عزل انزيم الفوسفاتيز القاعدي من نبات الصبار *Aloe Vera* ودراسة خواصه

سكينة حسين رشيد

قسم الكيمياء/ كلية العلوم/جامعة الموصل

الاستلام	القبول
2006/9/19	2007/1/9

ABSTRACT

The research was concerned with isolation of alkaline phosphatase (ALP) from the aqueous extract of *Aloe Vera* using gel filtration technique.

It was shown that, using gel filtration chromatography on Sephadex G-100, the solution of the proteinous precipitate produced by ammonium sulphate saturation, contained two proteinous peaks. The two peaks possessed a variable activity of alkaline phosphatase, where maximum specific activity was obtained in the first peak with higher molecular weight which showed (28) folds of purification.

Furthermore, the comparative molecular weight of the partially purified alkaline phosphatase (first proteinous peak) using gel filtration was found to be (147353) Dalton.

The research was also concerned with finding the optimum conditions of alkaline phosphatase. Maximum activity was obtained using sodium carbonate- bicarbonate buffer (100 mM) at pH (9.7), (50ºC) and (30 mM) of di-sodium phenyl phosphate as a substrate.

Using linweaver-Burk plot, it was found that the Vmax and Km have the values of (185.18 enzyme unit/dl of proteinous solution) and (3.9mM) respectively.

The results also predicted that the activity of alkaline phosphatase decreased gradually and reached 76% and 50% from the original value when stored at 4ºC and at room temperature (33-40ºC) respectively for 30 days.

الملخص

تضمن البحث عزل ا نزيم الفوسفاتيز القاعدي من المستخلص المائي لنبات الصبار Aloe vera باستخدام تقنية الترشيح الهلامي.

وقد تبين باستخدام تقنية الترشيح الهلامي على عمود الفصل الحاوي على الهلام Sephadex G-100 احتواء محلول الراسب البروتيني الناتج من الترسيب بكبريتات الأمونيوم

للمستخلص المائي لنبات الصبار على حزمتين بروتينيتين، وتبين امتلاك الحزمتين لفعالية متباينة لانزيم الفوسفاتيز القاعدي، فقد أظهرت الحزمة الأولى ذات الوزن الجزيئي العالي فعالية نوعية عالية للانزيم وبنقاوة بلغت (28) مرة في حين أن الحزمة الثانية تمتلك فعالية نوعية منخفضة جدا لانزيم الفوسفاتيز القاعدي.

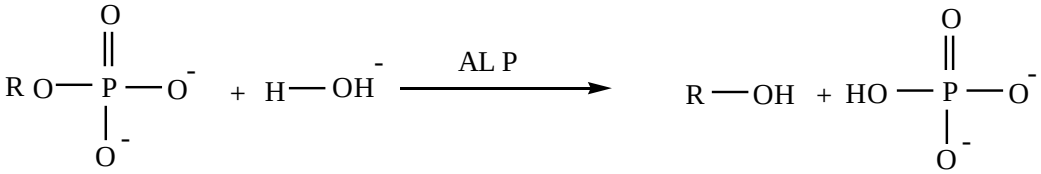
وذلك فضلا عن تحديد الوزن الجزيئي التقريبي لانزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا (الحزمة البروتينية الأولى) باستخدام تقنية الترشيح الهلامي وكان مقداره (147353) دالتون.

ثم حددت الظروف المثلى لعمل الانزيم المنقى ج زئيا، وبينت النتائج أن الانزيم يعمل في المحلول المنظم (كاربونات الصوديوم- بيكاربونات الصوديوم)عند تركيز امثل (100ملي مولار) واس هيدروجيني امثل (9.7) ودرجة حرارة مثلى (50 مئوية) وتركيز امثل (30 ملي مولار) لمادة الفنيل فوسفات ثنائية الصوديوم di-sodium phenyl phosphateكمادة أساس وباستخدام رسم لاينويفر- بيرك وجد أن السرعة القصوى التي يعمل بها الانزيم تساوي (185.18 وحدة أنزيمية /100ملي لتر من المحلول البروتيني) وان قيمة ثابت مكيليس- منتن تساوي (3.9 ملي مولار).

وأشارت النتائج إلى انخفاض فعالية الانزيم تدريجياً إلى (76%) و (50%) من القيمة الأصلية عند خزن الانزيم في درجتي حرارة (4 مئوية) ودرجة حرارة الغرفة (30-40 مئوية) على التوالي مدة 30 يوما.

المقدمة

ينتمي انزيم الفوسفاتيز القاعدي EC3.1.3.1 الذي يطلق عليه كذلك اورثو فوسفوريك احادي الاستر فوسفوريز (Orthophosphoric monoester phosphohydrolase) الى صنف الانزيمات المميئة (hydrolase) التي تساعد على انفلاق المركبات الحاوية لاصرة الفوسفات استر بوجود الماء عند الرقم الهيدروجيني (9.6-10) فعند انفصال هذه الاصرة يحصل انفلاق اخر في الاصرة الهيدروكسيلية لجزيئة الماء لينتج عن ه تكوين الكحول وحامض الفوسفوريك[1] وكما موضح في المعادلة الاتية:



يتواجد انزيم الفوسفاتيز القاعدي في عدة اعضاء من الجسم لاسيما الكبد والعظام والمشيمة والامعاء والكلية[2] ويفرز القسم الاكبر منه من النسيج الكبدي والعظمي[3].

