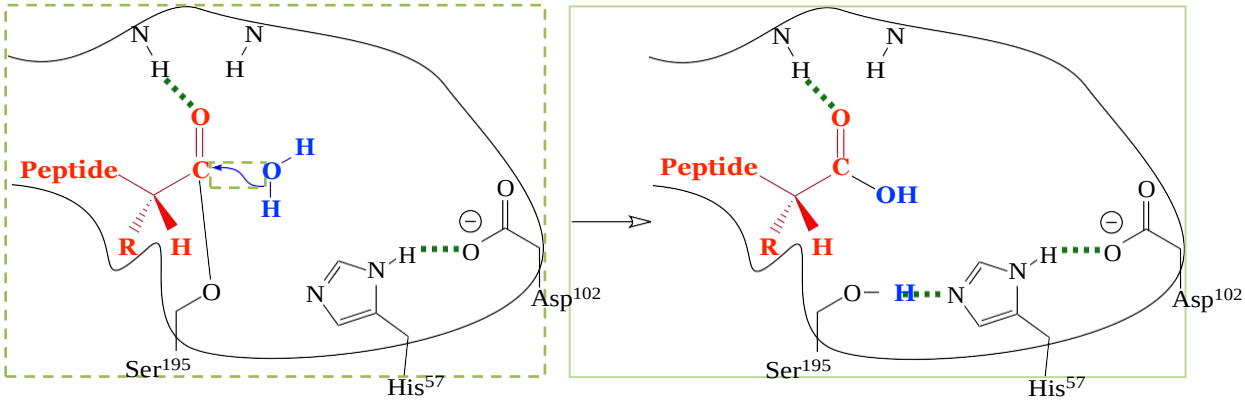


(1)





(2) (3)



(4) **(5)**

شكل **(1-2)**: الية عمل السيرين بروتييز(Dunn,2001)

1-8: وظائف الفسلجية للبروتييزات السيرينية في النباتات

تتواجد البروتييزات في جميع الكائنات الحية فهي موجودة في الحيوانات والنباتات والاحياء المجهريه (Neurath,1989; Ryan,1998; ;Lawrence and Koundal,2002; Valueva and Mosolove,2004;Christeller,2005; Mosolov and Valueva,2005) تلعب دورا رئيسيا في تحليل الاصرة الببتيدية (Barret,1997;Rawlings *et al*;2010) . في النبات تتواجد البروتييزات في معظم المجاميع التصنيفية ابتداءا من الاشجار والمحاصيل والنباتات العشبية كما انها توجد في كل اجزاء النبات لكنها تتواجد بصورة اكبر في الثمار حيث مكان حدوث كل العمليات الكيموحيوية.

الكثير من العمليات الفسيلوجيه في كل اشكال الحياة تعتمدعلى البروتييزات مثل هظم بروتينات الغذاء و تنشيط مسار إستماتة الخلايا (PCD) programmed cell death او مايسمى بـ Apoptosis فضلا إلى germination حيث تعمل البروتييزات على تجهيز جنين البذرة بالاحماض الامينية بعد تحليلها للبروتين المخزون بالبذرة فضلا عن تكوين الابواغ sporulation كذلك تلعب دورا في تحفيز الهرمونات Hormon activation ، الاخصاب Fertilization ، الاستجابه المناعيه Immuno respond ، تمايز الخلايا Diffrintiontion وايضا النمو Growth . (Bode and Huber,2000; Turk *et al*.,2000; Chou and Cai,2006)

3-النتائج والمناقشة Results and Discussion

3-1: التحري عن انزيم البروتييز في ثمار بعض نباتات العائلة القرعية

اختيرت مجموعة من الثمار العائده للعائلة القرعيه مثل : الحنظل ،الخيار ،البطيخ ،القرع العسلي والشجر ، للتحري عن فعاليه انزيم البروتيز في تلك المصادر لاختيار المصدر الانسب لانتاج الانزيم. وقد اظهرت النتائج المبينة في الجدول (3-1) الى وجود فعاليه للبروتييز في تلك المصادر وبنسب متفاوتة كما مبين في جدول (3-1) . اذ وجد ان مستخلص نبات الحنظل قد سجل نشاطا انزيميا عاليا اذ بلغت الفعاليه الانزيمية 13.56(وحدة/مليلتر) واعطى فعاليه نوعية مقدارها 75.33 (وحدة/ملغم) بروتين قياساً بمستخلصات الثمار الاخرى العائدة للعائلة القرعية حيث لم تتجاوز الفعاليه الانزيمية والنوعية لبقية المصادر عن 13.6(وحدة/مل) بروتين و52.71 (وحدة/ملغم) على التوالي؛ لذا عدّ الحنظل المصدر الانسب لانتاج الانزيم واستعمل في التجارب اللاحقة كما ان استعمال pvp مع دارئ الاستخلاص للحفاظ على ثبات الانزيم كونه عاملا مضادا للاكسدة يمنع تداخل الفينولات مع الانزيم في اثناء عمل الانزيم حيث يعد وجود الفينولات له تاثيرات ضارة في فعاليه الانزيم ، لذا تمت اضافة pvp في الدراسة الحالية للتخلص من الاثار الضارة للفينولات والمحافظة على ثبات الانزيم في هذه الدراسة . جائت هذه النتيجة مشابهه مع الدراسة التي اجريت لاستخلاص البروتييز من ثمار نبات الطماطة *Lycoperiscon esculentum* Mill فقد تمت اضافة 0.5 % من هذه المادة لمحلول الاستخلاص لمنع تثبيط الانزيم بواسطة المواد الفينولية (Karim *et al.*,1999) لم تشر الابحاث السابقة الى استعمال الحنظل مصدرا لانتاج البروتييز في حين هناك دراسات عديدة استخلصت الانزيم من بعض نباتات العائلة القرعية حيث استعملت بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* Var agrestis لانتاج الانزيم (Devi and Hemalatha,2014) . واستعملت ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi (Mufti *et al.*,2006)اما Kaneda واخرون (1997) فقد

استخلص الانزيم من نبات *Cucumis melo L.ssp.melo* var. Reticularus . وفي دراسة اخرى تناولت الانزيم المستخلص من ثمار نبات honeydew melon (Uchikoba *et al*.,1993) . بالإضافة الى دراسة تناولت الانزيم المستخلص من ثمار نبات *Cucumis melo L*.var.Prince (Kaneda and Tominaga,1975). مايخص استخلاص الانزيم من مصادر نباتية اخرى فقد استخلص الانزيم من نبات *Euphorbia hirta* (Patel *et al*.,2012) ، بلإضافة الى البروتييز المستخلص من نبات *Euphorbia cotinifolia* (Kumar *et al*.,2011) كذلك البروتييز المستخلص من نبات *Ficus reliiosa* (Kumar *et al*.,2010) ، بالإضافة الى البروتييز المستخلص من سويداء نبات جوز الهند coconut(Usha *et al*.,2009) .

دراسة اخرى تناولت الانزيم المستخلص من بذور نبات *Holarrhena antidysenterica* (Hidayatullah *et al*.,2008). بالإضافة الى الدراسة التي تناولت الانزيم المستخلص من لاتكس نبات الدفلة او مايسمى نبات البالا النيلي *Wrightia tinctoria* (Tomar *et al*.,2008) .اما دراسة (Ahmed *et al*.,2009) فقد تناولت الانزيم المستخلص من بذور نبات *Solanium dumbium* . دراسة Ashok وجماعته (2007) تناولت الانزيم المستخلص من اللاتكس لنبات *Ipomea carnea* .

جدول (3-1): الفعاليه الانزيمية (وحدة/مل) والفعاليه النوعية (وحدة /ملغم) للانزيم وتركيز البروتين

الثمار	الفعاليه الانزيمية (وحدة/مليلتر)	تركيز البروتين ملغم	الفعاليه النوعية (وحدة/ملغم)
الحنظل	13.56	0.180	75.33
الخيار	13.6	0.258	52.71
البطيخ	15.8	0.691	22.86
القرع	1.5	0.129	11.61
الشجر	0.35	0.504	0.69

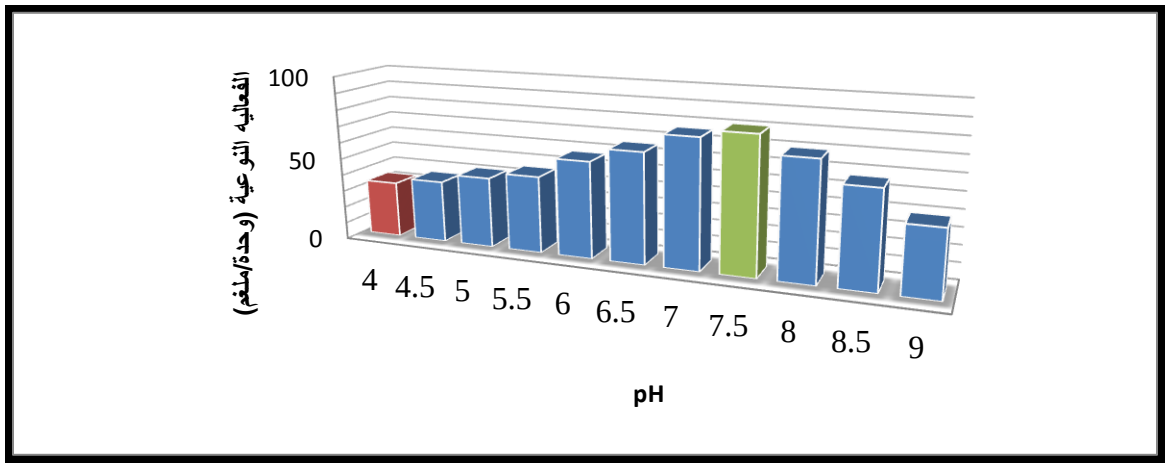
2-2: تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الانزيم من الحنظل

1-2-2: الرقم الهيدروجيني الامثل لمحلول الاستخلاص

درس تاثير ارقام هيدروجينية مختلفة لدارئ استخلاص انزيم البروتييز من الحنظل من خلال النتائج في الشكل (3-1) ان زيادة الاس الهيدروجيني قد اخذمنحنى النمو الطبيعي فقد ارتفعت فعالية الانزيم النوعية الى اعلى مايمكن عند 7.5 حيث بلغت 80.7 (وحدة/ملغم) ثم تبدأ بالانخفاض مع زيادة الاس الهايدروجيني عند الاس الهيدروجيني 9 حيث بلغت (وحدة/ملغم)

وهذه النتائج تتفق مع ماوجده Yamagata واخرون(1989) كان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البروتييز المنقى من ثمار البطيخ *Cucumis melo* 7.5، اما الرقم الهيدروجيني الامثل لمحلول استخلاص

البروتييز من ثمار نبات الطماطة *Lycoperiscon esculentum* Mill فقد كان الرقم الهيدروجيني الامثل 7.6 (Karim *et al.*,1999) . هذا وكان الرقم الهيدروجيني الامثل لمحلول استخلاص البروتييز من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis 7.2 (Devi and Hemathala,2014). اما الرقم الهيدروجيني الامثل لمحلول استخلاص البروتييز القاعدي من بذور نبات *Holarrhena antidysenterica* كان الهيدروجيني الامثل 8.5 (Hidayatullah *et al.*,2008) . من النتائج بان المحاليل الدارئة بالارقام الهيدروجينية الحامضية والقاعدية تؤثر على ثبات الانزيم وفعاليته وفك ارتباطه من الاجزاء النباتية (Chaplin and Chri, 2004) .

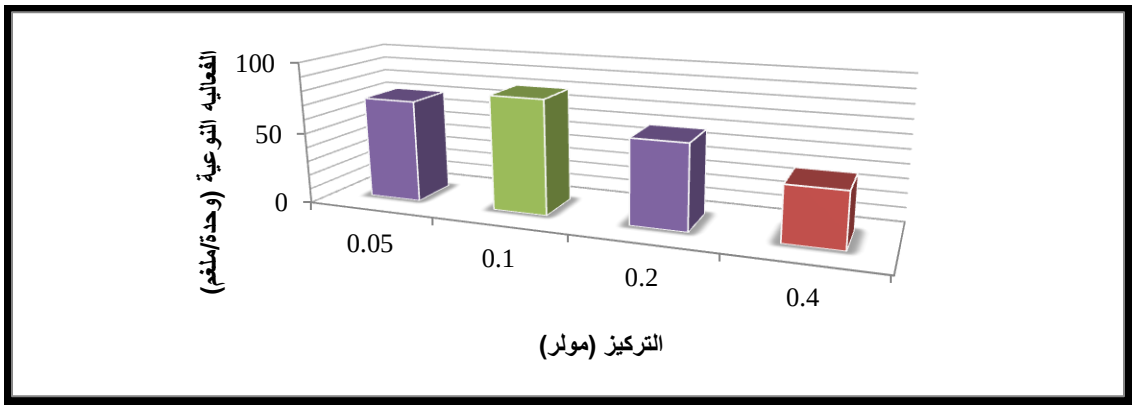


شكل (3-1): تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لمحلول استخلاص انزيم البروتييز من ثمارنبات الحنظل

3-2-2: تحديد التركيز المولاري الامثل لمحلول دارئ استخلاص انزيم البروتييز

لغرض تحديد التركيز المولاري الامثل لمحلول الاستخلاص الداريء فقد تم استخلاص الانزيم بتراكيز مولارية مختلفة من داري الاستخلاص تراوحت (0.4,0.2,0.1,0.05) حيث كان التركيز المولاري الامثل لداريء الاستخلاص هو0.1 مولار حيث بلغت الفعاليه النوعية للانزيم 80.2 وحدة / ملغم اما بقية التراكيز المولارية فانخفظت عندها الفعاليه النوعية وذلك يعود الى انه بزيادة التركيز المولاري لمحلول الاستخلاص

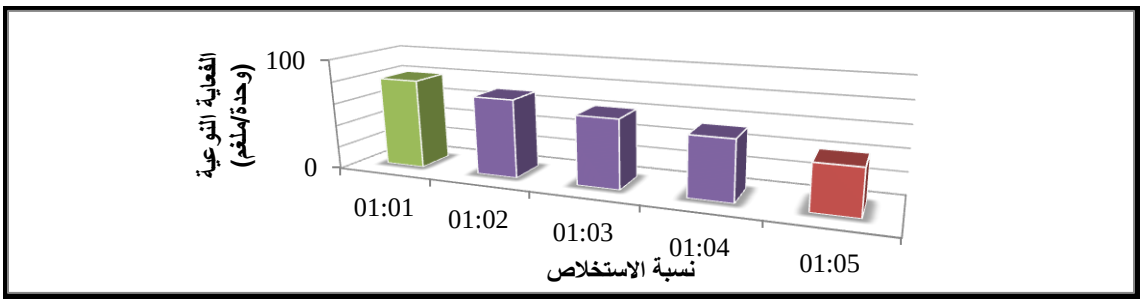
سوف يزداد تركيز الاملاح وزيادة تركيز الملح سوف يؤدي الى تكون المواد المرغوبة وغير المرغوبة نتيجة لزيادة الضغط التنافذي وبالتالي سوف تؤثر على نسبة الاستخلاص لانه بزيادة المواد المرغوبة وغير المرغوبة سوف يزداد تركيز البروتين ومن ثم سوف تقل الفعاليه النوعية باعتبار العلاقة بينهما علاقة عكسية جاءت نسبة الاستخلاص المثلى متفقة مع دراسة Devi and Hemaltha (2014) حيث كان التركيز المولاري الامثل لدارئ الاستخلاص هو 0.1 مولار في استخلاص البروتييز من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* Var agrestis ، وكانت متفقة ايضاً مع ماوجده Hidayatullah واخرون (2008) بان التركيز المولاري الامثل لمحلول استخلاص البروتييز من بذور نبات *Holarrhena antidysenteric* 0.1 مولار. اما البروتييز المستخلص من ثمار نبات *Cucumis melo* فقد استخلص بمحلول استخلاص ذي تركيزمولاري `0.1 (Yamagata *et al*.,1989) . بينما كان التركيز المولاري الامثل لمحلول استخلاص البروتييز من بذور نبات الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris L.* 0.2 مولار (المعموري ،2011)



شكل(3-2): يوضح العلاقة بين التركيز المولاري لدارئ الاستخلاص محلول فوسفات الصوديوم والفعاليه النوعية (وحدة /ملغم) .

