مجلة الزراعة العراقية مجلد15 عدد2 ص 79-86 تشرين الأول/2010

دراسة بعض صفات البروتييزات المنقاة من البنكرياس الكبدي لسمك الكارب العادي *Cyprinus carpio* L.

عبد العال فرحان القريشي

الملخص

هدف البحث الحالي الى دراسة بعض صفات البروتييزات (A_1 وA_2) المنقاة من البنكرياس الكبدي لسمك الكارب العادي *Cyprinus carpio* L. باستعمال كبريتات الامونيوم والتبادل الايوني والترشيح الهلامي، اشارت نتائج دراسة صفات الانزيمات المنقاة الى ان الوزن الجزيئي لبروتييز A_1 وبروتييز A_2 بلغا 63.09، 61.6 كيلو دالتون على التوالي عند تقديرها بطريقة الترشيح الهلامي، ووجد ان كلا الانزيمين يكونان فعالين بمدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت من 6-8.5 وتبلغ الفعالية الانزيمية اقصاها لبروتييز A_1 في الرقم الهيدروجيني 7.5 وعند الرقم الهيدروجيني 7 لبروتييز A2. واظهر الانزيمان ثباتاً بمدى من الارقام الهيدروجينة حيث تبين ان الرقم الهيدروجيني لثبات بروتييز A_1 يتراوح بين 6.5-8.5 وللبروتييز A_2كان 6.5-8. كانت درجة الحرارة المثلى لفعالية بروتييز A_1 وبروتييز A_2 بواقع 40م و35م على التوالي وباستخدام الكازين كمادة للتفاعل. بلغت قيمة طاقة التنشيط لتحويل المادة الاساس (الكازين) الى ناتج 8.78، 10.13 كيلو سعرة/مول لكل من A_1 و A_2 على التوالي. اما الثبات الحراري لهذه الانزيمات فقد تراوح بين 15-40°م لبروتييز A_1 و15-35°م لبروتييز A_2 واحتفظ بروتييز A_1 بكامل فعاليته الانزيمية عند حضنه بدرجة حرارة 2م لمدة 14 يوم وفقد بروتييز A_2 11.3-21.50% من فعالية عند اليومين الاخيرين من المدة ذاتها عند حضنة بالظروف ذاتها. وجد ان محتوى بروتييز A_1 من الكربوهيدرات بلغ 25.45% عند تقديره بطريقة الفينول-حامض الكبريتيك. اما بروتييز A_2 فقد وجد بانة يحتوي على كاربوهيدرات بنسبة 21.92% عند تقديرها بالطريقة ذاتها. واشارت نتائج دراسة الثوابت الحركية ان معدل قيم ثابت ميكالس (Km) ومعدل قيم السرعة القصوى (Vmax) بلغ 0.6، 0.65% و10.33، 9.77 ملي مولر/دقيقة لكل من بروتييز A_1 وA_2 على التوالي.

المقدمة

تضم عائلة البروتييزات مجموعة من الأنزيمات والتي تشترك جميعها بتحليل البروتينات الى مكوناتها الاساس وتتميز هذه الانزيمات بتسمياتها المختلفة واختلاف صفاتها ومجالاتها التطبيقية الواسعة. ونظراً الى تميز هذه الانزيمات باستخداماتها المتنوعه سواء كانت غذائيه، طبية وتصنيعية فقد اجريت دراسات متعدده باستخدام مصادر طبيعية مختلفة مكروبية، نباتية وحيوانية لغرض انتاج هذه الانزيمات. وهناك دراسات توجهت نحو الاحياء المائية وبالاخص الاسماك في محاولات للاستفادة من مخلفاتها التصنيعية (القناة الهضمية وملحقاتها) لغرض انتاج الانزيمات منها (الاميليزات، البروتييزات واللايبيزات) واهم انواع الاسماك التي تناولتها هذه الدراسات هي اسماك الكارب فبعض هذه الدراسات اكتفت بدراسة مستويات هذه الانزيمات في القناة الهضميه لهذه الاسماك. وفي دراسات اخرى اجريت عمليات استخلاص،تنقية ودراسة بعض صفات هذه الانزيمات (3، 6، 10، 16، 17، 21). تقسم البروتييزات بصورة رئيسية اعتماداً على الرقم الهيدروجيني الامثل لعمل كل انزيم الى بروتييزات حامضية، متعادلة وقاعدية (11) حيث تدخل البروتييزات المتعادلة في مجالات تطبيقية واسعة (9، 12) اما البروتييزات القاعدية والثابتة اتجاه الحراره فتكون متخصصة

كلية الزراعة- جامعة واسط- واسط، العراق.

