دراسة تأثير دعائم التقييد في ثباتية انزيم اليوريز المنقى من بذور الحنظل *Citrullus colocynthis*

محمد عبدالله جبر الخفاجي غازي منعم عزيز

فسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بابل فسم التقنيات الأحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد

مفيد جليل عوض

كليـــة الطب / جامعة بابـــــل

(NJC)

(Received on 20/5/2008) (Accepted for publication 16/7/2008)

الخلاصه

افادت الدراسة الى امكانية تقيد الانزيم المنقى من بذور الحنظل باستعمال الجيلاتين والجينات الكالـسيوم اذ كانت نسبة التقيد 89% و80% على التوالي. وبينت نتائج توصيف اليوريز المقيد بالجيلاتين احتفـاظ الانـزيم المقيد بكامل فعاليته عند حضنه تحت 70 م لمدة 50 دقيقة. كما لوحظ ان اقصى فعالية للانزيم المقيد كانت عنـد درجة 80 م. وكانت قيمة الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم المقيد 7.5 وعند دراسـة الثوابـت الحركيـة لليوريز المقيد، ظهر ان معدلات قيم ثابت ميكالس (K_m) والسرعة القصوى V_{max} كانـت 181 ملـي مـولار و225 ملي مولار/دقيقة على التوالي عند استخدام اليوريا مادة اساس. وعند دراسة ثباتية الخزن للانـزيم الحـر والمقيد أوجدت الدراسة ان الانزيم المقيد بالجيلاتين يفقد 20% من فعاليته بعد 90 يوماً من حفظه فـي محلـول الفوسفات الدارئ بتركيز 50 ملي مولار ، وبرقم هيدروجيني 8 ، وبدرجة حرارة 4^0 م قياساً بالانزيم الحر الذي يفقد 50% من فعاليته بالظروف نفسها اعلاه. كما احتفظ الانزيم المقيد بالجيلاتين بكامل فعاليته عنـد الاسـتخدام العاشر ، بينما أحتفظ الانزيم المقيد بالجينات الكالسيوم بكامل فعاليته لحد الاستخدام الرابع.

Abstract

This study revealed that urease was immobilized by entrapment in gelatin and calcium alginate, the ratios of immobilization were 89% and 80% respectively. The result of immobilized urease characterization showed that the enzyme retained its original activity when it was incubated at 70 ºC for 50 minutes. The maximum enzyme activity of immobilized enzyme was 80 ºC and the optimum pH of activity was 7.5.

The study revealed that the K_m and V_{max} of the immobilized enzyme were 181 mM and 225 mM/Min. respectively, when the urea was used as a substrate.

As for the stability of storage for free and immobilized enzyme, the study showed that the immobilized enzyme by gelatin lost 20% of its activity after 90 days from keeping in phosphate buffer 50 mM, pH 8 at 4 ºC in comparison with free enzyme which lost 50% under the same condition. The enzyme immobilized by gelatin retained its original activity till the tenth use while the enzyme immobilized by calcium alginate retained its original activity till the fourth use.

عن وسط التفاعل ؛ لذا يؤدي الى تقليل كلفة الانتاج فضلاً عن مزايا التقيد الاخرى وهي الثباتية وامكانية اعادة استخدام الانزيم مرة اخرى .ان مصطلح الانزيم المقيد Immobilized enzyme ثبت من Katchalski-Katzir عام 1971[8] . وتمكن عدد من الباحثين من استعمال اساليب ومواد مختلفة لتقيد الانزيمات[9] فقد اختبرت حوامل مختلفة مع انزيمات مختلفة من هذه الحوامل مثل الالجينات Alginate، والمغنتيت Magnetite،والكابا-كاراجنين Kappa-Carrageenan، والكلوترالديهايد ، وثنائي الاثيل سليلوز DEAE-Cellulose، والكاربوكسي مثيل سليلوز CMC-Cellulose ، والكاربون المنشط Activated carbon ، والكولاجين ، والالومينا GM-Sephadex ، والالياف السليلوزية Nitrocellulose fiber ، والامبرلايت XE-97 Amberlite) (10و11)

تتضمن تقنيات تقيد الانزيمات اساليب وطرائق متنوعة من ابرزها:- [12].

أ- الامتزاز Adsorption ب-الربط التساهمي Covalent bonding

ج-الارتباطات العرضية Cross-linking

د-الاقتناص والتغليف Entrapment and Encapsulation

نظراً لخواص التقيد المهمة في الاغراض الطبية والصناعية فقد اهتمت دراسات حديثة في تقيد

المقدمة

اليوريز (Urea amidohydrolase EC.3.5.1.5) من الانزيمات المعتمدة على النيكل[1]. ويحفز اليوريز التحلل المائي لليوريا في النباتات والفطريات Fungi وعدد من الاحياء المجهرية الى مركبي الامونيا والكارباميت Carbamate (2و3) وتكون هذه العملية المحفزة انزيمياً اسرع بحوالي 10^{14} مرة من التفاعلات غير المحفزة ، علماً أن جزيئة الكارباميت المنتجة خلال هذا التفاعل تتحلل تلقائياً عند الرقم الهيدروجيني الفسيولوجي لتعطي جزيئة امونيا ثانية وثنائي اوكسيد الكاربون[4] .

لوحظ ان تحلل نواتج التفاعل تؤدي الى زيادة مفاجئة في الرقم الهيدروجيني وهي السبب الرئيس للتأثيرات الجانبية السلبية لعمل اليوريز في صحة الانسان والحيوان، فضلاً عن التأثيرات السلبية في مجالات اخرى مثل المجالات الزراعية[5] ويعد اليوريز اول انزيم تم بلورته بشكل نقي من فاصوليا الجاك Jack bean من قبل Sumner [6] وبعد 70 عاماً من بلورته تم معرفة تركيب الحالة الصلبة لليوريز Solid state structure عام 1995[7].

الانزيمات المقيدة

الانزيم المقيد هو الانزيم المحجوز Imprison في اطوار واضحة المعالم يسهل فصله

ملغم في 0.2 مليلتر من الـدارئ) المعلـوم عـدد الوحدات. بعد المزج يضاف الكلوترالديهايد بنـسبة لتكـوين الترابطـات 0.6W/V% حجـم/وزن Organic cross-linker العرضية العضوية . ثـم يمزج جيداً بدرجة حـرارة 28 م ويـصب علـى Glass plate سـم (7×4) الالـواح الزجاجيـة للحصول على طبقة خفيفة من الانزيم. وخزن على درجة حرارة 4 م لمدة 18 ساعة لاكمال الترابطات العرضية، غسلت طبقة انزيم اليوريز المرتبط برفق بمحلول دارئ الفوسفات لازالة غير المرتبط ويـتم حساب عدد الوحدات في محلول الغـسل لغـرض تحديد نسبة الانزيم المرتبط بالجيلاتين بعدها قطعت طبقة الجيلاتين المحتوية على الانزيم المقيد الى كتل صغيرة وتحفظ بالثلاجة بدرجة حرارة 4 ْم لغرض اجراء التجارب اللاحقة.

تقيد الانزيم داخل الجينات الكالسيوم

استخدمت طريقة الحجر (Entrapment) باسـتعمال الجينـات الكالـسيوم Ca-alginate في تقيد انزيم اليوريز المنقى مـن بذور الحنظل حسب الطريقة الموصوفة من[18].

طريقة العمل

اضف 2 مليلتر من الانزيم المنقى الى 10 مليلترات من محلول الجينات الـصوديوم ومزجـت جيداً بالتحريك المستمر على المحرك المغناطيـسي ولمدة 15 دقيقة مع التبريد بعـدها سـحب الخلـيط بوساطة محقنة طبية مزودة بأنبوب مطاط قطـرة 3 مليلترات ، يتم تقطير المزيج بالقرب مـن سـطح محلول 1% كلوريد الكالسيوم البارد حيث تتحـول الجينات الصوديوم الى الجينات الكالسيوم

$$2Na\ (\alpha\lambda\gamma\iota\nu\alpha\tau\varepsilon) + XX^{++} \rightarrow XX\alpha\ (A\lambda\gamma\iota\alpha\tau\varepsilon)_2 + 2N\alpha^{+}$$

انزيم اليوريز فقيد باستخدام ورق الداي مثيل اثيـل سـليلوز DEAE-cellulose [13] . كما استخدمت مـادة الكابـا-كـراجنين Kappa-Carrageenan [14] ومادة Alkylamine ومـادة Arylamine [15] في تقيد انزيم اليـوريز. كمـا استخدمت حبيبات الزجاج في تقيد اليوريز[16].

