تنقية انزيم اليوريز المستخلص من بذور الرقي

انيس مالك الراوي* محمد مبارك علي طه** فيحاء مقداد خليل***

تاريخ قبول النشر ٢٠٠٦/٦/١٢

الخلاصة

تم في هذه الدراسة قياس فعالية انزيم اليوريز في مسحوق بعض البذور و وجد ان بذور الرقي جنس (*Citrullus Vulgaris*) تمتلك اعلى فعالية انزيمية يبلغ (353) وحدة/غم بروتين ودراسة الثباتية لانزيم المستخلص تحت ظروف التخزين المختلفة واظهرت النتائج ان الانزيم يفقد ثباتيته في وجود 2- مركبتو ايثانول والاثيلين داي امين تتراسيتات ثنائية الصوديوم EDTA تركيز 1 مللي مولاري لكل منهما وقد وجد ان اضافة الكليسرين بتركيز 10% للمحلول المنظم المستخدم في استخلاص الانزيم له تأثير فعالاً في حماية نشاط الانزيم وثباتيته.

نقي الانزيم من بذور الرقي (*Citrullus Vulgaris*) بخطوات التنقية اشتملت على الاستخلاص، الديلزة، المعاملة الحرارية، التجزئة بالاسيتون وكروماتوغرافيا التبادل الايوني باسلوب الوجبة (Batch wise) وبأستخدام عمود ثنائي اثيل امينو اثيل سيليلوز واوضحت نتائج الفصل ان الانزيم يوجد في شكلين هما (A) و (B) ويمكن فصلهما باستخدام محلول كلوريد الصوديوم بتركيز (0.2) و (0.3) مولاري على التوالي.

وقد بلغت الفعالية النوعية لهما (270.8) و (114.28) وحدة فعالية/ملغم بروتين حيث ان فعالية الانزيم (A) يفوق ضعف فعالية الانزيم (B). تم استكمال خطوات التنقية للانزيم (A) بالترشيح على عمود هلام السيفادكس G-200 وقد وصلت الفعالية النوعية للانزيم المنقى (204.54) وحدة فعالية / ملغم بروتين ويعني هذا تضاعفا في النقاوة مما هي في المستخلص الانزيمي الخام.

المقدمة:

يعد انزيم اليوريز (Urea amido hydrolase) احد الانزيمات التابعة للمجموعة المميزة (Hydrolase) ذي الرقم التصنيفي (.EC 3.5. 1.5) ويحتوي هذا الانزيم على النيكل لتحفيز التحلل المائي لليوريا لتحرير الامونيا وجزيئة الكارباميت (Carbamate) التي تتحلل تلقائيا لاعطاء جزيئة اخرى من الامونيا وحامض الكاربونيك وبعد حصول التوازن بين الامونيا والماء في جسم الكائن الحي (ينتج عنه هيدروكسيد الامونيوم مما يؤدي الى ارتفاع سريع للرقم الهيدروجيني (pH=9). (Andrews *et al*., 1984; Mobley and Hausinger, 1989)

تم تحديد فول الصويا Soy bean اول النباتات التي درست من قبل Takeuchi عام 1959 وتم العمل بها من قبل Kiesel عام 1911 و Zemplen عام 1912.

تم تشخيص هذا الانزيم في مجموعة كبيرة من النباتات وايضا لوحظ انتاج اليوريز في العديد من الكائنات المجهرية منها البكتريا والفطريات والخمائر (الاعفان، الطحالب) ولكنه لا ينتج في جسم الانسان.