تاريخ تسلم البحث: ايار/2009.

تاريخ قبول البحث: ك1 /2009.

اكثر في صناعة المنظفات (5، 7، 8، 14) اما البروتييزات الحامضية فتستخدم في مجال صناعة منتجات الالبان. تعد خطوة توصيف الانزيم ودراسة بعض خواصه من الخطوات المهمة والتي تعقب عمليات استخلاصه وتنقيته لان وجود مكونات اخرى مع الانزيم لايعطي صورة واضحة عن الصفات الحقيقية للانزيم ومن تلك الصفات هي درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والثوابت الحركية للانزيم تجاه المادة الاساس إذ تتيح المقارنة بين الانزيمات من مصادرها المختلفة فيما إذا كانت متماثلة تماما او جزئيا او انها انزيمات مختلفة تنشط التفاعل نفسة (20، 22). اجريت دراسات عديدة ومتنوعة تناولت دراسة اهم خصائص البروتييزات الماخوذة من مصادر طبيعية مختلفة وجميع هذه الدراسات اثبتت وجود تباين واختلاف بصفات هذة الانزيمات باختلاف مصادرها الطبيعية وفي هذه الدراسة وقع الاختيار على انزيمات البروتييز المنقاة من البنكرياس الكبدي لسمك الكارب العادي حيث يعد هذا السمك احد اهم الانواع التجارية العالمية والمحلية والمنتشر بكثرة في مياه انهار العراق وتتركز في مناطق الوسط وهي المفضلة محليا في استهلاكها كغذاء (1).

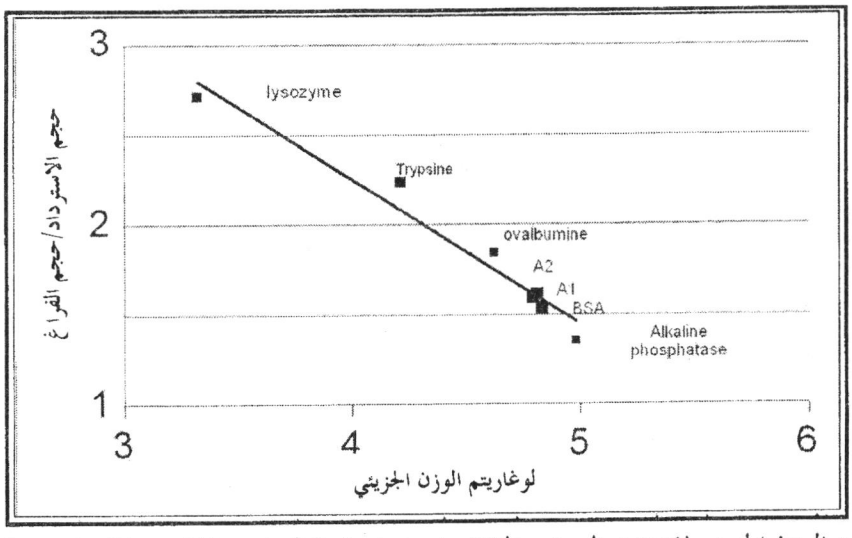
المواد وطرائق البحث

عين الوزن الجزيئي لانزيمات البروتييز المنقاة باستخدام تقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفاكريل **Sephacryl S-200** بابعاد **1.8×70** سم حيث تم تقدير حجم الفراغ للعمود **Vo** بامرار محلول الدكستران الازرق، اما حجم الاسترداد **Ve** للبروتينات القياسية فقد حسب بامرار محاليلها منفردة خلال العمود وتضمنت **Alkaline phosphatase**، **BSA**، **Ovalbumine**، **trypsine** و**lysozyme** حيث ان سرعة الجريان كانت ثابتة وهي **30** مل/ساعة.

