كفاءة تقنيات التقييد لبكتريا *Bacillus subtilus* المنتجة لأنزيم الأسبارجينيز
Effecienty of Immobilization technique of *Bacillus Sublilis* Asperginase producer

سناء برهان الدين سحر قاسم الزبيدي
كلية العلوم / جامعة بغداد
Sanaa Burhan Sahar Q. Alzobaidy
College of Science/ Baghdad University

المستخلص

تم الحصول على 20عزلة من بكتريا *Bacillus* عزلت من مصادر غذائية ومائية مختلفة اختبرت قابلية العزلات على انتاج انزيم الاسبارجنيز وكانت العزلة *Bacillus* B1 هي الاكثر انتاجاً والتي شخصت على انها احدى سلالات *B. subtilis* . اعلى انتاجية للانزيم كان عند تنمية البكتريا في الوسط الملحي الحاوي على 0.3 % اسبارجين وبرقم هيدروجيني 8 وحضنها بدرجة 40م لمدة 24 ساعة . قيدت خلايا *B. subtilis* B1 بتقنية الاقتناص داخل الجينات الكالسيوم والاكار اكار ، وبتقنية الامتزاز على السطوح الصلبة مثل (نشارة الخشب والقطن) ، ولوحظ ان نشارة الخشب كانت الافضل في تقييد الخلايا حيث احتفظت الخلايا بـ 88% من فعالية الاسبارجنيز بعد مرور 4 ساعة حضن مقارنة بالخلايا غير ا لمقيدة 65% . عرضت الخلايا المقيدة بنشارة الخشب لدرجات حرارة تراوحت بين (37-60)م ولارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (4-10) لمدة 120 دقيقة ، وبينت النتائج ان الخلايا المقيدة احتفظت بـ 78% من فعاليتها بدرجة 37م مقارنة بالخلايا الحرة (58 ، 70)% عند الرقم الهيدروجيني 7 مقارنة بالخلايا غير المقيدة والتي بلغت 52 %.

Abstract

Twenty *Bacillus* isolated were obtained from different sample food and water. *Bacillus* B1 isolated was the highest asparaginase producer, it was identified as a strain of *B. subtilis*.The highest production of asparaginase was observed when mineral salt medium containing 0.3% asparagen, pH 8 and incubated at 40^0c for 24 hrs. *B. subtilis* B1 cells were immobilized by entrapment methods (calcium alginate and agar), and by adsorption on solid surface such as sawdust and cotton. The result showed that the immobilized cells by adsorption on sawdust was the best, the immobilized cell retained 88% of asparginase activity after 48h while free cell retained 65%. Cells immobilized by adsorption on sawdust was incubated at different temperatures (37-60)^{0}c for 12 min. and at different pH (4-10) for 120 min. the result showed that the immobilized cell had 78% remaining activity at 37c while the free cells were 58%, and retaining activity was 70% at pH=7 while free cells were 52%.

المقدمة

يعد انزيم الاسبارجنيز L-asparginase من الانزيمات المحللة التي تحفز تحلل الحامض الاميني الاسبارجين الى الاسبارتيت Aspartate محرراً غاز الامونيا [1] . ينتج الانزيم من مصادر مختلفة من الطبيعة تتضمن البكتريا والنباتات والفقريات والاعفان والخمائر ومن مصول بعض القوارض ، لكن المصدر الرئيسي للانزيم المستخدم في المجالات الطبية هي الاحياء المجهرية حيث امكن عزله من *E. coli* ، *chrysanthemi* ، *Erwinia* ، *Enterobacter aerogenes* ، *Pseudomonas aeroginos* ، *Staphylococcus* ، *Candida utilis* [2،3،4] . تبوز اهمية انزيم الاسبارجينيز من استخدامه لمعالجة امراض ابيضاض الدم الحاد Acute lymphocytic leukemia فضلاً عن انواع معينة من الاورام اللمفاوية Lymphomas عن طريق تحلل الحامض الاميني الاسبارجين الموجود في الدورة الدموية للجسم ومنع تزويده للخلايا السرطانية والذي يعد من الحوامض الامينية الاساسية لتصنيع بروتيناتها واستمرار حيويتها لذلك ادخل هذا الانزيم الى قوائم العلاج الكيميائي Chemotherapy [5] ، هنالك نوعين من انزيم الاسبارجينيز ، يقع احدهما في السايتوبلازم ويدعى L-asparaginase I والآخر يقع في منطقة البلازما المحيط (periplasmic space) ويدعى بـ