Sumner and Somers., 1947; Blakeley) and Zerner., 1984; Philips *et al*., 1991; .(Smith *et al*., 1993

وان تكون اليوريز في النباتات يظهر كأنزيم اساسي بوضوح كمادة اساسية في النباتات على ان اليوريا تعد متوافرة بمختلف انواع النباتات والناتجة عن مسار انحلال مركبات اليوريدو (Ureido) في انسجتها (Shelp and .(Lreland, 1985

تم عزل اليوريز من البقول Jack beans) (*Canavalia Ensiforms* ، بشكل بلوري باستخلاصه بـ 30% حجم / حجم محلول الاسيتون. (Sumner, 1926; Reithel, 1971; Gazzola *et al*., 1973; Cesareo and .(Langton, 1992

ثم عزل اليوريز من فول الصوليا (*Glycin max*) (Soy bean)

* ا.د. / جامعة بغداد/ كلية العلوم للبنات

** أ.د./ وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

*** م./ جامعة بغداد/ كلية العلوم للبنات

(Polaco and Winkler, 1984). في عام 1941 تم اعادة بلورته (Recrystallization) بطريقة (Dounce) لاعطاء انزيم نقي (Bailey and Boulter, 1969).

ان طريقة كروماتوغرافيا الالفة كانت ناجحة لتنقية اليوريز المنتج من الباقلاء (Shobe and Brosseau, 1974) باستخدام مشتقات الهيدروكسي يوريا الهلامية، كذلك تمت تنقية انزيم اليوريز المستخلص من بذور فول الصويا بنفس الطريقة عام ١٩٧٩ من قبل (Polacco and Havir) وتضمنت الطريقة استخدام المعاملة الحرارية والترسيب بالاسيتون واستخدام المبادلات الايونية (Hydroxy apatite) والـ (Agarose – A- 15m) (Magana – Planza *et al*., 1971).

قام (Hrgreaves *et al*., 1983) بوصف طريقة لتنقية اليوريز من بذور (Cucurbita pepo) تتضمن بالتجزئة بكبريتات الصوديوم واستخدام المبادل الايوني (DEAE – Cellulose) (Pharmacia, 1980).

طريقة العمل

قياس فعالية انزيم اليوريز بطريقة الاندوفينول Urease Indophenol Assay المستخدمة من قبل (Weather burn, 1967, Mobley and Warren, 1987).

وتعرف وحدة فعالية الانزيم Enzyme unite activity هي كمية الانزيم اللازمة لتحويل مايكرومول من اليوريا الى امونيا في دقيقة واحدة عند درجة حرارة ٣٧ درجة مؤية (Todd and Hausinger, 1987).

اتبعت طريقة فولن (Waterbory and Lawry) المحورة لطريقة (Matthews, 1984) (*et al*., 1951) في تقدير البروتين.

١- استخلاص الانزيم بغية تحديد الطريقة المثلى لاستخلاص انزيم اليوريز فقد درست كفاءة عدة طرائق استخلاص كالاتي:

أ. الاستخلاص بثلاثة انواع من المذيبات العضوية (الاسيتون البيوتانول الاعتيادي وخليط من الكلوروفورم: ميثانول: ماء مقطر) بنسبة حجمية (V/V) (S: 1:12) (Samant and Rege, 1989; Damodarn and Siveramakrishnan, 1937).

ب. الاستخلاص بمحلول داريء فوسفات الصوديوم (Riddles *et al*., 1983).

٢- استخدمت مجوعة محددة لاختبار امثل استخلاص لليوريز من بذور الرقي وكانت تتضمن:-

١. 0.05 مولاري داريء فوسفات الصوديوم برقم هيدروجيني pH=7.5 الداريء نفسه مع احتوائه على 0.1% من (Triton X-100) او (1 مللي مولاري EDTA) او 0.1% (Triton X-100) مع 1 مللي مولاري EDTA.

٢. 0.05 مولاري خلات الصوديوم برقم هيدروجيني pH=5.6 لوحدة او مع 0.1% (Triton X-100).

٣. 0.05 مولاري داريء Tris – HCl برقم هيدروجيني pH=7.5.

