تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم L-Asparaginase من عزلة محلية من *Erwinia caratovora* AH88

Study the Effect of Optimum Conditions for L-Asparaginase Production from Local Isolate of *Erwinia caratovora* AH88

حميد عبود جبر أنفال خالد فيصل الاوسي
كلية الزراعة/ جامعة بغداد
Hameed Abbood Jebur Anfal Khalid Fasil
College of Agriculture / Baghdad University
dr_hameedm59@yahoo.com

الملخص

هدفت هذه الدراسة الى تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم L- asparaginase من عزلة محلية من بكتريا *Erwinia Caratovora AH88* (تم الحصول عليها من دراسة سابقة) وباستخدام تقنية المزارع المغمورة. أظهرت نتائج هذه الدراسة ان الظروف المثلى لانتاج انزيم L- asparaginas من العزلة المحلية المذكورة اعلاه تضمنت استخدام اللاكتوز بتركيز 1% مصدرا للكاربون وخلاصة الخميرة بتركيز 1 % مصدرا للنتروجين فضلا عن وجود الاسبارجين كمادة حاثة وبتركيز 0.19%. كما ان الرقم الهيدروجيني الامثل لوسط الانتاج هو 7 ودرجة الحرارة المثلى 30مْ وسرعة التهوية 150 دورة / دقيقة وان حجم اللقاح الامثل كان مساويا الى 2 % (محتويا على $3x\ 10^6$ وحدة تكوين مستعمرة / مل) وفترة الحضن المثلى كانت 24 ساعة. وتحت الظروف المثلى لانتاج انزيم L- asparaginase فان الفعالية الانزيمية والنوعية للانزيم بلغت 71.0 وحدة / مل و17 وحدة / ملغم على التوالي.

الكلمات الدالة: انزيم الاسبارجينيز ، بكتريا *Erwinia*

Abstract

The aim of this study was to determine the optimum conditions for L-asparaginase production form local isolate *Erwinia caratovora* AH88 (gained from previous study) by using submerged culture. The results of this study revealed that the optimum conditions for L-asparaginase production from this isolate were include using1 % of lactose as carbon source, 1% yeast extract as nitrogen source, in addition to asparagine with 0.19 % as inducer. The optimum pH was 7, optimum temperature was 30 C^o, aeration speed was 150 rpm, optimum size of inoculum was 2% (contain $3 X 10^6$ CFU/ ml) and incubation period was 24 hours. Under these optimum conditions for L- asparaginase production the results revealed that the enzyme activity and specific activity were 71.0 unit / ml and 17 unit / mg respectively.

Key word: L- asparaginase, *Erwinia*

المقدمـــــــــة

ينتمي إنزيم الأسباراجينيز L-asparaginase إلى مجموعة إنزيمات التحلل المائي Hydrolases، L-asparagine amidohydrolase EC 3.5.1.1 ويعمل الإنزيم في وجود الماء على تحليل الحامض الأميني L-asparagine إلى حامض أسبارتيك (L-aspartic acid) وأمونيا (Ammonia) [30]. يوجد الاسباراجينز في أنسجة عدد من الحيوانات والنباتات وفي الأحياء المجهرية الا إنه لم يلاحظ في الانسان [12]. وتعد البكتريا المصدر الأساسي لهذا الأنزيم. واوضحت بعض الدراسات أن هذا الإنزيم قد يكون ذا إفراز خارجي كما في بعض اجناس بكتريا *Bacillus* sp. [26]، وخميرة *Pichia pastoris* [16] وعفن *Aspergillus niger* [25] أو ذا إفراز داخلي [14]، وذلك باختلاف طبيعة الكائن المجهري، كما أن إنزيم الأسباراجينيز الداخلي اما ان يكون ضمن الفسحة البينية كما في بكتريا *Erwinia aroideae* و بكتريا *Erwinia carotovora* أو يكون معظمه ضمن السايتوبلازم، وفي بكتريا *Escherichia coli* وجد إنها تفرز نوعين من إنزيمات الأسباراجينيز أحدهما الأسباراجينيزI (L-asparaginase I) ويقع ضمن السايتوبلازم الذي يمتاز بألفة قليلة للمادة الاساس الاسبارجين والثاني الأسباراجينيزII (L-asparaginaseII) ويقع ضمن الفسحة البينية الذي يمتاز بألفة عالية للمادة الاساس الاسبارجين [36]. كما وجد ان هذا الانزيم ينتج من بعض الاحياء المجهرية الاخرى مثل بكتريا *Pseudomonas aernginosa* , *Staphylococcus* sp. , *Bacillus* sp. , *Erwinia carotovora* *Pectobacterium carrotovorum*, [33] . الا ان بكتريا *E.coli* أصبحت المصدر الرئيس لانتاج هذا الانزيم الاسبارجنيز بكميات كبيرة [15]، كما وجد ان انزيمات الاسبارجنيز المنتجة من البكتريا المحبة للحرارة مثل بكتريا *Thermus thermophilus* تتميز بالثبات تجاه الحرارة العالية [31] . وتتمثل الاهمية الطبية لأنزيم الأسباراجينيز في أستخدامه كعلاج مضاد لمرض السرطان في كونه يعمل على تحلل الحامض الاميني الأسباراجين الموجود في الدورة الدموية، ولان الخلايا السرطانية تحتاج في نموها لهذا الحامض ولاتستطيع تأمين حاجتها منه لذلك فإن انزيم الاسبارجينيز يقلل من جاهزية الحامض لتلك الخلايا مما يؤدي الى كبح نموها وموتها [30, 38]، في حين تستطيع الخلايا الطبيعية (السليمة) تأمين حاجتها من هذا الحامض الأميني كونه من الأحماض الأمينية غير الأساسية اذ يدخل الاسبارجين في المسارات الأيضية لعدد من الخلايا وذلك من خلال تصنيعه بوساطة إنزيم L-asparagine synthetase .

