فصل وتنقية وتوصيف جزئي للايسوزايم من زهرة القرنابيط

سوسن مصطفى عبد الرحمن
قسم الصناعات الغذائية – كلية الزراعة – جامعة بغداد

المستخلص

جرى في هذه الدراسة فصل انزيم اللايسوزايم من زهرة القرنابيط بواسطة محاليل استخلاص مختلفة وبعد اجراء التجارب الاولية ظهر محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار واس هيدروجيني 6.5 كافضل محلول استخلاص لكونه اعطى مستخلصا انزيميا باعلى فعالية نوعية بلغت 10.9وحدة/ملغم مقارنة مع المحاليل الاخرى . تمت تنقية اولية للانزيم بتركيز المستخلص الخام باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسبة تشبع 60% . اجريت عملية التنافذ الغشائي للراسب الانزيمي الخام مقابل محلول فوسفات الصوديوم الدارئ لازالة الاملاح . اعقب ذلك التنقية باستخدام كروموتوغرافي التبادل الايوني على عمود المبادل الموجب Duolite C-464 .اشارت نتائج لتنقية الايسوزايم الجزئية الى ان الحصيلة الانزيمية بلغت 58.2% بعدد مرات تنقية 7.7 وفعالية نوعية43.3 وحدة/ملغم . اظهرت نتائج التوصيف الجزئي لتحديدأفضل أس هيدروجيني لفعاليةانزيم اللايسوزايم بمدى 8-3.5pH الى ان الأس الهيدروجيني 6 يمثل افضل قيم الاس الهيدروجيني المدروسة ، في حين تراوح المدى الامثل لثباته بين قيمتي 6–5.5 pH اي انه يكون ثابتا في الاوساط الحامضية . وعند تحديد درجة الحرارة المثلى لاعلى فعالية لانزيم اللايسوزايم بدرجات حرارية مختلفةوعلى مدىتراوح من 30الى 80 مْ ابدى الانزيم اقصى فعالية عند درجة حرارة 60 مْ . بينما اشارت نتيجة دراسة الثبات الحراري إلى ان الانزيم احتفظ تقريباً بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة مابين (50-65) مْ لمدة 15 دقيقة عند الاس الهيدروجيني6 وبحوالي 92% من فعاليته الاصلية عند درجة حرارة 70مْ.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences 40 (2) : 111-1190 (2009) Abdul– Rahman

SEPARATION ,PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF LYSOZYME FROM CAULIFLOWER

S.M. Abdul – Rahman
Dept. of Food Tech. College of Agric/ Univ. of Baghdad

ABSTRACT

This study was aimed to separate cauliflower lysozyme by using different extraction solutions, after primry experiences it was found that 0.2 M phosphate buffer pH (6.5) is the best one for extraction because the specific activity for the enzyme reached 10.9 unit/mg comparison with other extraction solutions. primary purification of the enzyme was done by concentrating the crude extract using ammonium sulphate at 60% saturation, then dialyzed aginst phosphate buffer to remove the salts . followed by appling the dilayzed concentrate on ion exchange chromatography on the cation exchange column Duolite C-464 .The results of partial purification pointed out that the enzyme yield and purification folds and specific activity were 58.2% and 7.7 times and 43.3 unit/mg respectively. The results of enzyme partial characterization showed that the optimum pH for the enzyme activity was 6, and the enzyme was most stable at pH values ranged between 5.5 - 6 . At optimization the optimum temperature for activity the enzyme exhibited the maximum activity at 60 ^{o}C at temperature degrees ranged between 30 to 80 ^{o}C while the study of heat stability pointed out that the enzyme retained almost its entire activity over 15 min incubation at 50-65 ^{o}C at pH 6 and 92% from its original activity at 70 ^{o}C .

المقدمة

اللايسوزايم هو الاسم المتداول لانزيم ينتمي إلى المجموعة الثالثة للانزيمات المحللة Hydrolases . ويوصف علميا بانه N-acetylhexosaminodase ويصنف كـ Muramidase ويحمل التصنيف الرقمي (EC.3.2.1.17) . (11)