3-2-3: تحديد نسبة الاستخلاص المثلى

بغية تحديد النسبة المثاليه لاستخلاص البروتييز من ثمار الحنظل باستعمال دارئ فوسفات الصوديوم برقم هيدروجيني 7.5 فقد استخلص الانزيم من الثمار بنسب مختلفة (5:1,4:1,3:1,2:1,1:1) (وزن:حجم). وقد اظهرت النتائج المبينة في الشكل (3-3) ان فعاليه البروتييز تكون اقصاها عند استخلاص الانزيم بنسبة (1:1)(وزن:حجم) اذ بلغت الفعاليه النوعية80.2 (وحدة/ملغم) قياسا بنسب الاستخلاص الاخرى، اذ انخفضت الفعالية النوعية الى 70.01 (وحدة/ملغم) عند استخلاص الانزيم بنسبة (2:1) ووصلت الى61.25(وحدة/ملغم) عند الاستخلاص بنسبة (3:1). اما باستعمال النسبة (4:1) و (5:1) كانت الفعاليه النوعيه 53.4 و40.6 (وحده /ملغم)على التوالي وعليه اختيرت النسبة (1:1) في التجارب اللاحقة لما اثبته المستخلص الخام من فعاليه انزيمية وفعاليه نوعية عاليه. ربما يعود السبب الى ان نسب الاستخلاص الاخرى كان فيها المزيج مخفف جداً لذلك كانت الفعالية النوعية منخفضة قياسا بنسبة الاستخلاص (1:1) (وزن :حجم هذه النتائج تتفق مع ماوجده Ahmed واخرون (2009) ان نسبة الاستخلاص المثلى لانزيم البروتييز من بذور نبات *Solanum dubium*. اما البروتييز المستخلص من بذور نبات الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris L.* فقد كانت النسبة الامثل للاستخلاص هي 3:1 (وزن : حجم) (المعموري ،2011) .

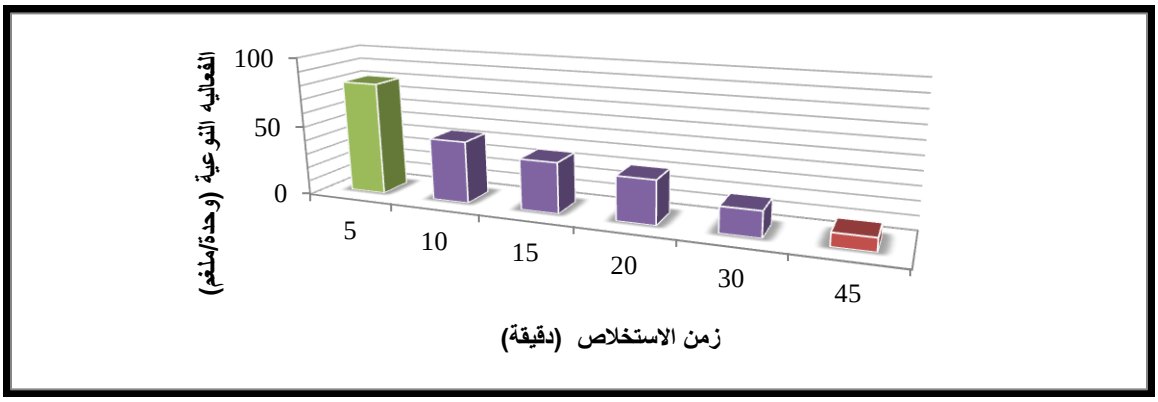


شكل (3-3): يوضح العلاقة بين نسب استخلاص البروتييز بمحلول دارئ الفوسفات (وزن/حجم) والفعالية النوعية (وحدة/ملغم)

4-2-3: تحديد المدة الزمنية لاستخلاص الانزيم

تشير النتائج المبينة في الشكل (3-4) الى العلاقة بين وقت الاستخلاص من (5-45) دقيقة والفعاليه النوعية للبروتييز ، ووجد ان افضل مدة زمنية لاستخلاص البروتييز من ثمار الحنظل هي 5 دقيقة اذ سجل المستخلص اعلى فعاليه نوعيه بلغ 80.06 وحدة/ملغم. في حين انخفضت الفعاليه النوعية الى 54.3 وحدة /ملغم عند استخلاص الانزيم لمدة 10 دقيقة قياسا بالفعاليه النوعية عند استخلاصه بـ 5 دقيقة كذلك الحال عند استخلاص الانزيم بـ 30 دقيقة فقد انخفضت الفعاليه النوعية الى 18.21وحدة /ملغم ؛بينما بلغت الفعاليه النوعية 9.36 وحدة /ملغم عن استخلاص الانزيم بـ 45 دقيقة ، لذا تم استخلاص الانزيم في التجارب اللاحقة بالمدة الزمنية التي امدها 5 دقيقة لما سجله الانزيم من فعالية نوعية عالية. وقد يعود السبب الى كون المحلول الدارئ بالمدة المذكورة قد فك ارتباط الانزيم عن مكونات الوسط بشكل كامل. اما عند استعمال مدة استخلاص اعلى من ذلك وبحدود 15 دقيقة و 30 دقيقة قد يحصل مسخ (دنترة) للانزيم او فقدان بعض المواد المرافقة للانزيم Co-factors والضرورية لفعاليه الانزيم بلاضافة الى تكون الرغوة Foam عند زيادة زمن الاستخلاص التي تؤدي الى دنترة الانزيم .تم التغلب على هذه المشاكل باستعمال مدة استخلاص قصيرة وبظروف مبردة بحسب الطريقة الموصوفة من (Karim *et al*., 1999) ، كما هو معروف ان الانزيمات جزيئات غير مستقرة تمتلك تنظيم فيزيو-كيميائي Physico-chemical محدد، وان اي تغير وان كان طفيفا في ذلك التنظيم يؤدي الى فقدان فعاليه الانزيم (Gupta, 1998) لذا تم استخلاص الانزيم قيد الدراسة في ضروف مسيطر عليها من قوى ايونية ورقم هيدروجيني ودرجة حرارة لتحقيق اعلى درجات الثبات كما ان انتقائية طريقة الاستخلاص تزيد من قدرة طريقة التنقية. ويختلف الزمن اللازم للاستخلاص حسب نوع النبات . فقد بينت دراسة (المعموري ، 2011) ان زمن استخلاص البروتييز المنقى من بذور نبات الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris L.* كان 15

دقيقة. بينما اظهرت دراسة اخرى ان افضل مدة زمنية لاستخلاص البروتييز من بذور نبات *antidysenterica Holarrhena* 24 ساعة بدرجة حرارة 4 م باستعمال التحريك المغناطيسي (Hidayatullah *et al*.,2008)a .



شكل (3-4): يوضح العلاقة بين وقت (دقيقة) استخلاص انزيم البروتييز من ثمارنبات الحنظل والفعاليه النوعية (وحدة/ملغم)

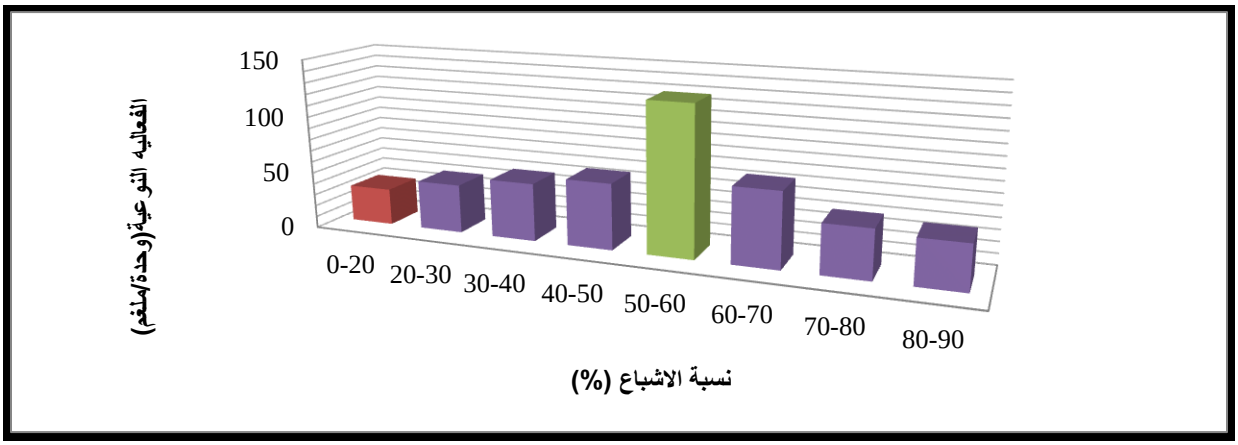
3-4: تنقية الانزيم

3-4-1: تركيز الانزيم الخام:

تعد هذه الخطوة في تنقية الانزيم من الخطوات المهمة لاجل الحصول على انزيم مهيأ لإجراء عملية التنقية بواسطة الكروماتوغرافي . حيث تركز الانزيمات للتخلص من النسبة الكبيرة من الماء وللحصول على درجة من النقاوة. وعادة تستعمل لهذا الغرض اما الاملاح مثل : كبريتات او كلوريدات الامونيوم اوالصوديوم او المذيبات العضوية مثل الكحول الاثيلي والاستون. كما تستعمل البوليمرات العضوية Organic polymers بعملية التركيز مثل البولي اثيلين كلايكول (PEG) Polyethylene glycol

(Janson and Ryden, 1998) ، ولمعرفة الطريقة الافضل لتركيز البروتييز المستخلص من ثمار الحنظل استعملت كبريتات الامونيوم بنسب اشباع مختلفة 20- 90% وبينت النتائج ان الفعاليه النوعية للانزيم قد ازدادت عند استعمال كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 50-60% الى 129.6وحدة / ملغم قياسا بالمستخلص الخام 80.6 وحدة/ملغم وانخفضت الى 65.5 وحدة/ملغم عند نسبة اشباع 60-70% ، اما عند استعمال كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 70-80% و80-90% بلغت الفعاليه النوعيه فيهما 42.8 و 39.2 وحدة /ملغم على التوالي ويحدث الترسيب بالاملاح العضوية بسبب معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والاخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئة البروتين، ويؤدي ذلك الى انخفاض ذائبية البروتين وترسبه وتسمى هذه العملية بعملية التمليح الخارجي (Salting out) (Witte *et al*., 1973; Janson and Ryden, 1998) . بلغ عدد مرات التنقية للانزيم المرسب بكبريتات الامونيوم . 1.6 وبحصيلة انزيمية 55.6%عند نسبة اشباع 50-60% جدول (3-2) . تم استعمال الكبريتات في ترسيب انزيم البروتييز بوصفها خطوة اولى في عملية التنقية في العديد من الدراسات حيث استعملت في ترسيب البروتييز المستخلص من بذورنبات *Cucumis melo* var agrestis وبنسبة اشباع 60% وكانت الحصيلة الانزيمية 44.2% (Devi and Hemaltha,2014). استعمل كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 60% في ترسيب البروتييز المستخلص من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi وكانت الحصيله الانزيميه 35% (Mufti *at al*.,2006) كما تمت ترسيب الانزيم المستخلص من ثمارالبطيخ *Cucumis melo* بنسب اشباع تراوحت من 30 - 60 % (Hiroshi *et al*.,1994) . ايضا رسب الانزيم من مصادر نباتية اخرى باستعمال كبريتات الامونيوم مثل الانزيم المستخلص من بذور الفاصوليا المنبتة *Phaseola vulgaris L.* بنسبة اشباع بلغت (70-90)% وبحصيلة انزيمية 68.117% وعدد مرات تنقية 1.472 (المعموري،2011). بينما دراسة اخرى بينت البروتييز المستخلص من بذورنبات *Holarrehena antridysentrica* قد رسب الانزيم بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 60% وكانت

الحصيلة الانزيمية 44.2% (Hidayatullah *et al*.,2008) بوصفها خطوة اولى في خطوات تنقية الانزيم . بينما كانت نسبة الاشباع بكبريتات الامونيوم للبروتييز الممستخلص من بذور الكاكاو *Theobeoma cacao* هي 60% وبحصيلة انزيمية 12.2% (Guilloteau *et al*.,2005) . كما ان 90% هي نسبة الاشباع المثلى لترسيب البروتييز المستخلص من بذور الماش *Phaseolus aureas* (Alkhafaji *et al*.,2009) .



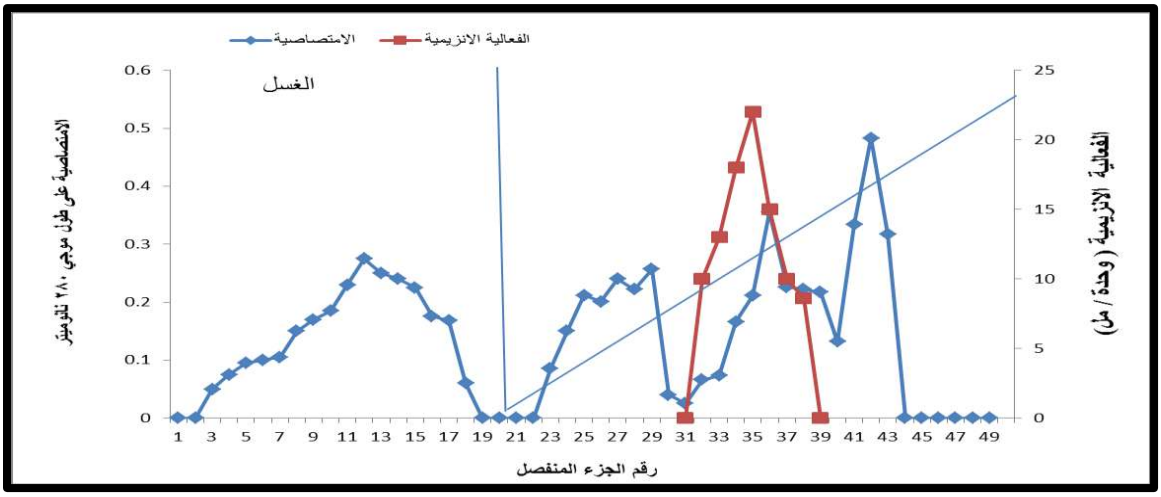
شكل (3-5):يوضح العلاقة بين نسبة الاشباع لترسيب الانزيم بكبريتات الامونيوم والفعالية النوعية للانزيم (وحدة/ملغم)

3-4-2:تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني Ion exchange chromatography

مرر المحلول الانزيمي بعد تركيزه بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 50-60% وديلزته خلال عمود المبادل الايوني DEAE-cellulose ، ولوحظ انفصال قمة واحدة للبروتين في مرحلة الغسل تعود للبروتينات غير المرتبطة التي تحمل شحنة مشابهة لشحنة المبادل الشكل (3-6)، وتمت استرداد البروتينات المرتبطة التي تحمل شحنة مخالفة لشحنة المبادل باستعمال تدرج ملحي خطي من كلوريد الصوديوم (0-1) مولر. لوحظ انفصال ثلاث قمم بروتينية مع قمة واحدة للفعاليه تركزت في الاجزاء المنفصلة 32-39 وكان

عدد مرات التنقية لهذه الخطوة 1.7 وبحصيلة انزيمية 36.5% وهذا يعني ان الانزيم يحمل شحنة سالبة تحت هذه الظروف وقد استعملت هذه الاجزاء الفعالة في استكمال التجارب اللاحقة لارتفاع فعاليتها قياسا مع الاجزاء المنفصلة في خطوة الغسل،ان استعمال المبادل الايوني DEAE-cellulose و طريقة التبادل الايوني من الطرائق التي تعتمد على مبدأ الشحنة التي يحملها البروتين وبالتالي فإن الفصل الذي يحدث في هذه الطريقة يكون معتمد على صافي الشحنة والقوة الايونية وتوزيع الشحنة على سطح البروتين وكذلك لما تمتلكه من قوة فصل عاليه وسعة عاليه لربط البروتينات فضلا عن تعدد استعمالاتها وسهولة انجازها. استعملت المبادلات الايونية الطبيعية التي هي عبارة عن مشتقات السليلوز بسبب ملائمتها لفصل البروتينات ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة فضلا عن الاحتمتالات القليلة لمسخ البروتين (Janson and Ryden, 1998). استعمل المبادل الايوني DEAE-cellulos في تنقية البروتييز المنقى من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis وبحصيلة انزيمية 31.38% وعدد مرات نقية 2.63 (Devi and Hemalatha,2014)، بينما دراسة اخرى اجريت من استعمل المبادل الايوني DEAE-sepharose والمبادل CM-Sepharose في تنقية انزيم البروتييز المستخلص من ثمار نبات Roxburghi *Cucumis trigonu* بحصيلة انزيمية بلغت 39% وعدد مرات نقية 0.6 (Mufti *et al*., 2006) بينما استعمل المبادل الايوني DEAE-cellulose في فصل البروتييز المستخلص من بذور نبات الفاصوليا المنبته *Phaseolus vulgaris* بحصيله انزيمية بلغت 8.352 % و كانت عدد مرات تنقية 4.09 (المعموري ، 2011) . من ثمار نبات *Cucumis melo L*.Var .Prince نقي باستعمال المبادل الايوني CM-Sepharose بعد خطوة الترسيب بالكبريتات الامونيوم (Yamagata *et al*.,1994). دراسة اخرى للبروتييز المستخلص من بذور نبات *Holarrhena antidysenterica* استعمل المبادل الايوني DEAE-Sepharose CL-6B (Hidayatulla *et al*.,2008) .