المواد وطرائق العمل

تم أستخلاص الأنزيم من بذور الحنظـل وتنقيتـه وتقدير فعاليته حسب طريقـة الخفـاجي (2007)(47) .

تقييد الانزيم

قيد انزيم اليوريز المنقى من بذور الحنظل في مادة الجيلاتين باستخدام طريقة الحجز باستعمال الجيلاتين المنشط بمادة الكلوترالديهايد تبعاً للطريقـة الموصوفة من قبل [17].

تقيد اليوريز في مادة الجيلاتين

المواد والمحاليل المستخدمة

أ- مسحوق الجيلاتين Gelatin powder

ب- الكلوترالديهايد Gluteraldehyde

ج- محلول الفوسفات الـدارئ بتركيـز 50 mM وبرقم هيدروجيني 8.

د- الواح زجاجية بأبعاد (4×7) سم.

طريقة العمل

تم وزن 0.8 غم جيلاتـين لتقيـد انـزيم اليوريز في 10 مليلتر من دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 50 ملي موار وبرقم هيدروجيني 8 لاجراء عملية الانتفاخ Swelling وسخن المزيج بدرجـة 50 درجة مئوية لمدة 5 دقائق لاكمال عملية الاذابة. برد المزيج وبعدها اضيف الانـزيم (بتركيـز 0.8

تقدير الثوابت الحركية للانزيم المقيد

قدرت قيم ثابت ميكالس (Km) والـسرعة القصوى (Vmax) في الكتل الجيلاتينيـة الحاويـة على اليـوريز حـسب طريقـة لاينـويفر-بيـرك Lineweaver-Burk plot.

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثـل لفعاليـة الانزيم الحر

المحاليل المستخدمة

حضرت محاليل عدة بتركيـز 50 ملـي مولار وبأرقام هيدروجينية تتـراوح مـن (4-10) وبفارق 0.5 من محلول الى اخر.

أ- محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 50 ملي مولار وبرقم هيدروجيني (4-6)

ب- محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 50 ملي مولار وبرقم هيدروجيني(6.5-8)

ج- محلول Tris الدارئ بتركيز 50 ملي مـولار وبرقم هيدروجيني (8.5-10)

طريقة العمل

حضرت محاليل المادة الاساس (500 ملي مولار يوريا) باستخدام محلـول الخـلات الـدارئ بتركيز 50 ملي مولار وبارقام هيدروجينية تراوحت ما بين 4-6 والمحضر على وفق الفقرة ومحلـول الفوسفات الدارئ بتركيز 50 ملي مـولار وبارقـام هيدروجينية 6.5-8 ومحلول Tris الدارئ بتركيـز 50 ملي مـولار وبارقـام هيدروجينيـة 8.5-10 والمحضر على وفق الفقرة .

قدرت فعالية الانزيم الحر في كل محلـول من محاليل المادة الاساس ذات القيم المختلفـة مـن الارقام المختلفة الهيدروجينية ورسمت العلاقة بـين الفعالية الانزيمية والرقم الهيدروجيني لتحديد الـرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم الحر.

وبشكل كرات ذات قطر 3 ملليترات .

غسلت الكرات مرات عدة بمحلول كلوريد الكالسيوم المعقم لازالة الانزيم غير المرتبط وقيست الفعالية في محلول الغسل لتحديد نسبة ارتباط اليوريز

توصيف الانزيم المقيد

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثـل لليـوريز المقيد بالجيلاتين

تم تقدير الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية اليوريز المقيد في الكتل الجيلاتينية وذلك بأخذ (1-2) من الكتل الجلاتينية الحاوية على عدد الوحـدات ذاتها الموجودة في الانزيم الحر. واستعملت المحاليل نفسها المستخدمة في تقـدير الـرقم الهيـدروجيني الامثل للانزيم الحر ، واتباع طريقة العمـل ذاتهـا ورسمت العلاقة بين الفعالية الانزيمية حيال الـرقم الهيدروجيني لتحديد الـرقم الهيـدروجيني الامثـل لليوريز المقيد بالجيلاتينن.

تعيين درجة الحرارة المثلى لثبات وفعاليـة الانزيم المقيد بالجيلاتين

تم حضن (1-2) من الكتـل الجلاتينيـة الحاوية على اليوريز وبعدد الوحدات ذاتها الموجودة في الانزيم الحر مع محلول مادة التفاعل، وقـدرت الفعالية الانزيمية في مدى من درجـات الحـرارة تراوح بين (20-90) م. ثم رسمت العلاقـة بـين درجات الحرارة والفعالية الانزيمية لليوريز المقيد.

ولاجل تعيين ثبات الانزيم المقيد لفتـرات زمنية مختلفة تم حضن (1-2) من الكتل الجيلاتينية الحاوية على اليوريز بدرجة حـرارة 40 م و70 م ولمدة تراوحت من 0-60 دقيقة، بـردت الانابيـب مباشرةً بحمام ثلجـي للتبريـد. وقـدرت الفعاليـة الانزيمية المتبقية (%) ورسمت العلاقة بين النـسبة المئوية للفعالية المتبقية والمديات الزمنية المختلفة.

اختبار كفاءة مادة التقييد

استخدمت طريقة الاقتناص Entrapment في تقيد الانزيم قيد الدراسة باستعمال الجينات الكالسيوم Ca-alginate شكل (1) والجيلاتين شكل (2) وهذه الطريقة احد طرائق الحجر الفيزيائي حيث تحتجز الانزيمات داخل شبكة Lattices تتكون نتيجة لكوثرة الهلام. وهذه الشبكة تسمح بانتشار جزئيات المادة الاساس ذات الوزن الجزيئي الواطيء ونواتج التفاعل. ان المواد المستعملة في هذه الطريقة اغلبها مواد محبة للماء Hydrophilic. كما وان الانزيمات لا تشترك في ارتباطات كيميائية مع حواملها.

اظهرت نتائج الدراسة كفاءة التقيد باستعمال الجينات الكالسيوم والجيلاتين مع افضلية التقيد بالجيلاتين قياساً مع الطرائق الاخرى والجينات الكالسيوم حيث بلغت الفعالية المتبقية للانزيم المقيد بالجيلاتين حوالي 89% ، بينما كانت80 % في الطريقة الاخرى شكل (3). لقد اختلفت نسبة التقيد باختلاف مادة وطريقة تقيد الانزيم فكانت 50% عند تقيد اليوريز باستخدام متعدد الاكريل امايد والجينات الصوديوم [19]، و56% عند استخدام Fannel cloth المنشط بالكلوترالديهايد[20] ، و51% عند استخدام ورق ثنائي اثيل امينو اثيل سليلوز DEAE-cellulose[13] ، و75% باستخدام الجيلاتين [21]، وبلغت 92.3% و90% عند استخدام Alkylamine وArylamine على التوالي[22]. ان الدراسات المذكورة آنفاً جميعها قد استخدمت اليوريز المنقى من بذور البسلة الهندية.

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم

لتحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم اليوريز المنقى، قدرت الفعالية الانزيمية في مدى من درجات الحرارة تراوح بين (20-90) م ثم رسمت العلاقة بين درجات الحرارة وفعالية الانزيم لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم الحر.

الثبات الحراري للانزيم

تم حضن اليوريز المنقى في حمام مائي بدرجات حرارية مختلفة تتراوح بين 5-90 م ولمدة 30 دقيقة ، ثم نقلت الانابيب الحاوية على محلول الانزيم مباشرةً الى حمام ثلجي، وقدرت الفعالية المتبقية) ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة والفعالية المتبقية % لتعيين درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم.ولاجل تعيين ثبات الانزيم لمدد زمنية مختلفة فقد حضن المحلول الانزيمي في حمام مائي بدرجة حرارة 40 م و70 م ولمدة تراوحت من 0-60 دقيقة، وسحبت كمية من الانزيم المعامل حرارياً كل 5 دقائق ومباشرة نقلت الى حمام ثلجي للتبريد. ثم قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية ورسمت العلاقة بين المديات الزمنية المختلفة والفعالية المتبقية للانزيم%.

