استخلاص وتنقية انزيم اليوريز من بكتريا *Proteus mirabilis*
Extraction and Purification of the Urease Enzyme from the *Proteus mirabilis* Bacteria

انتصار حسين علي هديل حميد داود
الجامعة التكنولوجية
Entesar Hussain Ali Hadeel Hameed Dawud
University of Technology
E-mail:Entesar_mosawi@yahoo.com

الملخص

حصل على العزلة البكتيرية من الاشخاص المصابين بالحروق من مستشفى الإمام علي في مدينة الصدر وبعد ان شخصت مظهريا ومجهريا بجهاز Vitek ومن ثم اثبتت قدرتها على انتاج اليوريز باستخدام وسط الإنتاج الزرعي مرق اللوريا Luria broth لانه وسط مناسب لتنمية خلايا البكتريا واستخلاص الانزيم ثم اجريت عمليات تنقية للانزيم تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيوم كخطوة تنقية اولية، ثم التبادل الايوني، والترشيح الهلامي ثم حددت فعالية الانزيم لكل خطوة تنقية. وقد اظهرت نتائج تنقية اليوريز المستخلص من عزلة *Proteus mirabilis* باستخدام كبريتات الامونيوم ان الفعالية النوعية كانت4.71 وحدة/ملغم، وان افضل نسبة اشباع كانت 60%، وعدد مرات التنقية والحصيلة الانزيميةهما 3.5و14.6% على التوالي. وظهرت نتائج التنقية باستخدام عمود التبادل الايوني DEAE -Cellulose ان الفعالية النوعية كانت 12.29 وحدة/ملغم، وعدد مرات التنقية والحصيلة الإنزيمية 9.2و 8 % على التوالي بينما كانت الفعالية النوعية15.1 وحدة/ملغم وعدد مرات التنقية والحصيلة الانزيمية 11.27، 14% على التوالي باستخدام عمود الترشيح الهلامي.

الكلمات الدالة: بروتيس مربلس، يورييز، الترشيح الهلامي

Abstract

Bacterial isolate was identified using vitek diagnosis; it's obtained from burns from Al-imam Ali Hospital which proved its ability to produce Urease by using Luria broth culture media because it is suitable for growing bacterial cells and for extraction of enzyme. Enzyme purification processes include precipitation with Ammonium sulfate, ion exchange chromatography and gel filtration then the enzyme activity was measured for each purification step. The results of Urease purification that extracted from the isolate of *Proteus mirabilis* using ammonium sulphate showed that the specific activity was 4.71 unit/mg, and the best saturation ratio was (60%), the number of purification times and yield were 3.5and14.6% respectively. Furthermore, the result of purification using Ionic exchange - Cellulose DEAE was gave the specific activity 12.29 units/mg, the number of purification times and the enzymatic yield were 9.2, 8% respectively while the specific activity was 15.1units/mg and the number of purification times and the enzymatic yield 11.27and 14% respectively by using gel filtration.

Keywords: *Proteus mirabilis*, Urease, Gel -filtration

المقدمة

الانزيمات Enzymes هي بروتينات متخصصة اذ تتصف بالصفات العامة للبروتينات، وتكون ذات وزن جزيئي عالي، وهي محفزات حيوية تنتج من قبل خلايا الجسم، تعمل على تسريع التفاعلات الكيميائية دون ان تستهلك وتتشابه الإنزيمات في عملها مع العوامل المساعدة الكيميائية الأخرى الا إنها تمتاز عنها في كونها ذو درجة عالية من التخصص، وبكفائتها العالية، تتكون الانزيمات من مجموعة من الاحماض الامينية التي ترتبط مع بعضها بالاواصر الببتيدية، تتاثر الانزيمات بعدة عوامل منها درجة الحرارة والاس الهيدروجيني اذ تصبح غير فعالة عند تغير التركيب الطبيعي لها [1].