اما الدراسة التي تناولت البروتييز المستخلص من بذور نبات الكاكاو *Theoroma cacao* فقد استعمل المبادل الايوني Q Sepharose بعد خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم وبحصيلة انزيمية بلغت 0.76% (Guilloteau *et al*.,2005). بينما استعمل دراسة اخرى المبادل الايوني DEAE-cellulose في تنقية البروتييز المستخلص من ثمار نبات الطماطة *Lycoperiscon esculentum* Mill وبحصيلة انزيمية 34% وعدد مرات تنقية بلغت 88 (Karim *et al*.,1999) .



شكل (3-6) : كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم البروتييز المستخلص من ثمار الحنظل *Citrullus colocynthis* باستعمال عمود المبادل الايوني DEAE-Cellulose بابعاد (35×3.5) سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ (0.02 مولار ، pH= 7.5) تمت الاسترداد بمحلولكلوريد الصوديوم بتدرج ملحي خطي من (0-1) مولار وسرعة جريان 30 مللتر / ساعة وبواقع 5 (مللتر /جزء).

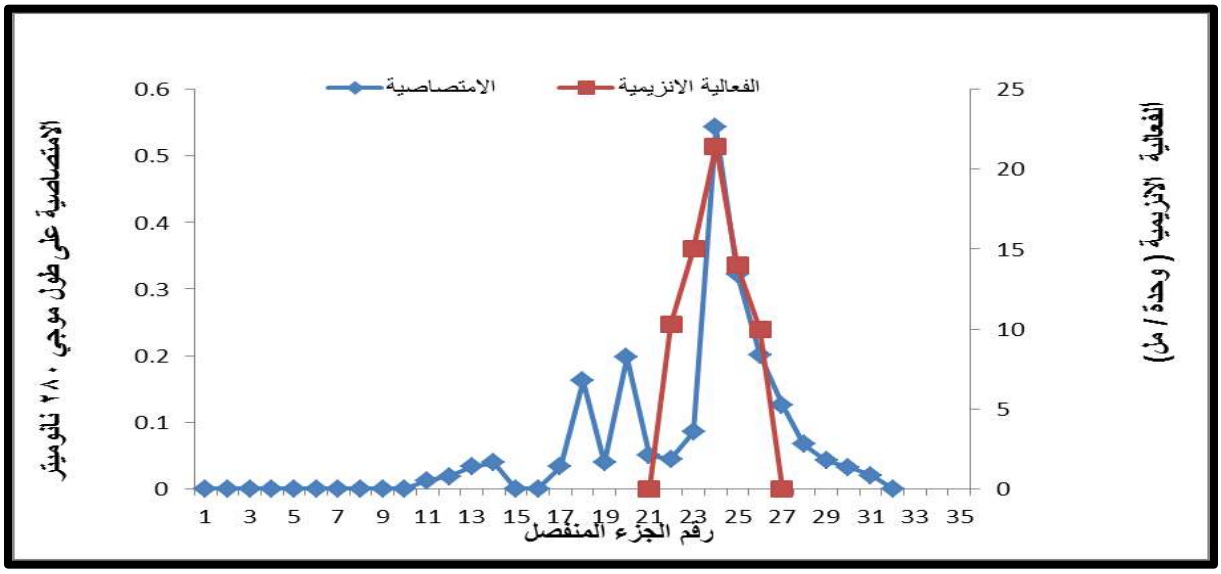
3-4-3: تقنية الترشيح الهلامي

اعقبت خطوة التبادل الايوني خطوة الترشيح الهلامي بمرحلتين باستعمال هلام Sephacryl S200 في المرحلتين كليهما ؛ لما يتمتع به من خصائص جيدة فهو يحتوي على الاكريل امايد فضلا عن الدكستران مما

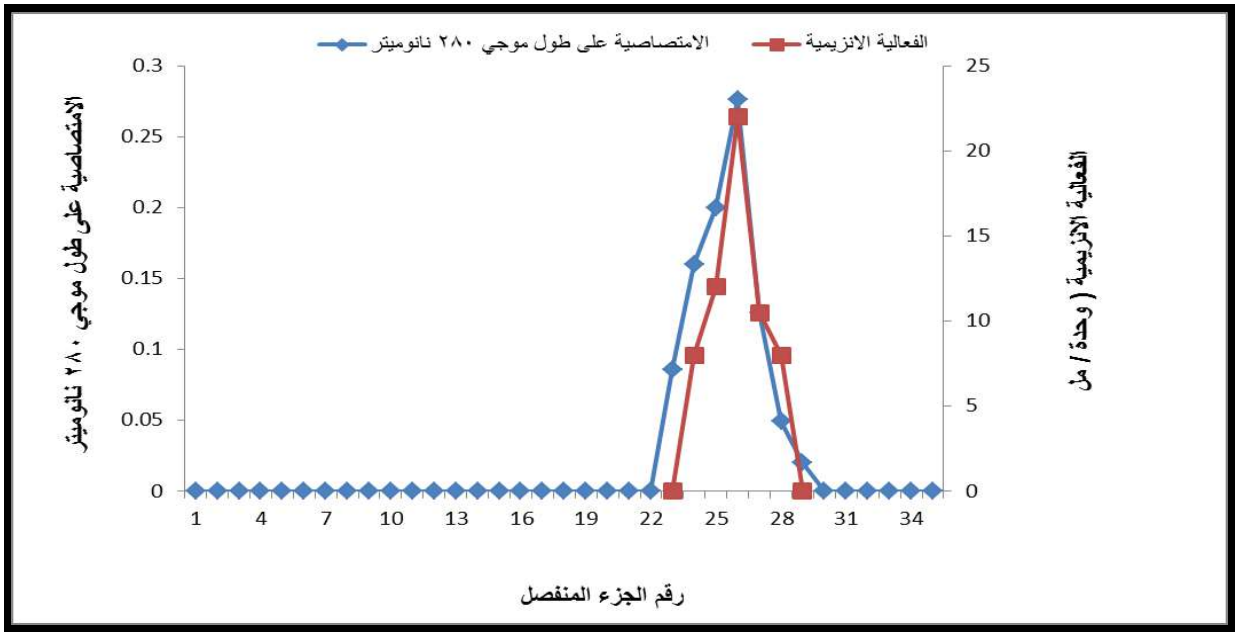
يعطيه صلابة ومقاومة للانضغاط. ويمتاز كذلك بالفصل الجيد والسريع فضلا عدم تلوثه بالبكتريا و سهولة الاستعمال والتحضير اذ يبقى ثابتا مدة طويلة كونه محضر سلفا من الشركة المنتجة Pharmacia fine chemical.

لوحظ انفصال ثلاث قمم بروتينية وتركزت الفعاليه الانزيمية في قمة واحدة عند الثالثه في الاجزاء (22_26) شكل (3-7) مع الحصول على عدد مرات تنقية 5.41 وحصيلة انزيمية مقدارها 24.8%. بعدها جمعت الاجزاء الفعالة وركزت مرة اخرى بعمود الترشيح الهلامي تحت الظروف ذاتها ، وتظهر النتائج في الشكل (3-8) انفصال قمة واحدة للبروتين مع ظهور قمة واحدة للفعاليه الانزيمية مطابقة تقريبا مع القمة البروتينية ، وتم الحصول على عدد مرات تنقية 15.01 وبحصيلة انزيمية 9.1%. ويعد تطابق قمتي البروتين والفعاليه احد ادلة النقاوة للانزيم (Whitaker, 1980). تشير الادبيات الى ان خطوة الترشيح الهلامي هي خطوة كاحدى خطوات التنقية لانزيم البروتييز بعد خطوة التبادل الايوني وذلك لغرض التاكد من زيادة نقاوة الانزيم جاءت هذه النتيجة مطابقة مع دراسة المعموري (2011) والذي قام بتنقيته للبروتييز من بذور الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris L.* باستعمال عمود Sephacryl S-200 ،تمت تنقية البروتيز من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis باستعمال عمود هلام Sephadex G-100 بحصيلة انزيمية 29.8% وعدد مرات تنقية 3.03 (Devi and Hemalatha.,2014) . كذلك اجريت دراسةاخرى لتنقية البروتييزالمستخلص من سويداء نبات جوز الهند حيث تم استعمال عمود Sephadex G-200 لغرض التنقية (Usha *et al*.,2009) نفسه عمود الترشيح الهلامي واستعمال Sephadex G-200 لغرض تنقية البروتييز المستخلص من نبات شوكة المسيح *Euphorbia milii* (Yadav *et al*.,2008) . اما البروتييز المستخلص من اللاتكس لنبات *Wrightia tinctoria* فقد استعمل عمود Sephadex G-200 في

مرحلة الترشيح الهلامي (Tomar *et al*.,2008) . بينما استعمل عمود Sephadex G-75 في خطوة بالترشيح الهلامي للبروتييز المستخلص من بذور نبات الكاكاو *Theoroma cacao* (Guilloteau *et al*.,2005) اما البروتييز المستخلص من جذور نبات البطاطا الحلوة *Ipomoea batatas* فقد استعمل عمود Superdex 75 وSuperdex HR(Chen *et al*.,2004) بعد خطوة التبادل الايوني . بينما استعمل عمود Sephadex G-75 في خطوة الترشيح الهلامي للبروتييز المستخلص من ثمار الطماطة *Lycoperiscon esculentum* Mill (Karim *et al*.,1999) . لذا يمكن عد ثمار الحنظل من المصادر الغنية جدا بانزيم البروتييز التي يمكن استغلاله على النطاق التجاري لما تتميز به من الصفات المذكورة سابقا فضلا عن رخص ثمنه لانه من النباتات التي تنمو بشكل طبيعي في بلدنا .



الشكل (3-7): كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي (الاول) للبروتييز المستخلص من ثمارالحنظل باستعمال عمود Sephacryl S-200 بابعاد (1.5×85) سم والذي تمت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 7.5وبسرعة جريان 60 مليلتر/ساعة وبواقع 5مليلتر/جزء.



الشكل (3-8): كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي (الثاني) للبروتييز المستخلص من ثمار الحنظل باستعمال عمود Sephacryl S-200 بابعاد (1.5×85) سم والذي تمت موازنته بمحلول دارئ الفوسفات 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 7.5وبسرعة جريان 60 مليلتر/ساعة وبواقع 2(مليلتر/جزء).

جدول (3- 2): خطوات تنقيه الانزيم المستخلص من ثمار الحنظل

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعاليه (وحدة/مل)	تركيز البروتين(ملغم)	الفعاليه النوعية (وحدة/ملغم)	الفعاليه الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة 100%
المستخلص الانزيمي الخام	100	13.2	0.176	80.6	1320	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم-60 %50	20	36.7	0.283	129.6	734	1.6	55.6
التبادل الايوني بعمود -DEAE Cellulose	35	13.8	0.13	138	483	1.7	36.59
الترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephacryl S-200 الخطوة الاولى	25	13.1	0.03	436.6	327.5	5.41	24.8
الترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephacryl S-200 الخطوة الثانية	10	12.1	0.01	1210	121	15.01	9.1

3-5: توصيف انزيم البروتييز

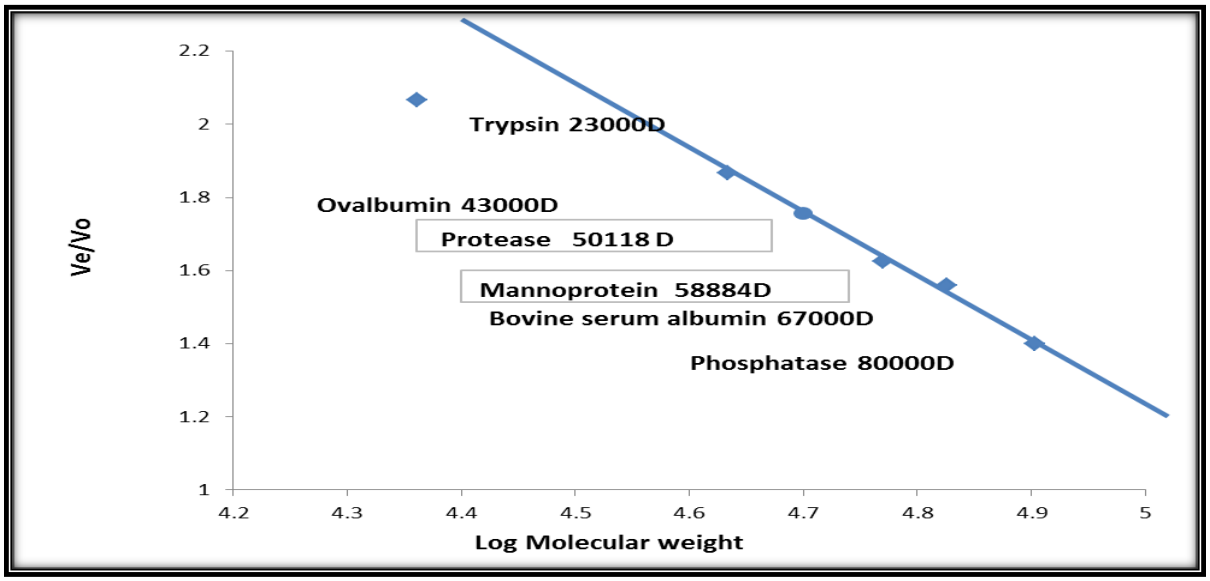
3-5-1: تعيين الوزن الجزيئي

جمعت الاجزاء الفعالة من خطوة الترشيح الهلامي بعد تركيزها ومررت مرة ثانية خلال عمود الترشيح الهلامي باستعمال هلام Sephacryl S -200 في تقدير الوزن الجزيئي لانزيم

البروتييز قيد الدراسة ويوضح شكل (3-9) المنحنى القياسي للوغارتيم الوزن الجزيئي مقابل نسبة حجم الاسترداد / حجم الفراغ (Ve/Vo) للبروتينات القياسية المستعملة وعن طريق هذه العلاقة قدر الوزن الجزيئي للانزم بـ 50118 دالتون.

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 باستعمال عمود Sephadex G-100 (Devi and Hemalatha,2014)، بينما بلغ الوزن الجزيئي للبروتيز المستخلص من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi باستعمال عمود Sephadex G-200 بلغ 67 kDa (Mufti *et al*.,2006) . بينما 60 kDa هو الوزن الجزيئي للبروتييزالمستخلص من نبات*Cucurbita ficifolia* باستعمال تقنية الترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephacryl S-300 (Curotto *et al*.,1989) ، اما (kaneda *et al*.,1975) فقد اكد ان الوزن الجزيئي للبروتييزالمستخلص من نبات *Cucumis melo* var prince باستعمال طريقة الترشيح الهلامي باستعمال sephadex G-75 قدر بـ 54 kDa . بينما الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من مصادر نباتية اخرى بلغ الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من نبات حشيشة العسل او *Euphorbia hirta* 34 kDa باستعمال SDS-PAGE (Patel *et al*.,2012) . دراسة اخرى اكدت ان الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من نبات *Euphorbia cotinifolia* يساوي 79.76 kDa باستعمال SDS-PAGE (Kumar *et al*.,2011). بينما الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من نبات التين *Ficus religiosa* بلغ 47 kDa باستعمال SDS-PAGE (Kumari *et al*.,2010) . الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من نبات *Wrightia tinctoria* هو 57.9 kDa باستعمال عمود Sephadex G-200 (Tomar *et al*.,2008). بينما الوزن الجزيئي للبروتييز المنقى من نبات *Holaerrhena antidysenterica* بلغ 25

kDa بإستعمال عمود Sephadex G-75 ثم SDS-PAGE (Hidayatullah *et al*.,2008) . كذلك الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من نبات *Euphorbia Milii* بلغ 54.4 kDa باستعمال عمود Sephadex G-200 ثم SDS-PAGE (Yadav *et al*.,2008) . اما الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من بذور نبات *Solanum dumbium* بلغ 66 kDa باستعمال SDS-PAGE (Ahmed *et al*.,2009). اما الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من بذور نبات الكاكاو *Theoroma cacao* بلغ 50 kDa باستعمال عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 (Guilloteau *et al*.,2005) . الوزن الجزيئي للبروتييز المستخلص من جذور البطاطا الحلوة *Ipomoea batatas* بلغ 82 kDa باستعمال عمود Superdex 75 وعمود Superdex 200 HR ثم SDS-PAGE (Chen *et al*.,2004) .