asparaginase II والذي يتميز بألفة عالية تجاه الحامض الاميني الاسبارجين ، كما يلعب دوراً اساسياً في النباتات الراقية في التغذية النتروجينية [6] استعملت الانزيمات والخلايا المقيدة في المجالات التطبيقية وتتضمن تقنيات التقييد طرائق مختلفة مثل الربط التساهمي والامتزاز والاقتناص والتغليف ولكل تقنية صفاتها وخواصها [7] ، تطورت تقنيات تقييد الانزيم بشكل واسع خلال السنوات الاخيرة شملت تقييد انزيم البروتييز ، الاميليز ، الانفرتيز الاسبارجنيز وغيرها . من المعروف أن الأنزيمات محفزات حيوية تلعب دوراً مهماً في العديد من التفاعلات الحيوية التي يتم عن طريقها أنتاج العديد من المواد المختلفة ذات الفائدة في العديد من المجالات الغذائية (صناعة أجبان ذات نكهة مميزة) وفي المجالات الصناعية (في المنظفات الجافة ، صناعة الورق) أما في المجال الطبي فقد أستخدمت الأنزيمات في التشخيص وعاملاً مضاداً للأورام السرطانية (antitumor agent) . لذلك فأن الهدف من البحث هو عزل الأنزيم من البكتريا ودراسة الظروف المثلى لأنتاجه وتقييد خلاياه بطرق مختلفة لكي يتسنى أستخدامه لمرات عديدة وتقليل كلفة أستخدامه.

المواد وطرق العمل

الاوساط الزرعية وظروف النمو Media and growth condition

عزلت البكتريا من جنس *Bacillus* من مصادر غذائية ومائية مختلفة باستخدام وسط الاكار المغذي Nutrient agar وتم تنقيتها على نفس الوسط الزرعي وشخصت اعتماداً على الفحوصات المجهرية والكيموحيوية وفق مصنف بيركي [8] . اختبرت قدرة العزلات على انتاج الاسبارجنيز باستخدام وسط الاسبارجين الصلب (2غم اسبارجين ، 0.5غم من $MgSO_4.7H_2O$ ، 1غم من K_2HPO_4 ، 20غم اكار في لتر من الماء المقطر ، اضيف اليه كاشف احمر الفينول وضبط الرقم الهيدروجيني 6.8 [9] حيث زرعت العزلات على الوسط نفسه وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 18 ساعة ، وقيست قطر الهالة ذات اللون الوردي الغامق المتكون ة حول المستعمرة لانتخاب العزلة الافضل انتاجاً . كما تم قياس فعالية الاسبارجنيز للعزلات بطريقة الاندوفينول [10] وذلك باضافة 2% من العالق البكتيري الى مرق الاسبارجين الخالي من الصبغة والاكار وحضنه بدرجة 37 مْ لمدة 18 ساعة ، ورسبت الخلايا واخذ 200 مايكروليتر من الراشح واضيف الى 50 مايكروليتر من محلول التفاعل (0.1 مولار اسبارجين) وحضنت الانابيب في حمام مائي بدرجة 37م لمدة 20 دقيقة ثم اوقف التفاعل باضافة 5 مل من كاشف أ (1غم من الفينول مع 5 ملغم من مادة Sodium nitroprussid في 100 مل من الماء المقطر) و 5 مل من كاشف ب (0.5غم من NaOH في 100 مل من الماء المقطر مضاف اليه 0.48 مل من هايبوكلورايت الصوديوم بتركيز 5 %) وضعت الانابيب في حمام مائي بدرجة 37 م لمدة 20 دقيقة ، قيست الامتصاصية عند الطول الموجي 600 نانوميتر وحسبت الفعالية الانزيمية بالاعتماد على المنحنى القياسي للامونيا وعرفت وحدة فعالية الأنزيم بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتحفيز تكوين مايكرومول واحد من الأمونيا من مادة الأساس الأسبارجيني في دقيقة واحدة تحت ظروف التفاعل . كما تم تقدير تركيز البروتين اعتمادا على طريقة لاوري [11] Lowery method وحسبت الفعالية النوعية للانزيم حسب المعادلة التالية :

الفعالية النوعية للانزيم وحدة / ملغم بروتين = فعالية الانزيم وحدة / مل / تركيز البروتين ملغم / مل .

العوامل المؤثرة في انتاج الاسباراجينيز

شملت مكونات وسط الانتاج باستخدام مصادر كاربو نية ونيتروجينة مختلفة وبتراكيز مختلفة ، كما شملت الدراسة تأثير الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة ومدة الحضن في انتاج الاسبارجينيز باستخدام ارقام هيدروجينية ودرجات حرارية مختلفة ومدد حضن مختلفة باستخدام الوسط المحلي للتنمية (0.5 غم من $MgSO_4.7H_2O$ و 1 غم من K_2HPO_4) .