لقد اجريت مجموعة من الدراسات الناجحة لعزل وتنقية ودراسة خواص انزيم الفوسفاتيز القاعدي من نبات البزاليا [4] ومن بكتريا E-coli [5] ومن الطبقة المخاطية المبطنة لامعاء العجل[6] ومن كلى الابقار[7] .

ويهدف البحث الحالي الى استخدام نبات الصبار كمصدر نباتي متوفر (بدلا عن المصادر الحيوانية) لعزل انزيم الفوسفاتيز القاعدي ودراسة خواصه للاستفادة منه في مجالات وتطبيقات علمية متعددة ولاسيما في مجال الاحياء المجهرية.

المواد المستعملة وطرائق العمل

-النبات المستعمل:

تم الحصول على نبات الصبار من مشتل كلية الزراعة والغابات في جامعة الموصل .

-تحضير المستخلص الخام للانزيم:

أُخِذَ كيلو غرام واحد من أوراق نبات الصبار، وبعد غسل الأوراق بالماء قطعت قطعاً صغيرة ومزجت مع الماء المقطر بنسبة (V:W 2:1) ثم سحق المزيج بالة الثرم مدة (10 دقائق) مع التبريد، وحرك المزيج بعد ذلك بوساطة المحرك الكهربائي مع م راعاة التبريد باستخدام حمام ثلجي ثم رشح المزيج خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد مدة (15 دقيقة) عند سرعة (4000 xg) للتخلص من المواد غير الذائبة وكان حجم المحلول المتجانس (2500 مللتر) وحجم المستخلص الرائق (1150 مللتر)، ثم قيست فعالية الانزيم في المستخلص المائي المحضر بحسب طريقة الباحثين [8] وكما قدّر البروتين بحسب طريقة لاوري المحورة[9].

وقلص حجم المستخلص الرائق بعد ذلك الى الثلث باستخدام جهاز التجفيد Lyophilizer ثم استخدم المستخلص الناتج في عملية فصل البروتين الكلي.

-فصل البروتين الكلي:

فصل البروتين الكلي بوساطة الترسيب بكبريتات الأمونيوم وبتشبع (75%)[10]، وكانت إضافة كبريتات الأمونيوم تدريجياً مع تحريك المزيج بالمحرك الكهربائي عند (4مئوية) مدة (60 دقيقة) وترك المحلول (24 ساعة) في الثلاجة، ثم فصل الراسب عن الر اشح بجهاز الطرد المركزي المبرد مدة (20 دقيقة) وبسرعة (6000xg) عند (4 مئوية).

بعد ذلك جففت العينة باستخدام جهاز التجفيد اذ تم الحصول على مسحوق بروتيني حفظ في درجة حرارة (20° مئوية) الى حين استعماله، علما ان فعالية الانزيم وتركيز البروتين قد قيستا قبل التجفيد وبعده .

-تجزئة البروتين الكلي:

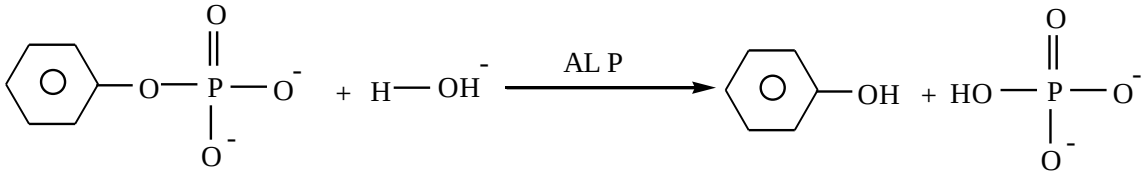
جزئ البروتين الكلي الناتج من الخطوة السابقة باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel-filtration chromatography باستعمال عمود الفصل ذي الأبعاد (2×88) سم والحاوي للهلام من النوع Sephadex G-100 على ارتفاع (75)سم وباستخدام الماء المقطر بوصفه محلول روغان.