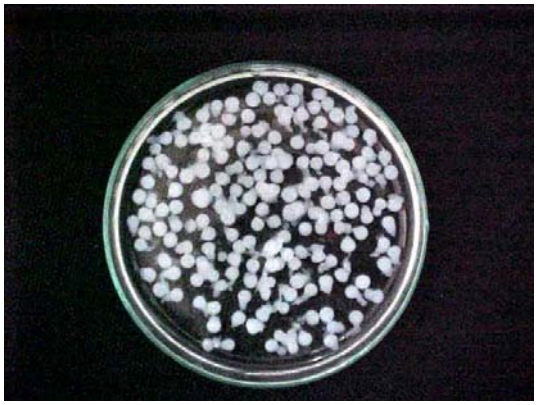
النتائج والمناقشه

اختبار كفاءة مادة التقيد

حضرت تراكيز مختلفة من المادة الاساس (100-800) ملي مولار باستخدام محلول الفوسفات الدارئ وبرقم هيدروجيني 7.5، ثم قدرت قيمة ثابت ميكالس (Km) ، والسرعة القصوى (Vmax) للانزيم حسب طريقة لاينويفر-بيرك Lineweaver-Burk plot (45).

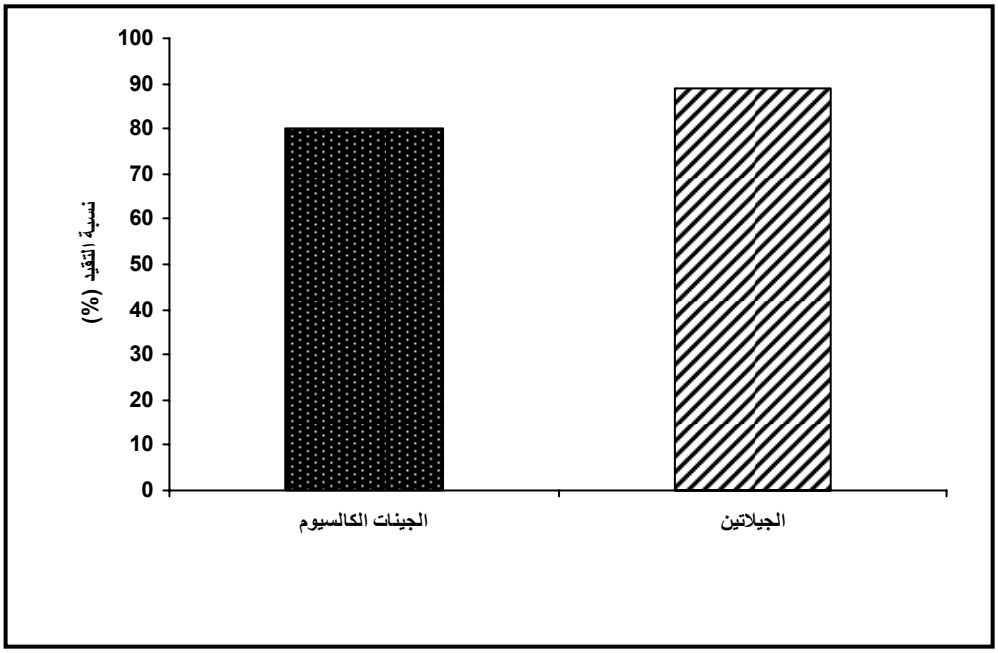
رخيصة نسبياً وغير سامة ، كما ان تنفيذها لا يحتاج الى اجهزة ومعدات معقدة. كما ان مقاومة انتـشار الكتلـــــــــــــــــــــــــــــــــــــــة Mass transfer resistance واطئة نسبياً قياسـاً بطرائق الاقتناص الاخرى[23].

ان استخدام الجيلاتـين فـي تقيـد انـزيم اليوريز المنقى من بذور الحنظل اعطى نسبة تقيـد 89% ، وقد استخدم في التجارب اللاحقة لما تمتاز به هذه الطريقة من صفات جعلتها ملائمة اذ تكـون هذه الطريقة يسيره وسهلة ، والكواشف المـستخدمة



شكل (1): انزيم اليوريز المنقى من بذور الحنظل والمقيد باستعمال الجينات الكالسيوم

شكل (2):أنزيم اليوريز المنقى من بذور الحنظل والمقيد باستعمال الجيلاتين.



شكل (3): نسبة تقيد اليوريز المقيد بالجيلاتين والجينات الكالسيوم.

Coupling بين الانزيم والجيلاتين محققاً واحدة من اهم اهداف التقيد الجيدة.

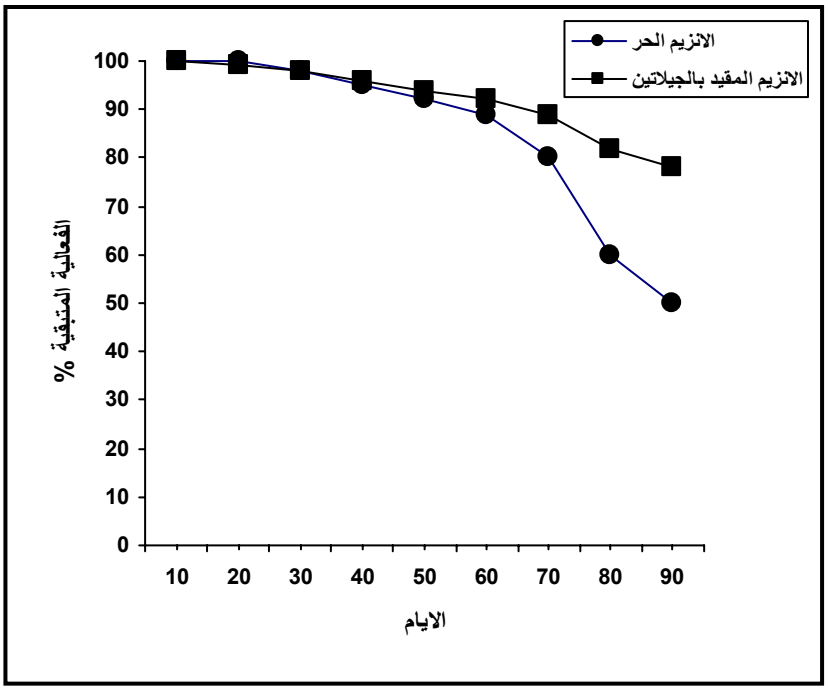
تشير الادبيات العلمية الى الاختلاف في الثبات الحراري لانزيم اليوريز وذلك حسب مصدر الانزيم وطبيعة المادة المستخدمة في التقييد . فقد وجد Srivastava وجماعته (2001)[21] أن انزيم اليوريز المنقى من بذور البسلة الهندية والمقيد باستخدام الجيلاتين يفقد 50 % من فعاليته بعد 240 يوم عند حفظه في دارئ Tris-acetate ذي الرقم الهيدروجيني 7.3 وبدرجة حرارة 4 م قياساً بالانزيم الحر الذي يفقد بما يقارب 25% من فعاليته خلال 50 يوماً. كما وجد Reddy وجماعته (2004)[13] ان انزيم اليوريز المقيد باستعمال ورق المبادل ثنائي اثيل امينو اثيل سليلوز يفقد 50% من فعاليته بعد 150 يوم من حفظه بدون محلول دارئ. كما درس

ثبات الخزن الحراري للانزيم المقيد

تعاني طرائق الاقتناص من نقصان من فعالية الانزيم بسبب عمليات الارتشاح التي تحصل للانزيمات المقيدة بهذه الطريقة وقد اشار Sankaran وجماعته (1989)[24] بالامكان التغلب على هذه المشكلة باضافة الكلوترالديهايد لتشجيع تكوين الترابطات العرضية. وقد اشارت النتائج الموضحة في الشكل(4) ان الانزيم المقيد بالجيلاتين قد احتفظ بـ78% من فعاليته بعد 90 يوماً من حفظه في محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 50 ملي مولار ، وبرقم هيدروجيني 8 ، وبدرجة 4 م قياساً بالانزيم الحر الذي يفقد 50% من فعاليته بعد 90 يوماً من خزنه بالظروف نفسها اعلاه. مما يؤكد ثبات انزيم اليوريز المقيد بالجيلاتين والمنشط بالكلوترالديهايد والذي يشير الى قوة الازدواج

فعاليته بعد 70 يوماً من خزنه بدرجة 4 م في دارئ Tris-acetate بتركيز 0.05 مولر برقم هيدروجيني 6.8 و7.0 عند تقيد باستعمال Alkylamine وArylamine على التوالي قياساً بالانزيم الحر الذي يفقد 90% من فعاليته عند حفظه بالدارئ نفسها اعلاه ، وبرقم هيدروجيني 7.3 وبالمدة نفسها.