عين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيمات البروتييز المنقاة بتقدير فعالية كل انزيم على حدة في كل محلول من محاليل المادة الاساس (الكازين) المحضرة بمدى من الارقام الهيدروجينية تتراوح ما بين **3.5–10.5** وبفارق مقداره **0.5** درجة. عين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيمات المنقاة باضافة حجم معلوم من كل انزيم منقى على حدة الى حجم مساوٍ لكل محلول من المحاليل الدارئة المحضرة بارقام هيدروجينية تراوحت بين **3.5–10.5** وبفارق مقداره **0.5** درجة في الرقم الهيدروجيني من محلول لاخر، وحضنت في درجة حرارة **37**م لمدة نصف ساعة ثم نقلت مباشرة الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية، كذلك قدرت درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيمات المنقاة بمدى من درجات الحرارة تراوحت بين **20–80**°م وبفارق **5** درجات ثم رسمت العلاقة بين الفعالية الانزيمية مقابل درجة الحرارة المستخدمة بالتفاعل. كما قدرت طاقة التنشيط للانزيمات المنقاة **[Ea]** لتحويل المادة الاساس الى ناتج بمدى من درجات الحرارة تراوحت بين **20–80**°م بفارق **5** درجات بتطبيق معادلة ارينوس المذكورة من قبل **Segel** (**20**). كذلك تم تعيين الثبات الحراري لانزيمات البروتييز المنقاة عند الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات كل انزيم وذلك بمعاملتها بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين **15–85**°م بفارق **5** درجات لمدة **15** دقيقة ثم نقلت الى حمام ثلجي ثم بعد ذلك قدرت الفعالية الانزيمية. كما عينت الثوابت الحركية للانزيمات المنقاة تجاه محلول الكازين المحضر بتراكيز **0.1–1**% بفارق **0.1**% والمذاب في محلول فوسفات البوتاسيوم الداريء بتركيز **0.02** مولر ورقم هيدروجيني **7** حيث حسبت السرعة القصوى (**Vmax**) وقيمة ثابت ميكالس (**Km**) من رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز المادة الاساس بطريقة **Linweaver-Burk reciprocal plot** (**19**). كما قدر المحتوى الكربوهيدراتي للانزيمات المنقاة استناداً الى الطريقة المذكورة من قبل القريشي (**3**).

النتائج والمناقشة

عين الوزن الجزيئي لانزيمات البروتييز المنقاة باستعمال تقنية الترشيح الهلامي على عمود السفاكريل Sephacryl S-200 المحضر بابعاد (1.8×70) سم حسبت نسبة حجم الاسترداد لكل بروتين قياساً الى حجم استرداد الدكستران الأزرق ومن خلال رسم العلاقة بين نسبة حجم الاسترداد الى حجم الفراغ (Ve/Vo) للبروتينات القياسية مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي (شكل 1) كانت القيم الناتجة والتي تمثل الاوزان الجزيئية لانزيمات البروتييز المنقاة تساوي 63.09 كيلو دالتون لبروتييز A_1 و61.6 كيلو دالتون لبروتييز A_2.



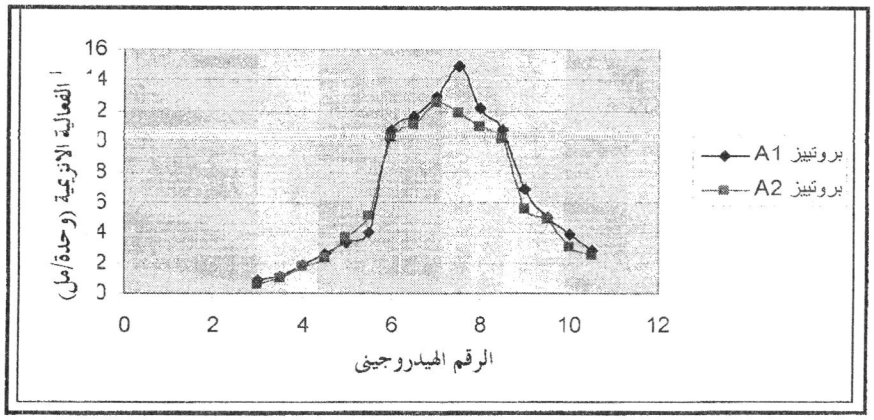
شكل 1: تعيين الوزن الجزيئي لانزيمات البروتييز المنقاة، باستخدام تقنية الترشيح الهلامي خلال المرشح Sephacryl S-200

بينت النتائج الموضحة في الشكل (2) ان انزيمات البروتييز A_1 وA_2 تكون فعالة بمدى من الارقام الهيدروجينية من 6–8.5 وتبلغ الفعالية الانزيمية اقصاها عند الرقم الهيدروجيني 7.5 لبروتييز A_1 وعند الرقم الهيدروجيني 7 لبروتييز A_2 ولوحظ انخفاض الفعالية الانزيمية لكلا الانزيمين عند الارقام الهيدروجينية المتطرفة القاعدية والحامضية (11، 5، 10، 10، 5، 9) و(5، 4، 4، 5، 3، 3) على التوالي، حيث انه عند تلك القيم المتطرفة من الارقام الهيدروجينية يحدث انخفاض في فعالية الأنزيم بسبب حدوث تغير في حالته الطبيعية Denaturation (2) وبالتالي الاقلال من فعالية الانزيم وصولاً الى الحد الذي يفقد معه الانزيم فعاليته تماماً (1) ويبين الشكل (3) نتائج دراسة ثبات انزيمات البروتييز المنقاة بمدى واسع من الارقام الهيدروجينية حيث ظهر ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم بروتييز A_1 يتراوح بين 6.5–8.5 اما بروتييز A_2 فكان الرقم الهيدروجيني الامثل لثباته يتراوح بين 6.5–8.