اليوريز Urease إنزيم يحتوي على النيكل يحفز التحلل المائي لليوريا Urea الى الامونيا Ammonia وثنائي اوكسيد الكاربون، ينتج من قبل البكتريا، الطحالب، الفطريات، والنباتات الراقية وظيفته الاساسية هو السماح للكائنات المجهرية بأستخدام اليوريا كمصدر اساسي للنايتروجين، أما في النباتات فانه يدخل في مسارات نقل النايتروجين النظامية، و في الإنسان يعمل اليوريز المنتج من قبل البكتريا كعامل ضراوة رئيسي في اصابات القناة البولية والهضمية [2].

تعود بكتريا Proteus الى عائلة البكتريا المعوية Enterobacteriaceae تكون واسعة الانتشار في البيئة الطبيعية اذ تتواجد في المياه الملوثة والتربة وتتواجد عادة في أمعاء الإنسان والحيوان تمتاز بقابليتها على تحطيم اليوريا الى أمونيا وثنائي اوكسيد الكاربون من خلال انتاج انزيم اليوريز حيث يكون أحد الأسباب الرئيسية في استيطان البكتريا للقناة البولية Urinary tract وتكوين العدوى Infection [3].

تستخلص الانزيمات من الاحياء المجهرية اعتماداً على اماكن تواجدها حيث تنتج الاحياء المجهرية اما انزيمات خارجية Extracellular enzymes اي انها تنتج الانزيم وتفرزه خارج الخلية الى الوسط المحيط حيث يعمل خارج الخلية والذي تكون عملية

استخلاصه وتنقيته اسهل، او انزيمات داخلية Intracellular enzymes والتي تبقى ضمن الخلية ولا تفرز خارجها وتكون عملية استخلاصه وتنقيته اصعب اذ يجب ان يتم تحليل الخلية اولا لاستخلاص الانزيم، والخطوة الاولى في تنقية الانزيمات تتضمن فصل الجزء البروتيني عن الجزء الغير بروتيني بطريقة التمليح الخارجي Salting out، بعد ذلك تنقى الانزيمات بعمود التبادل الايوني Ion exchange chromatography، ثم بعمود الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography [4].

هدفت الدراسة الى استخلاص وتنقية اليوريز Urease من بكتريا *Proteus mirabilis* لمعرفة الخصائص الحيوية للانزيم المستخلص والمنقى وذلك من خلال الخطوات التالية

1-عزل البكتريا وفحص وتقييم قدرة العزلات على انتاج اليوريز

2-استخلاص الانزيم بجهاز النبذ المركزي Centrifuge

3-تنقية الانزيم بالطرق الاتية (التمليح الخارجي Salting out بواسطة الترسيب بكبريتات الامونيوم، المبادل الايوني Ion exchange chromatography، الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography).

المواد وطرائق العمل

1- زرع البكتريا في وسط الانتاج

حصل على العزلة البكتيرية *Proteus mirabilis* المشخصة مجهرياً ومظهرياً ومشخصة بجهاز Vitek من الحروق من مستشفى الإمام علي في مدينة الصدر بنسبة نقاوة 99% بعدها حضر وسط الانتاج الزرعي وسط مرق اللوريا Luria broth المكون من (خلاصة الخميرة 5 غرام، كلوريد الصوديوم 0.5 غرام، تربتون 10 غرام والمضاف اليه 0.1 % من اليوريا المادة الاساس لعمل الانزيم) في 1000 مليلتر من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المنتجة عقم الوسط المحض تعقيمه في جهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة 121س° لمدة 15 دقيقة وضغط 15 باوند/انج^2 ثم زرعت العزلة البكتيرية في وسط الانتاج وحضنت في الحاضنة الاعتيادية بدرجة حرارة 37س° لغرض التنمية ولمدة 24ساعة بعدها حضن الزرع بالحاضنة الهزازة Rotating shaking incubator بعدد دورات 150 دورة/دقيقة وبدرجة حرارة 35 س° وذلك لكونها درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم اذ تم اعتمادها بعد دراسة الظروف المثلى للانتاج يلاحظ بعدها نمو الخلايا البكتيرية بتغير الوسط وتحوله الى وسط مضبب [5].