الثبات الخزني للانزيم المقيد باستعمال Fannel cloth والالجنيت Alginate فوجد ان الانزيم يفقد 50% من فعاليته بعد 70 و75 يوماً على التوالي [19,20]. وفي دراسات أخرى قام بها Reddy وKayastha (2006b)[15] وجدا ان تقيد انزيم اليوريز المنقى من بذور البسلة الهندية يفقد 15% و17% من



شكل (4): فعالية انزيم اليوريز الحر والمقيد بالجيلاتين المحفوظ بالدارئ الامثل (دارئ فوسفات البوتاسيوم برقم هيدروجيني (8) خلال 90 يوم في درجة حرارة 4 م.

البسلة الهندية والمقيد بمادة الجيلاتين 30 مرة في تقدير نسبة اليوريا بالدم بفقرة فاصلة قدرها 24 ساعة بين استخدام واخر ، وبعد الاستخدام الثلاثين يبقى الانزيم محتفظاً بـ 67% من فعاليته. كما وجد Kara وجماعته (2006)[25] ان يوريز فاصوليا الجاك المقيد بطريقة الحجز باستعمال (C-A PEG) ومادة P(AAm-co-AA)/carrageenan يحتفظ

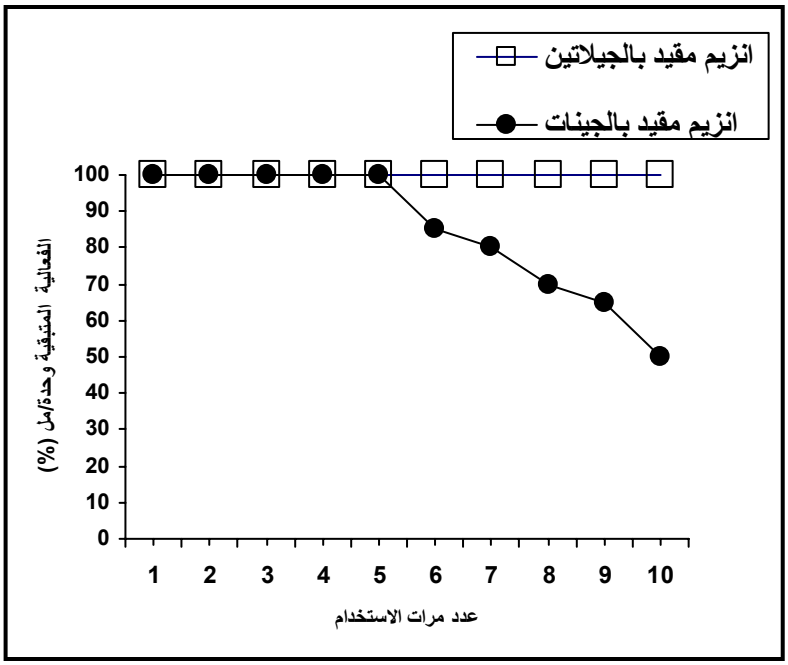
عدد مرات استعمال اليوريز المقيد

يوضح الشكل (5) عدد مرات استخدام انزيم اليوريز المنقى من بذور الحنظل والمقيد بمادة الجيلاتين المنشط بالكلوتراديهايد. وتشير النتائج الى امكانية استخدام الانزيم المقيد لاكثر من مرة فقد احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند الاستخدام العاشر. وقد اشار Srivastava وجماعته (2001)[21] الى امكانية استخدام انزيم اليوريز المنقى من بذور

حامض Gluronic acid ومصدر انتاج الهلام الذي تختلف صفاته باختلاف مـصدر انتاجـه كمـا وان صفاته تختلف ايضاً بالمصدر الواحد تبعـاً للجـزء المأخوذ منه وكما ذكر ان مصادر انتاج الجينيت هي الطحالب البحرية او قد يعود الى تحـرر ايونـات الكالسيوم المسؤولة عن الترابطات العرضـية بـين جزيئات المتعدد ؛ مما يؤدي الى زيادة فـي ذائبيـة الهلام ، كما ان وجود ايونات الفوسفات في الوسـط يزيد ذائبية الهلام ومن ثم تؤدي الى فقدان الـصفات المهمة للهلام (48). استخدمت الجينات الكالـسيوم في تقيد انزيم اليوريز المنقى من نوى التمر الزهدي المحلي فوجد ان الانزيم يحـتفظ بـ ـ 55% مـن فعاليته بعد الاستخدام الثالث وبعدها تنخفض الفعالية لتصل الى 20% بعد الاستخدام العاشر (49). ويعد الاستخدام المتعدد للانزيمات المقيدة احد التطبيقـات المهمة في حقل التقنيات الاحيائية.

بـ 55% و89% على التوالي مـن فعاليتـه بعـد الاستخدام العشرين خلال 5 ايام.

كما توضح نتائج الشكل (5) عدد مـرات استخدام الانزيم المقيد بالجينات الكاسيوم. وقد تبـين من النتائج امكانية استخدام الانزيم المقيد بالجينـات الكالسيوم لاكثر من عشر مرات مع الاحتفاظ بكامل فعاليته عند الاستخدام الرابع ، ثـم بـدأت فعاليتـه بالانخفاض لتصل الى 50% من الفعالية المتبقية بعد الاستخدام العاشر قياساً بالانزيم المقيـد بـالجيلاتين والذي احتفظ بكامل فعاليته حتى الاستخدام العاشر. وربما يعود ذلك وكما ذكر سابقاً الى قوة الترابطات العرضية نتيجة لاستخدام الكلوترالديهايد والذي تمنع ارتشاح انزيم اليوريز المقيد بالجيلاتين. اما انخفاض الفعالية الانزيمية لانزيم اليوريز المقيـد بالجينـات الكالسيوم قد تعود الى اختلاف فـي قـوة تماسـك الهلام ومرونته والذي تعتمد على ما يحتويـه مـن



شكل (5): عدد مرات استخدام انزيم اليوريز المنقى من بذور الحنظل والمقيد باستعمال الجيلاتين وبالجينات الكالسيوم.

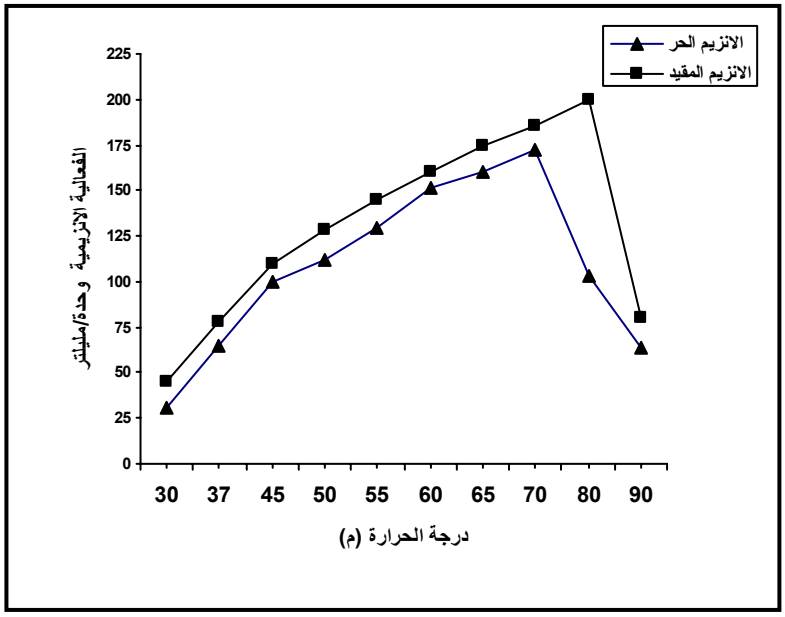
من خلال الترابطات العرضية المتكونة بين مجاميع الامين في كل من الجيلاتـين Protein polymer والانزيم [21]. فضلاً عن ذلك ان التقيد للانزيم هـو محاكاة لطبيعة الانزيمات عند الظروف الاعتياديـة في الخلايا الحية حيث تكون بشكل مرتبط بالغـشاء Membrane-bound form او مرتبطـة مـع جزيئات كبيرة اخرى ، وهي نادراً ما توجد بـشكل حر كما هو الحال في المستخلصات الانزيمية خارج جسم الكـائن الحـي[28]. وقـد ذكـر Kennedy (1987)[29] ان ارتفاع درجة الحرارة المثلى للانزيم المقيد يشير الى حقيقة كون الحـرارة الفعليـة فـي الهلام هي اقل ممـا عليـه فـي المحلـول Bulk solution.