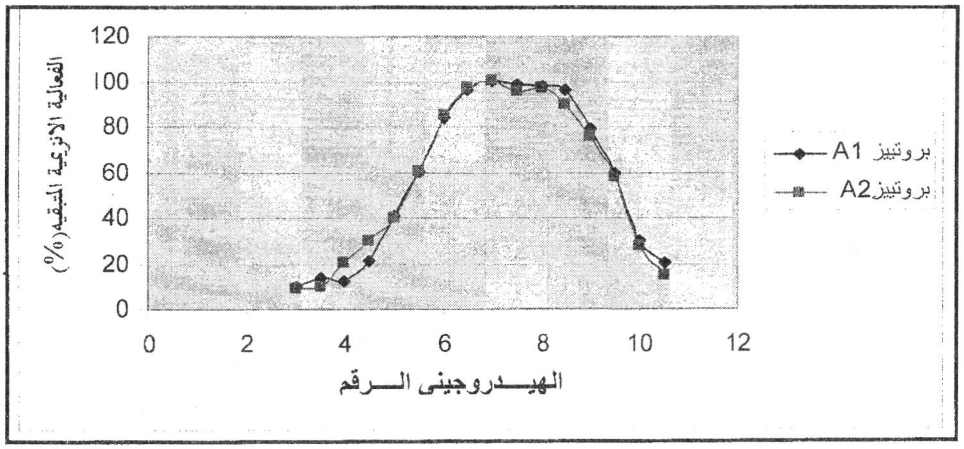
ذكر الباحث Laura (15) وجماعته ان الارقام الهيدروجينية المثلى لفعالية البروتييزات المنقاة من القناة الهضمية لسرطان البحر كانت تتراوح بين 8–9، وكانت هذه الانزيمات ثابتة في ارقام هيدروجينية تراوحت بين 7–8، وفقدت 50% من فعاليتها في الارقام الهيدروجينية 7,11 وفقدت فعاليتها بالكامل عند الارقام الهيدروجينية المتطرفة الحامضية والقاعدية.

يظهر الشكل (4) تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيمات البروتييز المنقاة حيث أوضحت النتائج المتحصل عليها زيادة في الفعالية الأنزيمية لكلا الأنزيمين مع ارتفاع درجة الحرارة من 15م وتصل الفعالية الأنزيمية أعلى مستوياتها في 40°م لبروتييز A_1 و35°م لبروتييز A_2، تنخفض بعد ذلك عند زيادة درجة الحرارة عن تلك الدرجات وقد يعود السبب في ذلك الى ان سرعة التفاعل الأنزيمي تزداد بزيادة درجة الحرارة لزيادة التصادمات بين جزيئات الإنزيم

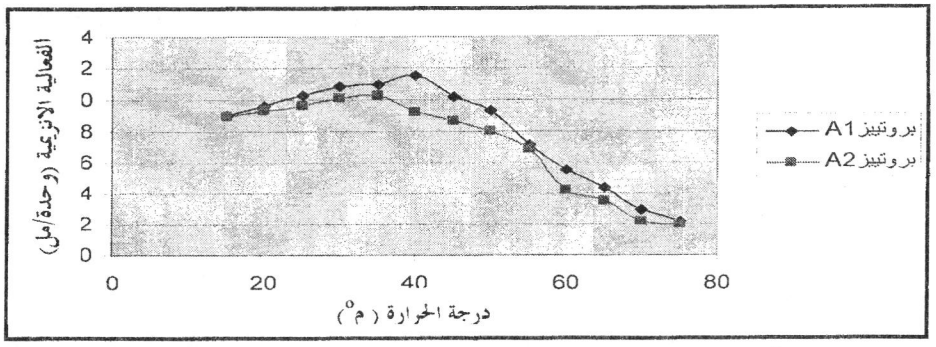
وجزيئات مادة التفاعل بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات (19) وتنخفض الفعالية الإنزيمية عند الوصول إلى درجة حرارة معينة والتي كانت في هذه الدراسة 45°م لبروتييز A_1 و40°م لبروتييز A_2 وذلك بسبب حدوث تغير في الحالة الطبيعية للأنزيم مما يؤدي الى تقليل التركيز الفعال للانزيم وبالتالي تقليل سرعة التفاعل الانزيمي. وفي هذا المجال وجد Huang وجماعته (11) ان درجة الحراره المثلى لانزيم البروتييز المنقى من بكتيريا ***Thermophilic bacillus*** بلغت 65°م، وذكر Yossan وجماعته (23) ان 50°م هي الدرجة المثلى لانزيم البروتييز المنقى من ***Bacillus megaterium***، اما انزيمات البروتييز المنقاة من القناة الهضمية لسرطان البحر فقد كانت درجات الحرارة المثلى لفعاليتها بمدى يتراوح بين 45-55°م وتبلغ اقصى فعالية لها في درجة حرارة 50م (15).