ومن الطرائق المهمة في انتاج هذا الانزيم هي طرائق المزارع المغمورة Submerged fermentation والتي تكون عادة اما بشكل مزارع

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

متقطعة أو بشكل مزارع مستمرة. وعادة تفضل طرائق المزارع المغمورة على طرائق تخمرات الحالة الصلبة ولاسيما عند انتاج الانزيمات من البكتريا[2]. اما عن استخلاص الانزيم فقد ذكرت عدة طرائق لاستخلاص إنزيم الأسباراجينيز، سواء كان ذلك من خلايا الأحياء المجهرية أو من الأنسجة الحيوانية ، ولكون موقع إنزيم الأسباراجينيزII ضمن الفسحة البينية (Periplasmic space) في خلايا *E. coli* فإن ذلك سهل عملية استخلاص هذا الإنزيم، إذ تعامل الخلايا بأنزيم اللايسوزايم (Lysozyme) والإثيلين ثنائي أمين رباعي حامض الخليك (EDTA) وبوجود السكروز يتم تحويل الخلايا السليمة (Intact cells) إلى خلايا منزوعة الجدار جزئياً تسمى سفيروبلاست (Spheroplast) فيتحرر إنزيم الأسباراجينيزII إلى الوسط الخارجي في حين يبقى إنزيم الأسباراجينيزI داخل الخلية، كما استخدمت طريقة تحليل الخلايا باستخدام الموجات فوق الصوتية (UltraSonic) لاستخلاص إنزيم الأسباراجينيز من عدد من المصادر الميكروبية مثل خلايا [42] Erwinia carotrovora . وعن تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الأسباراجينيز فان مكونات الوسط الزرعي المتمثلة بمصدر الكاربون والنتروجين تعد من العوامل الأساسية المؤثرة في إنتاج الإنزيمات فضلا عن درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط ومدة الحضن وحجم اللقاح وظروف التهوية عند استخدام المزارع المغمورة. أختلفت الدراسات حول تحديد افضل مصدر كاربوني لانتاج انزيم الاسبارجينيز وذلك حسب نوع الكائن المجهري المستحدم في الانتاج، فقد ذكر Rebecca [34] أن افضل مصدر كربوني هو المالتوز بتركيز1غم/لترلانتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *E. coli* غم/لترلانتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *E.coli* . كما استخدم Ibrahim [19] كل من اللاكتوز والكلوكوز والكليسرول مصادر رئيسة للكربون لانتاج الانزيم من بكتريا *Erwinia herbicola*. وبين Hymavathi [18] ان الكلوكوز يعَد هو المصدر الكربوني الاكثر ملائمة مقارنة بعدد من المصادر الكربونية في انتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا MTCC8574 *Bacillus circulans* ، كما ذكر [35] ، أن انتاج انزيم الاسباراجنيز من بكتريا *Serratia mercescens* يكون عند اقصاه باستخدام الفركتوز بتركيز 1% كمصدر للكاربون، في حين أشار Kuldeep [23] ، إلى أن انتاج انزيم الاسبارجينيز عند بعض سلالات *E. coli* K-12 يزاداد عند تنميتها في ظروف تهوية جيدة وبوجود اللاكتوز كمصدر كاربوني في الوسط .