لقد اتفقت عدد من الدراسات مـع النتـائج المستحصلة من هذه الدراسة التي اشارت الى ارتفاع درجة الحرارة المثلى للانزيم المقيد قياسـاً بـالحر وحسب مادة التقيد. فكانت درجة الحـرارة المثلـى لانزيم اليوريز المقيد باستعمال مـادة الكاربوكـسي مثيل سليلوز/الجينيت (CMC/AIg) 65 م قياسـاً بالانزيم الحر 50 م [30]. و75 م عند تقيـده فـي اغشية Chitosan المعاملة بالكلوترالديهايد [31]. كما ذكر Reddy وKayastha (2006b)[15] ان تقيـد انـزيم اليـوريز المنقـى مـن بـذور البسلة الهندية يظهر اعلى فعالية في درجـة حرارة 77 م وهي درجة الحرارة المثلـى نفـسها لفعاليـة انـزيم اليـوريز المقيـد باسـتخدام Chitosan[32]. فـي حـين ذكـر Srivastava وجماعته (2001)[21] ان درجة الحـرارة المثلـى لفعالية انزيم اليوريز المقيد باستخدام الجيلاتين هـي 65 م قياساً بالانزيم الحر 45 م.

تأثير درجة الحرارة في فعالية اليوريز الحر والمقيد بالجيلاتين

تؤثر درجة الحرارة في سرعة التفـاعلات الكيميائية بضمنها التفاعلات الانزيمية، حيث تتفاوت سرعة التفاعلات مع تغير درجة الحرارة علمـاً ان تأثيرها يكون نسبياً ولـيس مطلقـاً[26]. ولغـرض تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية اليوريز المنقـى من بذور الحنظل اجري التفاعل الانزيمي بـدرجات حرارة تراوحت بين 25-90 م ، حيث لوحظ ازدياد في سرعة التفاعل الانزيمي لليوريز الحر مع ارتفاع درجة الحرارة لحد 70 م اذ بلغت الفعالية الانزيمية اقصاها 160 وحدة/مليلتر ، ثم انخفضت عند ازدياد درجة الحرارة عن هذه القيمة حتى وصلت الى 60 وحدة/مليلتر عند درجة حـرارة 90 م شـكل (6). وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع مـا توصـل اليـه Jahns (1995)[27] حول امتلاك اليـوريز الحـر المنقى مـن *Sporobolomyces reseus* اعلـى فعالية في درجة حرارة 70 م وربما يعود ذلك الى بيئة وجود الانزيم والتركيب الوراثي له.

كما درس تأثير درجة الحرارة في سرعة التفاعل الانزيمي لانزيم اليوريز المنقى من بـذور الحنظل والمقيد بمادة الجيلاتين شـكل (6) فلـوحظ ارتفاع في سرعة التفاعل الانزيمي واتـضح مـن النتائج المبينة في الشكل ان الدرجة الحرارية المثلى لانزيم اليوريز المقيد هي 80 م قياساً مـع الدرجـة المثلى لليوريز الحر 70م. وبذلك يتبين ان اليـوريز المرتبط بالجيلاتين له القدرة على التفاعل بـدرجات حرارة اعلى من الانزيم الحر وربما يعود الـى ان طبقة الجيلاتين التي تشكل حماية للانزيم المـرتبط بها من التأثيرات الضارة لدرجات الحرارة المرتفعة



شكل (6): تأثير درجة الحرارة في فعالية اليوريز الحر والمقيد بالجيلاتين والمنقى من بذور الحنظل.

الظروف نفسها ؛ مما يؤكد ثبات الانزيم المقيد أتجاه درجة الحرارة والوقت قيد الدراسة قياساً مع الانزيم الحر المتأثر بتلك الظروف التي ادت الى فقدان كامل فعاليته بسبب عمليات المسخ غير العكسية التي تؤدي الى التغيرات التساهمية مثل : ازالة مجموعة الامين deamination من مخلفات الاسبارجين ، او التغيرات غير التساهمية مثل اعادة ترتيب سلسلة البروتين [33]. من الجدير بالذكر ان الارتفاع في درجات الحرارة يسبب تغايرات في التركيب الثلاثي للبروتين بسبب كسر الاواصر الهيدروجينية.

اكدت بعض الدراسات اهمية الجيلاتين في تحسين ثبات الانزيم أتجاه درجات الحرارة المرتفعة ، وفسرت ذلك الى الترابطات العرضية Cross-linking المتكونة بين الانزيم ومادة التقيد. فضلاً عن ذلك ان ارتباط الانزيم بمادة التقييد يعطي حماية للانزيم من التأثير المباشر للحرارة ، فجزيئات مادة التقييد تمتص جزءاً من الطاقة

الثبات الحراري لانزيم اليوريز الحر والمقيد

ان حضن الانزيم بدرجة حرارة 40 م وعلى اوقات مختلفة بقي الانزيم محتفظاً بكامل فعاليته لحد 50 دقيقة شكل (7). وبعدها لوحظ ان الانزيم الحر يفقد 6% من فعاليته بعد 60 دقيقة من الحضن. بينما احتفظ الانزيم المقيد بكامل فعاليته عند الظروف نفسها . قيس ثبات انزيم اليوريز الحر والمقيد بحضن الانزيم بدرجة حرارة 70 م شكل(8). فوجد ان الانزيم الحر يحتفظ بكامل فعاليته بعد 15 دقيقة من الحضن، وبعدها لوحظ ان الانزيم الحر يفقد ما يقارب 40% من فعاليته بعد 30 دقيقة من الحضن، في حين احتفظ الانزيم المقيد بكامل فعاليته. وكذلك يتبين من النتائج ان الانزيم الحر يفقد كامل فعاليته عند حضنه بدرجة حرارة 70 م بعد الدقيقة 50. فيما لوحظ الانزيم المقيد قد احتفظ بـ 85% من فعاليته عند حضنه لمدة 50 دقيقة عند

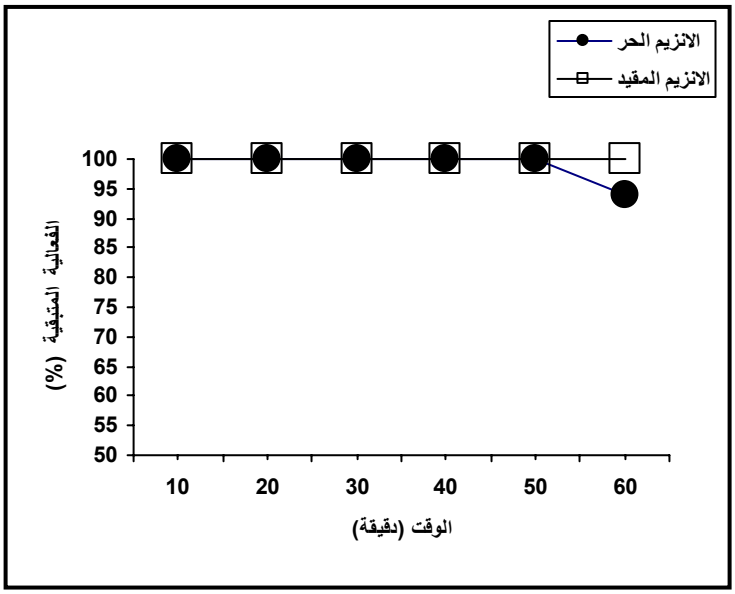
بكامل فعاليته بعد 15 دقيقة من حضنه بدرجة حرارة 70 م.

كما اشارت كثير من الادبيات العلمية الى الثبات الحراري العالي للانزيم المقيد قياساً مع الانزيم الحر وبنسب مختلفة تعتمد على طريقة التقيد ومصدر انتاج الانزيم[22,34,35,36]. كما ذكر Reddy وKayastha (2006b)[15] ان انزيم اليوريز الحر والمنقى من بذور نبات البسلة الهندية يفقد 78% من فعاليته بعد 15 دقيقة من حضنه بدرجة حرارة 77 م ، اما انزيم اليوريز المقيد باستعمال Alkylamine والـ Arylamine يبقى محتفظاً بـ 96% و98% من فعاليته على التوالي بعد 15 دقيقة من حضن الانزيم المقيد في درجة حرارة 77 م.