تقييد خلايا بكتريا *B. subtilis*

استخدمت طريقتان لتقييد خلايا بكتريا *B. subtilis* شملت طريقة الاقتناص Entrapment باستخدام الجينات الكالسيوم والاكار ، وطريقة الامتزاز على السطوح الصلبة physical adsorption باستخدام نشارة الخشب والقطن .

1. **تقييد الخلايا بطريقة الأقتناص Entrapment**

أ. تقييد الخلايا داخل الجينات الكالسيوم ، حيث علقت الخلايا بمحلول الفوسفات الدارئ 0.02 مولار برقم هيدروجيني 8 للحصول على نسبة استخلاص (0.5غم/2 مل) ، واضيفت الى 25 مليلتر من محلول الجينات الصوديوم 3 % بنسبة 1:1 (V/V) ، مزجت لمدة 15 دقيقة ثم سحبت بوساطة محقنة طبية معقمة واضيفت ببطء الى محلول 1% كلوريد الكالسيوم البارد بشكل قطرات خزنت بالثلاجة لمدة 15 دقيقة وغسلت مرتين

بمحلول كلوريد الكالسيوم ثم بالماء البارد للتخلص من الخلايا غير المقيدة [12] . حضنت الدوارق الحاوية على الخلايا المقيدة وعالق الخلايا الحرة بدرجة 37م لمدد زمنية مختلفة (3 ، 6 ، 9 ، 12 ، 24) ساعة . اضيف محلول التفاعل بعد كل مدة حضانة وحضنت بدرجة 37م في حمام مائي لمدة نصف ساعة ثم اوقف التفاعل باضافة كاشف أ ، ب كما موضح سابقاً . ثم قيست الفعالية الانزيمية ال متبقية للخلايا المقيدة في المحلول الرائق بعد النبذ المركزي وفق المعادلة :

% الفعالية المتبقية = عدد وحدات الانزيم المقيد / عدد وحدات الانزيم الحر x 100.

ب. **تقييد خلايا البكتريا بمادة الاكار :** مزج عالق الخلايا (0.5غم /2 مل) مع الاكار المعقم والمبرد الى درجة 40 م بنسبة 1:1 (V/V) في طبق معقم ثم قطع الاكار الى قطع صغيرة بحجم 2 ملم ، وغسلت بمحلول الفوسفات الدارئ للتخلص من الخلا يا غير المقيدة وحضنت بدرجة 37م لمدد زمنية مختلفة (3 ، 6 ، 9 ، 12 ، 24)ساعة وقيست الفعالية الانزيمية المتبقية كما موضح سابقاً .

2. **تقييد الخلايا البكتيرية بامتزازها على السطوح الصلبة**

استخدمت نشارة الخشب والقطن بعد تعقيمهما بجهاز الموصدة لمدة 30 دقيقة ثم وضعت بالفرن بدرجة حرارة 40 م لمدة 24ساعة . بعدها اضيف اليهما عالق الخلايا (0.5 غم/2 مل) بنسبة 1:1 (وزن/حجم) في اطباق صغيرة ومعقمة، حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدد زمنية مختلفة (24 ، 48 ، 72) ثم رشحت خلال ورق الترشيح وغسلت مرتين بمحلول الفوسفات الدارئ ثم اضيف اليها مادة التفاعل لقياس الفعالية الانزيمية المتبقية.

تأثير درجة الحرارة في ثبات الخلايا المقيدة

اضيف عالق الخلايا (0.5 غم / 2 مل) الى نشارة الخشب بنسبة 1:1 (وزن /حجم) وحضنت بدرجة الحرارة 37 م لمدة 48 ساعة ، رشحت وغسلت مرتين بمحلول الفوسفات الدارئ ثم حضنت في درجات حرارية مختلفة (37 ، 50 ، 60) ولمدد زمنية مختلفة (30 ، 60 ، 90 ، 120) دقيقة وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية .

تاثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الخلايا المقيدة

اضيف عالق الخلايا (0.5 غم / 2 مل) الى نشارة الخشب بنسبة 1:1 (وزن/ حجم) وحضنت بدرجة الحرارة 37 م لمدة 48 ساعة ، بعدها رشحت وغسلت مرتين بمحلول الفوسفات الدارئ ثم اضيفت الى محاليل دارئة مختلفة الارقام الهيدروجينية (3 ، 7 ،10) وحضنت بدرجة 37م لمدد زمنية مختلفة (30 ، 60 ، 90 ، 120) دقيقة وقدرت الفعالية الانزيمية المتبقية .

النتائج والمناقشة

تم عزل (20) عزلة من بكتريا *Bacillus* وشخصت اعتماداً على مصنف بركي وظهرت انها تعود الى *B. subtilis* وبينت النتائج ان العزلة B1 هي افضل العزلات من بين (20) عزلة في انتاج الانزيم حيث اعطت اعلى نسبة تحلل (قطر الهالة المتكونة \ قطر المستعمرة البكتيرية) وهي 4.3 واعطت اعلى فعالية انزيمية نوعية مقدارها 270 وحدة / ملغم بروتين لذلك انتخبت هذه العزلة في بقية خطوات البحث .