تنتشرانزيمات اللايسوزايم بشكل واسع في الطبيعة وبخاصة في بياض البيض والافرازات الجسمية كالدموع واللعاب والحليب والخلايا البيضاء Leucocytes كما يوجد في الاحياء المجهرية والفايروسات والعاثيات والحشرات والنباتات(14)، وبسبب خواص هذه الانزيمات التثبيطية تجاه بعض الانواع من الاحياء المجهرية فقد استعملت كمادة حافظة طبيعية في صناعة الاغذية (6 ، 17) وقد درس اللايسوزايم المستخلص من الحيوانات بشكل واسع من حيث وجوده ووظيفته وتركيبه وخواصه المختلفة الا ان القليل من الدراسات تمت على اللايسوزايم من مصادر نباتيه وقد تعاملت بشكل اساسي مع اللايسوزايم الموجود في العصارات النباتية مثل عصارة نبات البابايا (12،20) والتين (9) وعصارة شجرة المطاط *Hevea brasiliensis* (4،21) وعصارة نبات *Asclepias syriaca* (16) وعصارة نبات الديباج *Calotropis procera* (1).

ولقد اجري هذا البحث بهدف فصل انزيم اللايسوزايم من زهرة القرنابيط حيث يزرع هذا النبات في العراق ويعتبر من المحاصيل المهمة ، وتنقيته جزئيا ومحاولة التعرف على بعض خواصه اذ تساعد مثل هذه المعلومات في التعرف على محتوى مختلف الخضروات والفواكه الخام من اللايسوزايم .

المواد وطرائق العمل

استخلاص الانزيم

تم الحصول على نبات القرنابيط من السوق المحلية وبعد ان شذبت رؤوس القرنابيط ، اجريت عمليات الاستخلاص بنسبة 1:1 من عناقيد الازهار مع محاليل استخلاص مختلفة شملت الماء المقطر و محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 6.5 ، والدارئ نفسه الحاوي على 2% ملح كلوريد الصوديوم . مزجت في الخلاط لمدة 1-3 دقائق لاستخلاص العصير ثم رشح خلال 3 طبقات من الشاش ، وللتخلص من الرواسب اجري الطرد المركزي على سرعة مقدارها 4000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق وبعد جمع الراشح قدرت فعالية الانزيم وتركيز البروتين في المستخلص الخام وخلال خطوات التنقية .

فعالية الانزيم

قدرت فعالية اللايسوزايم حسب طريقة العكارة التي اوردها Li-chan واخرون (13) حيث حضر عالق خلايا بكتريا *Micrococcus Iysodeikticus* في محلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.006 مولار واس هيدروجيني 6.24 وبدرجة حرارة الغرفة وعلى امتصاصية مقدارها 0.6 – 0.7 على طول موجي قدره 450 نانومتر . اضيف 0.1 مل من محلول الانزيم لـ 2.5 مل من عالق الخلايا في وقت الصفر ومزج جيداً مع العالق وسجل الانخفاض في قيم الامتصاص على طول موجي 450 نانومتر كل 30 ثانية لمدة دقيقتين باستعمال جهاز الطيف الضوئي .

عرفت وحدة فعالية انزيم اللايسوزايم بانها كمية الانزيم التي تسبب انخفاضاً في الامتصاص الضوئي مقداره 0.001 في الدقيقة الواحدة على طول موجي قدره 450 نانومتر باستعمال عالق خلايا بكتريا *M. Iysodeikticus* كمادة اساس وتحت ظروف التجربة .

قدر تركيز البروتين حسب طريقة Lowry واخرون (15) .

تنقية الانزيم الجزئية

تمت الخطوة الأولى من تنقية انزيم اللايسوزايم وذلك بتركيز المحتوى البروتيني للمستخلص الخام باضافة كبريتات الامونيوم الصلبة بنسبة اشباع 60% مع التحريك لحين الاذابة ، ثم ترك المحلول لمدة 3 ساعات بدرجة 4 مْ جرى بعدها عملية الطرد المركزي بسرعة 8000 د / د لمدة 15 دقيقة ثم جمع الراسب وذوب في 7 مل من دارئ الاستخلاص ، واجريت عملية النضح الغشائي للمحلول مقابل محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز0.2مولار واس هيدروجيني6.5 بثلاث تبديلات لمدة 24 ساعة ثم قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين .

بعد ذلك اتبعت تقنية التبادل الايوني على عمود Duolite C-464بابعاد

(10.5 × 1.5) سم والذي سبق موازنته بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار واس هيدروجيني 7.5 ، بعد اضافة النموذج غسل المبادل بمحلول دارئ الموازنة بسرعة جريان 30 مل / ساعة وبواقع 5 مل / انبوب . أسترد الانزيم باستخدام محلول فوسفات الصوديوم بتركيز 0.5 مولار واس هيدروجيني 8 . قيس امتصاص الضوء على طول موجي 280 نانومتر لتعيين تركيز البروتين وقدرت فعالية الانزيم للأجزاء المستردة ثم جمعت الأجزاء المحتوية على الفعالية ، قيس الحجم وتركيز البروتين والفعالية الانزيمية .