٣- تنقية انزيم اليوريز المنتج من:

١. تنقية انزيم اليوريز المنتج من *C. Vulgaris*:

تمت تنقية الانزيم بعد استخلاصه وباستخدام الداريء المناسب (داريء فوسفات الصوديوم وبرقم هيدروجيني 7.5 والذي يحتوي على 1 مللي مولاري من EDTA و 10% كليسرول وعند درجة حرارة (4-7 °م).

DEAE- Cellulose Column (15 X 2.5 cm.i.d)

٢. تحضير المستخلص الخام الانزيمي:

تم استخلاص 20غم من البذور المطحونة للرقي (*C. Vulgaris*) بخلطها مع 100 مللتر من (0.05) مولاري من داريء فوسفات الصوديوم برقم هيدروجيني (7.5) والذي يحتوي على 1 مللي مولاري من EDTA و 10% كليسرول بوساطة الخلاط لمدة 15 دقيقة مع التبريد. يجري النبذ المركزي المبرد للخليط عند (4000 دورة/دقيقة) لمدة 20 دقيقة في درجة (7-4 °م). يجمع الراشح ويتم اعادة الاستخلاص للراسب باضافة 50 مللتر من الداريء نفسه لاعادة النبذ المركزي يجمع الراشحين معا والذي هو (الانزيم الخام).

يؤخذ المستخلص الانزيمي لتكملة المراحل القادمة للتنقية بعد قياس الفعالية الانزيمية حسب الفقرة (1) وتقدير كمية البروتين حسب الفقرة (2).

٣. أ. الترسيب بكبريتات الامونيوم:

تمت عملية اضافة كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة تدريجيا وببطء الى المستخلص وبنسبة تشبع 75% مع التحريك المستمر على المحرك المغناطيسي ولمدة ساعة وتحت ظروف التبريد (حمام ثلجي) ثم جمع المستخلص ونقل الى اناء زجاجي ذي غطاء محكم مع ضرورة التغليف

برقائق الالمنيوم، وحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة (0-5 °م) لمدة 24 ساعة، بعدها اجري النبذ المركزي المبرد (3000 دورة / دقيقة) لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة (4° م)، ثم عزل السائل الطافي عن الراسب لتقدير فعالية الانزيم حسب الفقرة (1) وتقدير كمية البروتين حسب الفقرة (2)، اما الراسب فيجمع لاجراء الخطوة القادمة في مراحل التنقية.

٣. ب. المعاملة بالحرارة:

يوضع المستخلص الانزيمي الخام في حمام مائي بدرجة حرارة 45 °م لمدة 30 دقيقة مع التحريك المستمر ويوضع بعدها في حمام ثلجي مباشرة ويحفظ الراشح عند درجة حرارة (-20 °م) طوال اليوم، تزال البروتينات الممسخة بواسطة النبذ المركزي وبسرعة (4000 دورة /دقيقة) لمدة 15 دقيقة، يتم الحفاظ على الراشح بعدها يتم قياس الفعالية حسب الفقرة (1) وتقدير البروتين حسب الفقرة (2).

التجزئة بالاسيتون

يضاف الاسيتون للراشح المعامل بالحرارة بمقدار (1/3) حجمه مع استمرار التحريك في حمام ثلجي. يعزل الراسب المتكون بواسطة النبذ المركزي (3000 دورة / دقيقة) لمدة 10 دقائق ولا تقاس الفعالية في هذه المرحلة. ثم يتم اضافة حجم واحد من الاسيتون للمستخلص الانزيمي مرة اخرى لاجراء النبذ المركزي عند (3000 دورة / دقيقة) لمدة 5 دقائق ويعزل الراسب ويذوب في دارىء الفوسفات برقم هيدروجيني (7.5).

الديلزة:

يؤخذ الراسب من المرحلة السابقة وهو ذائب في الدارىء ويوضع في انابيب الديلزة مقابل دارىء الفوسفات عند درجة حرارة (4 م°) طوال الليل مع التحريك المستمرة وضرورة تبديل الدارىء عدة مرات. بعد الديلزة يؤخذ الراشح ويتم قياس الفعالية الانزيمية حسب الفقرة (1) وتقدير كمية البروتين (2).