العوامل المؤثرة في انتاج الاسبارجينيز

تم دراسة عدد من العوامل لتحديد الظروف المفضلة لانتاج الانزيم من العزلة المنتخبة *Bacillus subtilis* B1 وتضمنت :

1. **تأثير مكونات الوسط الزرعي**

يوضح شكل (1) ان الوسط الملحي الحاوي على المصادر الكربونية والنيتروجينية (نقيع الفاصوليا ، نقيع الحمص ، سكروز ، سليلوز ، الشرش ، كلوتامين) ادت الى انخفاض في فعالية الانزيم قياساً بالسيطرة (الوسط الملحي فقط) ، في حين كان الوسط الملحي الحاوي على 0.3 % اسبارجين هو افضل وسط لانتاج الاسبارجينيز حيث اعطى فعالية نوعية مقدارها 196 وحدة/ملغم بروتين ، نلاحظ من النتائج ان هنالك اختلافاً في انتاجية الانزيم في الاوساط المختلفة ويعزى ذلك الى اختلاف انواع المواد العضوية وتركيزها في الوسط مثل : الكاربوهيدرات والبروتينات والمواد اللاعضوية بالاضافة الى تباين تركيب المواد كان تكون بسيطة او معقدة ومدى تعقيدها وارتباطها مع مواد اخرى تؤثر في قدرة الكائن على استغلال هذه المواد في نموه وقيامه بفعالياته الايضية المختلفة [13] . ان اضافة الاسبارجين الى الوسط الملحي يمكن ان يكون محفزاً لانتاج الاسبارجينيز ويفسر على ان الاحياء المجهرية تحصل على الطاقة من اكسدة مكونات الوسط الزرعي و اكثر المركبات النتروجينية المستخدمة هي الحوامض الامينية حيث يقوم الكائن بنزع مجموعة الامين او الكاربوكسيل بفعل الانزيمات المتخصصة لهذه العملية [13] .

2. تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج انزيم الاسبارجينيز

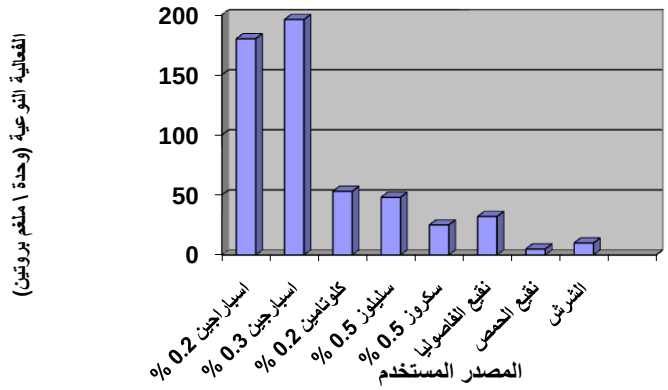
تظهر النتائج ان افضل رقم هيدروجيني لانتاج الانزيم هو 8 حيث بلغت الفعالية النوعية للانزيم 203 وحدة/ملغم بروتين ويبدأ بالانخفاض مع زيادة الرقم الهيدروجيني شكل (2) . يؤثر الرقم الهيدروجيني في انتاج الانزيمات عن طريق تأثيره في صفات الوسط الغذائي مثل ذائبية المواد الغذائية وانتقالها وتأثيره على الحالة الايونية لما دة الاساس وجاهزيتها للكائن المجهري النامي ومن ثم تأثيره على نمو البكتريا وانتاج الانزيمات . لوحظ ان الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *Bacillus* spp. هو8 [14] في حين تراوح بين 7 – 8 في البكتريا الخيطية *Actinomycetes* و 7.5 في بكتريا *E. Coli* [1] .