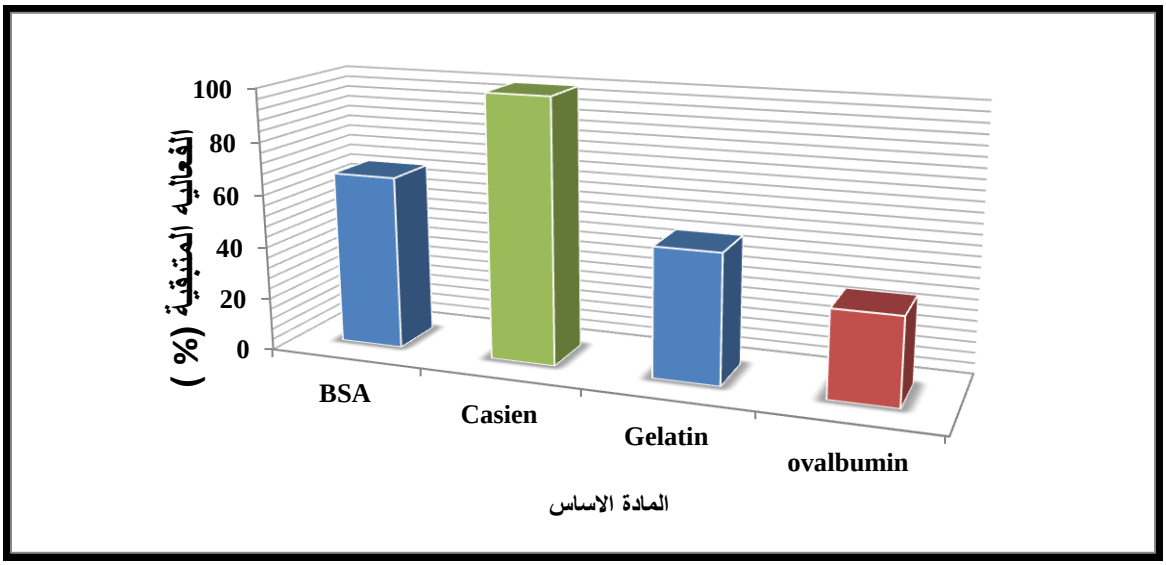


شكل (3- 9): المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم البروتييز المستخلص من ثمار الحنظل *Citrullus colocynthis* بطريقة الترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S-200 تم غسل بمحلول دارئ فوسفات الصوديوم 0.2 مولر ورقم هيدروجيني 7.5 وبسرعة جريان 60 مل / ساعة وبواقع 2 مليلترللجزء الواحد

3 -5-2: تقدير فعاليه البروتييز نحو مواد تفاعل مختلفة

يمتاز انزيم البروتييز بتخصصه الواسع وفعاليته حيال العديد من مواد التفاعل سواء كانت صناعية او بروتينات طبيعية (Gupta *et al*.,2002). لذا اختبرت فعاليه البروتييز المستخلص من ثمار الحنظل *Citrullus colocynthis* المحلية نحو اربعة مواد تفاعل مختلفة هي الجيلاتين والبومين المصل البقري (BSA) والكازائين والبومين البيض بتركيز 1% واظهر البروتييز المستخلص من الثمار فعاليه نحو الكازائين بوصفها مادة اساس اعلى من البروتينات الاخرى المستعملة ، اذ بلغت فعاليه الانزيم المتبقية نحو الكازائين 100 % وكانت فعاليه الانزيم المتبقية نحو البومين المصل البقري 66% ، بينما كانت فعاليته المتبقية نحو الجيلاتين49% ، اما البومين البيض (Ovalbumin) فكانت الفعاليه 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 التي تضمنت مواد التفاعل الكازائين والجيلاتين والبومين المصل البقري BSA والبومين البيض . وبينت النتائج ان الكازائين هو افضل مادة للتفاعل من البروتينات الاخرى ، اذ بلغت الفعاليه الانزيم 100% بينما كانت فعاليه الانزيم نحو الجيلاتين بوصفها مادة تفاعل 33.5% بينما بلغت الفعالية المتبقية للأنزيم نحو اللبومين المصل البقري 51% بينما بلغت الفعاليه 24.7% نحو البومين البيض ovalbumin (Devi and Hemalatha.,2014) . بينت دراسة اخرى ان البروتييز المنقى من نبات *Euphorbia cotinifolia* اظهر الافضلية للكازائين بوصفها مادة اساس للتفاعل وذلك بإحتفاضه بفعاليته مقارنة مع الهيموغلوبين والايزوالبومين (Kumar *et al*.,2011). بينما دراسة اخرى اجريت من قبل Hidayatullah وجماعتها (2008) اذ بينت ان افضل مادة تفاعل للبروتييز المنقى من بذور *Halorrhena antidysentrica* هي الكازائين حيث انتج اعلى فعاليه للانزيم مقارنة ببقية مواد التفاعل الاخرى مثل الجيلاتين و البومين المصل

البقري اذ بلغت فعاليه الانزيم فيها 60% و70% على التوالي . وفي دراسة اخرى اكدت ان البروتييز المنقى من اللاتكس لنبات *Wrightia tincoria* قد احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه مع المادة الاساس الكازائين مقارنة مع الهيموغلوبين والايزوكازائين (Tomar *et al*.,2008). وجدت دراسة اجريت من (Devaraj *et al*,2007) ان افضل مادة اساس كانت الكازائين ثم الالبومين ثم الجيلاتين الذي سجل اقل فعاليه انزيمية للبروتييز المستخلص من نبات *Ficus racemosa*. كما وضحت دراسة اخرى ان المادة الاساس الامثل للبروتييز المستخلص من بذور الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris L.* الكازائين ثم الالبومين والجيلاتين على التوالي (المعموري، 2011) .



شكل (3-10): فعاليه البروتييز المنقى من نبات الحنظل نحو مواد تفاعل مختلفة ، حضن الانزيم بدرجة 37 °م لمدة 30 دقيقة وقدرت الفعاليه الانزيمية المتبقية .

3-5-3: الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليه البروتييز

درس تاثير الرقم الهيدروجيني في فعالية البروتييز المنقى عند ارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 4-9 اظهرت النتائج ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفـعاليه البروتييز هـو 7.5 إذ اعـطى اعـلى فـعالية نوعية 13.8(ملغم/مل) الشكل (3-11). ولوحظ انخفاض في الفعاليه الانزيمية عند الارقام الهيدروجينية الحامضية اذ بلغت الفعالية الانزيمية حوالي 2.75 (وحدة/مل) عند الرقم الهيدروجيني 4. تشير هذه النتائج الى ان الفعاليه المثلى لانزيم البروتييز تقع ضمن الارقام الهيدروجينية المتعادلة الى القاعدية. ذكر De man (2007) .

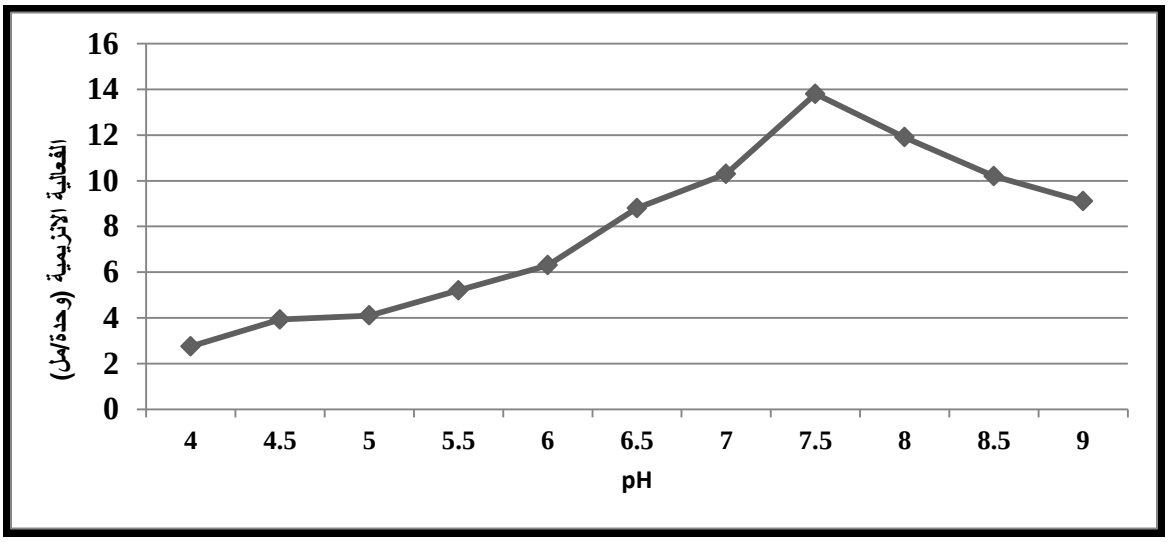
ان كل انزيم يمتلك رقما هيدروجينيا مثالياً واحداً لفعاليته ، بيد ان بعض الانزيمات تمتلك اكثر من ذلك .ان الفعالية الانزيمية تقل عند قيم pH اقل او اكثر من قيمة الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم وذلك بسبب تكوين اصرة ايونية للإنزيم او المادة الاساس اولكليهما معا غير ملائمة للتفاعل الانزيمي ، وقد يكون بسبب تغير في التركيب الطبيعي للإنزيم (الداودي ،1991).

تؤثر القيم الاعلى والاوطأ من الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية على ثمالات الاحماض الامينية للإنزيم والتي يجب ان يكون في حالة معينة لكي يحدث التفاعل من شأنه ان يؤثر على ارتباط المادة الاساس بالانزيم اضافة الى تأثيراته على شحنة الانزيم ومادة التفاعل بالانزيم لذا سوف يعيق او يبطل التحفيز (Murray *et al*. ;2003;Yandri *et al*.,2008).

فقد اشار Sharma وجماعته (2012) ان الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من نبات *Cucumis melo* L.var.prince هو7.1 . بينما اكد Uchikob واخرون (2001) إمتلاك البروتييز المستخلص من نبات *Cucurbita metuliferus* رقم هيدروجيني امثل بلغ 8 ، دراسة Noda واخرون

(1994) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليه البروتييز المنقى من *Cucumis melo* هو 7.1. بينما دراسة Devi and Hemaltha (2014) بينت ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليه البروتيز المنقى من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis هو 9. وفي مايخص الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من مصادر نباتية اخرى اظهرت دراسة ان البروتييزالذي تمت تنقيته من بذور نبات *Holarrhena antidysenterica* الرقم الهيدروجيني الامثل له 7.5 (Hidayatullah *et al*.,2008) ،اما دراسة Kumari واخرون (2012) ان الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من نبات *Ficus resigiosa* هو 7.6 الرقم الهيدروجيني للبروتييز المنقى من اللاتكس لنبات *Euphorbia hirta* بلغ 7.2 (Patel *et al*.,2012).اما الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من نبات *Euphorb cotinifolin* هو 7 (Kumari *et al*.,2011) ، بينما الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من لاتكس نبات التين *Ficus carica* var.Brown Turky هو 8 (Brankica *et al*.,2014). دراسة اخرى بينت ان الرقم الهيدروجيني الامثل لأحد صورتي انزيم البروتييز المنقى من بذور نبات الفاصوليا المنبتة *Phaseolus vulgaris L.* كانت 8 المعموري) (2011، . بينما الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من نبات *Ficus religiosa* كان 8 (Kumari *et al*.,2010). اما الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من نبات *Ficus benghalensis* هو 8 ايضا (Kumari *et al*.,2009) . بينما بينت اخرى ان البروتييز المنقى من لاتكس نبات *Pedilanthus tithymaloids* كان افضل رقم هيدروجيني لفعاليته يتراوح 8 (Bhowmick *et al*.,2008) . اما البروتييز المنقى من نبات *Euphorbia milii* كان افضل رقم هيدروجيني لفعاليته 8 (Yadav *et al*.,2006) . دراسة Usha واخرون (2009) اكدت ان الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من سويداء نبات جوز الهند coconut كان 9 . الرقم الهيدروجيني للبروتييز المنقى من نبات *Euphorbia neriifolia* كان 9 (Ravi *et al*.,2011). بينما اكدت دراسة Ahmed واخرون (2009) ان الرقم الهيدروجيني الامثل للبروتييز المنقى من بذور نبات *Solanum*

dubium كان 11 . Mufti واخرون (2006) اكد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية البروتييز المنقى من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi هو 11.



شكل(3-11) : الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليه الانزيم المنقى من ثمار الحنظل

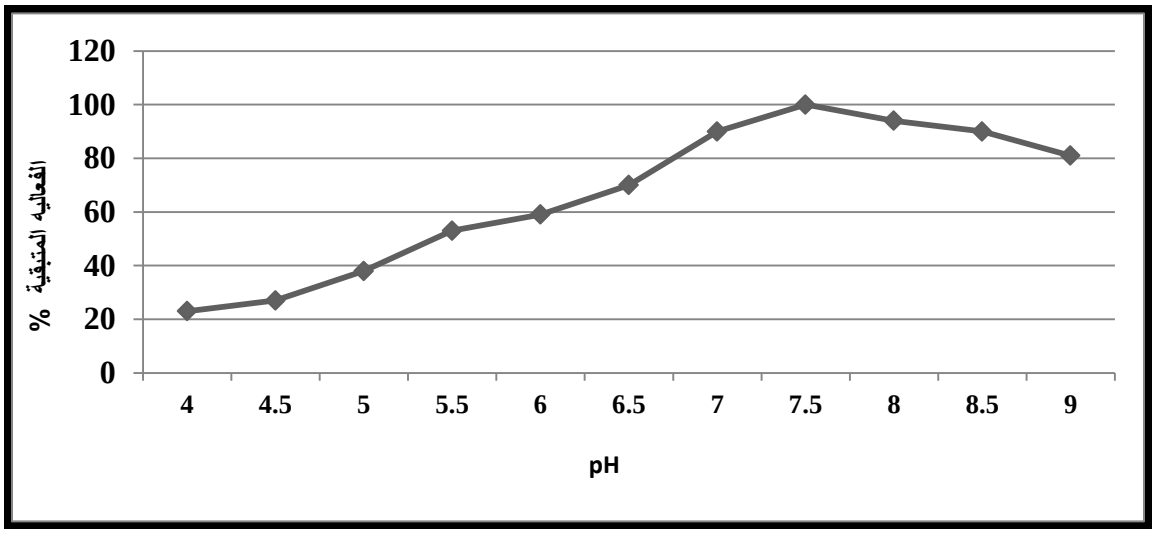
3-5-4: الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات البروتييز

بينت نتائج هذه الدراسة ان البروتييز المنقى من الحنظل *Citrullus colocynthis* يمتلك ثباتا نحو الرقم الهيدروجيني عند القيم المتعادلة (7 -8.5) اذ احتفظ الانزيم 90 بـ % 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 فعاليه البروتييز في الارقام الهيدروجينية قليلة الحامضية الى تاثير حموضة الوسط في تركيب بروتين الانزيم وتاين المجاميع الموجودة في الموقع الفعال ، وان زيادة الرقم الهيدروجيني عن الحد الامثل يؤدي الى مسخ البروتين وتغير تركيب الموقع الفعال وفقدان فعاليه الانزيم Segal, 1976 () ، وقد يحدث مسخ غير عكسي في المحاليل شديدة الحامضية او القاعدية مما يؤدي الى تغير في الموقع الفعال وفقدان فعاليته (Whitaker, 1980) ، 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 المنقى من بعض نباتات فقد اشار Brankica وجماعته (2014) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الفعاليه للبروتيز المنقى من لاتكس نبات التين *Ficus carica* var.Brown تراوحت بين 8-8.5 بينما دراسة اخرى اجريت من Devi and Hemaltha (2014) اظهرت ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات البروتييز المنقى من بذور نبات *Cucumis melo* Var agrestis يتراوح من 8-10. اما الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات فعاليه البروتييز المنقى من ثمارنبات *Cucumis trigonus* Roxburghi هو 4-11 (Mufti *at al* .,2006) ،وفي دراسه اخرى اجريت من Kaneda وجماعته (1997) اكدت 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 من بذور نبات الفاصوليا المنبته *Phaseolus vulgaris L.* كان عند الارقام الهيدروجينية (7-8.5) و (5-6.5) على التوالي (المعموري،2011) . بينما البروتييز المنقى من نبات *Euphorbia neriifolia* تراوح 7-11 (Ravi *et al*.,2011) . بينما دراسة اخرى اكدت ان الرقم الهيدروجيني لثبات البروتييز المنقى من نبات *Euphorbia cotinifolia* كان 7-8 (Kumari *et al*.,2011) ، اما البروتييز المنقى من نبات *Ficus religiosa* فقد ظهرت ثباتيته عند الرقم الهيدروجيني 8-8.5 (Kumari *et al*.,2010). اما البروتييز المنقى من اللاتكس لجويزاء نبات جوز الهند كان الرقم الهيدروجيني الامثل لثباتية يتراوح من 7-11 (Usha *et al*.,2009).اما البروتييز المنقى من بذور نبات *Holarrhena antidysenterica* فكان الرقم الهيدروجيني الامثل لثباته يتراوح 7-8 (Hidayatulla *et al*.,2008) . في دراسة اخرى بينت ان الرقم الهيدروجيني

الامثل لثبات فعاليه البروتييز المنقى من نبات الصبار *Euphorbia milii* كان 5.5-12 (Yadav *et al*.,2006). بينما البروتييز المنقى من نبات التين *Ficus carica* كان ثبات فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 6.5-8.5 (Kumar *et al*.,2008) .