-تحديد الوزن الجزيئي:

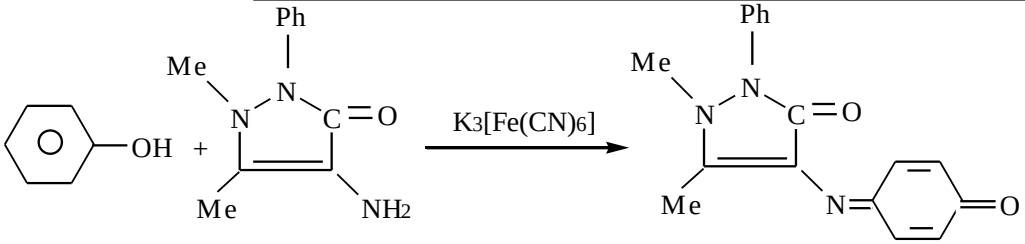
حُدّد الوزن الجزيئي التقريبي لانزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا من نبات الصبار باستخدام تقنية الترشيح الهلامي حسب طريقة الباحث [11] باستخدام عمود الفصل نفسه المستخدم في تجزئة البروتين والحاوي للهلام من النوع Sephadex G-100 اذ قورن حجم استرداد الانزيم مع حجوم استرداد مركبات أخرى معلومة الوزن الجزيئي.

-قياس فعالية الانزيم:

قيست فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي بحسب طريقة الباحثين [8] وتعتمد هذه الطريقة على استخدام مادة الأساس(الفنيل فوسفات ثنائية الصوديوم di-sodium phenyl phosphate التي يعمل عليها انزيم الفوسفاتيز القاعدي وكما موضح في المعادلة الآتية:



ولغرض الكشف والتقدير الكمي للفينول الناتج بفعل هذا الانزيم أضيف المركب 4-امينو انتي بايرين (4-amino antipyrine) والمركب بوتاسيوم سيانيد الحديديك (Potassium ferric cyanide)، اذ يكون معقدا احمر اللون يعرف بالكوينون ذي شدة امتصاص تتناسب مع فعالية الانزيم، قيست شدة الامتصاص باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي مقداره (510) نانومتر.



-الكواشف المستخدمة

الكاشف الاول (1) Reagent	Carbonate-bicarbonate pH(10)
الكاشف الثاني (2) Reagent	1 gm phenol / 1L (0.1 N) HCl
الكاشف الثالث (3) Reagent	6 gm (4-aminoantipyrine)/1L H_2O
الكاشف الرابع (4) Reagent	2.4% $K_3Fe(CN)_6$ potassium ferricyanide
هيدروكسيد الصوديوم	(0.5N) NaOH
بيكاربونات الصوديوم	(0.5 N) $NaHCO_3$
المادة الاساس Substrate	disodiumphenylphosphate

طريقة العمل:

نأخذ أربعة أنابيب اختبار نظيفة وتضاف اليها الإضافات الآتية:

الكفء (Blank)	القياسي (Std.)	السيطرة (Contral)	الاختبار (Test)
1 ml Reagent (1)	1.1 ml Reagent (1)	1 ml Reagent (1)	1 ml Reagent (1)
1 ml substrate	1 ml Reagent (2)	1 ml substrate	1 ml substrate disodiumphenylphosphate

- توضع انابيب الاختبار الاربعة في حمام مائي عند (37 درجة مئوية) مدة (3 دقائق).
- ثم يضاف لانبوبة الاختبار (test) (0.1 ملليلتر) من الانزيم المنقى جزئياً مع مراعاة الرج الجيد.
- تحضين في الحمام المائي (15 دقيقة) عند (37 درجة مئوية).

0.8 ml (0.5N) NaOH	0.8 ml (0.5N) NaOH + 0.1 ml (enzyme sample)	0.8 ml (0.5N) NaOH	0.8 ml (0.5N) NaOH
1.2 ml (0.5N) $NaHCO_3$	1.2 ml (0.5N) $NaHCO_3$	1.2 ml (0.5N) $NaHCO_3$	1.2 ml (0.5N) $NaHCO_3$
1 ml Reagent (3)	1 ml Reagent (3)	1 ml Reagent (3)	1 ml Reagent (3)
1 ml Reagent (4)	1 ml Reagent (4)	1 ml Reagent (4)	1 ml Reagent (4)

– تقرأ الامتصاصية عند الطول الموجي (510 نانوميتر)

–الحسابات:

فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي = $\frac{\text{امتصاصية محلول الاختبار – امتصاصية محلول السيطرة}}{\text{امتصاصية المحلول القياسي – امتصاصية محلول السيطرة}} \times 10$ (Kind and King U/dl)

–تقدير كمية البروتين:

استخدمت طريقة الباحث لاوري المحورة (Schacterle and Pollack,1973) لتقدير تركيز البروتين.

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج احتواء المستخلص الرائق لنبا ت الصبار على فعالية عالية لانزيم الفوسفاتيز القاعدي ومقدارها (79.16) وعليه فقد اختير نبات الصبار بوصفه مصدراً لعزل الانزيم وتنقيته وتحديد صفاته في الدراسات اللاحقة في هذا البحث.

***–عزل انزيم الفوسفاتيز القاعدي من نبات الصبار وتنقيته:**

إن نتائج التنقية الجزئية لانزيم الفوسفاتيز القاعدي من الصبار موضحة في الجدول (1) اذ يلاحظ أن الفعالية النوعية للانزيم زادت بمقدار (1.8 مرة) بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم.