3. تأثير درجات الحرارة في انتاج انزيم الاسبارجينيز

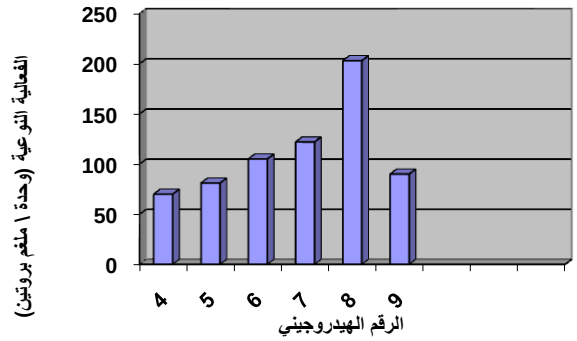
من الشكل (3) يؤكد ان زيادة انتاج الانزيم يزداد مع زيادة درجة الحرارة لغاية 40 م حيث بلغت الفعالية النوعية له 215 وحدة/ملغم بروتين ثم يبدأ بالانخفاض تدريجياً . حيث ان لدرجة الحرارة تاثيراً مهما في انتاجه عن طريق تأثيرها في ذائبية الاوكسجين والطاقة الحركية للجزيئات [15] . وكانت النتيجة مشابهة الى ما توصل اليه [16] حيث لاحظ ان اعلى انتاجية للانزيم المعزول من بكتريا *Erwinia cartavora* هو عند درجة حرارة 40م وتكون نتائجنا متقاربة مع بحوث كثيرة توصلت الى ان درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم ه ي 37م[14] .

4. تأثير مدة الحضن في انتاج انزيم الاسبارجينيز

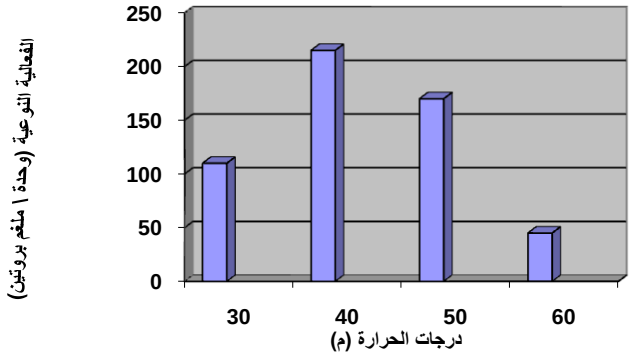
نلاحظ ان الفعالية النوعية للانزيم بلغت اقصاها خلال 24 ساعة حضن شكل(4) حيث بلغت 240 وحدة/ملغم بروتين وبدأ الفعالية النوعية بالانخفاض مع استمرار مدة الحضن . ان اغلب الدراسات تشير الى ان اعلى انتاجية للانزيم تحصل عند دخول المزروع البكتيري طور الثبات [17 ، 14] .



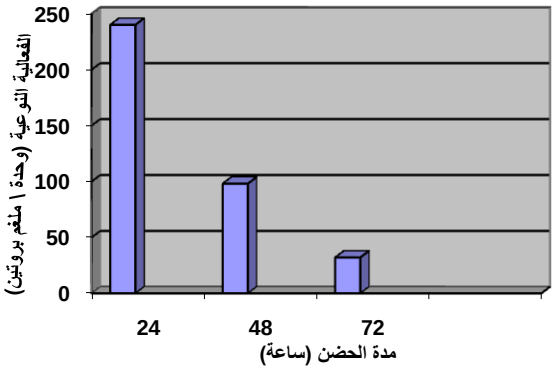
شكل (1) :انتاج انزيم الاسبارجينيز من العزلة *B. subtilis* B1 عند زرعها في وسط ملحي برقم هيدروجيني 8 يحتوي على تراكيز مختلفة من مصادر كاربونية ونيتروجينية وحضنه بدرجة 37 م لمدة 18 ساعة



شكل (2) :انتاج انزيم الاسبارجينيز من العزلة *B. subtilis* B1 عند تنميتها في الوسط الملحي الحاوي على 0.3 % اسبارجين بارقام هيدروجينية مختلفة وحضنه بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة



شكل (3): انتاج انزيم الاسبارجينيز من العزلة *B. subtilis* B1 عند تنميتها في الوسط الملحي برقم هيدروجيني 8 والحاوي على 0.3 % اسبارجين وحضنه بدرجات حرارية مختلفة لمدة 18 ساعة



شكل (4): انتاج انزيم الاسبارجينيز من العزلة *B. subtilis* B1 عند تنميتها في وسط الانتاج الملحي برقم هيدروجيني 8 والحاوي على 0.3 % اسبارجين وحضن بدرجة 40 مْ ولمدد زمنية مختلفة