شكل 2: فعالية انزيمات البروتييز المنقاة بمدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين 3.5-10.5

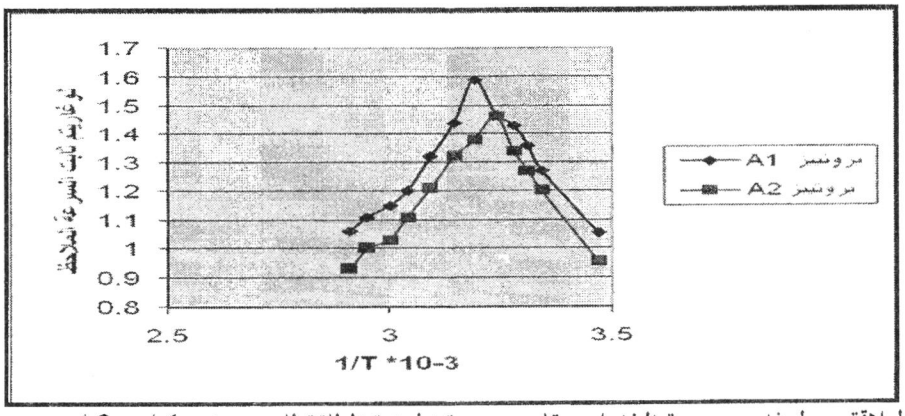


شكل 3: ثبات انزيمات البروتييز المنقاة بمدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين 3-10.5 وبدرجة حرارة 37 لمدة 30 دقيقه وباستخدام الكازين كماده اساس



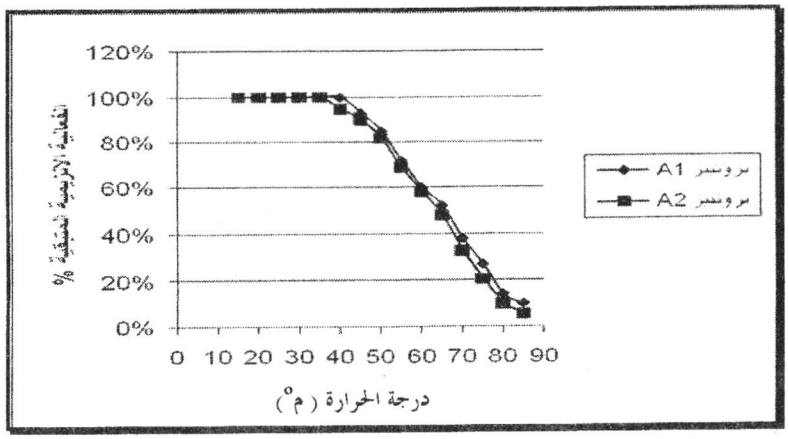
شكل 4: علاقة الفعالية الأنزيمية للبروتييزات A_1 و A_2 المنقاة مع درجة الحرارة

يبين الشكل (5) العلاقة بين لوغاريتم سرعة التفاعل لانزيمات البروتييز المنقاة ومقلوب درجة الحرارة المطلقة وقد اتضح ان قيم طاقة التنشيط لكل من بروتييز A_1 وبروتييز A_2 كانت **8.78** و**10.13** كيلو سعرة على التـــوالي. وتقع هذه القيم ضمن المدى المعروف لقيم طاقة التنشيط لتفاعلات تحويل المادة الاساس الى نواتج المحفزة بفعل الانزيمات التي تقع بين **6–15** كيلو سعرة/مول (22).