كما يعد النتروجين احد العناصر المغذية المهمة التي تحتاجها الاحياء المجهرية كونه يدخل في تركيب الوحدات البنائية لعدد من المركبات العضوية النتروجينية البنائية والوظيفية كالاحماض الامينية والبروتينات والقواعد النتروجينية وبعض الفيتامينات، وتضاف مصادر النتروجين الى اوساط الانتاج اما بهيئتها العضوية او اللاعضوية مثل الامونيا واملاح النترات واملاح النتريت وغيرها. ان مستخلص الخميرة يعدَ أفضل مصدر للنتروجين لانتاج انزيم الاسبارجنيز من الفطريات مقارنة بتسعة مصادر نتروجينية استخدمت في الدراسة [22]. كما وجد، ان افضل مصدر نتروجيني لانتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *Streptomycess ginsengisoli* هو باستخدام البيتون مقارنة بالمصادر الاخرى التي تضمنت خلاصة الخميرة وخلاصة اللحم البقري كل على انفراد [29].

وعلى خلاف ما ذكر آنفاً فقد اشار [18]، الى ان استخدام كلوريد الامونيوم كمصدرلاعضوي للنتروجين ادى الى الحصول أعلى انتاجية من انزيم الاسبارجينيز المنتج من عزلة من بكتريا MTCC8574 *Bacillus circulans* ، وفي السياق ذاته فان استخدام نترات الامونيوم كمصدر لاعضوي للنتروجين كان هو الافضل من بين المصادر النتروجينية الاخرى في الحصول على اعلى انتاجية من انزيم الاسبارجنيز من بكتريا *Serratia mercscen* [35].

اما عن الرقم الهيدروجيني فان انتاج الانزيم يتحدد با لرقم الهيدروجيني ، لذلك فإن انحراف الرقم الهيدروجيني الابتدائي عن القيمة المثالية يؤدي الى انخفاض انتاج الانزيم مما يؤثر على فعالية الانزيم بوضوح [4]. واشار Narayana [28]، الى ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي لانتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *Streptomyces albidoflavus* يتراوح بين 7.5 - 8، كما وجد ان إنتاج إنزيم الاسبارجينيز من السلالة *Erwinia carotovora* يتطلب الحفاظ على الرقم الهيدروجيني للوسط الإنتاجي في مدى يتراوح بين 6.8 - 7.0 [13]. كما تُعَدَ درجة الحرارة عاملا اساسيا مؤثرا في النمو والفعاليات الحيوية للاحياء المجهرية وغالبا ماترتبط درجة الحرارة المثلى للنمو وانتاج الانزيم بنوع الاحياء المجهرية المستعملة، فقد وجد ايضا أن درجة الحرارة المثلى لانتاج الاسبارجينيز من البكتريا الخيطية *Streptomyces spp.* المعزولة من الاسماك البحرية كانت بحدود 37 مْ [14]، في حين ان أفضل انتاجية لانزيم الاسبارجينيز من بكتريا *Bacillus* sp. CMU- HB-631 كانت بحدود 45 م ْ [32]. كما عُدت الحرارة 30 مْ هي الافضل لانتاج انزيم الاسبرجينيز من بكتريا *Erwinia herbicola* المستخلصة من الطماطم [19]. وقد قدرت درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم من السلالة *Serratia marcescens* من خلال دراسة اجراها [35] فوجد انها مساوية الى 35 م ْ. اما عن تأثير ظروف التهوية على انتاج الانزيم، فقد وجد ان الظروف المثلى لانتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *E. coli* - 11303 هي بحضن العزلات في ظروف هوائية في حاضنة هزازة بسرعة 200 دورة / دقيقة مدة 15 ساعة [45] . في حين ان افضل انتاجية لانزيم الاسبارجينيز يمكن الوصول اليها عند حضن عزلات من بكتريا *Bacillus sp.* CMU-HB-494 مدة 24 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة 175 دورة /دقيقة [32].

المواد وطرق العمل

1- المزرعة البكتيرية

تم الحصول على عزلة نقية من بكتريا *Erwinia cartrovora* AH 88 من دراسة سابقة [1]

2- الوسط المستخدم في الانتاج (YMA) Yeast Maltose –Asparagine

استخدم الوسط الاساس السائل لغرض انتاج الانزيم [43] . حيث حضر هذا الوسط بإذابة المكونات التالية في 100 مل من الماء المقطر : yeast extract 1.7 غم ، Maltose 1.1غم ، L-asparagine 0.19 غم .