تقييد الخلايا Cell Immobilization

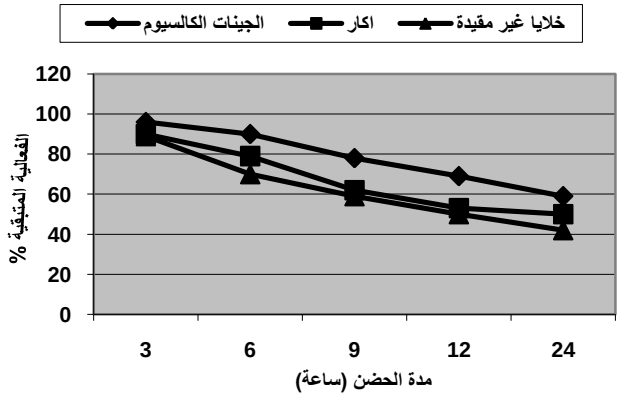
قيدت خلايا *B. subtilis* B1 بطرق تقييد مختلفة وباستخدام مواد تقييد عديدة وحضنت لمدد زمنية مختلفة وكانت نشارة الخشب افضل مادة لتقييد الخلايا مقارنة بمواد التقييد الاخرى حيث اعطت اعلى نسبة للفعالية المتبقية بلغت85% عند حضنها بدرجة 37م لمدة 48 ساعة في حين حافظت الخلايا الحرة والتي حافظ ت على 62% من فعاليتها في المدة نفسها كما في شكل (5 ، 6) . تعتبر نشارة الخشب من المواد المتوفرة والرخيصة والتي تطرح الى البيئة بشكل مستمر والتي يمكن استخدامها كبديل عن المواد الغالية الثمن والمستخدمة في تقييد الخلايا مثل الجينات الكالسيوم والاكار [18] . تتصرف نشارة الخشب بصفات جيدة حيث توفر مساحة سطحية واسعة واحتوائها على ثقوب تساعد على امتزاز الانزيم والاحتفاظ به لفترة طويلة .

تأثير درجة الحرارة في ثبات الخلايا المقيدة

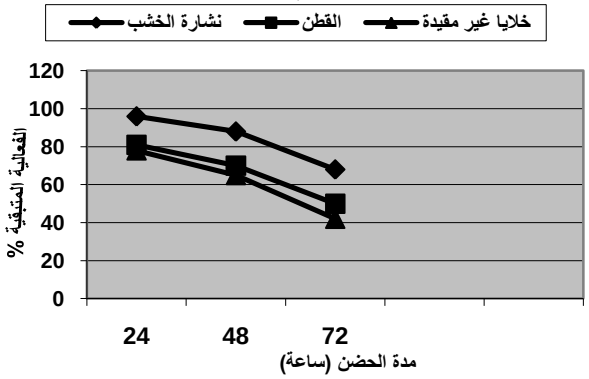
نلاحظ من شكل (7) ان الخلايا المقيدة بنشارة الخشب احتفظت باعلى فعالية 91% عند حضنها بدرجة 37م ولمدة 120 دقيقة قياسا بالخلايا الحرة التي احتفظت بـ 72% من فعاليتها في هذه المدة ، كما احتفظت بـ 60 % من فعاليتها عند حفظها بدرجة 50م وبالمدة نفسها وبـ 38% من فعاليتها عند حضنها بدرجة حرارة 70م لمدة 120 دقيقة.تبين النتائج ان الثبات الحراري للخلايا المقيدة بنشارة الخشب اعلى من الثبات الحراري للخلايا الحرة عند حضنها بدرجة (37 ، 50 ، 60)م ويتضح من ذلك ان ارتباط الخلايا بالمواد الصلبة يعطي حماية للانزيم من التأثير المباشر فجزيئات المادة المقيدة تمتص جزء من الطاقة الحرارية مما يقلل تأثيرها في الانزيم ، كما ان انخفاض الحركة الحرة للانزيم وثبات شكله يساعدان في المحافظة على تركيب الانزيم بدون تغيير عند ارتفاع درجة الحرارة او تقليل تعرضه للمسخ بفعل الحرارة قياساً بالانزيم الحر [1] ، لوحظ ان افضل درجة حرارة لتقييد انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *E. Coli* هي 40 م ويفقد 50% من فعاليته عند حضنه بدرجة 50م ولمدة 30 دقيقة [1].

تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الخلايا المقيدة

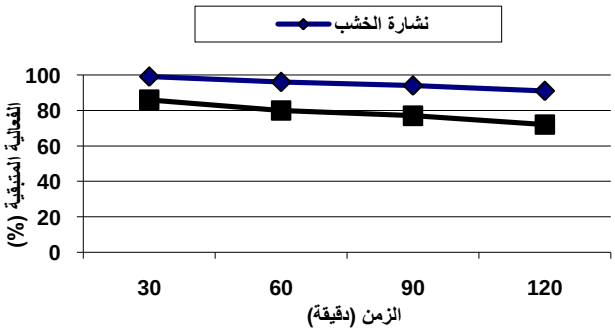
بينت النتائج شكل (8) ان الخلايا المقيدة بنشارة الخشب اعطت اعلى فعالية 90% عند الرقم الهيدروجيني 7 عند حضنه بدرجة 37 م لمدة 120 دقيقة ، في حين احتفظت الخلايا الحرة بـ 75% من فعاليتها . اما في الارقام الهيدروجينية المتطرفة [4 ، 7] لوحظ انخفاض في الفعالية المتبقية بلغت (30 ،32)% على التوالي عند حضنها بدرجة 37م ولمدة 120 دقيقة مقارنة بالخلايا الحرة (4،5) % على التوالي . تتميز الخلايا المقيدة بصفات فيزيولوجية قياسا بالخلايا الحرة العالقة فهي مقاومة للضغوط البيئية مثل : المضادات الحيوية ، والملوثات البيئية وكذلك مقاومة للحرارة والرقم الهيدروجيني [19] .