توصيف الانزيم

شمل اجراء الاختبارات التالية : .

1 . تعيين الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم . استخدم للتفاعل محلولان دارئان هما محلول خلات الصوديوم الدارئ بقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني 3.5 , 4 , 4.5 , 5 , 5.5 ومحلول فوسفات الصوديوم الدارئ وبقيم اس هيدروجيني , 6 , 6.5 7 , 7.5 . 8.

2 . تعيين الاس الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم حيث حضن الانزيم مع المحاليل المنظمة ذات قيم الاس الهيدروجيني المختلفة تراوحت بين3.5 8 لمدة نصف ساعة جرى بعدها تقدير الفعالية المتبقية للانزيم.

3 . تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم : على درجات حرارية مختلفة بنقله 5 درجات بين درجة واخرىمن 30 مْ لغاية 80مْ عند أس هيدروجيني 6 لمحلول التفاعل .

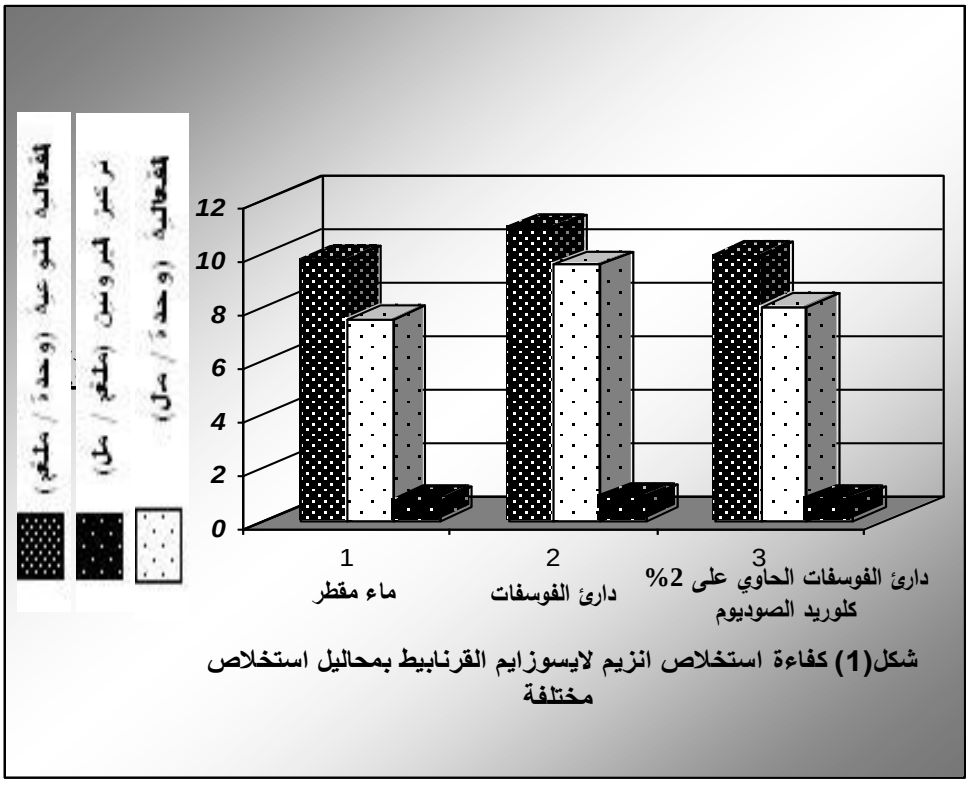
4. دراسة الثبات الحراري للانزيم في درجات حرارية مختلفة: تراوحت من30-80 مْ ولمدة 15 دقيقة وباستخدام اس هيدروجيني 6 لمحلول التفاعل .

النتائج والمناقشة

استخلاص الانزيم

قدرت الفعالية النوعية لانزيم الايسوزايم المستخلص من ازهار نبات القرنابيط باستخدام محاليل استخلاص مختلفة تمثلت بالماء المقطر ومحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار واس هيدروجيني 6.5 والدارئ نفسه الحاوي على 2% كلوريد الصوديوم ، اذ حقق الاستخلاص بمحلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.2 مولار واس هيدروجيني 6.5 اعلى فعالية نوعية بلغت 10.9 وحدة / ملغم مقارنة بالمحاليل الاخرى (محلول الفوسفات الدارئ الحاوي على كلوريد الصوديوم بنسبة 2% والماء المقطر) فكانت الفعالية النوعية لهما 9.9 و 9.7 وحدة/ملغم على التوالي .