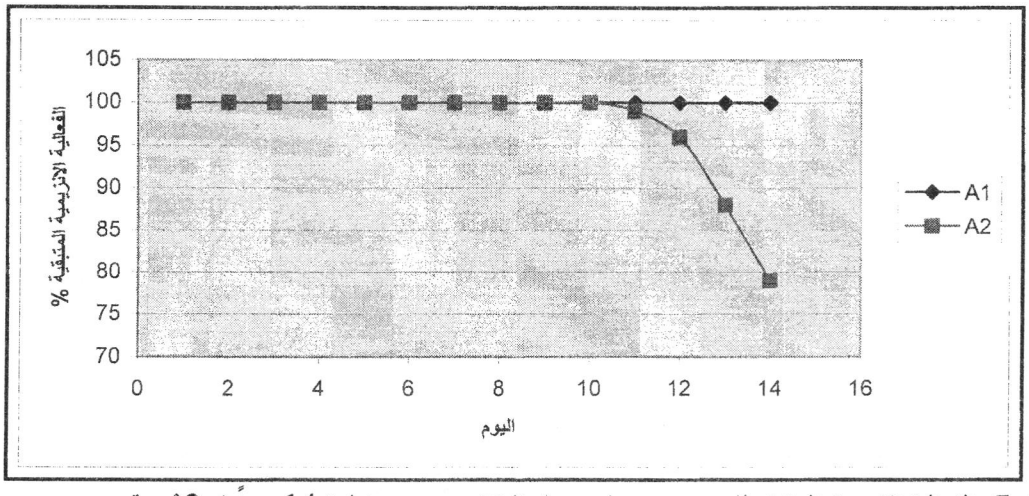
شكل 5: العلاقة بين لوغاريتم سرعة التفاعل ومقلوب درجة الحرارة المطلقة للبروتييزات **A1** و **A2**

بينت النتائج الموضحة في الشكل (6) الثبات الحراري للانزيمات المنقاة حيث احتفظ بروتييـــز A_1 بكامـــل فعاليتة الانزيمية عند حضنه في درجات حرارة **15–40**°م لمدة **15** دقيقة و**93.51**% من فعاليته في درجة حراره **45**م عند المدة ذاتها. اما بروتييز A_2 فقد احتفظ بكامل فعاليته الانزيمية عند حضنه في درجات حرارة **15–35**م واحـــتفظ بـــمقدار **95.09**% من فعاليته الانزيميه في **40**°م. ولوحظ من الشكل ذاته انخفاض الفعالية الانزيمية لكلا الانزيمين مع ارتفاع درجات الحرارة حيث لم يحتفظ بروتييز A_1 الا بما يقرب **38.11**، **27.2**% من فعاليته في **70**، **75**م° علـــى التوالي لمدة **15** دقيقه وفقد بروتييز A_2 حوالي **67**، **79.2**% من فعاليته في **70**، **75**°م على التوالي عند المدة ذاتهـــا. ان انخفاض الثبات الحراري المبين من خلال الشكل ذاته يرجع الى ما تتميز به الانزيمات بصورة عامة من حساسيتها تجاه درجات الحرارة المرتفعة حيث تؤدي هذه الأخيرة الى زيادة سرعة التثبـــيط الحـــراري للإنزيمـــات (**1**، **18**). اشـــار **Yossan** وجماعته (**23**) الى ان انزيم البروتييز المنقى من ***Bacillus megaterium*** احتفظ باكثر من **95**% مـــن فعاليته عند حضنه في درجات حرارة تراوحت بين **30–45**م. وذكر **Laura** (**15**) وجماعته ان درجات الحرارة المثلى لثبات انزيمات البروتييز المنقاة من القناة الهضمية لسرطان البحر كانت بمدى يتراوح بين **10–40**°م.



شكل 6: الثبات الحراري لأنزيمات البروتييز A_1 وA_2 المنقاة عند حضنها بمدى من درجات الحرارة تراوحت بين **15–85** °م لمدة **15** دقيقه في الرقم الهيدروجيني7