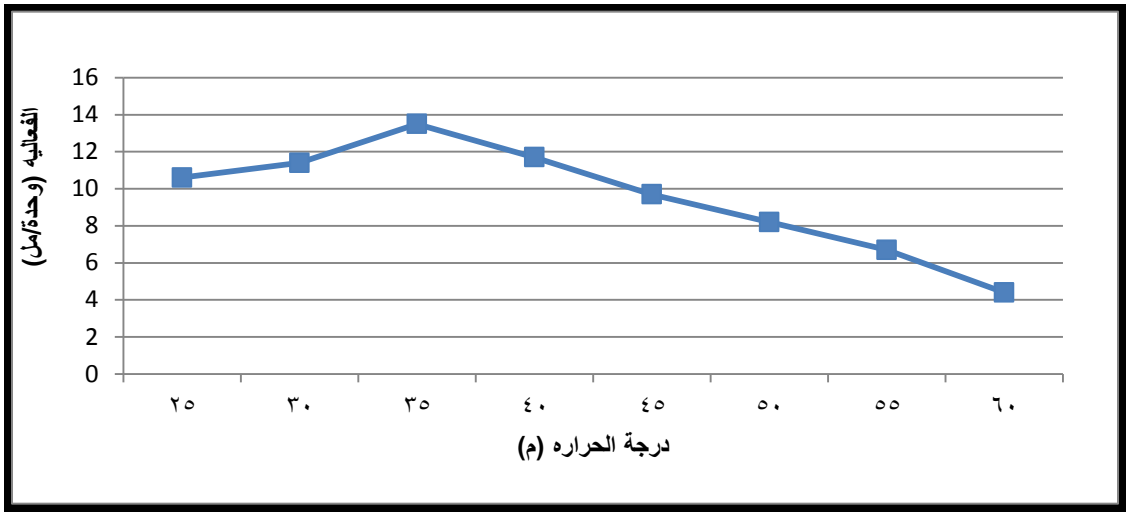
شكل (3-12): الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات فعاليه الانزيم المنقى من ثمار الحنظل

3-5-5: درجة الحرارة المثلى في فعاليه البروتييز

بينت نتائج تاثير درجات الحرارة المختلفة (25-60) درجة مئوية في فعاليه البروتييز من ثمار نبات الحنظل ان فعاليه 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 (وحدة/مل) عند درجة 60 درجة مئوية شكل (3-13) ، 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 بفعل زيادة درجة الحرارة ، الا ان ارتفاع درجات الحرارة عن حدود معينة يؤدي الى مسخ الانزيم وتلف التركيب الثلاثي له ومن ثم انخفاض فعاليته (Segal, 1976 ; Muro *et al*., 1984).درجة الحرارة المثلى

للبروتييزات السيرينية النباتية تتراوح (20-50) درجة مئوية (Antao and Maclcata,2005). فقد وجدت عدة دراسات البروتييزات المنقاة من اجناس اخرى من نفسه العائلة وعوائل نباتية اخرى ان البروتييزالمستخلص من لاتكس نبات *Ficus carica* var.Brown كانت 60 درجة مئوية (Brankica *et al*.,2014) . اما البروتييز المنقى من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis كانت فعاليته المثلى عند درجة حرارة 40 درجة مئوية ، دراسة اخرى اجريت من (Mufti *at al* .,2006) اكد فيها ان البروتييز المنقى من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi فعاليته المثلى كانت عند درجة حرارة 70 درجة مئوية ، دراسة اخرى بينت ان البروتييز المنقى من نبات *Cucumis melo* L.spp.*melo* var Reticulatus كانت درجة الحرارة المثلى له 35 درجة مئوية (Kenda *et al*.,1995) ،في حين بلغت فعاليه البروتييز المنقى من نبات البطيخ *Cucumis melo* var prince melo اقصاها عند درجة الحرارة 70 درجة مئوية (Noda *et al*., 1994) . في دراسة اخرى لنبات البطيخ *Cucumis melo s* سجل اعلى فعاليه انزيمية عند درجة حراره70م (Uchikoba *et al*, 1993) .اما البروتييز المستخلص من نبات *Cucurbita ficifolia* فكانت درجة الحرارة المثلى لفعاليته هي 55 درجة مئوية (curotto *at al*,1989) . في حين ان البروتييز المنتج من نبات *Cucumis melo* قد امتلك اعلى فعاليه عند درجة حرارة 70 درجة مئوية (Kaneda andTominaga,1975). دراسات اخرى تخص البروتييز المنقى من مصادر نباتية اخرى مثل البروتييز المنقى من اللاتكس لنبات *Euphorbia hirta* كانت الدرجة الحرارية المثلى لفعاليته 50 درجة مئوية (Patel *et al*.,2012) . اما البروتييز المنقى من نبات *Euphorbia cotinifolia* كانت افضل فعاليه له عند درجة حرارة 50 درجة مئوية (Kumar *et al*.,2011) .كذلك دراسة اخرى اكدت ان درجة الحرارة المثلى للبروتييز المنقى من اللاتكس لنبات *Ficus religiosa* 50 درجة مئوية (Kumar *et al*.,2010) ، بينما دراسة اخرى بينت ان البروتييز المنقى من نبات *Ficus benghalensis* كانت اعلى فعاليه له عند درجة حرارة 55 درجة مئوية (Kumar *et*

(*al*.,2009 . البروتييز المنقى من نبات جوز الهند coconut كانت افضل درجة حرارة لفعاليته 40 درجة مئوية (Usha *et al*.,2009 . البروتييز المنقى من بذور نبات *Solanium dubium* بلغ افضل فعاليه له عند الدرجة الحرارية 70 درجة مئوية (Ahmed *et al*.,2009) . بينما دراسة اخرى اكدت ان للبروتييز المنقى من بذور نبات *Holarrhena antidysenterica* درجة حرارية مثلى لفعاليته بلغت 35 درجة مئوية (Hidayatulla *et al*.,2008) .اما البروتييز المنقى من نوى تمر الزهدي *Phoenix dactylifera* فكانت افضل فعالية له عند درجة الحرارة 35 درجة مئوية (الشكرجي، 2009) بينما البروتييز المنقى من جذور البطاطا الحلوة *Ipomoea batatas* كانت الدرجة الحرارة المثلى لفعاليته 40 درجة مئوية (Chen *et al*.,2004) .



شكل (3-13): درجة الحرارة المثلى لفعاليه الانزيم المنقى من ثمار الحنظل

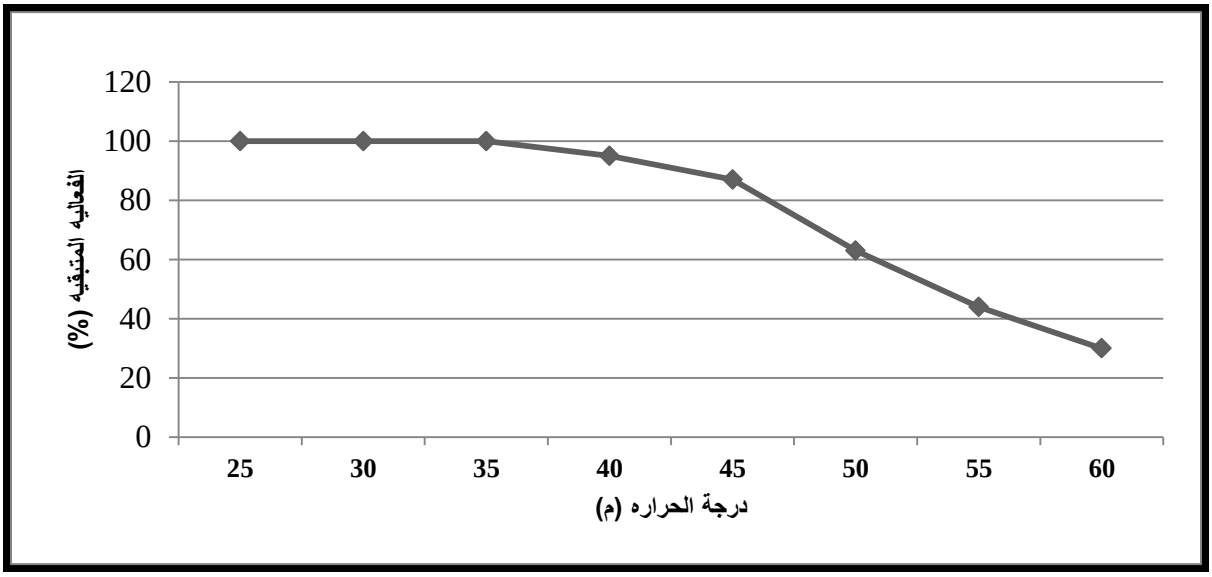
3-5-6: تاثير درجة الحرارة في ثبات الانزيم :

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 بدات الفعاليه الانزيمية بالانخفاض مع

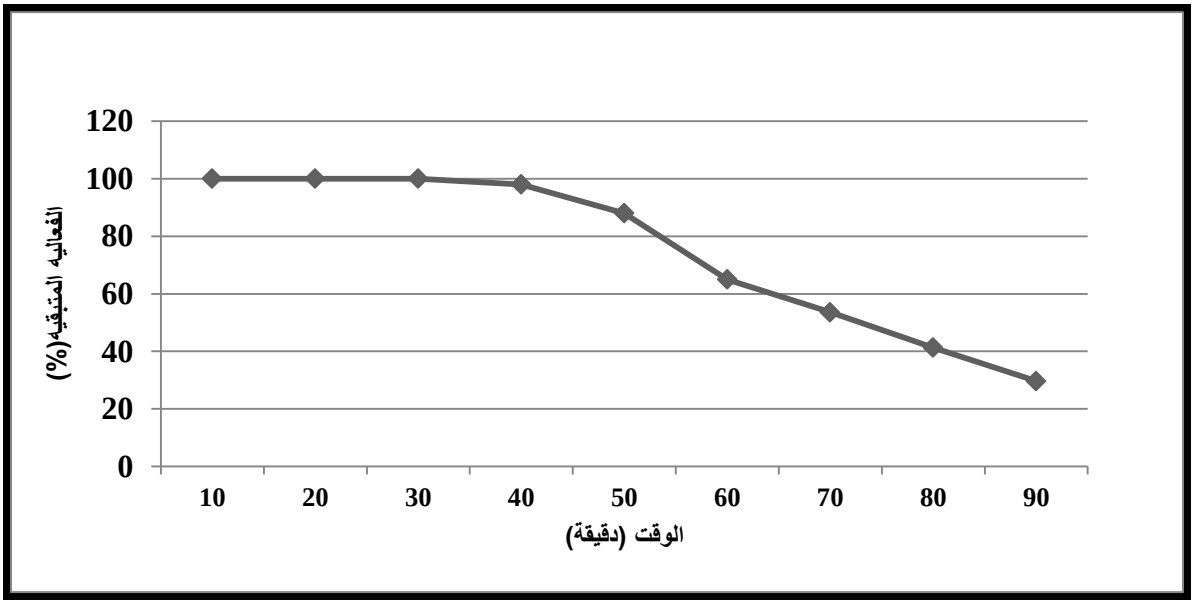
ارتفاع درجة الحرارة وفقد نسبة عاليه من فعاليته بحدود 70% عند حضنه بدرجة حرارة 60 درجة مئوية شكل (3-14) . هذه النتائج تتفق مع ماوجده Unchikoba واخرون (2001) على ثباتية انزيم البروتييز المنقى من نبات *Cucurbita metuliferus* بدرجة حرارة 40-20 درجة مئوية . اما البروتييزالمستخلص من بذور نبات البطيخ *Cucumis melo* var agrestis كان ثابت الفعاليه عند درجة حرارة 40-60درجة مئوية (Devi and Hemalatha,2014) بينما اكدت اخرى ان البروتييز المنقى من لاتكس نباتFicus carica var.Brown كانت فعاليته ثابته بين 60-80 درجة مئوية (Brankica *et al*.,2014. البروتييز المستخلص من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi كان ثابت الفعاليه عند درجة حرارة 80 درجة مئوية (Mufti *et al*.,2006) . فيما يخص البروتييز المنقى من مصادر اخرى اكدت دراسة انت البروتييز المستخلص من اللاتكس لسويداء نبات جوز الهند coconut ان البروتييز كان ثابت الفعاليه عند درجة حرارة 60-40 درجة مئوية (Usha *et al*.,2009) . بينما البروتييز المنقى من اللاتكس لنبات *Wrightia tinctoria* كان ذي فعاليه ثابتة عند 80 درجة مئوية (Tomar *et al*.,2008) . بينما دراسة اخرى وضحت ان البروتييز المستخلص من بذور نبات*Solanum dobium* كان يمتلك ثباتية عند درجات الحرارة 70 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة (Ahmed *et al*.,2009) . اما البروتييز المنقى من بذور نبات الكاكاو *Theobroma cacao* كانت فعاليته ثابته عند الدرجات الحرارية 47-52 درجة مئوية (Guilloteau *et al*.,2005) .ان الانزيمات معظمها تكون اكثر ثباتا بدرجات الحرارة المنخفضة ولكي يتم الاحتفاظ بفعالية الانزيمات كاملة يفضل حفظها بدرجات حرارة منخفضة كما يمكن ان يعزى انخفاض فعالية الانزيم عند درجات حرارة عالية الى تغير الحلة الايونية الطبيعية للانزيم (مسخ بروتين الانزيم) denaturation وان التغير السريع في طبيعة الانزيم يؤدي الى تحطيم الاواصر الهيدروجينية الضعيفة بصورة تؤدي الى فقدان فعالية الانزيم لفعاليته كليا (دلالي،1983 Muthulaksmi,2011) .

تبدي اغلب الانزيمات حساسية لدرجة الحرارة العالية اذ تعمل على تكسير الاواصر غير التساهمية التي تحافظ على التركيب الثلاثي الابعاد فتبدأالسلاسل متعددة الببتيد بالانفتاح والذي يرافقه فقدان سريع للفعالية الانزيمية (Whitaker,1972;Murray *et al*.,2003) .

إنخفاض فعاليه الانزيم قيد الدراسة عند حضنه بدرجات حرارة اعلى من 40 درجة مئوية ياتي نتيجة تاثير الحرارة في التركيب ثلاثي للبروتين وقد يؤدي الى مسخ البروتين وفقدان فعاليته (Neito and Ellis,1986) وهو مالوحظ عند حضن الانزيم بدرجة حرارة 60 درجة مئوية اذ فقد نسبة عاليه من فعاليته. كما ان حضن الانزيم بدرجة حرارة 35 درجة مئوية وعلى اوقات مختلفة بقي الانزيم محتفظا بفعاليته لحد 50 دقيقة شكل (3-15). وبعدها لوحظ ان الانزيم يفقد 41.6% من فعاليته بعد 90 دقيقة من الحضن بينما اكدت دراسة ان البروتييز المنقى من ثمار نبات *Cucumis trigonus* Roxburghi بقي محافظا على اكثر من 90% من فعاليته بعد مدة زمنية مقدارها 24 ساعة (Mufti *et al*.,2006).



الشكل (3-14): تاثير درجة الحرارة على ثبات انزيم البروتييز المنقى من الحنظل لمدة 30 دقيقة



شكل (3-15) :الثبات الحراري للإنزيم البروتييز المنقى من الحنظل عند حضنه بدرجة حرارة 35 م لمدة 30 دقيقة

3-5- 7: تأثير بعض المواد الكيمياوية والايونات المعدنية في فعاليه البروتييز

درس تاثير الايونات المعدنية في فعاليه 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 (3-3) . كما بلغت الفعاليه المتبقية للانزيم عند حضنه مع ايونات الصوديوم 97% و93% ، والكاليسيوم 105% و112% على التوالي ،اشارت بعض الدراسات الى دور ايونات الكالسيوم والمغنسيوم في زيادة فعاليه الانزيم ولها دور في تحفيز الانزيم وثباته نحو التحلل الذاتي (Autolysis) والمسخ الحراري (Xiubao and Xiulan, 1984) . لوحظ ايضا عدم تاثير المركبات المختزلة مثل cysteine بتركيز 5 ، 10 ملي مولار في الفعاليه 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 فعاليه الانزيم عند حضنه مع هذه الماده وهي من العوامل الكلابية، اذ بلغت الفعاليه المتبقية للانزيم عند معاملته بتركيز1 و10 ملي مولار من EDTA حوالي 97% و 95 %على التوالي ، في حين ثبطت الفعاليه المتبقيه الانزيم بصوره كامله عند 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 هو من نوع البروتييز السيرين (Serine Protease) حيث يقوم بسلفنة Sulfonated للحامض الاميني السيرين Serine الموجود في الموقع الفعال للإنزيم وبالتالي ينتج عنه فقدان الفعالية بالكامل (Sharma and De,2011) ويثبط بوجود PMSF.