من ملاحظة الشكل 1 نجد ان الفعالية النوعية للانزيم المستخلص بالماء المقطر كانت منخفضة مقارنة بالمحاليل الدارئه المستخدمة مما يدل على ان الماء المقطر اقل ملائمة للاستخلاص ، اضافة إلى زيادة نسبة البروتين المستخلص بمحلول الفوسفات الدارئ بسبب ارتفاع القوة الايونية له مقارنة بالماء المقطر وبالتالي ساهم في فك ارتباط الانزيم من انسجة النبات ، وهذا يتوافق مع ماذكره Parkin (18) من ان كفاءة أي محلول لاستخلاص البروتينات بشكل عام يعتمد على عدة عوامل منها الاس الهيدروجيني لمحلول الاستخلاص والقوة الايونية له وكذلك الطبيعة الكيمياوية للمحلول . ولاستخلاص الانزيمات يجب استخدام محاليل دارئه تحافظ على الاس الهيدروجيني في المدى الذي يكون فيه الانزيم ثابت .



شكل(1) كفاءة استخلاص انزيم لايسوزايم القرنابيط بمحاليل استخلاص مختلفة

تركيز الانزيم وتنقيته الجزئية

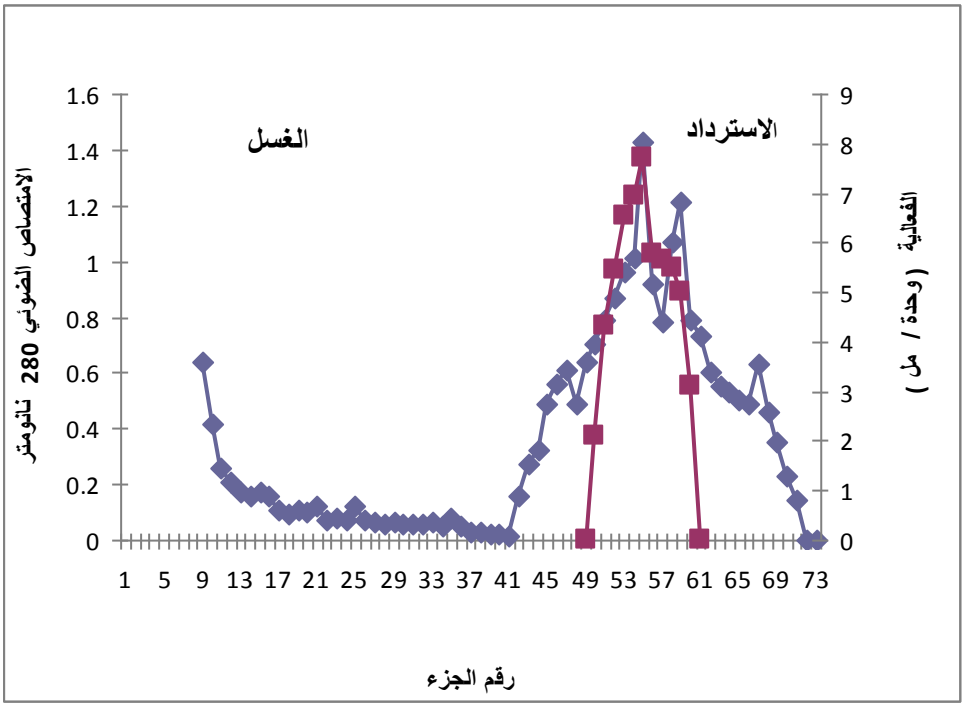
تم تركيز الانزيم للمستخلص الخام باستخدام كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 60% فكانت فعالية الانزيم وفعاليتة النوعية 16.5 وحدة / مل و 18.3 وحدة / ملغم على التوالي ، اما عدد مرات تنقية في هذه المرحلة فكانت 3.3 وبحصيلة انزيمية مقدارها 69%.(جدول 1) .