التركيز: يتم تركيز الراشح وهو في انبوب الديلزة بوساطة مادة PEG6000 الى حجم 10 مللتر.

كروماتوغرافيا التبادل الايوني (بالمبادل الايوني) داي اثيل امينو اثيل سليلوز: اتبعت الطريقة المذكورة من قبل (Whitaker, 1972) في تحضير هذا المبادل. DEAE- Cellulose Column (15 X 2.5 cm.i.d) الذي تمت موازنته بمحلول ٠,٠٥ مولاري فوسفات الصوديوم برقم هيدروجيني ٧,٥ والذي يحتوي على ١ مللي مولاري EDTA + ١٠ % كليسرول وبسرعة جريان ٦٠ مللي لتر لكل ساعة (حجم الجزء ١٠ مللتر)

الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephadex G-200 (Pharmacia,1985). باستخدام Sephadex G-200 column (80 X2.5 cm i.d)

بعد موازنته بدارىء فوسفات الصوديوم (٠,٠٥) مولاري وبرقم هيدروجيني ٧,٥ والذي يحتوي على ١ مللي مولاري EDTA وبسرعة جريان ١٨ مللتر لكل ساعة (حجم الجزء ٣ مللتر)

النتائج والمناقشة:

تم اختبار قدرة المجموعة المختارة من بذور الرقي جنس (*Citrullus Vulgaris*) وبذور القرع العسلي (*Cucurbita maxima*) وبذور اللبلاب جنس (*Dolichos biflorus*) في احتوائها على انزيم اليوريز. ووجد ان طريقة تحضير مسحوق الاسيتون هي افضل طريقة للاستخلاص وذلك بالحصول على فعالية انزيمية جيدة كما في الجدول (1) ومشابهة للطرائق المستعملة لاستخلاص الانزيمات من الاحياء المجهرية والانسجة النباتية والحيوانية والتي اشارت الى اهمية المذيبات كالكحول المثيلي والكحول الاثيلي والاسيتون في استخلاص الانزيمات، ووجد ضرورة استخدام مثل هذه المذيبات في درجات حرارة منخفضة مع مراعاة سرعة الاستخلاص تحاشيا لمسخ البروتين وفقدان الفعالية (Reed, 1975).

جدول رقم (1) تأثير ظروف الاستخلاص في فعالية انزيم اليوريز المنتج من انواع من البذور

نوع البذور	الفعالية الانزيمية (وحدة / مللتر)		
	الاستخلاص بالماء المقطر	الاستخلاص بمحلول فوسفات الصوديوم	مسحوق الاسيتون
بذور اللبلاب Dolichos biflorus	25.21	60.6	90.0
بذور القرع العسلي Cucurbita maxima	82.0	102.0	140.90
بذور الرقي Citrullus vulgaris	149.0	220.0	٣٥٣,٠

تم تقدير فعالية الانزيم باستخدام الاندوفينول حيث يعد من الكشوفات الحساسة التي يمكن تقدير كمية الامونيا التي قد تصل الى 0.01 مايكرومول. (آلية التفاعل تتم بتفاعل الامونيا مع مركب (Phenol – Hypochlorite) تحت ظروف شديدة القاعدية لتكوين الاندوفينول ذي اللون الازرق الذي تعتمد شدته على كمية الامونيا المتحررة وتقاس الامتصاصية بالمطياف عند الطول الموجي (625) نانومتر (Mobley, 1992).

تم تحضير مستخلص نقي ومتجانس وتضمنت طريقة التنقية بعد ان تم تحضير المستخلص الانزيمي ضمن الظروف المثلى (دارىء فوسفات الصوديوم 0.05 مولاري برقم هيدروجيني 7.5 والذي يحتوي على 1 مللي مولاري من EDTA و 10% كليسرول وعند درجة حرارة (4-7° م) لحفظ المستخلص الخام، وباستخدام عملية النبذ المركزي في منبذة مبردة للحفاظ على فعالية الانزيم وللتخلص من المخلفات الخلوية غير المرغوب بها.