اشـــارت العـــديد من الدراسات الـــى تاثير بعـض المـــركبات فـــي فعـــاليه انـزيم 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 حيـــث بلغـــت الفعاليـــه المتبقيـــة للانـــزيم 93 % ،91%،93% علـــى التـــوالي. (Devi and HemaLatha.,2014) 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 الفعاليه المتبقية عند حضن الانزيم مع المادة الاخيرة بتركيز 5 ملي مولار بلغت 25% بينما بقي الانزيم محافظاً 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 تاثر مادة EDTA ومادة Cysteinعلى الفعاليه حيث احتفظ بها بصوره كاملة (Karim *et al*.,1999) . ومن هذا يستدل ان الايونات المعدنية لها تاثير في فعاليه الانزيم يختلف باختلاف نوعها وتركيزها. اذ بينت دراسة ان البروتييز المنقى من نبات البطيخ *Cucumis* Roxburghi *trigonus* قد ثبط تثبيطا كاملا عند معاملته مع الـ PMSF بتركيز 5 ملي مولار ، بينما لم تتاثر فعاليته عند حضنه مع ايونات الكاليسيوم والمغنيسيوم (Mufti *et al*.,2006). دراسة اخرى بينت بان 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 الفعاليه عند حضنه مع ايونات البوتاسيوم (Hidayatulla *et al*.,2008) . كذلك ثبط البروتييز المنقى من لاتكس جوز الهند

coconut عند حضنه 5 ملي مولار من مادةPMSF (Usha *et al*.,2009) . كذلك البروتييز المنقى من بذور نبات *Solanum dubium* كانت قد ثبطت فعاليته بصورة كامله عند حضنه مع مادة PMSF (Ahmed *et al*.,2009) . ايضا بينت اخرى البروتييز المنقى من جذور نبات البطاطا الحلوة *Ipomoea batatas* ثبطت فعاليته عند حضن الانزيم مع مادة PMSF (Chen *et al*.,2004) ممايدل على ان البروتييز المنقى يعود الى مجموعة البروتييزات السيرينية .

جدول (3-3) تأثير الايونات المعدنية والمواد المثبطة والمختزلة على الانزيم المنقى من ثمار الحنظل

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

3-5-8: إختبار فحص الحساسيه للبروتييز كمضادا حيوي

اظهر الانزيم المستخلص من ثمرة الحنظل كفاءة عاليه بالتثبيط عند استعمالها بطريقة الحفر وبتراكيز مختلفة 5% و 10% و 15% و20% بسبب زيادة كمية الانزيم النباتي وانتشار هذا الانزيم خلال الاكار في الطبق مما ادى الى الحصول على مناطق تثبيطية،كما اظهرت الدراسة من شكل(3-16) ان زيادة تركيز الانزيم يزيد من تاثيرها في تثبيط العزلات الميكروبية وكان هذا واضحا عند استعمال تركيز 10 و15 و20 (%) من الانزيم المنقى على العزلات المستعملة في الدراسة التي تمت الحصول عليها من مناطق الاصابة بالاضافة الى العينات القياسية حيث كانت جميع النتائج ايجابية بحصول مناطق تثبيط واسعة.

3-5- 9: التوصيف الاحيائي لفعاليه الانزيم:

اختبرت فعاليه البروتييز النقي ضد عدد من الاحياء المجهرية الممرضة للانسان والقياسية وتم ذلك باجراء اختبار تقدير التركيز المثبط الادنى (MIC) لهذه الاحياء المجهرية وتم تحليل الاحصائي المتباين وذلك بمعرفة الاستجابة بين السلالات البكتيرية والفطرية لنوع الانزيم المستعمل من جهة ومعرفة تاثير هذا الانزيم في الاحياء المجهرية بصورة عامة.

الجدول (3-4) يبين نتائج الاستجابة بين السلالات البكتيرية نحو الانزيم النباتي النقي لثمار نبات الحنظل والذي كان ذا تاثير مثبط لجميع الاحياء المجهرية المستعملة في هذه التجربة وبتراكيز متفاوتة مما يؤكد فعاليه الانزيم النباتي النقي لنبات *Citrullus colocynthis* نحو البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام فضلا عن الفطريات ، وقد بلغت اعلى استجابة للسلالات البكتيرية نحو الانزيم النقي في البكتيريا *S.agalagciae* وعند التركيز المثبط 5 ملغم /مل في الوقت نفسه كان متوسط اوطأ استجابة في البكتريا *S.aureus* وعند التركيز المثبط 15 ملغم /مل. وبين التحليل الاحصائي ان قيمة L.S.D وعند مستوى احتماليه (0.05) وحسب الجدول (3-16) بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين البكتريا

الممرضة والموجبة لصبغة غرام *S.agalactiae* مع *سلالات البكتريا* الاخرى *Shigella spp.* وبكتريا *S.aureus* وبكتريا السالبة لصبغة غرام *E.coli* بالرغم من استجابتها للانزيم عند تراكيز مثبطة اعلى ومن جهة نلاحظ ان مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة غرام والمتمثلة بالبكتريا *S.aureus* الممرضة والبكتريا المشخصة *S.agalagciae* أظهرت فروق معنوية فيما بينها ظهرت كذلك فروقات معنوية مع مجموعة البكتريا السالبة لصبغة غرام بالإضافة الى الفروق المعنوية بين تراكيز البكتريا الواحدة . لم تثبط السلالات البكتيرية الموجبة والسالبة بالتركيز 5 (ملغم / مل) ماعدا بكتريا *S.agalagciae* حيث بلغ متوسط قطر منطقة التثبيط 16.3مل ، بينما اظهرت جميع السلالات استجابة تثبيطية للتركيزين 10 ملغم /مل و 15ملغم /مل على التوالي . اما بالنسبة للنتائج التحليلية لإستجابة وتثبيط فطر *A .niger* وخميرة *C.albicans* نجد ان الفطر قد ثبط عند تركيز 20 (ملغم /مل) ، بينما ثبطت الخميرة عند التراكيز 20,15 (ملغم / مل)، لكن اوضح تثبيط النموكان عند التركيز 20 (ملغم /مل) حيث بلغ قطر التثبيط 25 مل للفطر و 35 مل للخميرة وكانت الفروق المعنوية واضحة مقارنة مع السلالات البكتيرية .نلاحظ بان الخميرة *Candida albicanus*هي اكثر تاثراً وإستجابة مقارنة مع فطر*Aspergillus niger* ، حيث تم تثبيط الخميرة بتراكيز اوطا اي اعطت استجابة وتاثيرا اعلى وهذا قد يعود الى طبيعة البناء الخلوي لكل منهما ان الجدار الخلوي لـ *Candida albicanus* يحتوي على نسبة من البروتينات اعلى من الفطر حيث بلغت 10% بالاضافة الى انه الجزء البروتيني يوجد في الجزء الخارجي القريب من سطح الجدار الخلوي ممايسهل عملية مهاجمة انزيم البروتييز للبروتينات وبالتالي تحليلها (Gow and Hube,2012) بينما نسبة البروتينات في الجدار الخلوي لفطر *Aspergillus niger* لاتتجاوز1.15% (Mitchell and Taylor,1969) وهذا يفسر استجابة الخميرة لتراكيز اقل من الانزيم من استجابة الفطر.

ان هذه الفروقات المعنوية والملاحظة بصورة عامة ما بين استجابة البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وتثبيط مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام بتراكيز اعلى قد يعود الى طبيعة هاتين المجموعتين البكتريتين من ناحية بناء الجدار الخلوي ومناطق الاصابة في الجسم التي تهاجمها هذه البكتريا وشدة ونوعية المضادات المايكروبية المستعملة نحوها . وعند ملاحظة استجابة الفطريات للانزيم النقي نجد ان الفطر *A niger*. قد ثبط عند تركيز 20 (ملغم /مل) بينما ثبطت الخميرة *C. albicans* بصورة افضل عند التركيز 15 , 20(ملغم / مل) ايضا. ونتيجة لاجراء هذه الاختبارات للانزيم النباتي نحو بعض الاحياء المجهرية الممرضة للانسان نلاحظ ان استجابة البكتريا المشخصة لتاثير الانزيم النقي كانت اكبر مما هي عليه في السلالات البكتيرية الممرضة . وهذا يعزى الى تعرض البكتريا الممرضة في العادة الى مؤثرات خارجية فضلا عن جرع مختلفة من المضادات الحيوية اثناء احداثها الاصابة لجسم الانسان ومن ثم حصولها على المقاومة نتيجة لامتلاكها كروموسومات مقاومة. خارجية والتي توجد على البلازميدات (plasmides) والمسماة ببلازميدات المقاومة (R -plasmids) مما يكسب هذه البكتريا مقاومة نحو التاثير التثبيطي للمضادات المايكروبية (Bertram *et al*., 1993). هذا من جهه ومن جهه اخرى نلاحظ استجابة البكتريا الموجبة لصبغة غرام اكثر من استجابة البكتريا السالبة لصبغة غرام وذلك يعزى الى ان طبقة الببتيدوكلايكان في البكتريا الموجبة والتي تشكل الجزء الرئيسي في الجدار يكون تواجدها اكثر من البكتريا السالبة لصبغة غرام حيث إنه يربط بين هذه الاجزاء في هذه الطبقة اواصر ببتيدية التي تربط بين الاحماض الامينية والتي تشكل البروتين وبعد تحليل هذه الاواصربواسطة الانزيم يتحلل الجدار والذي هو الببتيوكلايكان وبعدها يعمل الانزيم على تحليل البروتينات في الغشاء البلازمي والتي تكون مسؤولة عن دخول الايونات ويؤدي الى تحطم الغشاء وبالتالي موت الخلية .

اما البكتريا السالبة لصبغة غرام فتتكون من بروتينات في السطح الخارجي وبصورة اكبر ولكن بعد تحليلها من قبل الانزيم حيث تليها طبقه الببتيوكلايكان التي توجد اسفلها والتي تعمل كحاجز يمنع انفجار الخلية وبعدها تحطيمها ثم يصل الى الغشاء وبالتالي يحلل البروتين ويحطم الخلية لذلك تكون العملية اكثر تعقيدا من سابقتها لاحتواء جدارها على طبقتين حيث تتكون الطبقة الخارجية من السكريات ودهون . إن اليه العمل للبروتييز تتلخص من خلال مهاجمتها للبروتينات الجدارية للاحياء المجهرية وبتالي تحليل الاصرة الببتيدية التي تربط بين الاحماض الامينية ومن ثم تؤدي الى هضم البروتينات وتمتنع صناعتها بحيث ينتج عن هذا تغيرفي تركيب الجدارالخلوي وتغيير الوظائف الطبيعية للغشاء الخلوي (Tyler *et al.*, 1988) وبالتالي تثبيط تكوين الجدار الخلوي المايكروبي ، او تثبيط التصنيع الحيوي لبعض البروتينات الاساسية يؤدي الى ايقاف العمليات الايضية للحامض النووي (DNA).

جدول (3-4): إستجابة العزلات البكتيرية للتراكيز المختلفة لإنزيم البروتييز المنقى من ثمار الحنظل

نطاق تثبيط النمو مقاس بالملم (المعدل ± الخطأ القياسي)				
تركيز الانزيم (ملغم/مل)	الجراثيم الموجبة لصبغة غرام		الجراثيم السالبة لصبغة غرام	
	S.aureus	*S.agalactiae*	*E.coli*	*Shigella spp*
Control	0±0 Da	0±0 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa
5	0±0 Aa	16.33±0.88 Ab	0±0 Ab	0±0 Ab
10	0±0 Ba	28.66±1.85 Ab	0±0 Ab	20±0.57 Bc
15	14.33±0.66 Ca	32.33±1.45 Bb	14.33±0.66 Bb	32.66±1.2 Ca

* تشيرحروف الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية في حين تشير الحروف الصغيرة الى القراءة الافقية .

* تشير الحروف المتشابهه الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيًاً في حين تشير الحروف المختلفة بين أي مجموعتين الى وجود اختلافات مهمة احصائيًا تحت مستوى احتمالية ($P<0.05$) .

جدول (3-5): استجابة العزلات الفطرية للتراكيز المختلفة لإنزيم البروتييز المنقى من ثمار الحنظل

نطاق تثبيط النمو مقاس بالملم (المعدل ± الخطأ القياسي)		
تركيز الانزيم (ملغم /مل)	قطر تثبيط النمو بالملم	
	Aspergillus niger	*Candida albicanus*
control	0±0 Aa	0±0 Aa
5	0±0 Aa	0±0 Aa
10	0±0 Aa	0±0 Bb
15	0±0 Ba	0±0 Ba
20	28.33±1.76 Ca	31±3.05 Ca

* تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية في حين تشير الحروف الصغيرة الى القراءة الافقية .

* تشير الحروف المتشابهه الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيا في حين تشير الحروف المختلفة بين أي مجموعتين الى وجود اختلافات مهمة احصائيا تحت مستوى احتمالية ($P<0.05$) .

جدول (3-6): نتائج اختبار (MIC) بوحدة (ملغم /مل) لإنزيم البروتييز المنقى من ثمار الحنظل للعزلات البكتيرية والفطرية.

الاحياء المجهرية	MIC (ملغم/مل)
E.coli	8
S. aureus	12
S. agalatcia	2
Shigella.spp	8
Aspergillus niger	8
Candida albicanus	8

الاستنتاجات Conclusions

1- تم الحصول على مصدر جديد للبروتييز من ثمار الحنظل المحلية له فعالية عالية وثباتية جيدة مقارنة مع فعالية البروتييز المستخلص من ثمارالخيار ، البطيخ ، القرع والشجر.

2- حددت الظروف المثلى لإستخلاص الانزيم من ثمار الحنظل المحلية كما تم تنقيته بخطوات قصيرة

3- يمتلك بروتييز الحنظل صفات كيموحيوية جيدة من تحمله لدرجات حرارة عالية وكذلك ثباتية في الظروف المعتدلة الى القاعدية .

4 - يتأثر انزيم بروتييز الحنظل بالمواد المثبطة وبتراكيز مختلفة .

5 - أظهرت النتائج بأن بروتييز نبات الحنظل من نوع السيرين وذلك لوجود الحامض الاميني السيرين في الموقع الفعال او بالقرب منه من خلال تثبيط فعاليته بأستخدام المثبط PMSF .

6- اظهر الانزيم القدرة على تثبيط مجموعة من الاحياء المجهرية المختبرة عند استخدامة بتراكيز معينة مما يتيح امكانية استخدامه كمضاد حيوي .

7- امتلك انزيم البروتييز المنقى من ثمار نبات الحنظل *Citrullus colocynthis L.* فعالية كبيرة تجاه بروتينات الكازائين مقارنة مع البومين المصل البقري والجيلاتين والبومين البيض.

التوصيات:

1- إستخدام انزيم البروتييز المنقى من ثمار نبات الحنظل في التطبيقات الصناعية والزراعية.

2- دراسة تسلسل الاحماض الامينية للإنزيم ، ودراسة إمكانية التلاعب بالموقع الفعال للإنزيم ضمن تقنيات الهندسة البروتين لزيادة فعالية الإنزيم وجعله يتحمل ظروف متطرفة .

3- إستخدام انزيم البروتييز المنقى من ثمار نبات الحنظل في التطبيقات الطبية في معالجة الحروق والجروح ومعالجة الالتهابات وغيرها.

المصادر العربية :

ابو هيلة ، عبد الله بن ناصر .(1987) . اساسيات علم الفطريات .مطابع جامعة الملك سعود .جامعة الملك سعود .

بابوجيان ، جورجيت والقاضي،عماد، (2010) . أساسيات تصنيف النبات (الفصائل النباتية) منشورات جامعة دمشق –سوريا ، ص 241- 250.

الجبوري ، محيميد مد الله (1990) . علم البكتريا المرضية . دار الكتب للطباعة والنشر ، الموصل .

حسين ، فوزي طه قطب (1979) .النباتات الطبية وزراعتها ومكوناتها .الدار العربية للكتاب. تونس :357 صفحة.

دار الكتاب الحديث. (1988).التداوي بالاعشاب واسرار الطب العربي –الكويت .ص 22- 23.

الداودي ، علي محمد حسن (1991) . الكيمياء الحيوية المتقدمة . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة بغداد- كلية الزراعة .

دلالي ، باسل كامل . (1983) . اساسيات الكيمياء الحيوية . جامعة الموصل – الموصل (ترجمة) صفحة 468 .

الراوي ، خاشع محمود .(2000) . المدخل الى الاحصاء . كلية الزراعة والغابات . جامعة الموصل . وزارة التعليم والبحث العلمي . 469 صفحة .

الراوي ، علي . (1988). النباتات السامة في العراق . الهيئة العامة للبحوث الزراعية . الطبعة الثالثة :122 صفحة.