جدول 1 خطوات تنقية انزيم اللايسوزايم من القرنابيط

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة / مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الخام	50	6.7	1.2	5.5	335	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم	14	16.5	0.9	18.3	231	3.3	69
التبادل الايوني بعمود Duolile C-464	30	6.5	0.15	43.3	195	7.7	58.2

من المعلوم ان كبريتات الامونيوم من اكثر الاملاح استعمالاً في تركيز البروتينات نظراً لقلة كلفتها ولذائبيتها العالية وكذلك لانعدام تأثيرها في الاس الهيدروجيني ومن ثم لاتؤثر في ثبات الانزيم . وان مبدأ التركيز بكبريتات الامونيوم يعتمد على معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والاخلال بطبقة الماء المحيطة به مما يؤدي إلى ترسيبه بتأثير ما يعرف Salting out (7) .

اكملت التنقية الجزئية للانزيم باستعمال المبادل الايوني Duolite – C464 وذلك لكفاءته المميزة في الفصل ، استرداد الانزيم بنقاوة عالية مع امكانية استخدامه عدة مرات دون الحاجة لخطوة اعادة فعالية Regeneration (13) . ويعد ظهور الفعالية الانزيمية في جزء الاسترداد من عمود المبادل الايوني دليلاً على ان شحنه الانزيم موجبة مما جعلته يرتبط بالمبادل (شكل 2) بلغت الحصيلة الانزيمية 58.2% وبعدد مرات تنقية 7. .



شكل 2 كروموتوغرافي التبادل الايوني لتنقية لايسوزايم القرنابيط باستخدام عمود المبادل الايوني Duolite – C464 تمت موازنته بمحلول 0.05 مولار فوسفات الصوديوم الدارئ واس هيدروجيني 7.5 . وتم الاسترداد بمحلول 0.5 مولار فوسفات الصوديوم الدارئ واس هيدروجيني 8 . سرعة الجريان 30 مل / ساعة بواقع 5 مل للجزء الواحد .

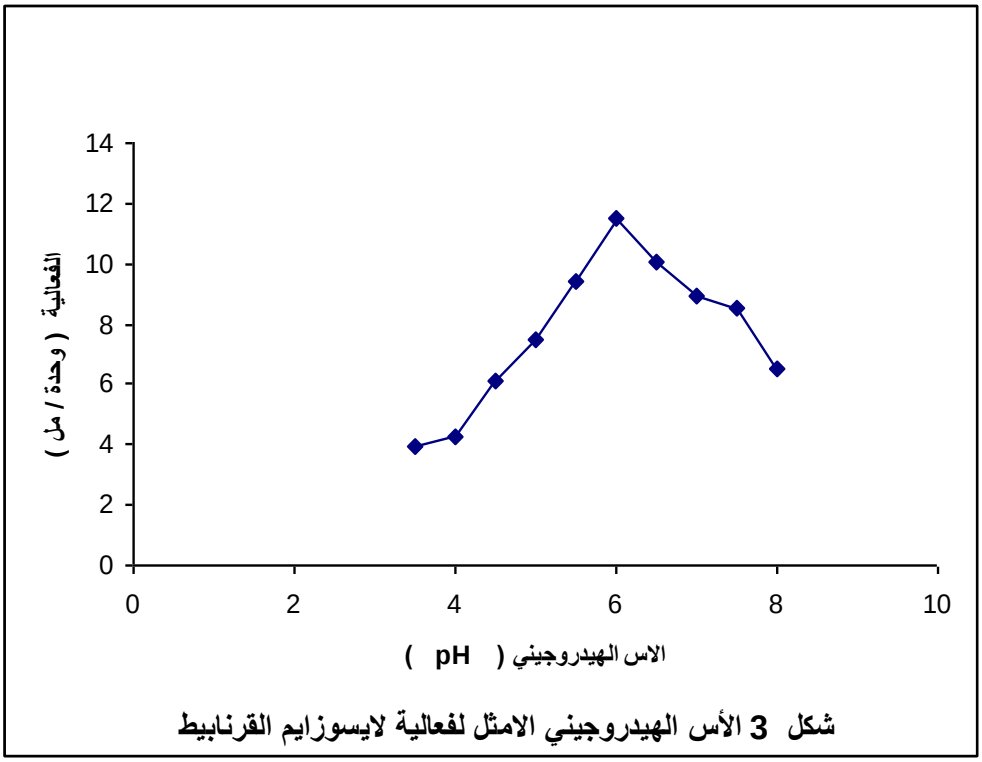
لقداستخدمت طرائق عدة لتنقية انزيم اللايسوزايم من مصادره المختلفة فقد حصل Hara و Matsushima (10) عند تنقية انزيم اللايسوزايم من نبات اللفت *Brassica rapa* وفصله على المبادل الايوني الموجب CMC بعد اجراء الترسيب الملحي بكبريتات الامونيوم على انزيمي I , II بحصيلة 42% و 16% على الترتيب . اكملت التنقية بواسطة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-75 ووصلت الحصيلة الانزيمية 35% للانزيم I , 13% للانزيم II