تعد عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم اولى مراحل التنقية لترسيب البروتينات الموجودة في المستخلص الانزيمي اعتمادا على درجة تشبع المحلول (Robyte and White, 1987)، اعتمدت نسبة التشبع 75% بوصفها نسبة التشبع المثالية.

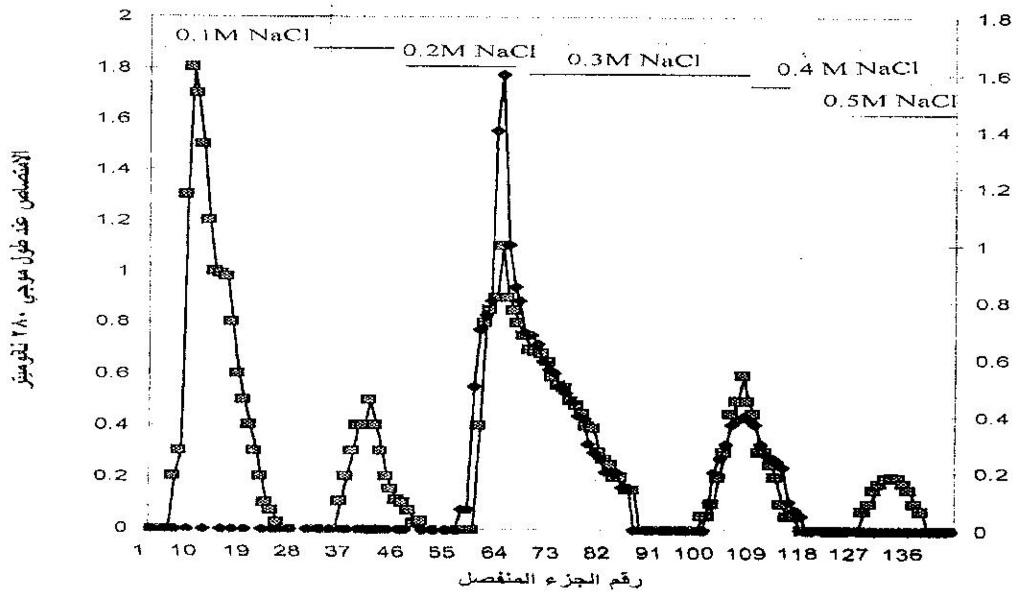
ثم الديلزة لتخليص المحاليل من المواد والاملاح والبروتينات ذات الاوزان الجزيئية الصغيرة باستخدام غشاء نصف ناضح يسمح بمرور الجزيئات الصغيرة ولا يسمح بمرور الجزيئات الكبيرة.

تمت معالجة المستخلص الانزيمي بالحرارة بدرجة 45 م° لمدة 15 دقيقة مع التبريد المفاجيء في الثلج لذلك من الضروري اضافة مثبطات البروتيز كلسيرول 10% و EDTA بتركيز 1 مللي مولاري للتخلص من تأثير ما تبقى من انزيمات البروتيز التي لم تتأثر بالمعاملة الحرارية.

لوحظ ان دارىء فوسفات الصوديوم 0.05 مولاري برقم هيدروجيني 7.5 حافظ على فعالية الانزيم بعد التسخين 45 م° اذ ان للرقم الهيدروجيني دورا في عملية مسخ البروتين وخاصة عند رفع درجة الحرارة (Whitaker, 1972).

في هذه الدراسة تم استخدام مادة الداي اثيل امينو اثيل سيليلوز DEAE – Cellulose من راتنجات مبادل الشحنة السالبة (Anion Exchange)، ولقد تم اختبارها لكون بروتين اليوريز يحمل شحنة سالبة عند الرقم الهيدروجيني المتعادل.