2-تحديد الظروف المثلى لانتاج اليوريز

درجة الحرارة المثلى لإنتاج الانزيم

لتعيين الدرجة الحرارية المثلى لانتاج انزيم اليوريز Urease حضن الوسط الزرعي للانتاج الذي يحتوي على زرع البكتريا بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين 20، 25، 30، 35، 40، 45س° في الحاضنة لمدة 48 ساعة بعدها حددت الفعالية للإنزيم المنتج من بكتريا *Proteus mirabilis* لمعرفة درجة الحرارة المثلى [6].

الرقم الهيدروجيني pH الامثل للإنتاج

لتعيين الاس الهيدروجيني الأمثل لانتاج الإنزيم تم تغيير الاس الهيدروجيني للوسط الزرعي للانتاج وذلك ضمن حدود 4.5، 5، 5.5، 6، 6.5، 7، 7.5، 8 تم بعدها تلقيح الوسط ببكتريا *Proteus mirabilis* وحضنت بدرجة حرارة 35 س° لمدة 48 ساعة لاستخلاص الانزيم [7].

4-استخلاص انزيم اليوريز من البكتريا

وضع الزرع البكتيري الذي حصل عليه من خطوة الزرع في وسط الانتاج في أنابيب إختبار مناسبة plain tube ثم رسبت الخلايا بجهاز الطرد المركزي Centrifuge لاستخلاص الانزيم وذلك لكون الانزيم يفرز خارج الخلية Extracellular enzyme وعليه تم فصله عن طريق عملية الطرد المركزي Centrifugation عند 3000 دورة/الدقيقة لمدة 15 دقيقة حيث تترسب الخلايا في قعر انبوب الاختبار ويبقى الراشح الذي يتم عليه اجراء عمليات التنقية الأولية اذ تستخدم أوراق الترشيح للحصول على راشح نقي يمثل الإنزيم[8].

5-قياس فعالية انزيم اليوريز الخام

تقاس فعالية انزيم اليوريز اعتمادا على معدل تحلل اليوريا وانتاج الامونيا، اذ تم قياس فعالية الانزيم اعتمادا على طريقة وذربورن Weatherburn [9] مع بعض التحوير حيث اضيف 0.5 مل من محلول المادة الاساس والمكون من اليوريا بتركيز0.167 مولاري و Tris-HCl بتركيز 0.2 مولاري ذو اس هيدروجيني 7.4 الى 0.5 مل من الانزيم الخام ثم اضيف الى المزيج 1مل من المادة الموقفة للتفاعل TCA بتركيز 10% ثم حضن المحلول لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة بعدها رسب المحلول باستخدام النبذ المركزي عند 2000 دورة بالدقيقة ولمدة 10 دقائق بعد الترسيب قيست فعالية الانزيم بقراءة الامتصاصية للراشح الناتج بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 625 نانومتر[9].

6-تنقية انزيم اليوريز Urease purification

الترسيب بكبريتات الامونيوم Ammonium Sulfate Precipitation

اضيفت اوزان معينة من كبريتات الامونيوم Ammonium Sulfate الى 200 مل من الانزيم الخام بنسب اشباع تراوحت بين 20 ، 40، 60 و 80% بالتدريج مع التحريك المستمر للحصول على افضل نسبة تشبع للانزيم وبنقاوة اعلى من النسب الاخرى ثم وضع الانزيم في حمام ثلجي على محرك مغناطيسي وبعدها فصلت المكونات بجهاز الطرد المركزي على 1600 دورة بالدقيقة لمدة 10 دقائق يهمل الراشح ويذاب الراسب في 5 مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي phosphate buffer slain ذو الاس هيدروجيني 7.4وبعدها تقاس الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجي 625 نانومتر[10].