توصيف الأنزيم

الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الانزيم

يلاحظ من الشكل 3 الذي يمثل الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم ان الفعالية الانزيمية زادت بزيادة الاس الهيدروجيني ووصلت حدها الاقصى عند قيمة 6 مما يعني انه الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية ويمكن ملاحظة

الانخفاض التدريجي على جانبي الاس الامثل ، ومع الارقام الهيدروجينية 3.5 و 8 كان الحد الادنى من الفعالية . وهذا الانخفاض نتيجة تأثير الاس الهيدروجيني لوسط التفاعل على الحالة الايونية للمجاميع الحفزية (Catalytic groups) الموجودة في الموقع الفعال للانزيم او نتيجة التغير في الحالة الايونية لمعقد الانزيم – المادة الاساس (ES) ومعقد الانزيم – الناتج (EP) . أي ان الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية يُمثل تلك القيمة التي تكون عندها جميع مكونات التفاعل في افضل حالة ايونية لاسيما الحوامض الامينية الموجودة في الموقع الفعال من الانزيم (22) . وعلى الرغم من اختلاف مصدر الانزيم النباتي وتباين طريقة تقدير فعاليته فقد جاءت نتيجة هذه الدراسة مشابهة لما وجده Audy واخرون (2) من ان اقصى فعالية لايسوزايم جنين الحنطة كان عند الاس الهيدروجيني 6 ، ومتفقة لما حصل عليه Ereifej و (8) Markakis .

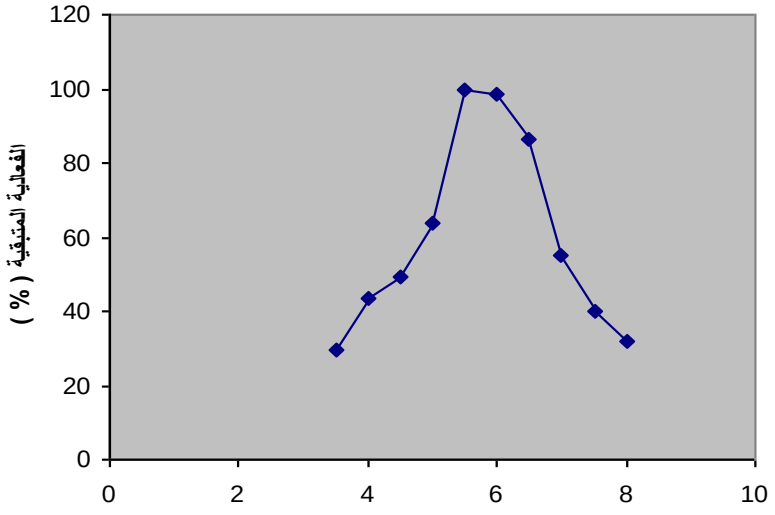


شكل 3 الأس الهيدروجيني الامثل لفعالية لايسوزايم القرنابيط

الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم

تعد دراسة الاس الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم جزءاً أساسياً لخواص أي انزيم اذا ان معرفة هذه الخاصية تساعد في تحديد ظروف خزن الانزيم وظروف تنقيته .

يبين الشكل 4 ان المدى الامثل لثبات الانزيم يكون عند قيم الاس الهيدروجيني 5.5 و 6 أي انه يكون ثابتاً في الاوساط الحامضية ويبدي انخفاضاً في الاوساط الحامضية المتطرفة والقاعدية . ويعود هذا الانخفاض في ثبات الانزيم إلى تأثير الاس الهيدروجيني في جزئية الانزيم وحده من خلال تغيير شكله الفراغي بتغييره للتركيب الثالثي والثانوي أي يحدث تغير بالحالة الطبيعية للانزيم وبالتالي الاقلال من فعالية الانزيم وصولاً إلى الحد الذي يفقد فيه الانزيم فعاليته تماماً (5 ، 19) .