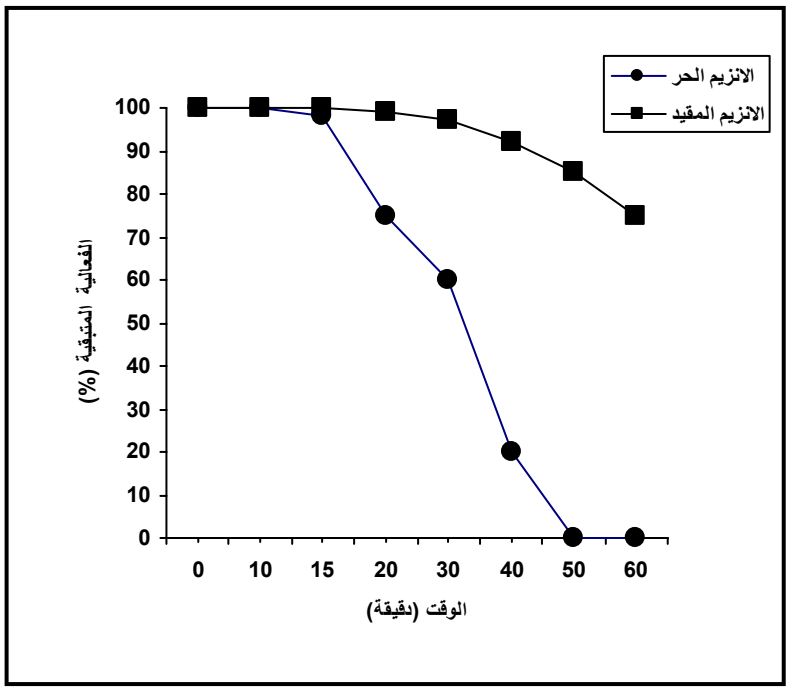
الحرارية مما يقلل تأثيرها في الانزيم. كما ان انخفاض الحركة الحرة للانزيم وثبات هيئته Conformation يساعدان في المحافظة على تركيب الانزيم بدون تغير عند ارتفاع درجة الحرارة وتقليل تعرضه للمسخ قياساً بالانزيم الحر[28].

ان زيادة الثبات الحراري للانزيم المقيد هو احد الفوائد الناتجة من تقييد الانزيمات مما له اهمية كبيرة في التطبيقات العلمية عن طريق الحفاظ عليه لمدة اطول عند خزنه بدرجات حرارة منخفضة.

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده Jahns (1995)[27] والذي اشار الى الثبات الحراري العالي لانزيم اليوريز المنقى من بكتريا *Sporobolomyces roseus* حيث يحتفظ الانزيم



شكل (7): الثبات الحراري لانزيم اليوريز الحر والمقيد والمنقى من بذور الحنظل عند حضن الانزيم بدرجة حرارة 40 م ولفترات زمنية مختلفة.



شكل (8): الثبات الحراري لانزيم اليوريز الحر والمقيد بالجيلاتين والمنقى من بذور الحنظل عند حضن الانزيم بدرجة حرارة 70 م ولفترات زمنية مختلفة.

الحفزي للانزيم وتأين مادة التفاعل ، فضلاً عن تأثيره في قابلية الانزيم على تحويل معقد الانزيم-مادة التفاعل الى ناتج[37,38]. وتقع فعالية الانزيم قيد الدراسة ضمن مدى الارقام الهيدروجينية لعدد من الدراسات والذي اختلف فيها الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم تبعاً لمصدر انتاجه فقد تتراوح بين 6-8 لكل من بذور فاصوليا الجاك وفول الصويا والبكتريا[2و39و40]. كما وتتطابق هذه النتائج مع نتائج دراسات محلية اخرى فقد كان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم اليوريز المنقى من بذور الرقي *C.vulgaris* مساوياً الى 8 [50]. وهو الرقم الهيدروجيني نفسه لفعالية انزيم اليوريز المنقى من نوى التمر [49].

اشارت دراسات اخرى حول تغاير الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية اليوريز

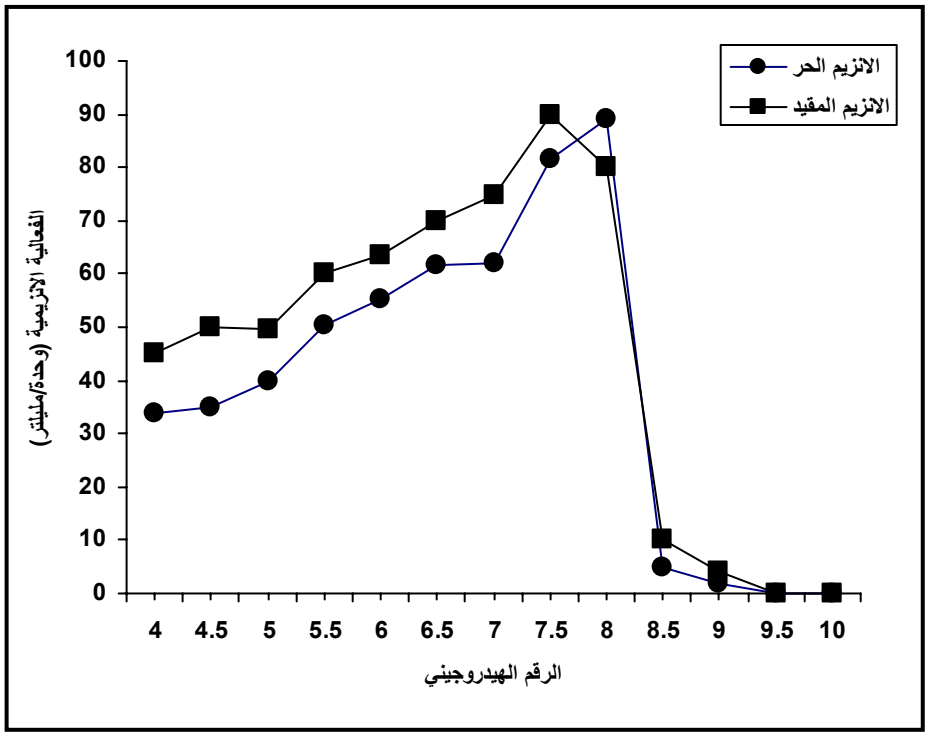
الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية اليوريز الحر والمقيد بالجيلاتين

درس تأثير ارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (4-10) على الفعالية الانزيمية لليوريز الحر والمقيد لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية. وقد اظهرت النتائج المبينة في الشكل (9) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لانزيم اليوريز الحر والمقيد بمادة الجيلاتين هو 8 و7.5 على التوالي. كما لوحظ ان الانزيمين يفقدان فعاليتهما في الارقام الهيدروجينية الاعلى من 8 مع انخفاض واضح لفعاليتهما الانزيمية في الارقام الهيدروجينية الحامضية بين 4-5.5. ويمكن ان يعود تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في ارتباط المادة الاساس بالانزيم والحالة الايونية لمتخلفات الاحماض الامينية التي تشترك في الفعل

الهيدروجيني الامثل للفعالية الـى 8.5 عنـد تقيـده باستعمال Chitosan[32]. بينما وجد فـي دراسـة اخرى أن كل من اليوريز الحر والمقيد بمادة الكابا-كاراجنيين يظهـران اعلـى فعاليـة عنـد الـرقم الهيدروجيني نفسه 7 [14]. وربما يعود ذلك الى ما تحدثه مادة تقيد الانزيم من تحوير في سلوك جزئية الانزيم. وهذا يعتمد على شحنة المتخلفات الموجودة على السطح لكل من الانزيم ومادة التقيـد وطبيعـة الاواصر المتكونة بينها، لذا تحدث تغيرات مباشـرة قرب جزئية الانزيم مما قد يسبب تغايراً Shifte في قيمة الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية[28] .