تنقية انزيم اليوريز باستخدام عمود التبادل الايوني Urease purification by ion exchange chromatography

تحضير عمود المبادل الايوني Preparation of ion exchange column

حضرت مادة DEAE-Cellulose اعتمادا على الطريقة التي وصفها العالمان Whitaker وBernhard [11] اذ علق 10 غم من مادة المبادل الايوني في اسطوانة مدرجة تحتوي 1 لتر من الماء المقطر اذ تترسب المادة ويسحب الراشح كررت العملية عدة مرات لحين الحصول على عالق نقي ثم رشحت بعدها بأستخدام قمع بخنر Bukhner's funnel بعدها وضعت المادة في عدة محاليل بفرية حيث وضعت في 500مليلتر من محلول كلوريد الصوديوم NaCl (0.25) مولاري وغسلت 3-5 مرات بالماء المقطر لمدة 30 دقيقة، ثم وضعت في 500 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH (0.25) مولاري لمدة 30 دقيقة، وغسلت من 3-5 مرات بالماء المقطر بعدها وضعت في 250 مل من محلول حامض الهيدروكلوريك HCl (0.25) مولاري لمدة 30 دقيقة ثم غسلت من 3-5 مرات بالماء المقطر ثم وضعت في محلول Tris-HCl (0.02 مولاري ورقم هيدروجيني 7.5) بعدها توضع المادة في عمود ابعاده (1.5 × 10) سم ثم يترك العمود لحين تصلب المادة [11].

فصل انزيم اليوريز خلال عمود المبادل الايوني

وضع 10 مل من الانزيم ببطئ على جدرن عمود المبادل الايوني الذي يحتوي على مادة المبادل باستخدام القطارة dropper في انابيب مناسبة وبمعدل جريان 36 مل/الساعة 3 مل لكل جزء، ثم تم اجراء خطوة الغسل Wash step الجزء المفصول يجمع بأستخدام محلول Tris –HCl ذو رقم هيدروجيني 7.5 في حين خطوة الاسترداد Elution اجريت بأستخدام تراكيز مختلفة من كلوريد البوتاسيوم0.5-0 مولاري بعدها تم قياس الامتصاصية لكل جزء مسترد عند طول موجي 280 نانومتر لكل من خطوات الغسل والاسترداد ثم تم حساب فعالية الانزيم في الاجزاء المجموعة من المبادل لتحديد الاجزاء الحاوية على فعالية الانزيم من خلال حساب فعالية الانزيم وتركيز وحجم البروتين [12].

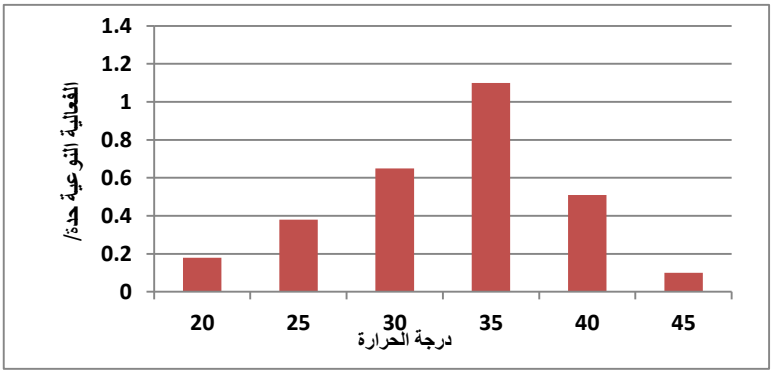
تنقية الانزيم بالترشيح الهلامي Enzyme purification by gel filtration

حضرت مادة الترشيح الهلامية تبعا لتعليمات الشركة المجهزة Pharmacia Sweden اذ وضعت مادة Sephadex G-200 في 500مليلتر من الماء المقطر لأزلة المواد الحافظة بعدها غسلت بمحلول دارئ الفوسفات potassium phosphate buffer عند رقم هيدروجيني 7.5 وبتركيز 0.2 مولاري ثم عبئت المادة في عمود ذو ابعاد (1.5×60) سم وتركت لتتصلب بعدها تم معايرة العمود بأستخدام محلول دارئ الفوسفات نفسه. ثم أخذ 8 مل من الانزيم المنقى في خطوة التبادل الايوني ووضع ببطئ على جدران عمود الترشيح الهلامي، وتم استرداد الانزيم باستخدام نفس المحلول الذي غسلت به المادة عند معدل جريان 30 مل/ساعة، 3 مل لكل جزء بعدها قيست امتصاصة الجزء البروتيني عند طول موجي 280 نانومتر وقيست فعالية الأنزيم لجميع القمم البروتينية و حسب تركيز البروتين [13].