الرحمة ، عبد الله بن ناصر (2005) . اساسيات علم الفطريات . جامعة الملك عبد الله , السعودية.

السعدي ،محمد. (2006). خفايا واسرار النباتات الطبية والعقاقير في الطب القديم والحديث ، عمان، الاردن ، دار اليازوري ، صفحة 156-160 .

الشكرجي، فريال حياوي محمد .(2009) . تنقية وتوصيف انزيم البروتييز من نوى تمر الزهدي *Phoenix dactylifera* L. ، مجلة بغداد للعلوم . مجلد (6) .العدد 4.633-639 الصفحة.

الشماع ، علي عبد الحسين ، العقاقير وكيمياء النباتات الطبية ، (1989) ، بيت الحكمة ، بغداد ، ص 323-324 .

صفر ،ناصر حسين.(1984). النباتات الطبية عند العرب . دائرة الشؤون الثقافية والنشر .بغداد:323 صفحة.

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.

فودة ، يحيى حسن وعبد الله ، محمد امين والشيبي ، مجدي جمعة . (1998) . نظم الانزيمات وتطبيقاتها في التصنيع الغذائي . الدار العربية للنشر والتوزيع .

الكاتب ، يوسف منصور . (1988) . تصنيف النباتات البذرية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد: 589 صفحة.

لبنية، محي الدين. (2002). الحنظل داء ودواء. المجلة العربية العدد 305

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 .

المنظمة العربية للتنمية الزراعية .(1988) . النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي . جامعة الدول العربية . الخرطوم :477 صفحة .

الموسوي ، علي حسين عيسى . (1987) . علم تصنيف النباتات . مطبعة جامعة بغداد وزارة التعليم العالي والبحث العلمي : 366 صفحة .

المصادر الاجنبية:

Afifi , M.S.; Sayed ,M.D. and Balbe , S.I.(1967). Nitrogenous bases of the differe organ from Iraq .Bull.Biol.Res.Cent .Univ. Baghdad ,12(1): 9-39.

Ahmed, M. and Khan H. (2007). Alow molecular weight of alkaline serine protease from seed of *Nelumbo nucifera* ,J.Chem. Society .Pak., 29, (2): 155-160.

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

Akoh, C.C. and Nwosa , C.V. (1992). Fatty acid composition of melon seed oil lipids and phospholipids. J. Am. Oil Chem. Soc., 69: 314-316.

AL-Khalifa, A.S.(1996) .Physicochemical Characteristics, Fatty Acid Composition, and Lipoxygenase Activity of Crude Pumpkin and Melon Seed Oils .J.Agric.Food Chem. 44: 964-966.

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

AL-Khafaji , M.A.; Merhij,E.,I. and Neim, B.,A.(2009).Partial purification of acidic protease from the mung bean (*Phaseolus aureus* roxb.) seed. Dep.of Biol. Colleage of Sci.,Unvi.of Babylon. Journal of Babylon unvi.,2.17.

AL-Rawi, A. and Chakaravarty , H.L . (1988) . Medical plant of Iraq Agric . Iraq , Baghdad .,pp. 26-27.

Antâo , C.M. and Malcata F.X.(2005). Plant serine protease. Biochemical Physiological and molecular features. Plant Physiol. Biochem,43:637-650 .

Arima,K.;Uchicoba,T.;Yonezawa,H.;Shimada, M and Kaneda,M.(2000). Isolation and characterization of a serine protease from the sprouts of *Pleioblastus hindsii* Nakai. Journal of phytochemistry,54 (6): 559-565.

Ashok , K. P.; Vijay K. S. and Medicherla V.J.(2007). Carnein, a Serine Protease from Noxious Plant Weed *Ipomoea carnea* (Morning Glory). J Agric Food chem,55(14):5809-5818.

Bankole, S. A. and Jola, A. O. (2004). Effect of lemon grass (*Cymbopogon citrates* stap f) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds, Journal of Basic Microbiology.45(1): 20-30

Bankole, S.A., Osho, A., Joda, A.O. and Enikuomehin, O.A. (2005). Effect of drying method on the quality and storability of "egusi" melon seeds (*Colocynthis Citrullus L.*). African Journal of Biotechnology, 4 (8): 799-803.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B.(1972).Illustred genera of imperfect fungi Burgess Puble . Co., Minnesota. 3 rd ed .

Baron, E.J.,Change, R.S.,Woward, D.H., Miller andTumer, J.A. (1994). Medical Microbiology, short course.. Ajohn Wiley and Sons, Inc, New York. Pp. 119-135.

Baron,E.J. and Finegold, S.M.(1990). Bailey and Scott's Diagnostic microbiology .8th ED. Mosby Company , Pp:172-173.

Barrett, A J. (1997). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature.Recommendations 1992.Supplement 4: correction and additions (1997).Euopean journal of biochem ,250(1):1-6.

Batchelor,A.K .; Boutilier,K .; Miller,S.S .; Labbé,H .; Bowman,L.; Hu,M.; Johnson,D.A .; Gijzen, M.and Miki, B.L.(2000).The seed coat-specific expression of a subtilisin-like gene, SCS1, from soybean, Planta 211 : 484–492.

Bertram , S. Heinrich , B.,David, B.,S. Neil, S.M ,Stuart, J.(1997). Temprerature Sensitive Expression of Drosophila Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. Journal Neurochem.68,1812-1819.

Bertram, G. and Anthony ,J.(1993). Pharmacology (examination and bord review). Appleton and Lange . Los Altos- Colifornia – USA. Pp.267-270.

Bhowmick, R., Kumari, N.K.,Jagannadham, M.V. and Kayastha, A.M.(2008).Purification and characterization of novel protease from the latex of *Pedilanthus tithymaloids*.Protein pept lett.15(9):1009-1016.

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

Booth, M.C., Pence, L.M. , Mahasreshti, P. and Gilmore, M.S.(2001). Clonal associations among *Stamphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. Infect. Immun. 69 : 345-352.

Borriss, R.(1987).Biology of enzymes.In. Biotechnology (eds. Rhem,J.H.and Reed,G.)Vol. 7a:35-36 VCH Deerfield Beac.

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.

Brankica ,R.,Olga,B.,Radivoje,P.,Vesna, N. and Natalija,P.(2014). Identification , purification and characterization of anovel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. Journal of Bioscience and Bioengineering. 118 (6): 622-627.

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

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers ormetabolic inhibitors in bacteria. Nature .3: 238–250.

Brummer, W. and Gunzer, G. (1987). Loboratory techniques of enzymes recovery In : Biotechnology (eds. Rehm, J. H. and Reed, G.). 70 : 213-278.

Brzin, J. and Kidrič, M. (1995). Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 13: 421–467 .

Burkill, H.M.(1985) . The useful plants of west tropical Africa. Vol.1, families A-D. Royal Botaic Garden . Kew, UK.

Chakravarty,H.L.(1968). Cucurbitaceae of chana (Bull- J.F.A.N.,Dakar).

Chandra, M. (2003). Aguide for prepration and use of buffers in biological system. CALBIOCHEM. PP, 19-20.

Chaplin, M. and Chri (2004). Enzyme technology. http.//www. sbu. Ae.

Chen, T. E.; Huang,D. J. and 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.

Chou, K. C**.** and Cai, Y. D. (2006). Prediction of protease types in a hybridization space . Biochemical and Phytochemical Research Cammunications. 399(3):1015-1020.

Christeller, J.T. (2005). Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability.Biochemistry.272 (22):5710-5722.

Claus , E.P.; Tyler,V.E. and Brady, L.R.(1967).Pharmacognosy 6 th ed. pp.108-115 Lea and Febiger. Philadelphia, U.S.A.

Collee, J.G.; Marimun, B.P.; Fraser, A.G. and Simmons, A. (1996). Mackie and Mc Cartne Practical Medical Microbiology.

Cristofoletti, P. T.; Ribeiro, A. F. and Terra, W. R. (2005). The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: Sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect* Biochemistry and Molecular Biology, 35(8): 883-901.

Curotto, E**.** G.; González, S. O . and Reilly, G. T. (1989) . Isolation and partial characterization of a protease from *Cucurbita ficifolia*, FEBS Lett. 243: 363–365.

Dafni, A.; Yaniv ,Z .and Palevitch,D **.** (1984). Ethobotanical survey pf medicinal plants. J. Ethnopharmacol .10:295-310.

Daoud, S.H.(1984) . Flora of Kuwait. Vol.1Pp.44-45.KPI.Lid., London, UK.

De man ,J.M.(2007).Principles of Food Chemistry .Third Edition. Springer International Edition.

Devaraj , K. B.; Kumar, P.R. and Prakash ,V. (2008). Purification and charactrazation solvent –induced thermal stabilization of ficin from latex of *Ficus carica*. J. Agric. Food Chem. 56 (23):11417–11423

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

Devi,B.G. and Hemalatha,K.P.J.(2014).Isolation,partial purification and characterization of alkaline serine protease from seeds of *Cucumis melo* var agrestis.Journal of Research in Engineering and Technology,3.(6): 2319-2321.

Dismukes. (1992). Infectious diseases. Cecile. Text book of Medicin. Wyngarden, Smith and Bennett (19th ed).

Diwan, F.H.; Abdel-Hassan, I.A and Mohammed, S.T. (2003). Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. Easten Mediterranean Health Journal.6:345-351.

Domsch, K.H.;Gams , W.and Anderson ,T. (1980) . Compendium of soil fungi Academic press, p :85.

Drapeau , G.**;** Boily , Y. and Houmard , J. (1972). Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus* . J. Biol. Chem ., 247 (20): 6720 – 6726.

Duke , J.A. (1978). The quest for tolerant germplasm . In : ASA special symposium , croptolerance to suboptiomal and conditions .Int. As. Soc. Agron. Madison , WI.p.1-61.

Duke, J. A. (1983).*Citrillus colocynthis* (L.)SCHRAD. Hand Book of energy Crops .

Dunn, B.M. (2001). Determination of protease mechanism ,in R.Beynon,J.S. Bond (Eds),Plant proteolytic enzymes-apractical approach, oxford University Press,New York ,pp.77-79.

EL-Magoli, S.B.; Morad,M.M. and EL-Fare,A.A.(1979). Evalution of some Egyption melon seed oils. Anstrichmittel, 81(5) : 201.

Ewing, W,H (1986). "Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae", 4 th ed. Elsevier, New York .

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.

Fan, T.J.; Han, L. H.;Cong, R. S. and Liang, J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 37(11): 719–727 .

Felter, H.W. and Lioy, J.U. (1898). *Colocynthis* (U.S.P) Colocynth. Kings American Dispensatory.1:118.

Franco, O. L.; Dias, S. C.; Magalhes, C. P.; Monteiro, A. C. S.; Bloch-Jr, C.; Melo, F. R.; Oliveira-Neto, O. B.; Monnerat, R. G. and Grossi-De-S, M. F. (2004). Effects of soybean kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). FEBS,250 (1):1-6.

Fraser, V. J., Jones, M. and Dunkel, J. (1992). Candidemia in atertiary care hospital: Epidemiology, Risk Factors and Predictor of Mortality. Clin. Infect. Dis. 15: 414.

Fullbrook , P. D. (1983) . Practical limits and prospects in : Industrial enzymology . (eds . Godfery , T. and Reichelt , J.) pp. 41 – 110 . Nature press .

Girgis, P. and Said, F.(1968). Charactrization of melon seeds oil. J.Sci. Food .Agr.19 : 615-616 .

Gow,N.A.and Hube,B.(2012). Importance of the Candida albicanus cell wall during commensalism and infections.*J. of Microbiol*, 15(4):406-412.

Groover, A. and Jones,A.M.(1999). Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis, Plant Physiol. 119:375–384.

Grudkowska, M. and Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. Acta Biochimica Polonica, 51(3): 609-624.

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.

Gupta, P.K. (1998). Elements of Biotechnology. First edition. INDIA.

Gupta, R.;Beg,Q.;Khan,S. and Chauhan,B.(2002). An overview on fermentation downstream processing and properties of microbial alkaline protease .Appi Microbial Biotechnol.60:381-395.

Hancock, R. E. W. and Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. Trends Biotechnol, 16: 82–88.

Hatam , N.A.R.;Whiting,D.A. and Yousif,N.J.(1990).Lipids and sterlls of Citrullus colocynthis. International.J.of crude Drug. Research ,28;183-184.

Havery, M.D. , and John , S.F.(1998). Colocynthis : king's American Dispenasatory .Kohler's medizinal – pflanzen, Vol. 1, Bentley and Trimen, Med plant,114.

Hedstrom, L. (2002). Serine Protease Mechanism and Specificity.*Chemical Reviews*, 102(12): 4501-4524.

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.

Hillocks, R.J and Waller,J.M. (1997).Soil borne disease of tropical crop. CAB international .

Hiroshi, Y., Takuya, M., Yuko, N., Tatsuji, O. and Teruo, I .(1994).Cucumisin , aSerine Protease from fruit , Shares structural Homology with subtilisin and is Generated from alarg precursor.J.Bio Chem,269 (52):32725-32731.

Huang , K.; Akoh, C.C. and Erickson ,M.C.(1994).Enzymatic modification of melon seed oil **:** In corporation of eicosapentaenoic acid. J.Agric.food chem,42**:**2646-2648**.**

Janson, J.-C. and Ryden, L. (1998). Protein purification principles, high-resolution methods, and application. 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc, pp. 695.

Jaouadia,B.; Chaabouni,E.S.; Rhimi,M.and Bejar,S.(2008). Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency.

Jawetz , M; Adelberg, E.A.; Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Medical Microbiology. (22nd ed.) McGraw-Hill Company, New York.

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.

Kaneda, M. and Tominaga, N.(1975). Isolation and characterization of a protease from the sarcocarp of melon fruit, J. Biochem. 78 : 1287–1296.

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.

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.

Kobayashi, K.; Sato, S.; Hotta,Y.; Miyajima,N.; Tanaka,A.and Tabata,S.(1994). Characterization of cDNAs induced in meiotic prophase in lily microsporocytes, DNA Res. 1 : 15–26.

Kornberg, A. (1990). Why purify enzyme In: Methods in enzymology (ed. M.P. Deutscher). Vol. 182: 1-5. Academic press. New York.

Krischiner, B.S. and Black , D.D.(1998).The Gastrointestinal track Behman, R.E. and Kliegman , R.M. In; Nelson Essentials of pediatrics,3 rd ed. Philadelphia.

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.

Kumari, M.; Sharma,A. and Jagannadham, M.V.(2009). Benghaleusin, ahighly stable serine protease from latex of medical plant *Ficus benghlensis*. J.Agric Food chem .57(23):11120-11126.

Kumari,M.;Sharma,A.and Jagannadham, M.V.(2010).Deolorization of crude by activation characterization ,purification and physcio-chemical characterization of religiosin amilk –clotting serine protease from the latex of *Ficus religiosa* .J.Agric Food chem.58(13):8027-8034.

Kumari,M.;Sharma.A. and Jagannadham, M.V.(2012). Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*.Food . chem,131(4): 1295-1303.

Ladhani, S., Poston, S.M and Evans,R.W.(1999). Staphylococcal scaldd skin syndrome : exfoliative toxin A (ETA) induces serine protease activity when combined with A_{431} cells. Acta Pediatr., 88(7) : 776-779.

Ladhani, S.; Konana, O.S.;Mwarumba,S and English, M.C. (2004). Bacteraemia due to *Staphylococcus aureus*. Arch. Dis. Child.,89 : 568-571.

Laloi, M.;McCarthy, J.; Morandi, O.; Gysler, C and Bucheli, P.(2002).teinases TcAP1 and TcAP2 From *Theobroma cacao* seeds. planta 215:754 -762.

Laplaze, L.; Ribeiro,A .; Franche,C .; Duhoux,E .; Auguy, F.; Bogusz,D. and Pawlowski,K.(2000). Characterization of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homologue of *Alnus glutinosa* ag12, Mol. Plant Microb. Interact. 13 : 113–117.

Laskowski, M. and Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annuareview* ,Biochemistry. 49, (1): 593 - 626.

Lawrence, P.L. and Koundal ,K.R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects.J .Biotechnology.5 (1).93-109

LeMinor,C and Veron, M.(1989) . Bacteriology Medical . 2nd ed ., Flammation, paris . Cited . By Ja'a Be – Allah S.M.F. (1999) .

Levy, O. (2004). Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. J Leukoc Biol 76, 1–16.

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.

Loewy , A. G **.**; Santer, U. V. ; Wieczorek , M.; Blodgett, J. K.; Jones, S. W. and Cheronis. J. C .(1993). Purification and characterization of a novel zinc- proteinase of *Aeromonas hydrophila.* J. BioChem. 268 :Pp , 907 .

Lowy, k. (1998). *Staohylococcus aureus* infections NEngl.J.Med.,339 520 - 532.

MacFaddin , J. F. (2000) . Biochemical test for identification of medical bacteria 3rd ed., the Williams and Wilkins Co., Londan.