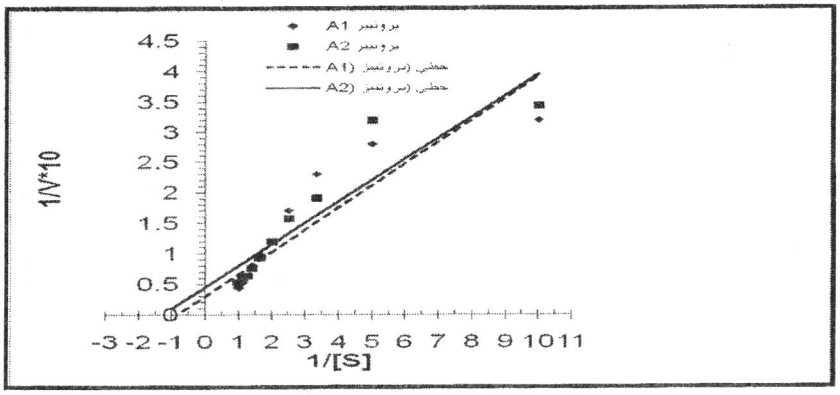
يظهر الشكل (7) نتائج اختبار خزن أنزيمات البروتييز المنقاة في درجة حرارة 2°م لمدد بلغت 1-14 يوماً حيث أظهرت نتائج متابعة الفعالية الأنزيمية احتفاظ البروتييز A_1 بكامل فعاليته الانزيمية بعد مرور 14 يوماً وفقد بروتييز A_2 مايقارب 11.3، 21.509% عند اخر يومين من المدة المذكورة ذاتها.



شكل 7: الفعالية الانزيمية المتبقية للبروتييزات A_1 و A_2 المنقاة بعد حضنها لمدة 14 يوماً في 2مْ ورقم هيدروجيني 7.

اتضح من نتائج تقدير الكربوهيدرات لانزيمات البروتييز المنقاة ان بروتييز A_1 يحوي كربوهيدرات بنسبة 25.45 % في حين يحوي بروتييز A_2 على 21.92% كربوهيدرات، وهذا الاختلاف في المحتوى الكربوهيدراتي يمكن ان يكون سبب الثبات العالي لبروتييز A_1 عند خزنه (الشكل 7)، حيث يعتقد ان للجزء الكربوهيدراتي للانزيم الذي يكون ارتباطه تساهمياً مع الجزء البروتيني للانزيم وظيفة وقائية تشمل توفير حماية للانزيم تجاه التحلل الذاتي كما ان هذا الجزء يجعل الانزيم اكثر ثباتا تجاه معاملات الحرارة العالية واكثر ذوباناً ويحد من تاثير المثبطات عليه (1).

أظهرت نتائج دراسة الثوابت الحركية لانزيمات البروتييز المنقاة عند رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز المادة الاساس (الكازين) لكل انزيم باربع طرائق، ان معدل قيم ثابت ميكالس (Km) بلغ 0.6% وكان معدل قيم السرعة القصوى Vmax بواقع 10.33 ملي مولار/دقيقة لبروتييز A_1 وبلغ معدل قيم (Km) و Vmax القيم 0.65%، 9.77 ملي مولار/دقيقة على التوالي لبروتييز A_2. يوضح الشكل (8) حساب الثوابت الحركية لبروتييز A_1 وA_2 باتباع طريقة Lineweaver-Burk plot لكونها من اكثر الطرائق شيوعا في حساب الثوابت الحركية ويعد حسابها بهذه الطريقة مهما لاعطاء تصور واضح عن تاثير تركيز المادة الاساس الداخلة في التفاعل (4، 13).



شكل 8: الثوابت الحركية لبروتييزات A_1 و A_2 المنقاة باتباع طريقة Lineweaver-Burk plot

المصادر

1- القريشي، عبد العال فرحان (2005). استخلاص انزيم الفا-اميليز من البنكرياس الكبدي لسمك الكارب العادي *Cyprinus carpio* L. وتنقيتة ودراسة بعض صفاته و استخداماته التطبيقية. رسالة ماجستير-كلية الزراعة- جامعة بغداد، العراق.

2- دلالي، باسل كامل وكامل الركابي (1981). كيمياء الاغذية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

3- حمادي، دينا سعاد علي (2001). فصل وتنقية وتوصيف البيسين من معدة اسماك الجري *Siluris glanis*. رسالة ماجستير-كلية الزراعة- جامعة بغداد، العراق.

4- Barcelo, R. A.; M. Mrales and A. Pedreno (1998). Specific compartmentalization of peroxidase isozymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. In: Lignin and lignan biosynthesis (eds. Lewis and S. Sakanen) p:84-95. American Chem. Soc., (Asc) Washington. DC. USA.

5- Boonyanas, S.; S. Supachok; P. Suree and C. Shutein (2000). Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus sterothermophilus* TLS33. Protein Exper. Purif., 20:142-151.

6- Ezquerra, J.M. and F.L. Garcia (1997). Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (Penaeus vannamei). J-food-biochem, 21(5): 401-419.