النتائج والمناقشة

درجة الحرارة المثلى لانتاج اليوريز

اختيرت عدة درجات حرارية لمعرفة درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم وقد أوضحت النتائج ان افضل درجة حرارة لإنتاج الإنزيم هي 35س° وكما موضح في شكل (1). اذا إن اعلى فعالية نوعية كانت 1.1 وحدة/ملغم وهذا يتفق مع البحوث السابقة في قياس درجة الحرارة المثلى لانتاج إنزيم اليوريز [7]، اذ يؤثر ارتفاع درجة الحرارة على انتاجية الانزيم من خلال تأثيرها على سرعة التفاعلات الانزيمية داخل الخلية وعلى بعض العوامل المساعدة لنمو العزلة البكتيرية مثل أنخفاض في كمية الاوكسجين الذائب ومسخ البروتينات اما درجات الحرارة المنخفضة فأنها تسبب بطئ في نمو الكائن المجهري وبالتالي بطئ في انتاج الانزيم [14].

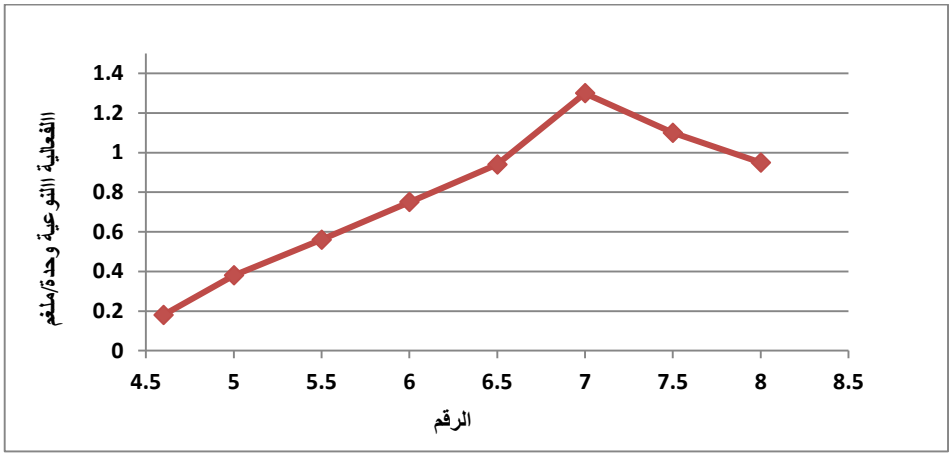


شكل (1): تأثير درجة الحرارة في انتاج إنزيم اليوريز من بكتريا *Proteus mirabilis*

الاس الهيدروجيني الامثل لانتاج اليوريز

اختيرت عدة أسس هيدروجينية لمعرفة الاس الهيددروجيني الأمثل لانتاج إنزيم اليوريز وقد اوضحت النتائج إن افضل اس هيدروجيني لانتاج الانزيم كان 7 حيث اعطى اعلى فعالية نوعية عند هذا الاس اذ وصلت الفعالية النوعية الى 1.3 وحدة/ملغم وكما يلاحظ في شكل (2) بينما أدت الأسس الهيدروجينية الأخرى الى تقليل الفعالية وهذا يتفق مع البحوث السابقة في قياس الاس الهيدروجيني الامثل لانتاج إنزيم اليوريز [15] اذ يؤدي استخدام الاسس هيدروجينية اخرى الى نقصان معدل النمو للكائن المجهري

وكذلك يؤثر على تركيب البروتين الثلاثي Tertiary Stricture اذ يؤدي تأثيره على الحالة الايونية لوسط الانتاج وكذلك يؤثر في نمو الكائن المجهري المراد انتاج الانزيم منه [16].