إن تجزئة البروتين الكلي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام الهلام من النوع Sephadex G-100 أظهرت حزمتين بروتينيتين رئيسيتين (I&II) وكما موضح في الشكل (1).

ومن خلال قياس فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي تبين أن الحزمتين (I&II) تمتلكان فعالية متباينة اذ تمتلك الحزمة الأولى (I) فعالية نوعية أعلى مقارنة بالحزمة الثانية (II) كما موضح في الجدول (1)، وبذلك عدت الحزمة الأولى (I) الحزمة الرئيسة الفعالة والمحتملة لانزيم

الفوسفاتيز القاعدي في الدراسات اللاحقة في هذا البحث، كما يوضح الجدول (1) أن الفعالية النوعية للانزيم في الحزمة البروتينية الأولى اكثر بمقدار (28 مرة) عن الفعالية النوعية للانزيم في المستخلص الخام.

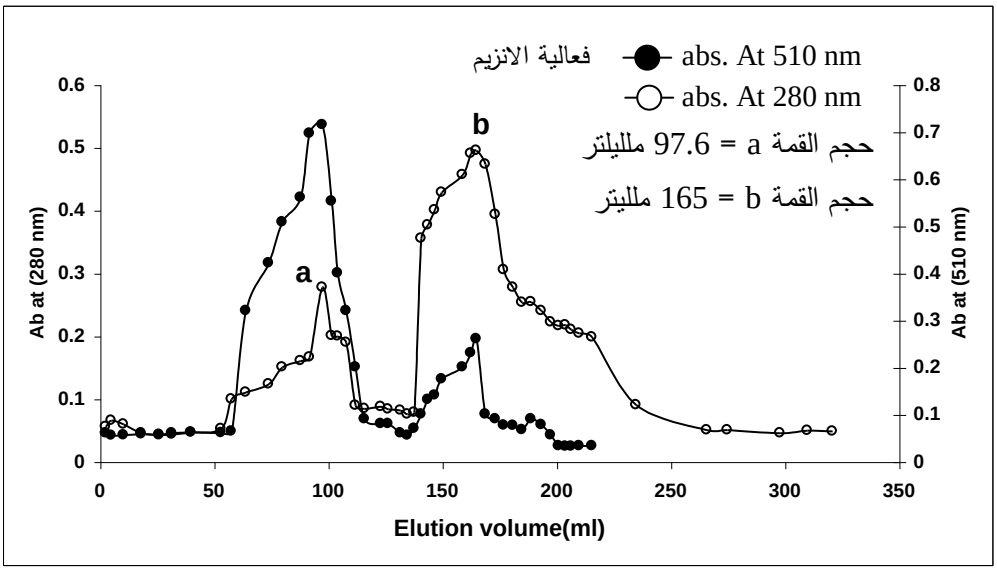
الجدول (1): خلاصة نتائج مراحل تنقية انزيم الفوسفاتيز القاعدي من نبات الصبار

مراحل التنقية		تركيز البروتين ملغرام/ مليلتر	البروتين الكلي ملغرام	الفعالية*	الفعالية الكلية	الفعالية النوعية**	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
المحلول المتجانس		1.39	3475	87.9	219750	63.237	100	1.0
المستخلص الرائق		1.41	1621.5	149.4	171810	105.9	78.2	1.7
الترسيب بكبريتات الأمونيوم (0-75%)		2.7	1725.84	307.3	196426.2	113.8	89.4	1.8
الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-100	الحزمة البروتينية الأولى	0.0915	16.836	161.66	29745.44	1766.775	13.536	28
	الحزمة البروتينية الثانية	0.137	61.65	26.2	11790	191.24	5.365	3.0

*الفعالية: عدد وحدات الانزيم الموجود في 100 مليلتر من المحلول البروتيني.

وان وحدة الانزيم مقاسة بال (Kind and King U/dl) وتعبر عن كمية الانزيم اللازمة لتحرير (1 mg) فينول في (15 دقيقة) وبدرجة (37 مئوية).

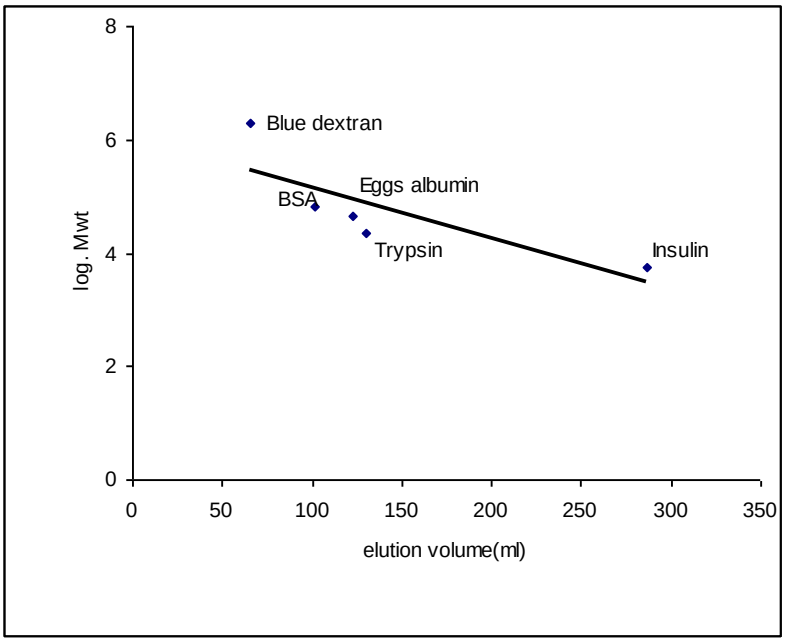
**الفعالية النوعية: عدد وحدات الانزيم (Kind and King U/dl) لكل ملغرام بروتين.