المقيـد قياساً بالانزيـم الحـر[35,41]. حيث كـان الانزيم المقيد اكثر مقاومـة للظـروف الحامـضية والقاعدية تبعاً لمادة التقيد المستعملة. كـذلك سـجل تغاير في الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليـة انـزيم اليوريز المنقى من بذور البسلة الهندية من 7.3 الى 6.8 عند تقيده باستعمال ورق داي اثيل امينو اثيـل سـليلوز[13] ،والـى 6.5 عنـد تقيـده باسـتعمال الجيلاتين[21] ،والى 6.8 و7 عند تقيـده باسـتعمال Alkylamine وArylamine علـى التـوالي[15].

أما اليوريز المقيد باستعمال المبادل الايوني Ion-exchange textile يظهر اعلى فعالية عنـد الرقم الهيدروجيني 7.6. في حـين ارتفـع الـرقم



شكل (9): الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية اليوريز الحر والمقيد بالجيلاتين والمنقى من بذور الحنظل *Citrullus colocynthis*.

V_{max} بين الانزيم المقيد والانزيم الحر يمكن ان يعود الى اختلاف المادة المستعملة في تقيد الانزيم. ومعظم هذه الدراسات اشارت الى ارتفاع قيمة K_m للانزيم المقيد قياساً بالانزيم الحر. وقد يعود السبب في ارتفاع K_m وV_{max} لليوريز قيد الدراسة الى التغيرات التركيبية الداخلية التي تحدثها مادة التقيد. إذ ان التغيرات في V_{max} تشير الى التغيرات الوضعية (Conformational changes) في التركيب الثلاثي للانزيم والعوامل المؤثرة في قابلية ارتباط المادة الاساس بالموقع الفعال للانزيم [43] اما الارتفاع في قيم K_m فقد يعزى الى ما تبديه الطبقة غير المتحركة (الخاملة) Unstirred (Stagnant) layer التي تحيط بجزئيات الانزيم المقيدة من مقاومة لانتشار المادة الاساس او الى نشوء تراكيز متدرجة من المادة الاساس عبر هذه الطبقة، ومن المعروف أن هنالك بيئة مايكروية تحيط بالانزيم Micro environment والتي تتألف من المحلول الداخلي وجزء من الطبقة المحيطة الخاملة من المحلول والتي تتأثر بالصفات السطحية للانزيم المقيد وبيئة المحلول الكبير (Macro Bulk solution environment). ولكي يقوم الانزيم المقيد بفعله الحفزي يجب ان تنتشر المادة الاساس خلال تلك البيئتين ، لذا تحدث تجزئة للمادة الاساس بين تلك البيئيتين فجزئيات المادة الاساس يجب ان تنتقل اولاً عبر الطبقة الخاملة للوصول الى سطح الانزيم وتتحول الى ناتج ، ويسمى هذا بالانتقال الخارجي . ولكي يتم استعمال معظم الانزيم في الفعل الحفزي يجب ان تنتشر جزئيات المادة الاساس خلال الثقوب الموجودة في سطح الجزئيات المقيدة للانزيم ، وتدعى العملية بالانتقال الداخل. أي ان تشبع الانزيم يحتاج الى تراكيز عالية من المادة الاساس قياساً بالانزيم الحر ، وهذا يقود

تقدير الثوابت الحركية لانزيم اليوريز الحر والمقيد بالجيلاتين

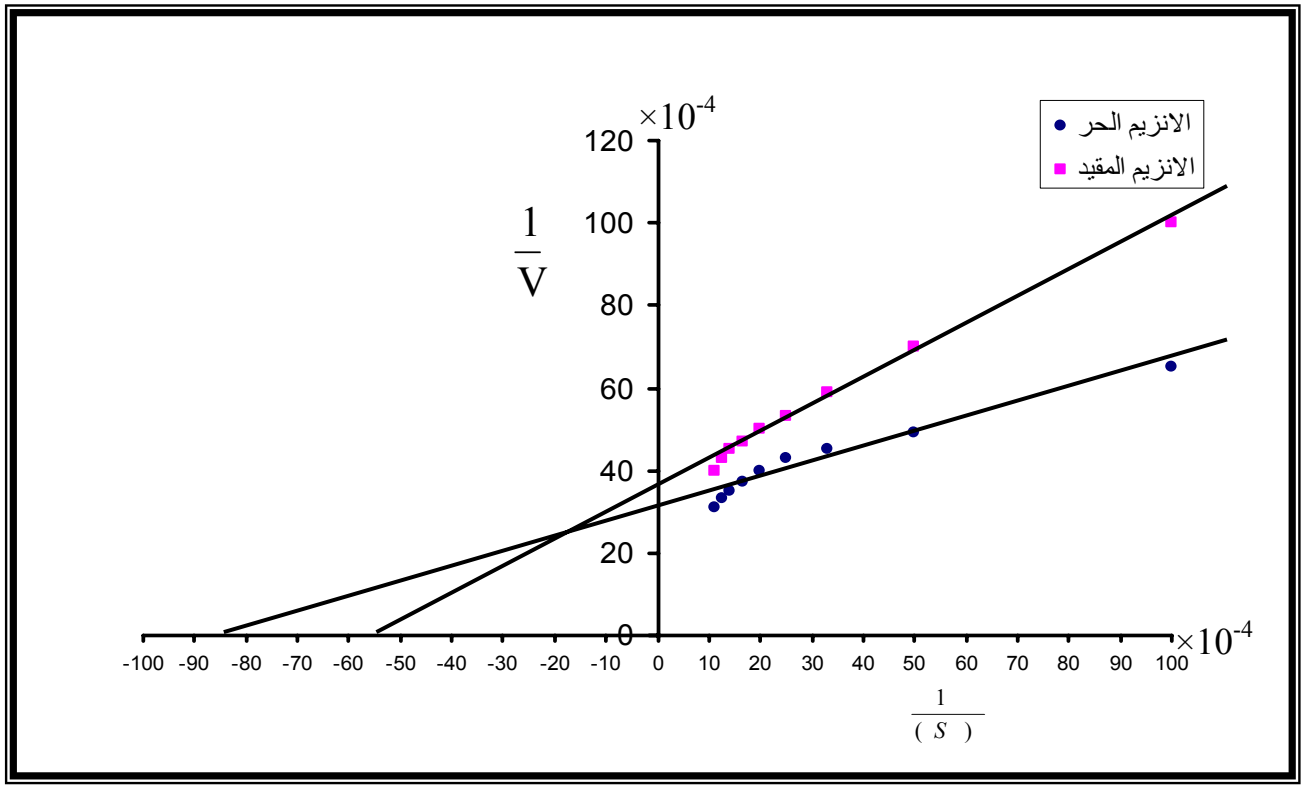
استخدمت طريقة لاينويفر-بيرك لرسم العلاقة بين مقلوب سرعة التفاعل ومقلوب تركيز المادة الاساس ، لتقدير ثابت ميكالس (K_m) والسرعة القصوى (V_{max}) للانزيم الحر والمقيد بالجيلاتين باستخدام اليوريا كمادة اساس ، وبتراكيز تتراوح بين 100-800 ملي مولار، وقد اظهرت النتائج المبينة في الشكل(10) ان قيمة ثابت ميكالس للانزيم المقيد بالكتل الجيلاتينية قد بلغت 181 ملي مولار ، وهي اعلى من قيمتها في الانزيم الحر اذ بلغت قيمة ثابت ميكالس للانزيم الحر 120 ملي مولار. في حين كانت السرعة القصوى للانزيم المقيد 225 ملي مولار/دقيقة وهي اوطأ مما هي عليه في الانزيم الحر(332 ملي مولار/دقيقة). ان اختلاف قيم ثابت ميكالس تختلف باختلاف مصادر انتاج الانزيم التي قد تشير الى تراكيز اليوريا في البيئات التي يوجد فيها الانزيم. كما يعود الاختلاف ايضاً الى الرقم الهيدروجيني والقوة الايونية للدارئ المستخدم. فقد كانت قيمة ثابت ميكالس 3.12 ملي مولار لانزيم اليوريز المنقى من بذور الرقي المحلية عند استخدام دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني 7.5 وباستخدام تراكيز مختلفة من اليوريا بمدى (1.25-10) ملي مولار(50)0. اما قيمة ثابت ميكالس لبذور الباقلاء فكان (1.3) ملي مولار باستخدام دارئ الترس-حامض الهيدروكلوريك (Tris-HCl) [42]. كما قدرت قيمة K_m وV_{max} لليوريز المنقى من بكتريا التربة *Bacillus pasteurii* بحوالي 235 ملي مولار و1960 ملي مولار/دقيقة على التوالي[46]

كما اشارت العديد من الادبيات العلمية الى ان اختلاف قيم ثابت ميكالس K_m وثابت السرعة

يؤدي الى ارتفاع قيم K_m للانزيم المقيد[32]. كما وجدت دراسة قام بها Das وGuibault (1970)[44] انخفاض في قيمة K_m لليوريز المنقى من فاصوليا الجاك والمقيد باستعمال هلام متعدد الاكريل امايد Polyacrylamide gel.