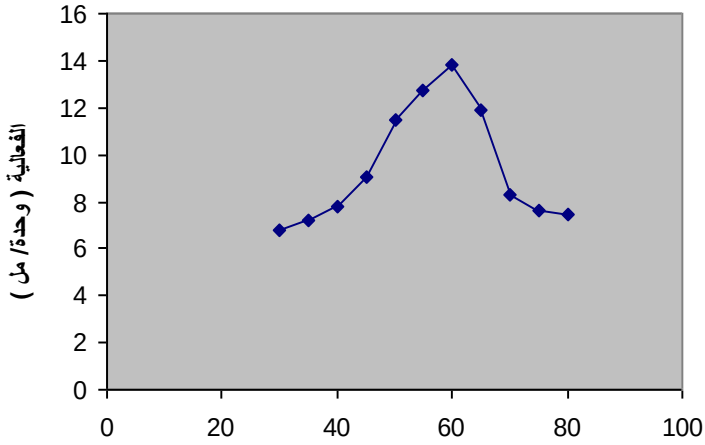


شكل 4 ثبات أنزيم لايسوزايم القرنابيط بقيم أس هيدروجيني مختلفة حضن الانزيم في المحاليل الدرئة بقيم أس هيدروجيني مختلفة لمدة نصف ساعة ثم قدرت الفعالية

درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم

تشير نتائج دراسة درجة الحرارة المثلى (شكل 5) إلى زيادة فعالية الانزيم عند زيادة درجة الحرارة لتصل اقصاها عند درجة حرارة 60 مْ حيث سجلت اعلى قيمة لها ، ثم انخفضت بعدها . ويشترك عاملان في هذه الظاهرة احدهما زيادة الطاقة الحركية الذاتية لكل من الانزيم ومادة التفاعل والاخر زيادة فرصة التصادم بين الانزيم ومادة التفاعل كنتيجة لزيادة معدل حركتهم بفعل الحرارة (18) .

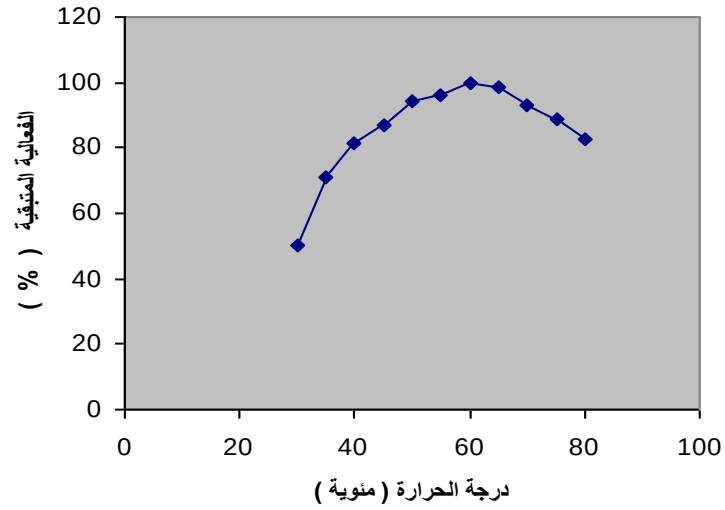
اما انخفاض فعالية الانزيم في درجات الحرارة العالية فيحدث نتيجة كسر للعديد من الاواصر الهيدروجينية الضعيفة وبالتالي تغير التركيب الثلاثي للانزيم فيفقد قوته الحفزية وقد يحدث مسخ له ويفقد فعاليته بالكامل (18) . وتتشابه نتيجة هذه الدراسة مع ما ذكره Audy وجماعته (2) من ان اعلى فعالية لانزيم اللايسوزايم المعزول من جنين الحنطة كانت عند درجة حرارة 60 مْ وعند دراسته عَلى مدى درجات من 5 إلى 90 مْ . وقد ذكرت البحوث ان من السمات المشتركة لانزيمات اللايسوزايم النباتية تتمثل في انها غالباً ما تكون فعالة بدرجات حرارية عالية نسبيا.(3)



شكل5 درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم لايسوزايم القرنابيط

الثبات الحراري للانزيم

تم تعيين الثبات الحراري لانزيم لايسوزايم القرنابيط بوصفه من العوامل المهمة في توصيف الانزيم من خلال تحديد درجات الحرارة التي يحتفظ فيها الانزيم بفعاليته وتلك التي تؤثر عليه بشكل سلبي . فيلاحظ من الشكل 6 ان الانزيم احتفظ تقريباً بكامل فعاليته عند معاملته بدرجات حرارية من 50 – 65 مْ وبحوالي 92% من فعاليته الاصلية عند درجة حرارة 70 مْ لكنه لم يحتفظ الا بحدود 75% من فعاليته بدرجة 80 مْ ، وهذه النتيجة تدل على ان للانزيم ثباتيه حرارية ، وغالباً ما تتميز الانزيمات التي لها درجات حرارية مثلى عالية بثباتها الحراري العالي .