شكل (2): تاثير الرقم الهيدروجيني في انتاج انزيم اليوريز من بكتريا *Proteus mirabilis*

التنقية بكبريتات الامونيوم

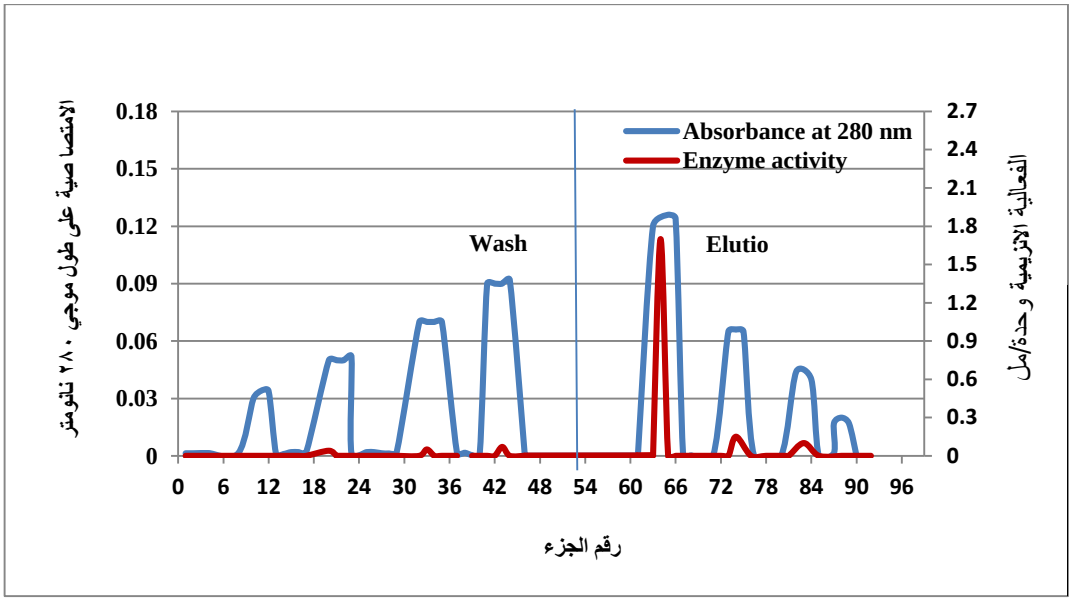
استخدمت كبريتات الامونيوم كخطوة تنقية اولية في تنقية انزيم اليوريز من بكتريا *Proteus mirabilis* حيث تستخدم مثل هذه الاملاح للتخلص من نسبة عالية من الماء وفي ترسيب البروتينات وللحصول على درجة نقاوة اعلى اذ تم استخدام درجات تشبع مختلفة من كبريتات الامونيوم تراوحت بين 20، 40، 60، 80% لمعرفة اي درجة تشبع ترسب الانزيم بنسبة اعلى من خلال حساب فعالية الانزيم بعدها جمع الانزيم بعملية النبذ المركزي عند 1600 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة وقيست بعدها فعالية الانزيم واظهرت النتائج الوضحة في جدول (1) ان افضل نسبة تشبع بكبريتات الامونيوم للحصول على فعالية نوعية اعلى لليوريز هي 60% حيث اصبحت الفعالية النوعية للانزيم 4.71 وحدة/ملغم مقارنة بالفعالية النوعية للانزيم المستخلص الخام والبالغة 1.34وحدة/ملغم اما عدد مرات التنقية والحصيلة الانزيمية فقد بلغت 3.5 و 14.6% على التوالي [17].