الى ارتفاع قيمة (K_m) للانزيم المقيد ، وحسب المادة المستعملة في تقيد الانزيم and [33]

وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما وجده Srivastava وجماعته (2001) بأن قيمة K_m للانزيم المقيد بالجيلاتين تزداد قياساً بالانزيم الحر. كما ان تقيد انزيم اليوريز باستعمال Chitosan



شكل (10): الثوابت الحركية لانزيم اليوريز المنقى من بذور الحنظل تجاه اليوريا بطريقة لابنويفر-بيرك Lineweaver Burk plot.

المصادر

1- Dixon, N.E.; Gazzola, C.; Blakeley, R.L. & Zerner, B. ***Am. Che. Soc***., 1975, **97**, 4131.

2- Mobley, H.L.T. & Hausinger, R.P.. ***Microbiol. Rev***., 1989, **53 (1)**, 85.

3- Friedrich, A.W.; Köck, R.; Bielaszewska, M.; Zhang, W.; Karch, H. & Mathys, W.. ***Journal of Clinical Microbiology,*** 2005, **43 (2)**, 546.

4- Basu, I.; Subrumanian, R.V.; Mathew, A.; Kayastha, A.M.; Chadha, A.; Bhattachary, E.. ***Sensors & Actuators B***., 2005, **107**, 418.

5- Ciurli, S.; Benini, S.; Rypniewski, W.R.; Wilson, K.S.; Miletti, S. & Mangani, S. ***Coordination Chemistry Reviews***., 1999, 331.

bioreactor. ***Biot. Bioeng***., 1990, **35**, 99.

19- Das, N. & Kayastha, A.M. & Malhotra, O.P., ***Biotechnol. Appl. Biochem***., 1998, **27**, 25.

20- Das, N. & Kayastha, A.M. ***World Journal Microbiology & Biotechnology***, 1998, **14**, 927.

21- Srivastava, P.K.; Kayastha, A.M. & Srinivasan..,***Biotechnol. Appl. Biochem***., 2001, **34**, 55.

22- Reddy, K.R.C. & Kayastha, A.M.. ***Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry***, 2006a, 1.

23- Wang, N.S.. Experiment No.7 enzyme Immobilization by Gel Entrapment.,(2004),www.glue.umd.edu.

24- Sankaran, K.; Godhole, S.S.; D'Souza, S.F. ***Enzyme Microb. Tech***., 1989, **11 (9)**, 617.

25- Kara, F.; Dermird, G. and Tumtuk, H., ***Bioprocess and Biosystems Engineering***, 2006, **29 (3),** 207.

26- DeSantis, P.C. ***JAIC***., 1983, **23 (1)**, 7.

27- Jahns, T. ***Springer Nethlands***, 1995, **68 (3)**, 209.

28- Mosbach, K. Methods in enzymology. (1976).Vol. 44. Academic press, New York.

29- Kennedy, J.F. Enzyme technology. In: J.F. Kenddd and J.M.S. Cabral (eds.), Biotechnology. Vol. 70. Weinhuin, (1987). Germany, UCH Publisher-Verlagsgesllschaft mbH, pp. 398-399.

30- Elcin, A.E. & Elcin, Y.M. ***Biotechnol***., 2000, **28 (1)**, 95.

31- Krajewska, B.; Leszko, M.; Zaborska, W., ***J. Chem. Technol. Biotechnol***., 1990, **48 (3)**, 337.

32- Kayastha, A.M. & Srivastava, P.K., ***Appl. Biochem. Biotechno,*** 2001, **96 (1-3)**, 41.

6- Sumner, J.B. ***J. Biol. Chem.***, 1926, **69**, 435.

7- Jabri, E.; Carr, am.b.; Hausinger, R.P.; Karplus, P.A.. ***Science***, 1995 , **258**, 998.

8- Katchalski-Katzir, E., ***Trends in Biotechnology***, 1993,**11**, 471.

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

10- Taylor, R.F. Protein immobilization, fundamental and application. Marcel Dekker Inc., New York Basel, (1991). HongKong

11- Norouzian, D., ***Iranian J. Biotechnology***, 2003, **1 (4),** 197.

12- Bickerstaff, G.FIn: Methods in Biotechnology, vol. 1. Immobilization of urease and cells. Ed. Bickerstaff, G.F. Humana press, Inc. .(1997). Totowa, NJ. Pp. 1-11.

13- Reddy, K.R.C.; Srivastava, P.K.; Dey, P.M. & Kayastha, A.M. ***Biotechnol. Appl. Biochem***., 2004, **39**, 323.

14- Baysal, s.h.; Karagoz, R.. ***Prep. Biochem. Biotechnol***., 2005, **35 (2),** 135.

15- Reddy, K.R.C. & Kayastha, A.M. Improved stability of urease upon coupling to alkylamine and arylamine glass and its analytical use. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 2006b, **38**, 104.

16- Pijanowska, D.; Remiszewska, E.; Pederzoli, C.; Lunelli, L.; Vendano, M.; Canteri, R.; Dudzinski, K.; Kruk, J. and Torbicz, W., ***Semsors*** , 2006, **6**, 370.

17- El-Shora, H.M.. ***Bot. Bull. Acad. Sin***., 2001, **42**, 251.

18- Guo, Y.; Lou, F.; Peng, Z.; Yuna, Z. & Korus, R.A.. Kinetics of growth and amylase production of immobilized *B. substilis* in an air life

33- Chaplin, M. and Chri Enzyme technology. (2004). http.//www. sbu. ae

34- Sheffield, D.J.; Harry, T.R.; Smith, A.J. and Rogers, L.T., ***Phytochemistry***, 1995, **38 (5)**, 1103.

35- Azari, F.; HosseinKhani, S.; Nemat-Gorgani, M., ***APPI.Biochem. Biotechnol,*** 2001, **94 (3)**, 265.

36- Reddy, K.R.C.; Turcu, F.; Schulte, A.; Kayastha, A.M. & Schuhmann, W., ***Anal. Chem.***, 2005, **77**, 5063.

37- Fullbrook, P.D. (1983). Kinetics (practical applied kinetics). Chapter 2. pp 67-70. In: Godforg, T. & Riechelt, J. Industrial Enzymology(1983).. The Nature press, U.K.

38-Chesworth, J.M.; Stuchbury, T.; Scaife, J.R., An Introduction To Agricultural Biochemistry. Chapman & Hall, London. (1998)

39- Kerr, P.S.; Bievins, D.G.; Rapp, B.J. & Randall, D.D., ***Physiol. Plant***, 1983, **57**, 339.

40- Polacco, J.C. & Winker, R.C., ***Plant Physiol***., 1984, **74**, 800.

41- Lin, C.C.; Yang, M.C., ***Biomaterials***, 2003, **24 (1)**, 1989.

42- Cesareo, S.D. & Langton, S., ***RFEMS Microbil. Lett***., 1992, **78**, 15.

43- Goldstein, L.. Kinetic behavior of immobilized enzyme systems. Methods in enzymology(1976) (K. Mosbach Ed.) Vol. 44, pp. 397-443, Academic press, New York.

44- Guibault, G.G. and Das***, J. Anal. Biochem***., 1970, **33**, 341.

45- Segel, I.H. Biochemical calculations. (1976). John Wiley & Sons.

46- Ciurli, S.; Marzador, C.; Banini, S.; Delana, S. & Gessa, C. Soil Biol. Biochem., (1996). 28 (6): 811-817.

47- الخفـاجي ، محمـد عبـد الله جبـر . (2007) . **أطروحة دكتوراة . كلية العلوم . جامعة بغداد.**

48- عزيز، غازي منعم وعمران، محفوظة عباس. ***المجلة العراقية للتقانـة الاحيائيـة***.، 2003 ، المجلد **(2)**، العدد **1** صفحة 111.

49- الشكرجي، فريال حياوي محمد. (2004). رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

50- القيسي، فيحاء مفداد خليل. (2001). رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات- جامعة بغداد.