الشكل (1): المظهر الجانبي لروغان المحلول البروتيني بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (2×88)سم والحاوي لمادة الهلام (sephadex G-100) على ارتفاع (75)سم.a وb تمثل قمتي الحزم البروتينية الاولى والثانية على التوالي، سرعة الجريان (50 مليلتر/ساعة).

***-تحديد الوزن الجزيئي:**

من خلال استخدام تقنية الترشيح الهلامي على عمود الفصل ذي الأبعاد (2×88) سنتيمتر والحاوي على الهلام من نوع Sephadex G-100، تم تحديد الوزن الجزيئي التقريبي لانزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا حيث وجد ان وزنه الجزيئي (147353 دالتون) وهذا مقارب لحد بعيد لما وجده الباحث [7] حيث وجد ان الوزن الجزيئي لانزيم الفوسفاتيز القاعدي المعزول من كلى الابقار كان مقداره (140000 دالتون)وهذا يتفق مع ما وجده [6]حيث وجد ان انزيم الفوسفاتيز القاعدي المعزول من الطبقة المخاطية المبطنة لامعاء العجول يتكون من اثنتين من الوحدات الثانوية (sub-units) يبلغ الوزن الجزيئي لكل وحدة (69000دالتون). في حين وجد ان الوزن الجزيئي لانزيم الفوسفاتيز القاعدي المعزول من نبات البزاليا مقداره(103000دالتون)[4] ، ويقدر الوزن الجزيئي لانزيم الفوسفاتيز القاعدي المعزول من بكتريا Streptomyces griseus بمقدار (124000 دالتون)، ويوضح الشكل (2) المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي للانزيم بتقنية الترشيح الهلامي.



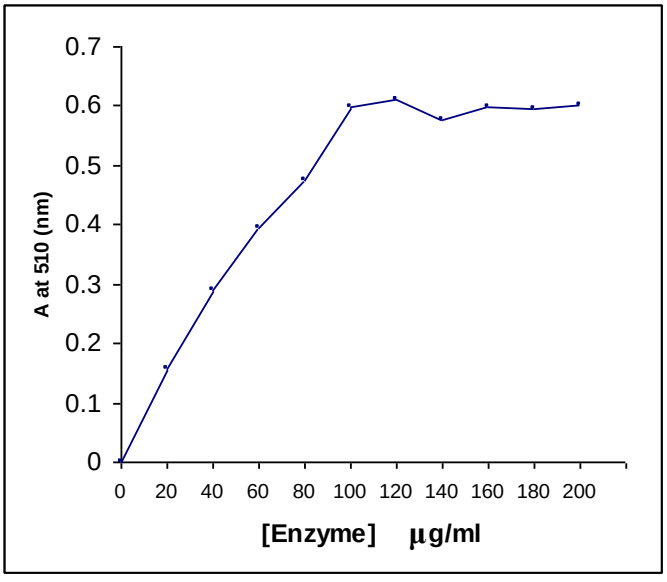
الشكل(2) المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي

***-تحديد الظروف المثلى لعمل الانزيم:**

لغرض تحديد الظروف المثلى لعمل انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا من نبات الصبار اجريت التجارب الاتية:

_ تأثير تركيز الانزيم على فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي :

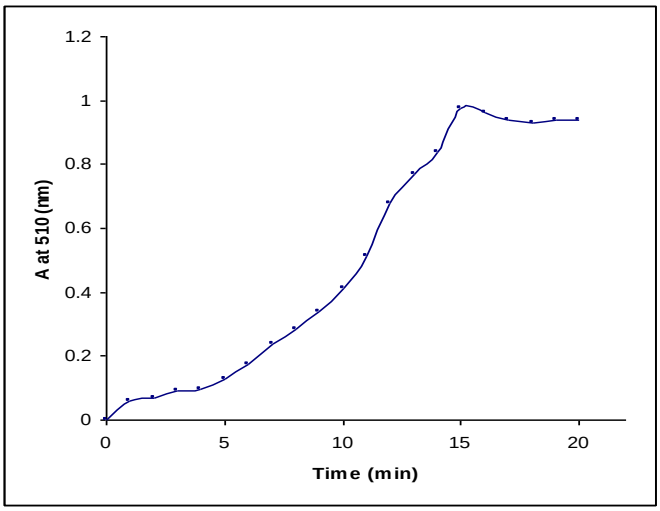
يبين الشكل (3) ان اعلى فعالية لانزيم الفوسفاتيز القاعدي تم الحصول عليها عند (120µg/ml) وهذا يتفق مع[12] قد اعتمد هذا التركيز في التجارب اللاحقة.