7- Fu, Z.; B.A. Hamud; C.N. Razak; M. Basri; A.B. Saleh and R.N. Rahman (2003). Secretory expression in *Eschericha coli* and single-step purification of a heat-stable alkaline protease. Protein Exper. Purif., 28: 63-68.

8- Gabriella, O.; D. Slawomir and K. Jozel. (2003). High level expression, secreasion and purification of the thermostable aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-I in *Pichia pastoris* . Protein Exper. Purif., 29: 223-229.

9- Helman, J.D. (1995). Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* SA-dependant promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and promoter DNA. Neuclic Acids. RES., 23:2351-3260.

10- Hidalgo, M.C.; E. Urea and A. Sanz (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits proteolytic and amylase activities, Aquaculture, 170(3) :267-283.

11- Huang, G.; T. Ying; P. Huo and J. Jing (2006). Purification and characterization of a protease from therophilic bacillus strain HSO8. African Journal of Biotechnology, 5(24): 2433-2438.

12- Imanaka, T.; M. Shibazaki and M. Takagi (1986). New way of enhacing the thermostability of proteases. Nature, 324: 695-697.

13- Jeong, J.S.; S.J. Kwon; S.W. Kang; S.G. Rhee and K. Kim (1999). Purification and characterization of a second type thiredoxin peroxidase (Type II Tpx) from *Sacharomyces cerevisiae*. J. Biochem. 38:776-783.

14- Kumar, C. G. (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. Lett. Appl. Microbiol., 34: 13-17.

15- Laura, E.; C. Guerrero; L. Fernando; J. Carreno and M. V. Angels (2004). Characterization of protease in the digestive system of Spiny Lobster (*Panulirus interruptus)*. Biotechnol., 6: 262-269.

16- Liu, Z.Y.; Z. Wang and J. Zhang (2008). An acidic protease from the grass carp intestine (Ctenopharyngodon idellus) Comparative biochemistry and physiology, 149 (1): 83-90.

17- Rafik, B.; A. Barkia; A. Bougatef; N. Ktari and M. Nasr(2008). A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization, J. Food chemistry, 113: 146-154.

18- Reed, G. (1975). Carbohydrases. In: Enzymes in food processing, 2nd, Acdemic Press. New York.
19- Segel, I. H. (1976). Biochemical calculation, 2nd ed. John Wiley and sons, New York, USA.
20- Segel, I.H. (1975). Enzymes kinetics: behavior analysis of rapid equilibrium and steady state systemes. Wiley Iinter. Science, New York, USA.
21- Tsui, H. T.;W.Y. Mock; K. K. Lau and W. P. Fong (1996). Proteolytic activation of grass carp (*Ctenopharygodon idellus*) liver alcohol dehydrogenase, Biochim Biophys Acta., 15(1): 41-46.
22- Whitaker, J. R. (1972). Principles of enzymology, for the food sciences. Mercel Dekker, Inc., USA.
23- Yossan, S.; A. Reungsag and M. Yasuda (2006). Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from Thai fish sauce fermentation process. Science Asia, 32(4): 379-385.

PARTIAL CHARACTERIZATION OF PURIFIED PROTEASES FROM HEPATOPANCREAS OF COMMON CARP *Cyprinus carpio* L.

A. F. Alquraishi

ABSTRACT

This study aimed to investigate some characteristics of protease (A_1, A_2) which extracted and purified from hepatopancrease of common Carp. The results of enzymes characterization were as follows: the molecular weights of the enzyme were, 63.09, 61.6 KDa for protease A_1, A_2 respectively, optimum pH for both enzymes were 7.5 for protease A_1 and 7 for protease A_2, and both enzymes show stability at pH values ranged between 6.5-8.5, 6.5-8 respectively. The optimum temperature for proteases activity was 40C° and 35C° respectively. The activation energy for conversion of the substrate (casein) to products was 8.78, 10.13 Kca/mol for protease A_1 and A_2 respectively. The thermal stability were ranged between 15-40C° for protease A_1, while protease A_2 show stability ranged between 15-35C°. protease A_1 retained entire activity over 14 days incubation at 42C°, while protease A_2 activity declines to 11.3 to 21.5% on incubation at the same conditions.

It have been found that carbohydrates fraction of protease A_1 was 25.45% as determined by phenol-sulfuric acid estimation method, while protease A_2 has 21.92%. The results of kinetics constants study indicated that the average value of Mechalis constant (Km) and the average of maximum velocity were 0.6, 0.65% and 10.33, 9.77 mM/min for protease A_1, A_2 respectively.

College of Agric.- Univ. of Wassit - Wassit, Iraq.