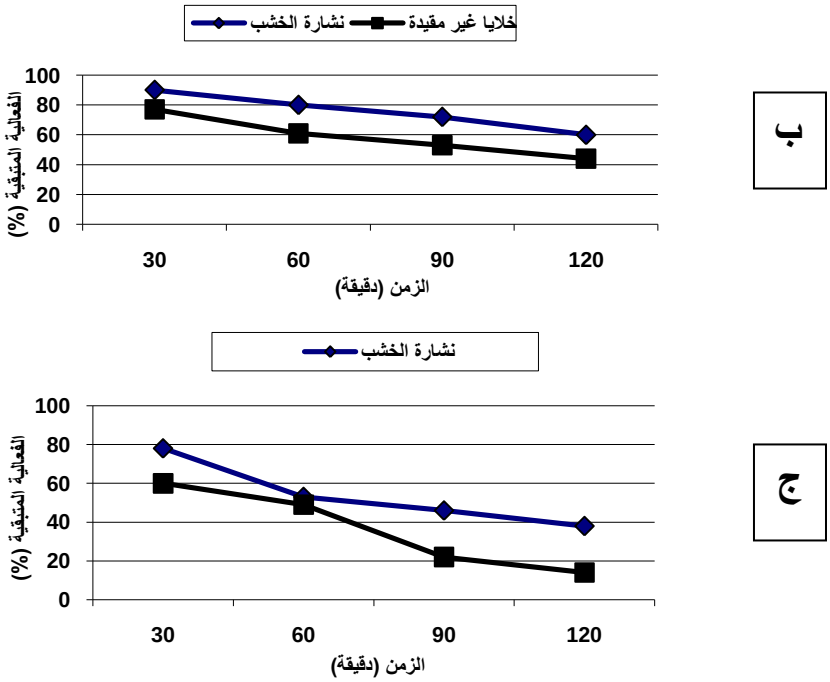
شكل (5) :فعالية انزيم الاسبارجينيز من العزلة *B. subtilis* B1 والمقيدة بطريقة الامتصاص (بالجينات الكالسيوم والاكار) بعد حضنها بدرجة 37م ولمدد زمنية مختلفة



شكل (6): فعالية انزيم الاسبارجينيز من العزلة *B. subtilis* B1 والمقيدة بامتزازه على سطوح صلبة (نشارة الخشب والقطن) بعد حضنها بدرجة 37م ولمدد زمنية مختلفة.