جدول (1) : نتائج خطوات التنقية لانزيم اليوريز المستخلص من بكتريا *Proteus mirabilis*

خطوات التنقية	الحجم (مليلتر)	الفعالية الانزيمية (وحدة/مليلتر)	تركيز البروتين (ملغم/مليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية %
الانزيم الخام	90	2.15	1.6	1.34	193.5	1	100
التنقية بعد المعاملة بكبريتات الامونيوم	10	2.83	0.6	4.71	28.3	3.5	14.6
التنقية بعد التبادل الايوني DEAE-cellulose	9	1.72	0.14	12.29	15.48	9.2	8
التنقية بعد الترشيح الهلامي Sephadex G-200	10	2.71	0.18	15.1	27.1	11.27	14

التنقية بالتبادل الايوني

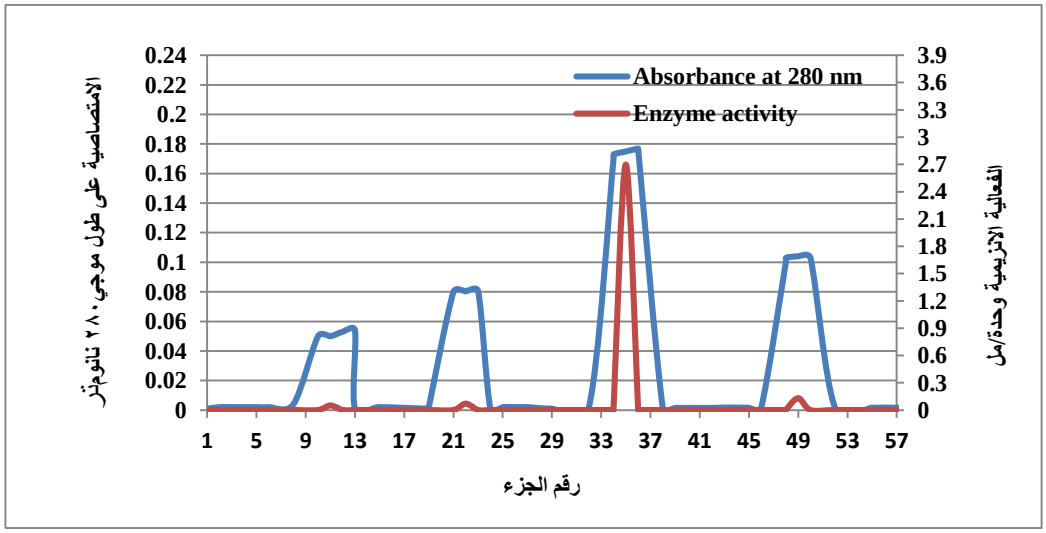
استخدام عمود التبادل الايوني DEAE-Cellulose وهو من مبادلات الشحنة السالبة (Anion exchange) حيث مرر الانزيم في عمود التبادل الايوني والذي تم معايرته باستخدام محلول منظم Tris-Hcl (0.02, pH =7.5 مولاري) كما موضح في شكل (3) اذ اظهرت النتائج أن هنالك اربع قمم بروتينية في الأجزاء المستردة من المبادل، إلا أن الفعالية الأنزيمية تركزت في قمة واحدة فقط اي في الجزء ذات القمم العالية يظهر الانزيم باعلى نقاوة حيث ان اعلى كمية من الانزيم تم الحصول عليها عند هذه النقطة اما في القمم الواطئة ظهرت كمية البروتين قليلة اي درجة نقاوه قليلة وقلة فعاليته حيث انه في خطوة الاسترداد وعند مرور انزيم اليوريز ترتبط شحناته السالبة بالشحنات الموجبة لمادة العمود بينما تمر البروتينات التي تحمل شحنة مغايرة لليوريز خلال العمود وتم استرداد الانزيم باضافة دارئ الاسترداد الذي يحتوي على متدرج ملحي من كلوريد البوتاسيوم واظهرت النتائج ان الفعالية النوعية 12.92وحده/ملغم، والفعالية الكلية 15.48 وحدة، وعدد مرات التنقية 9.2 والحصيلة الانزيمية 8% [18].