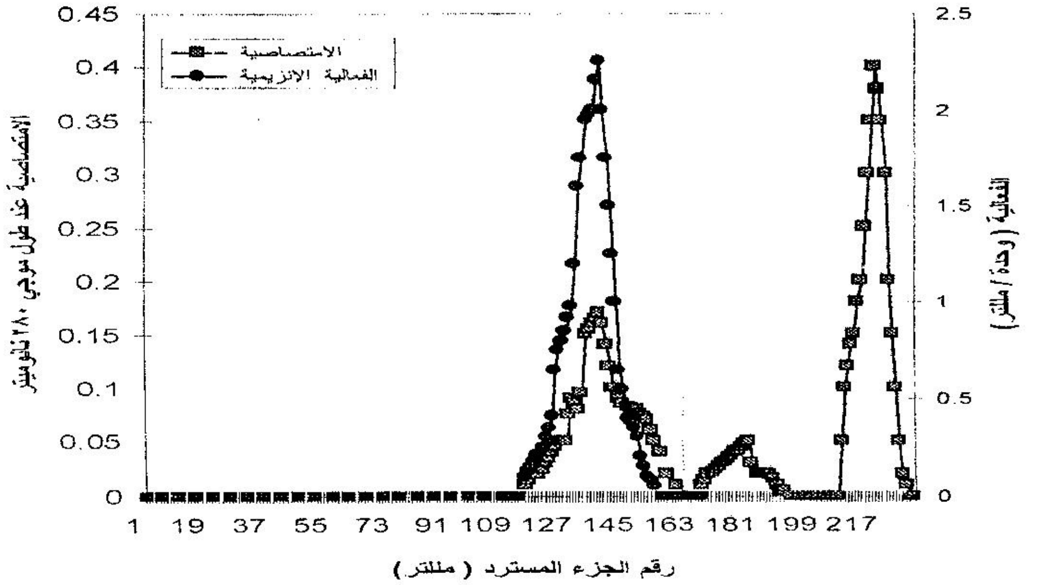
استخدمت بذور الرقي C.vulgaris لتنقية الانزيم وجد ان الانزيم يكون بشكلين ISO Enzyme A و ISO Enzyme B، يمكن فصلها بتركيز 0.2 و 0.3 مولاري على التوالي، وبوجود 10% كليسيرول (Brummer and Gunzer, 1987) كما في الشكل (1).



الشكل (1) : كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم اليوريز المنتج من بذور الرقي *C. vulgaris* باستخدام عمود التبادل الايوني DEAE- Cellulose بابعاد (2.5 × 15 سم) الذي تمت موازنته بمحلول 0.05 مولار فوسفات الصوديوم الداري برقم هيدروجيني 7.5 والذي يحتوي 1 مللي مولاري EDTA + 10% كليسرول بسرعة جريان 60 مللتر / ساعة (حجم الجزء 10 مللتر).

جاءت خطوة الترشيح الهلامي باستخدام عمود هلام Sephadex G-200 بعد خطوة التبادل الايوني لاستكمال تنقية الانزيم (A) وكان عدد مرات التنقية (83.41) والحصيلة الانزيمية (28.48%) كما في جدول رقم (2).

وظهرت قمة الفعالية متطابقة مع قمة البروتين كما في الشكل رقم (2) واستخدم المحلول الانزيمي المنقى بعد تركيزه بالتجفيد في تقدير فعالية الانزيم قيد الدراسة بعد تخفيفه الى التراكيز الملائمة.



الشكل (2) : الترشيح الهلامي بعمود السيفادكس G-200 لانزيم اليوريز المنتج من *C. vulgaris* .(2.5 × 80 سم) بعد موازنته بداريء الفوسفات الصوديوم (0.05M) وبرقم هيدروجيني 7.5 والذي يحتوي على 1 مللي مولاري EDTA وبسرعة جريان 18 مللتر / ساعة (حجم الجزء 3 مللتر) .