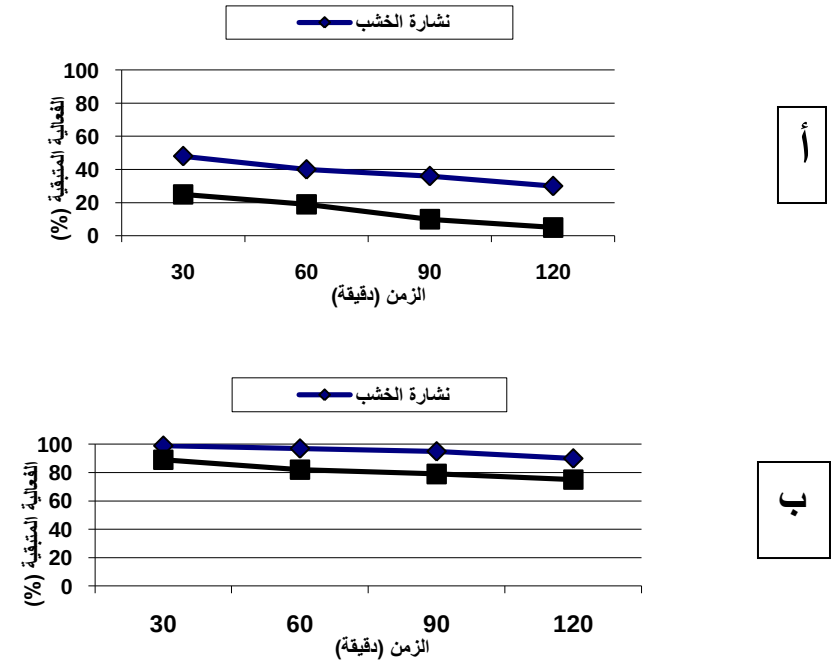


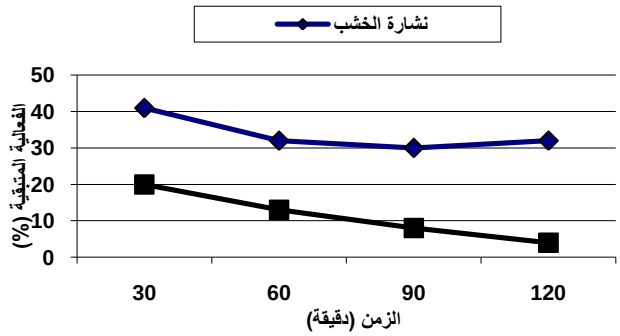
أ



شكل (7): فعالية الاسبارجينيز المنتج من *B. subtilis* B1 والمقيدة بنشارة الخشب بعد حضنه بدرجات حرارية مختلفة ولمدد زمنية مختلفة

أ: 37 م ب: 50 م ج: 60 م





شكل (8): فعالية الاسبارجينيز المنتج من *B. subtilis* B1 والمقيدة بنشارة الخشب بعد حضنها بدرجة 37 م ولمدد زمنية مختلفة وارقام هيدروجينية مختلفة

أ: pH 4 ب: pH 7 ج: pH 10

References

1. Magdy, M.; Youssef G., and Mohammed, A. Al-Omair. 2008. Cloning purification, characterization and immobilization of L-asparaginase II from *E. coli*. W3110. Asian journal of Biochemistry. 3(6): 337-350.
2. Ashraf, A. El-Bessoumy; Mohammed Sarhan and Jehan Mansour. 2004. production, Isolation and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid – state fermentation journal of Biochemistry and Molecular. Vol. 37, No. 4 pp. 387 – 393.
3. Khushoo, A.; Y. Pal; B. N. Srugh and K. J. Mukherjee. 2004. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. Protein Expression purification. 38: 29-36.
4. Kotzia, G. A. and N. E. Labrou. 2007. L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. J. Biotechnol. 127: 657 – 669.
5. Richards, N. G. and Kilberg, M. S. 2006. Asparagine synthetase chemotherapy. Annual Review of Biochemistry. Vol. 75, N. 1. pp: 629 – 654.
6. Cho, C. ; H. Lee ; E. Chung ; K. Kim ; J. Heo ; J. Kim and J. Chung *et al.* 2007. Molecular characterization of the Soy bean L-asparaginase gene induced by low temperature stress. J. Mol. Cells. 23: 280-286.
7. Kara, A.; Osman, H. and A. Denizli. 2005. Immobilization of α-amylase on Cu+2 chelated poly matrix via adsorption. Reactive and functional polymers. 62: 61-68.
8. Holt, J. G.; Kriea, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and William, S. T. 1994. Bergey's Manual of Determination Bacteriology. (9th ed.) Williams and Wilkins.
9. Beck, J. V. 1971. Enrichment culture and isolation techniques particularly for aerobic bacteria in: Methods in Enzymology, Academic press, New York.
10. Novak, E. K. and Philip, A. W. 1974. L-glutamine as substrate for L-asparaginase from *Serratia marcesccens*. J. Bacteriology. 117 (2): 593 – 600.
11. Lowry, O. H.; Rosenbourgh, N. J.; Farr, A. L. and RAndell, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 – 275.
12. Dey, G.; B. Singh and R. Banerjee. 2003. Immobilization of α-amylase produced by *Bacillus circulans*. Brazilian Archeived of Biology and Technology. 46: 167 – 176.
13. السعد، مها رؤوف 1990 . مبادئ فسلجة الاحياء المجهرية . جامعة بغداد . مطبعة التعليم العالي في الموصل .

14. Mohapatra, B. R.; Sani, R. K. and Banerjee, U. C. 2008. Characterization of L-asparaginase from *Bacillus* sp. Isolated from intertidal marine algae. Applied Microbiology. 21 (6): 380 – 383.

15. Bull, A. T. and Bushnel, M. E. 1976. Environmental Control of Fungal growth. In filamentous fungi (eds. Smith, J. E. and Berry, D. E.) P: 1-26. Edward Arnold, London.

16. Borkotaky, B. and R. L. Bezbaruah. 2002. Characterization of L-asparaginase isolated from *Erwinia cartavora*. Regional Research. Laboratory, Biochemistry. 47 (5).

17. Taylor, M. J. and Richardson, T. 1979. Application of Microbial enzymes in feed system and biotechnology. Adv. Appl. Microbiol. 25: 7 – 31.

18. Wang, N. S. 2003. Enzyme immobilization by gel entrapment. Biochemical Engineering Laboratory.

19. Villain, S. and Jouenne, T. 2004. Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cell: a multivariant statistical approach. Anal. Biochem. 329: 120 – 130.