الشكل (3) تأثير تركيز البروتين (بوصفه مصدراً للانزيم) في فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي

- **زمن التفاعل:**

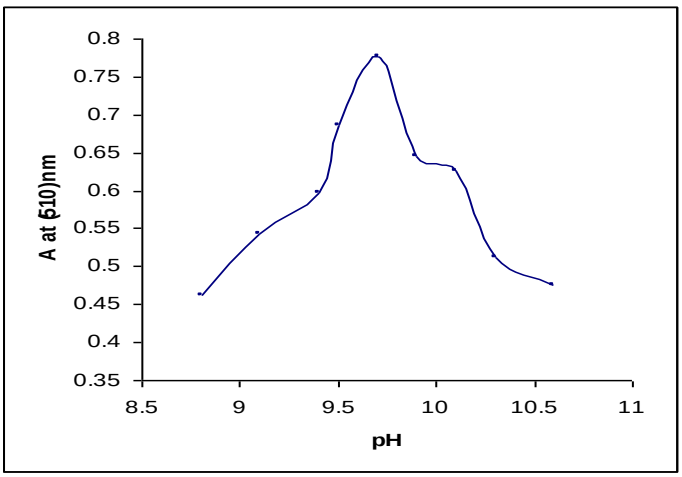
تزداد فعالية انزيم الفوس فاتيز القاعدي تدريجيا الى ان تظهر اعلى فعالية للانزيم بعد (15 دقيقة) من زمن التفاعل وكما هو مبين في الشكل (4) وهذا يتفق مع نتائج الباحثين في الادبيات[7,6] .



الشكل (4) العلاقة بين فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا من نبات الصبار وزمن التفاعل

-تأثير تركيز المحلول المنظم والاس الهيدروجيني:

اظهرت النتائج ان اعلى فعالية لانزيم الفوسفاتيز القاعدي كانت عند اس هيدروجيني مقداره (9.7) كما في الشكل (5) في المحلول المنظم ذ ي التركيز (100mM) كما موضح في الجدول (2).



الشكل (5) تأثير الاس الهيدروجيني (pH) على فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا من نبات الصبار في المحلول المنظم ((100 ملي مولار) كاربونات-بيكاربونات الصوديوم)

الجدول (2) تأثير تركيز المحلول المنظم (كاربونات الصوديوم_بيكاربونات الصوديوم) في فعالية انزيم الفوسفاتيز المنقى جزئيا من الصبار

تركيز المحلول المنظم(كاربونات الصوديوم_بيكاربونات الصوديوم) (mM)	*الفعالية لانزيم الفوسفاتيز القاعدي (Kind and King U/dl)
50	157.5
100	160.4
150	158.5
200	156.5

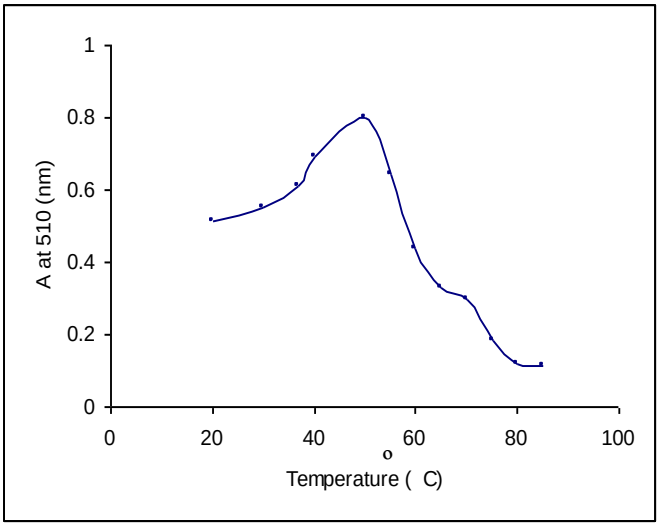
*الفعالية: عدد وحدات الانزيم الموجود في 100 مليلتر من المحلول البروتيني.

وان وحدة الانزيم مقاسة بال (Kind and King U/dl) وتعبر عن كمية الانزيم اللازمة لتحرير (1 mg) فينول في (15 دقيقة) وبدرجة (37 مئوية).