جدول (2) خطوات تنقية انزيم اليوريز المنتج من بذور الرقي ***C.vulgaris***.

ت	خطوات التنقية	الحجم (مللتر)	الفعالية (وحدة/مللتر)	الفعالية الكلية (وحدة)	تركيز البروتين (ملغم/مللتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية (%)
	المستخلص الانزيمي الخام	50	395	19750	160	2.46	1	100
	المعاملة بالحرارة	30	374	11220	62	6.63	2.45	56.81
	التجزئة بالاسيتون	30	350	10500	23.5	14.89	6.05	53.16
	التبادل الايوني DEAE – Cellulose باسلوب الوجبة يوريز A (0.2 مولاري NaCl)	20	325	6500	1.2	270.8	110.09	32.91
	يوريز B (0.3 مولاري NaCl)	12	80	960	0.7	114.28	46.45	4.86
	الترشيح الهلامي بعمود Sephadex G-200 ليوريز A	25	225	5625	1.1	204.54	83.14	28.48

Reference

1. Andrews, R. K., Blakeley, R.L. and Zerner, B. (1984). Urea and urease. In ("Advances in Inorganic Biochemistry") (Ed. By Eichhorn, G.L. and Marzilli, L.G.), Vol. 6, pp. 245-283. Elsevier Science Publishing, Inc., New York.

2. Bailey, X.J. and Boulter, D. (1969). The subunit structure of Jack bean urease. Biochem. J. 113: 669-677.

3. Blakeley, R.L. and Zerner, B. (1984). Jackbean urease: The first nickel enzyme. J. Mol. Catalysis. 23: 263-292.

4. Brummer, W. and Gunzer, G. (1987). Lobrotory techniques of enzymes recover In: Biotechnology (eds. Rehm, J.H. and Reed, G.). Vol. 7a: 213-278. VCH. Deerifield Beach.

5. Cesareo, S.D. and Langton, S.R. (1992). Kinetic properties of Helicobacter pylori. Urease compared with Jackbean urease. FEMS. Microbiol. Lett. 78: 15-21.

6. Damodaran, M. and Sivarmakrishnan, P.M. (1937). New sources of urease for determination of urea. Biochem. J. 31: 1041 – 1046.

7. Gazzola, C., Blakeley, R.L. and Zerner, B. (1973). On the substrate specificity of Jack bean Urease (Urea amidohydrolase (EC.3.5.1.5)> Can. J. Biochem. 51: 1325-1330.

8. Hargeaves, A. B., Rego, C.O. and Zahner, A. (1983). Isolation and molecular properties of urease from cucurbita pepo seeds. Rev. Brasil. Biol. 43: 395-400.

9. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

10. Magana-Plaza, I., Montes, C. and Ruiz-Herrera, J. (1971). Purification and Biochimical characteristics of urease from *Proteus rettgeri*. Biochim. Biophys. Acta. 242: 230-237.

11.Mobley, H.L.T. (1992). Ureases, Microbial Encyclopedia of Mocrobiology. 4: 327-335.

12.Mobley, H.L.T. and Warren, J.W. (1987). Urease-positive bacteriuria and obstruction of long term urinary cathetes. J. Clin. Microbiol. 25: 2216-2217.

13.Mobley, H.L.T. and Hausinger, R.P. (1989). Microbiol. Rev. 53: 58-108.

14.Pharmacia Fine Chemicals AB Publications (1980). Ion-exchange chromatography principles and methods. Uppsala.

15.Pharmacia Laboratory Seperation Division. (1985). Gel Filteration Theroy and Practice and Gel Filtration Calibration Kit instruction Manual Uppsala.

16.Philips, A. Pretorius, G.H. and Du-Toit, P.J. (1991). A survey of yeast ureases and characterization of partially purified *Rodosporidium paludigenum* urease. FEMs Microbiol. Lett. 63: 21-25.