شكل (3): كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية اليوريز المستخلص من بكتريا *Proteus mirabilis* باستخدام عمود ذو ابعاد (1.5×10) سم ومادة (DEAE-Cellulose)

التنقية بالترشيح الهلامي

أظهرت نتائج التنقية بالرتشيح الهلامي وجود أربع حزم بروتينية بينما قمة واحدة فقط تبين فعالية الانزيم كما موضح في شكل (4) حيث كانت الفعالية النوعية 15.1 وحدة/ملغم، الفعالية الكلية 27.1 وحدة وكان عدد مرات التنقية 11.27اما الانتاجية الانزيمية فهي 14% .[19]



شكل (4): كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية اليوريز من بكتريا *Proteus mirabilis* بأستخدام عمود الترشح الهلامي ذو ابعاد (1.5×60) سم ومادة الترشيح الهلامي Sephadex G-200

المصادر

1. أل فليح، خولة أحمد "مدخل الى الكيمياء الحياتية". (2000). دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل ص 148.

2. Krajewska, B., Van-Eldik, R., AND Brindell, M. (2012). Temperature- and pressure-dependent stopped-flow kinetic studies of Jack Bean urease. Implications for the catalytic mechanism. Journal of Biological Inorganic Chemistry. 17, 1123-1134.

3. Dominika Drzewiecka. (2016). Significance and roles of proteus spp. Bacteria in Natural Environments. Microb Ecol. 72(4): 741–758.

4. McGrath, M.J., Scanaill, C.N. (2014). Sensor technologies: healthcare, wellness and environmental applications (Apress Media, LLC, New York) Available online. Covers sensor technologies and their clinical applications, together with broader applications that are relevant to wellness, fitness, lifestyle and the environment.

5. Nikaido. (2009). The limitations of LB medium. The Microbe Blog.

6. Jones, BD., Mobley, HLT. (1987). Infection and Immunity. 55:9- 2198

7. Yang, L.,Wang, S., Tian, Y. (2008). Purification, properties, and application of a novel acid urease from *Enterobacter* sp. Appl. Biochem. Biotechnol. DOI .1007/s12010-008-8159-6.

8. Akogal, S., Yagmur, Yolenkaya. Gulay, Bagramogula., Adil, Denizli., and Yakuparica, M. (2002).

9. Weatherburn, M. M., Anal. (1967). Chern. 39, 971

10. Duong, L.y., Krisna, C., Gabelli and Sandra, B. (2014). "Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation". *Methods in Enzymology*. 541: 85–94.

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

12. Weber, M., Jones, M.J. and Ulrich, J. (2008). Optimisation of isolation, and purification of the jack bean enzyme urease by extraction and subsequent crystallization. Food Bioprod Process. 86(C1):43-52.

13. Nakano, H., Takenishi, S. and Watanabe, Y., Agri Whitaker and Bernhard R.A. (1972). Experiments for an introduction to enzymology. The whiber press, Davis, Galif. *c*. *Biol. Chem*., 1984, 48(6), 1495.

14. Davies, R. (1963). Microbial extracellular enzymes their uses and some factors affecting their formation in"biochemistry of industrial microorganism "(eds Rainbow. and Rose,A.H.,) Academic press, New York

15. Senthil, B.S., Fazila, F. and Jayalakshmi, S. (2012). Characterization of urease enzyme from marine bacterium *Klebsiella* species, *African Journal of Microbiology Research*, Vol.6(30), 5914-5923,

16. Marzadori, C., Ciurli, S., Benini, S., Deiana, S., Gessa, C. (1988). Urease from soil bacterium *Bacillus paster* II: Immobilization on Ca- Polygalacturonate.Soil Biol Biochem. 18, 482-488

17. Al-Shikirchy, F.H.M. (2004). Extraction, purification and characterization of urease from zahdi dates plam seeds (*Phoenix dactylifera* L.). MSc. thesis, Baghdad University.

18. Narjis, H., Essam, F. and Anis, M. Extraction and purification of urease from *Proteus mirabilis*. Nat J Chemistry. (2009). 33:138–145.

19. Krishna, BL., Singh, A.N., Patra, S., and Dubey, V.K. (2011). Purification, characterization and immobilization of urease from *Momordica charantia* seeds. Process Biochem. 46(7):1486–1491. doi: 10.1016/j.procbio.2011.03.022