MacFarlane, T. W. and Samaranayake, L. P. (1989). Fungal infection. In clinical oral microbiology. London: Wright, 122-39.

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 .

Marianne ,D.,Giordano, H. and Delotto, R.(2001). Autoproteolysis and feedback in aprotease cascade directing *Drosophila* dorsal-ventral cell fate.J. EMBO.20 (10): 2387-2393.

Mayville , P.; Beavis,G. JI.R; Yang, H.; Goger , M.; Novick ,R.P and Muir,T. W.(1999).Structure activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence . Proc . Natl . Acad . Sci . USA 96 : 1218- 1223 .

Means , G. E. and Feeny , R. E. (1971) . Chemical modification of proteins . Holden – Day Inc. San Francisco. metuliferus, J.

Mellado,E.,Diaz-Guerra,T.M.,CuencaEstrella,M.(2000).Characterization of apossible nosocomialaspergillosis outbreak.J .Clin Microbiol Infect;6:543-548.

Menon.M., Vithayathil,P,J.; Raji, S.M and Ramadoss,C.S.(2002). Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium granii* Hook, ، f ، , Plant Sci. 163: 131-139 .

Mitchell, A.D. and Taylor,I.E. (1969).Cell wall proteins of *Aspergillus niger* and *Chaetomium globosum*. J.gen Microbiol, 59(1):103-109.

Moubasher , A. H. and AL-Subia, A.T.(1987) Soil fungi instand of Qatar, University of Qater .

Moustafa,A.F.(1982). Taxonomic studies on the fungi of Kuwait. Aspergillus j. Uni.Kuwait (Sci)., 9: 245-260.

Mufti, A., Key, S.K and Yeon G. Y. (2006). Rumaisase anovel serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi. Phytochemistry,67: 870-875.

Müntz, K.; Belozersky,M.A.; Dunaevsky,Y.E.; Schlereth,A. and Tiede-mann,J.(2001). Stored proteases and the initiation of storage protein mobiliza-tion in seeds during germination and seedling growth, Journal of Exp. Bot. 50 : 1741–1752.

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

Murry, R.;Granner,D.;Mayes,P.and Rodwell,V.(2003).Harper's Illustrated Biochemistry.Twenty-sixth edition .Mc Graw-Hill companies,Inc.USA.

Muthulaskshmi,C.Gomathi, D.;Kumar,D.;Ravikumar,G.;Kalaiselvi,M. And Uma,C.(2011).Production,Purification and Charactrization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation .Jordan Journal of Biological Sciences . 4(3):137-143.

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

Neurath, H., (1989) . Proteolytic processibg and physiological regulation. Trends Biochem. Sci., 14 : 268-277.

Nmila, R.; Gross, R.; Rchid, M.; Manteghetti, M.; Petit, P.; Tijane, M;Ribes,G and Sauvarie, Y.(2000). Insulintropic effect of *Citrullus colocynthis* fruit extract. Planta Medical. 66, 413-423 .

Noble , C . W . (1998) .Skin bacteriology and role of *Staphylococcus aureus* infection . Br. J . Dermatol .,139 : 9 – 12 (12) : 4501-4524.

Noda, K.**,** Koyanagi,M and Kamyia, C. (1994). Purification and characterization of an endoprotease from melon fruit, J. Food Sci. (59): 585–587.

Nolt. (1982). Pathogenic microorganisms and the host, P.523- 555, Oral Microbiology, (4th ed.), The C. V.Mosby Company, S. T. Louis. Tornto. London.

North , M . J **.** (1982) . Comparative biochemistry of the protease of eukaryotic microorganisms Microbiol . Rev, 46 (3) : 308 – 340 .

Novak , R . P . (2000) . Pathogenicity factors and their regulation, P. 392 - 407 . In V. A . Fischetti , R . P . Novick , J . J . Ferretti , D . A.

Odds, F. C. (1988). Candida and Candidiosis. Areview and biblography. 2nd ed. London: Bailliere Tindall, 42-59.

Otto, H. H. and Schirmeister, T. (1997). Cysteine proteases and their inhibitors. *Chemical Reviews*. 97(1): 133-171.

Palevitch, D. and Yaniv, Z. (1991). Medical plants of the Holyland. (in Hebrew) Tamus Modan-press, Tel AVIV. P. 56-58.

Pandey, M.,Dubey,T.K.,Yadav, S.C. and Jagannadham, M.V.(2006). Novel serine protease from *Cryptolepis buchanani*, J.Agric. Food Chem , 54 (26):10141-10150.

Pandey,M.;Dubey,T.K.;Yadav,S.C. and Jaggandham,M.V.(2006).Novel serine protease from Cryptolepis buchanani.J.Agric.Food Chem.54(26): 10141-10150.

Patel, A.K., Singh ,V.K. and Jagannadham, M.V.(2007). Aserine protease from noxious plant weed Ipomoea carnea .J.Agric. Food Chem.,55 :5809-5818.

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.

Pearl, L. (1987). Sequence specificity of retroviral protease . Nature,328(6130).pp 351-354.

Pitt, J. I. and Hocking, A. D.(1997). Fungi and food spoilage. Second edition Blackie Acadmic. Professional Press Cambridge.

Poulle, M and Jones, B.L. (1988). Aproteinase from germinating barley. Purification and some physical properties. J Plant Physiol. 88:pp 1454–60.

Power, F.B.and Moore.C.W.J.(1910).Chem.Soc., 97:99,Cited by; Rizk, A.M (1986). Iridoids and flavonoids of Teucrium polium herb.Planta Med.(2)87-8.

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.

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

Ravi, P. Y. , Ashok K. P and Jagannadham M.V.(2011). process Biochemistery,46: 1654-1662.

Rawling,N.D. and Barret,A.J. (1994). Familis of serine peptideses, Method Enzymol. 244:16-19.

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

Rehm , S, and Wessels , J.H.; Sci.food ,Agric., 8 :687.(1957).Cited by Rizk, A.M (1986) .

Ribeiro, A . ; Akkermans,A . D . ; Kammen,A . V . ; Bisseling,T . and Pawlowski, K.(1995).A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like pro-tease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development, Plant Cell. 7 : 785–794.

Rizk, A.M. (1986). The phyto chemistry of the flora of Qatar, 1/E.pp:110-117, University of Qatar ,Doha, king print of Richmond, UK .

Roberts , I.N.; Murray, P.F.; Caputo,C.P. S. and Passeron, A.J. B. (2003). Purification and characterization of a subtilisin-like serine protease induced during the senescence of wheat leaves, Physiol. Plant118 : 483–490. .

Ryan ,S.N. Laing,W.A, and McManus,M.T.(1998).Acycteine protease inhibitor purified from apple fruit .Phytochemistry ,49 (4):.957-963.

Ryan, C.A. and Walker,S.M. (1981). Plant proteinases. In : The biochemistry of plants. Marcus, A. (Ed.). Academic press. New York. Vol. 6.

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.

Sawaya,W.N.; Daghir , N.J. and Khalil,J.K. (1983). *Citrullus colocynthis* seeds as apotntial source of protein for food and feed .J.Agric. Food Chem., 34:285-288.

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

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.

Sharma,A.;Kumar,M. and Jagannadham, M.V.(2012). Religiosin C, a cucumisin-like serine protease from *Ficus religiosa*.Biochem,47(6):914-921.

Sharma,N. and.De,K.(2011).Production ,Purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamari* [EF661565.1].Agric. Biol.J.N.Am.2(7):1135-1142.

Shaw, L.; Golonka, E.; Potempa, J. and Foster, S.J. (2004). The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus.* Microbiology, 150: 217- 228.

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

Smith, J.F. and Berry. D.R. (1978). Development mycology. In : The filamentous fungi. Edward Arnold publisher. 3: pp. 464.

Takeuchi , S.; T. Kinoshita .; T. Kaidoh and N. Hashizume . (1999) Purification and characterization of protease produced by *Staphylococcus aureus* isolated from a diseased chicken . Veterinary Microbiol . 67: 195 -202 .

Tan , H . H . ; Tay , Y .K. and Goh, K . (1998) . Bacterial skin infections at a tertiary dermatological center . Singapore . Med. J., 39 (8): 353 - 56 .

Todar , k. (2007). "Pathogenic E.coli " .Online Textbook of Bacteriology . University of Wisconsin –Madison Department of Bacteriology .

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

Tornero, P.V. and Conejero,P.V.(1996).Primary structure and expression of apathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants; similarity of functional domains to subtilisin like endoprotease . proc.Natl. Acad.Sci. USA.93-6332-6337.

Townsed,C.C. and Guset , E.(1980). Flora of Iraq .Coranaceae to Rebiaceae.Ministry of Agriculture and Agraeian Reform Baghdad,Iraq 4(1): 194-197.

Tsao,A.S.; Kim .,E.S. and Hong ,W.K.(2004). Chemoprevention of cancer. C.A.cancer J.clin. 54:150-168.

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

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.

Uchikoba, T., Hosoyamada, S., Onjyo, M., Arima, K., Yonezawa, H. and Kaneda, M.(2001). A serine endopeptidase from the fruits of *Melothria japonica* (Thunb.) Maxim, Phytochemistry 57 : 1–5.

Uchikoba, T., Yonezawa , H. and Kaneda, M.(1995).Cleavage specificity of cucumisin , aplant serine protease . J. Biochem ., 117: 1126-1130.

Uchikoba,T., Niidome,T., Sata,I.and Kaneda,M.(1993) Protease-D from the sarcocarp of honeydew melon fruit, Phytochemistry, 33 :1005– 1008.

Udayasekhara, R .(1994). Nutrient composition of some less-familiar oil seeds.Food chem. . 50: 379-382 .

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

Valueva .T.A. and Mosolov, V.V. (2004). Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defence against phytopathogenic micro-organisms. Biochem .69:1305-1309.

Valueva .T.A. and Mosolov, V.V. (2005). Proteinase inhibitors and their function in plants : Areview. Biochemistery and Microbiology.41 (3):227-246.

Volesky, B. and Luong (1985). Microbial enzymes production, purification and isolation CRC (Critical Reviews in Biotechnology), 2: 119-149.

Walter, J.B and Talbot, L.C.(1996).Walter and Talbot General pathology. 17th , ed.,Churchill Livingstone , Medical Division of pearson professional Limited.

Wasfi, I.A. (1994) .Some pharmacological studies on *Citrullus colocynthis* .J, of the herbs , species and medical plant .2 :65-79.

Whiley, R.A. and Hardie, J.M.(2009).Genus I .Streptococcus Rosenbach 1884.Bergey's manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes (2nd ed.). Springer. 3:655-711.

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 .

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

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

Wilkinson, B.J . (1997) . Biology . In : Crossley KB , Archer GL , eds . The staphylococci in human disease . New York : Churchill Livingstone , 38 .

Wu, T.; Samaranayake, L. P.;Leung, W. K. and Sullivan, P. A. (1999). Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme. J. Med. Microbiol. (48): 721-730.

Xiubao, Q. and C. Xiulan(1984).A study of the purifications and sc properties of alkaline proteinase from *Bacillus pwnillus* strain .J. Acta, Microbiol. Sin. 24 (1) : 66-73. Cited from Biol. Abst. 1: 78: 94799 .

Xu, F. X. and Chye, M. L. (1999). Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal. *The Plant Journal*, 17(3):321 –327.

Yadav, S.C., Pande, M., Jagannadham, M.V.(2006). Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*.*Phytochemistry*, 67(14): 1414–1426.

Yadav,S.C.;Pande ,M. and Jagannadham, M.V.(2008).Purification, Biochemical and functional characterization of Milin from latex of *Euphorbia milii*. Phytochemistery,64(14): 1414-1426.

Yah, S.C.; Eghafona, N.O.; Enabulele, I.O. and Aluyi, H.A.S. (2006). Ampicillin usage and ampicillin resistant (Ampr) plasmids mediated *E. coli* isolated from diarrheagenic patients attending some teaching hospital in Nigeria. Shiraz. Med J, 7 (4):1-12.

Yamagata, H., Ueno, S. and wasaki , T.(1989) Isolation and characterization of a possible native cucumisin from developing melon fruits and its lim-ited autolysis to cucumisin ,Agric. Bio Chem. 53 1009–1017.

Yandri. ;Suharti, T.; Herasari, D.and Hadi, S.(2008). The chemical modification of protease enzyme isolated from local bacteria isolate Bacillus subtilis ITBCCB 148 with cyanuric chloride polyethylenglycol. European Journal of Scientific Research .23(1):177-186.

Yaniv, Z.; Moshe, E. and Zur,M. (1994). Schafferman, D.; Elber, Y.; Ben-Evaluation of *Sinapis alba* as a rich source of erucic acid in seed oil. Indust. Crops Prod, 2: 137-142.

Yaniv, Z.; Shabelsky, E.; and Schafferman, D. (1999).Colocynth: Potential arid land oil seed from an ancient cucurbit. Journal Janick(ED),257-261.

Ye, Z.H.and Varner,J.E.(1996). Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*, Plant Mol. Biol. 30 :1233–1246.

Zhao, K.; Ping, W.; Hao, Q. Li, S.; Zhao, L.; Gao, T. and Zhou, D. (2009). *Aspergillus niger* var. taxi, anew species variant of taxol producing fungus isolated from *Taxus cuspidat*e in China .Journal of Applied Microbiology,107(4):1202-1207.

Zhen ,E. Y.; Brittain , I. J.; Laska, D. A.; Mitchell, P. G.; Sumer, E. U., Karsdal, M. A. and Duffin, K. L. (2008). Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. Arthritis and Rheumatism , 58(8) : 2420-2431.

Ziebandt , A. ; Weber , H.; Rudolph , J.; Schmid , R.; Hoper , D.; Engelmann , S. and Hecker , M. (2001) . Extra cellular proteins of *Staphylococcus aureus* and the role of Sar A and Sigma B. Proteomics 1:480 – 493 .

Summary:

This study is conducted in Al- Qadisiyah University – Science College . Five species were chosen from the cucurbitaceae *Citrullus colocynthis* L as well as *Cucumis sativas* L , *Cucurbita moschata* L. and *Cucurbita pepo* L to get information about the level of protease in study of these fruits The result showed that the fruits of *Citrullus colocynthis* had high level of the specific activity so it was chosen to study enzyme circumstances were chosen to get enzyme from *Citrullus colocynthis* by using different buffers with different concentration and PH .The solution of sodium phosphate buffer with 0.1 M and pH 7.5 was suitable to get enzyme which recorded high spesefic activity to 80.7 unit/ mg .The best portion of is 1:1 (w:v) compared to the other portions (1:2,1:3,1:4:1:5) which gave high spesefic activity 80.2 unit/mg. Also the time to get enzyme was chosen and it was 5 minute. The enzyme showed the best time to get high spesefic activity is 80.6 unit/mg.The study showed that when adding pvp of 0.5% (w:v) to the buffers , it is important to keep the enzyme protease purified by many steps including ammonium sulfate 50-60% and ion exchange DEAE-Cellulose and gel filtration on Sephacryl-S200 chromatography in two steps with fold 15.01 and yield 9.1%.

The results showed That is:

1. Molecular weighet of the enzyme was 50118 Da by gel filtration.

2. The activity of enzyme was checked towards four substrate casein, Bovin serum albumin ,Gelatin and Ovalbumin so the enzyme showed high tendency 100% towards casein while 66% with BSA , 49% with Gelatin and 33% with Ova albumin.

3. The standers pH of the activity was 7.5 and stable in (7-8.5).

4. The standers temperature of the activity of enzyme was 35 C

5. The enzyme keep in full activity for 30 min (25-40) C and lost 70% of activity with 60 C

6. The effect of some chemical compounds in the activity of enzyme showed that the enzyme not effected by KCl and $NaCl_2$ except low portion in 5,10 mM but increased in asmall portion clasping enzyme with $CaCl_2$ reached to 105% and 112% and $MgCl_2$ with 110% and 121% in the concentration of 5 and 10 Mm respectively . The inhibitors of thiol like cystein did not showed effect of the activity of enzyme, it kept the enzyme with it,s complete activity when keeping concentration of 5, 2mM from this substance .Also it was effected by chelating agent like EDTA , the enzyme kept 97% and 95% of it,s activity in the concentration of 1 and 10 mM

respectively while the activity of enzyme was inhibited with PMSF the activity was 35% and 5% in 0.1 and 1 mM respectively

Ministry Of High Education & Scientific Research
University Of AL-Qadisiya
Collage of Science

Characterization Of Protease partially purified from *Citrullus colocynthis* Fruits and Their inhibitory Effect on Some pathoginic Microbes

A thesis

Submitted to the Council of College of Science - University of AL-Qadisiyah in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master in Biology - Botany

By

Rawaa Majid Dakhil AL-Sefar

(B. Sc. Biol.-College of Science-AL–Qadisiya University-2011)

Supervised by

Assist .Prof.Dr.Nazar Abdulameer Hamzah

2015 A.C **1436 A.H**