تشير الدراسات السابقة الى ان pH الامثل لانزيم الفوسفاتيز القاعدي يساوي (9.13)[13] ، و pH الامثل لانزيم الفوسفاتيز المستخلص من البزاليا مقداره (8.0)[4] و pH الامثل للانزيم المعزول من كلى الابقار مقدارهـ(9.8)[12]

_ تأثير درجة الحرارة في فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي:

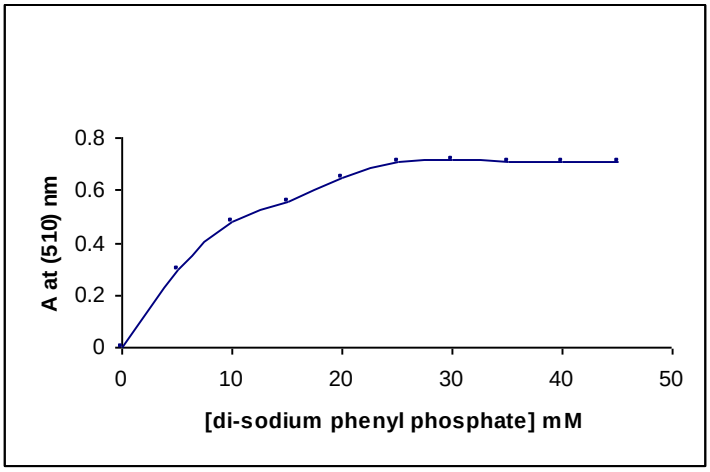
وجد ان درجة الحرارة ال مثلى للانزيم تساوي (50 درجة مئوية) وكما موضح في الشكل(6). وتبين الدراسات السابقة ان درجة الحرارة المثلى لانزيم الفوسفاتيز القاعدي تساوي (62 مئوية)[14] ودرجة الحرارة المثلى لانزيم الفوسفاتيز القاعدي المعزول من كلى الابقار مقدارها (56 مئوية)[12].



الشكل (6) تأثير درجة حرارة التفاعل في فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا من نبات الصبار

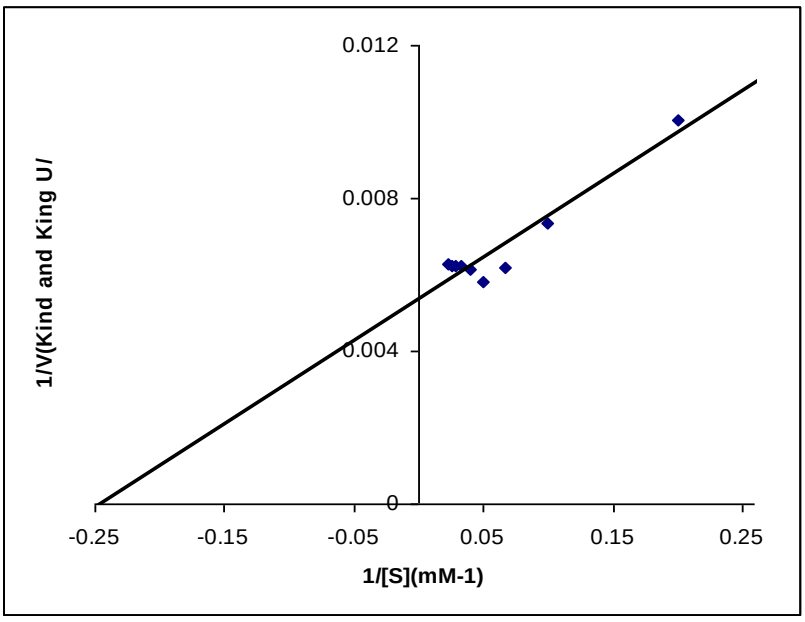
_ تأثير تركيز مادة الاساس في فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي:

درس تأثير تركيز مادة الاساس، ويوضح الشكل (7) ان تشبع الانزيم بـالمادة الأساس الفنيل فوسفات ثنائية الصوديوم di-sodium phenyl phosphate حصل عند استخدام تركيز (30 ملي مولار) من مادة الاساس.



الشكل (7) تأثير تركيز مادة الاساس di-sodium phenyl phosphate في فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا من نبات الصبار

واظهر رسم لاينويفر– بيرك الشكل (8) ان قيم تي Vmax و Km على التوالي (185.18 وحدة انزيمية/100مليلتر من المحلول البروتيني) و (3.9 ملي مولار).



الشكل(8) رسم لاينويفر–بيرك لتوضيح قيمة Km و Vmax

وتشير الدراسات السابقة الى ان قيمة Km لانزيم الفوسفاتيز القاعدي المستخلص من بكتريا Streptomyces griseus تساوي (130 مايكرومول) باستخدام مادة 4–نايترو فنيل فوسفات بوصفها مادة اساساً[15].