17.Polacco, J.C. and Havir, E.A. (1979). Comparisons of Soybean ureas isolated from seed and tissue culture. J.Biol. Chem. 254: 1707-1715.

18.Polacco, J.C. and Winkler, R.C. (1984). Soybean leaf urease: a seed enzyme? Plant Physiol. 74: 800-803.

19.Reithel, F.J. (1971). Ureases in "The Enzymes" (Ed. By Boyer, P.D. Lardy, H. and Myback, K.), Vol. 4, pp. 1-21.

20.Riddles, P. W., Andrews, R. T., Blakeley, R.L. and Zerner, B. (1983). Jack bean urease. VI. Determination of thiol and disulfide content.

21.Robyte, J.F. and White, B. J. (1987). Biochemical techniques, Theory and practice (1^{st} ed.). Brooks/cole. Montery, California.

21.Samant, S.K. and Rege, D.V. (1989). Some enzymes and enzymes inhibitor from cucurbit seeds. J. Sci. Food Agric. 47: 383-385.

22.Shelp, B.J. and Ireland, R.J. (1985). Ureid metabolism in leaves of nitrogen

fixing soybean plants. Plant Physiol. 77: 779-783.
23.Shobe, CR. And Brosseau, G. (1974). Purification of urease by affinity chromatography. II. Matrix characteristics ligand specificity and adsorbent capacity. Can. J. Microbiol. 20: 1147-1151.
24.Smith, P.T., King, A.D. Jr. and Goodman, N. (1993). Isolation and Characterization of Urease from *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol. 139: 957-962.
25.Sumner, J.B. (1926). The Isolation and Crystallization of the enzyme urease. J. Biol. Chem. 69: 435-441.
26.Sumner, J.B. and Somers, G.F. (1947). Chemistry and Methods of enzymes. Academic press. Inc. New York.
27.Waterborg, J.H. and Matthews, H.R. (1984). The lowery method for protein quantitation. In: Walker, J.H. (ed.) Methods in Biology-protein. Vol. 1: 1-5. Humana press. Clifton.
28.Weatherburn, M.W. (1967). Phenol – hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical Biochemistry. 39 (8): 971-974.
29.Whitaker, J.R. (1972). Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker. Inc. New York.

Citrullus Vulgaris Purification of urease from watermelon seeds *Citrullus Vulgari*

***Anis M.AL-Rawi   **Muhammed M. Taha   ***Faihaa M. Khalil**

*Prof. College of Science for Women/ University of Baghdad.
** Dr./ Ministry of Higher Education
*** Dr./ College of Science for Women/ University of Baghdad

Summary

Watermelon seeds showed also a higher production even more than the legumes. Measured enzyme activity for watermelon milled seeds was found to have 353 unit/gm seeds.

However, stabilization characters were studied which showed that there is a very high stability under extraction conditions and under different storage parameters. Results also showed that the enzyme stability decreased gradually in the presence of 2-mercaptoethanol, ethylene diamine tetra acetate di sodium (EDTA) at (1 mmolar) for each concentration. Addition of glycerol (10%) to a buffer's solution used is the process of enzyme activity.

Enzyme from *C. vulgaris* was purified through different steps as extraction, dialysis, heat treatment, acetone fractionation, ionic exchange as a (Batch wise) employing ion exchange column using diethyl amino ethyl cellulose (DEAE cellulose),. Separation results showed that the enzyme found to have two shapes (A & B) and it can be easil separatedfrom each other, using NaCl (0.2 and 0.3) Molar subsequently. The specific activity were measured and found to be (141.66) and (58.57 unit/mg protein) since the activity of enzyme A is superies that of enzymes by two folds.

Purification steps for enzyme A were completed through filtration on the column of Sephadex G-200 and the specific activity for this purified enzyme reached up to 204.54 unit/mg protein.