شكل6 الثبات الحراري لا نزيم لايسوزايم القرنابيط
حضن الانزيم بدرجات حرارية مختلفة لمدة 15 دقيقة ثم قدرت الفعالية

المصادر

1- Al-Samaraie, S.M.A.R.2003. Separation, purification and characterization of lysozyme from *Calotropis procera* .Ph.D.Thesis.Dept.Food Sci.,Coll.of Agric.,Univ.of Baghdad.pp.93.

2 - Audy, P.,J, Trudel, and A.Asselin. 1988. Purification and characterization of a lysozyme from wheat germ. Plant Sci. 58:43-50.

3-Beintema,J.J.and A.C.Terwisscha Van Scheltinga.1996. Plant lysozyme. In P.Jolles (ed.).Lysozymes:Model Enzymes in Biochemistry and Biology. p.75-86.

4- Bokma,E.,M.Spiering.,K.S.Chow.,P.P.M.F.A.Mulder.,J. Subroto., and J.J.Beintema.2001.Determination of cDNA and Genomic DNA sequence of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliesis* .Plant Physiol . Biochem.39:367-376.

5-Crabb,W.D, and J.K.Shetty.1999.Commodity scale production of sugars from starches.Current Option in Microbiology.2:252-256 .

6-Datta,S.2005. Purification of lysozyme from shell liquor of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and its use in antimicrobial films to preserve smoked fish. M.Sc.Thesis,Dept.of Food Sci., Coll. of Agriculture and Mechanics.,Univ. of Louisiana. pp.58.

7 - England, S. and S. Seifter. 1990. Precipitation Techniques. Methods in Enzymology . 182:425-441.

8 - Ereifej, k. I and P. Markakis. 1980. Cauliflower lysozyme. J. Food Sci. 45:1781-1782.

9-Glazer, A.N.,A.O,Barel., J.B.Howard, and D.M. Brown, 1969. Isolation and characterization of fig lysozyme. J.Biol. Chem. 244:3583-3589.

10 - Hara, S. and Y. Matsushima. 1972. Studies on the substrate apecificity of egg white lysozymes. IV. A comparative study of the substrate specificities of lysozyme from different sources. J. Biochem. 72:993-1000.

11 - Kato, A.,H.R. Ibrahim,S. Nakamura, and K. Kabayashi, 1994. In J.S Sim and S Nakai (ed.). Egg Uses and Processing Technologies. Wallingford (UK) : CAB International. p. 250-268.

12 - Lakhtin, V.M.,E.A. Kostanova, and N.P. Arbstskij. 1995. Isolation and characterization of multiple forms of papaya latex lysozyme. Prikladngya. Biokhimiya Mikrobologiya. 31(2):247-254.

13 - Li – Chan, E.,S. Nakai,J. Sim,D.B. Bragg, and K.V. Lo. 1986. Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. J. Food Sci. 51(4):1032-1036.

14 - Losso, J.N.,S. Nakai, and E.A. Charter. 2000. Lysozyme In A.S. Naidu(ed.).Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press, LLC. p.185-210.

15-Lowry,O.H.,N.J. Rosebrough, A.L.Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurment with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193:265-275.

16 - Lynn, K.R. (1989). Four lysozyme from latex of *Asclepias syriaca*. Phytochemistry. 28:1345-1348.

17-Masschalck,B.and C.W.Michiels.2003.Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborn vegetative bacteria. Crit Rev.Microbiol.29:191-214.

18-Parkin,K.L.1993.Environmental effects on enzyme activity. In T.Nagodawithana and G.Reed (ed.). Enzymes in Food Processing.Academic Press , Inc.New York,USA, pp.273.

19- Segal, I.H. (1976). Biochemical Calculation. 2nd – edition, John Wiley & Sons, Inc, New York,USA, pp.273.

20-Subroto,T.,S.Sufiati, and J.J.Beintema.1999.Papaya(*Carica papay*) lysozyme is a member of the family 19 (Basic class II) chitinases.J.Mol.Evol. 49:819-821.

21- Tata, S.J.,J.J. Beintema, and S. Balabaskaran. 1983. The Lysozyme of *Hevea brasiliensis* Latex: Isolation, purification, enzyme kinetics and partial amino acid sequence. J. Rubb. Res. Inst. Malaysia. 31 (1):35-48.

22-Whitaker,J.R. 1972. Principles of Enzymology for Food Science.Merecel Dekke , Inc,New York, USA, p.65-119.