ووجد الباحث[12] ان قيمة Km تساوي(21.5 مايكرومول) باستخدام Pyridoxine 5'-phosphate بوصفها مادة اساساً، وفي دراسة اجراها [16] لدراسة حركية انزيم الفوس فاتيز القاعدي في مصل الدم باستخدام Pyridoxine 5'- phosphate بوصفها مادة اساساً كانت قيمة Km بمدى (11±56 مايكرومول).ومن ثمة فان الظروف المثلى لعمل انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا من نبات الصبار موضحة في الجدول (3)

جدول (3): الظروف المثلى لقياس فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا من نبات الصبار

تركيز الانزيم (مايكروغرام/مليلتر)	زمن التفاعل (دقيقة)	التركيز والأس الهيدروجيني للمحلول المنظم	درجة الحرارة (درجة مئوية)	تركيز مادة الأساس (ملي مولار)
120	15	9.7	50	30

وقد وجد ان فعالية انزيم الفوسفا تيز القاعدي تزداد بمقدار (3.2 %) باستخدام الظروف المثلى مقارنة مع الظروف التمهيدية.

*****تأثير الخزن:

يوضح الجدول (4) دراسة تأثير فترة ودرجة حرارة الخزن على فعالية الانزيم اذ ظهر أن الانزيم يحتفظ ب (76%) من فعاليته عند خزن .هـ فـي درجة ح رارة (4 مئوية) مدة (30 يوماً) في حين يحتفظ ب (50%) من فعاليته عند خزنه في درجة حرارة الغرفة (33-40 مئوية) مدة (30 يوما). ومن هذه النتيجة تبين أن الانزيم يمتلك استقرارية حرارية في الدرجات الحرارية الاعتيادية.

الجدول (4) تأثير فترات الخزن في فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزئيا من نبات الصبار عند درجة حرارة الغرفة (33-40 مئوية) ودرجة حرارة (4 مئوية).

فترة الخزن بالأيام	%للفعالية *،** عند درجة حرارة (4 درجة مئوية)	%للفعالية *،** عند درجة حرارة الغرفة (33-40 درجة مئوية)
0	100	100
1	98	94
5	89	82
10	88	70
20	82	63
30	76	50

* % للفعالية : تحسب بالاعتماد على ان فعالية الانزيم قبل الخزن هي (100%)

** قيست فعالية الانزيم تحت الظروف المثلى الموضحة في الجدول (3).

المصادر

1- I.D.P.Wotton, Micro analysis in medical biochemistry. 4th ed., J. and D. Churchill. LTD, London Group Limited, p.113.1974.

2- L.G.Whitby, A.F.Smith and G.J. Beckett Lecture notes on clinical chemistry. 4th ed. Blackwell Scientific Publications, U.K., pp.26,121. 1988.

3- L.Bishop, J.L. Duben and E.P. Fody ,Clinical Chemistry: principles, procedures correlations. J.B. Lippincott company, London. 1985.

4- J.Kieleczawa, S.J.Coughlan and G. Hind, Isolation and characterization of an alkaline phosphatase from Pea thylakoids. Plant Physiol. 99(3):1029-1036. 1992.

5- L.Schedule, Isolation and characterization of alkaline phosphatase from *E.Coli*.J.Cell Sci.,(3):20-24,2002.

6- S.Bhattacharjee, A.K. Das and S.K. Mandal, Isolation and characterization of alkaline phosphatase from calf intestine mucosa . Indian J. Biotechnology, 3(4):558. 2004.

7- S.Fujimoto, Y.Urata, T.Nakagawa and A.Ohara, Characterization of intermediate-moleculare weight alkaline phosphatase from bovine kidney cortex. J. Biochem (Tokyo). 96:1079-1088. 1984.

8- P.R.N. Kind and E.J.King, Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. J.Clin. Path., (7), 322-326. 1954.

9- G.R. Schacterle, and R.L.Pollack, A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. Anal. Biochem., 51:654-655. 1973.

10- M. Dioxin, and E.C. Weeb, Tools of Biochemistry. T.G.Copperol, John Wiley and Sons, Inc. p. 370. 1961.

11- P.Andrews, The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. J. Biol. Chem.,96: 595. 1964.

12- S.P.Coburn, J.D.Mahuren, M. Jain, Y. Zubovic and J. Wortsman, Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) in serum is inhabited by

physiological concentrations of inorganic phosphate. J. Clin. Endocrinology &Metabolism. 83(11):3951-3957. 1998.

13- M.H.Ross, J.O.Ely and J.G. Archer, Alkaline phosphatase activity and pH optima. J.Biol.chem. 192:561-568. 1951.

14- M.K.Chattopadhyay, K.U.Devi, Y. Gopishankar and S. Shivaji, Thermolabile alkaline phosphatase from sphingobacterium antarcticus a psychrotrophic bacterium from anarctica. Polar Biology. 15(3): 215-219. 1995.

15- R.S.Moura, J.F.Martin, A.Martin and P.Liras, Substrate analysis and moleculare cloning of the extracellulare alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. Microbiology. 147:1525-1533. 2001.

16- H.N. Fernley and P.G. Walker, Studies on alkaline phosphatase, inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. Biochem. J. 104:1011-1018. 1967.