3-استخلاص الانزيم

فصلت الكتلة الحيوية من وسط النمو بالنبذ المركزي المبرد وعلى سرعة (5000 دورة / دقيقة) مدة 20 دقيقة وعلى درجة حرارة 4م، تم التخلص من الرائق، اما الراسب الذي يمثل الخلايا الكاملة فقد تم غسلها بالماء المقطر بحجم يعادل حجم وسط الانتاج (50) مل ونبذت مركزيا تحت الظروف نفسها المذكورة آنفاً. كررت هذه العملية مرتين وتم التخلص من الرائق وعلق الراسب في كمية من دارئ الفوسفات (pH=7) وعرضت الى جهازتحطيم الخلايا بالذبذبات فوق الصوتية Ultrasonication المسمى sonicator المجهز من شركة Grant مدة ساعة كاملة اجريت بعدها عملية طرد مركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة بدرجة 4 مْ ، أهمل الراسب الحاوي على بقايا الخلايا المتكسره ، واخذ الرائق الذي يمثل مستخلص الانزيم الخام الى انابيب اختبار نظيفة لتقدير الفعالية الانزيمية [42] .

4- تقدير فعالية الانزيم

تم تقدير الفعالية الانزيمية وذلك بتقدير كمية الامونيا المتحررة في النماذج التي استخدم معها المستخلصات الانزيمية وبواقع مكررين لكل عينة ، وحسب الطريقة المذكورة في [1].

وعرفت وحدة فعالية الانزيم Unit بأنها كمية الانزيم التي تحرر مايكرومول واحد من الامونيا في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

5-تحديد الظروف المثلى لانتاج الانزيم

درس تأثير عدد من العوامل لتحديد الظروف المثلى لانتاج الانزيم من عزلة محلية لبكتريا *Erwinia caratovora* AH88 (تم الحصول عليها من دراسة سابقة) [1] تضمنت مصدر الكربون وتركيزه ومصدر النتروجين وتركيزه والرقم الهيدروجيني الابتدائي ودرجة الحرارة ومدة الحضن والتهوية وتأثير الاملاح وحجم اللقاح وبعد انتاج الانزيم واستخلاصه بطريقة الموجات فوق الصوتية ، قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين وحسبت الفعالية النوعية على وفق المعادلة الاتية :

$$\text{الفعالية النوعية (وحدة /ملغم بروتين)} = \frac{\text{فعالية الانزيم (وحدة/مل)}}{\text{تركيز البروتين (ملغم/مل)}}$$

وشملت تلك الظروف على :

أ - تحديد المصدر الكربوني الامثل

درس تأثير عدد من مصادر الكربون في انتاج الانزيم اشتملت على الكلوكوز، والكالاكتوز والسكروز و اللاكتوز فضلا عن البكتين بتركيز 1% في الوسط الاساس السائل YMA المذكور آنفا.

ب- تحديد التركيز الامثل لسكر اللاكتوز

درس تأثير تراكيز مختلفة من اللاكتوز كأفضل مصدركربوني أنتخب من التجربة السابقة في الوسط الاساس السائل YMA المستعمل في انتاج الانزيم وشملت تلك التراكيز 0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4 % .

ج - تحديد مصدر النتروجين الامثل لانتاج الانزيم

استبدل مصدر النتروجين في الوسط YMA بمصادر نتروجينية عضوية شملتBeef extract , yeast extract , peptone ومصادر نتروجينية لاعضوية شملت KNO_3 , $(NH_4)SO_3$ ، واضيفت المصادر المذكورة الى وسط الانتاج بتركيز 1% مع مراعاة استعمال التركيز الامثل من المصدر الكاربوني المتمثل باللاكتوز والذي تم تحديده في ضوء التجربة السابقة .

د - تحديد التركيز الامثل للمصدر النتروجيني

درس تأثير تراكيز متدرجة من مستخلص الخميرة كأفضل مصدر نتروجيني أنتخب من التجربة السابقة في الوسط الاساس السائل.

هـ تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم

استعمل وسط الاساس السائلYMA مع تعديل المصدر الكربوني والنتروجيني في وسط الانتاج في هذه التجربة والتجارب اللاحقة بناءً على نتائج تحديد مصادر الكربون والنتروجين المذكورة آنفاً. إذ حضر الوسط بأرقام هيدروجينية تراوحت من 6 – 9 بفارق نصف درجة من وسط لآخر لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم .

و - تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم

حضن وسط الانتاج الملقح بخلايا البكتريا قيد الدراسة في درجات حرارة مختلفة تراوحت بين 25-45ْم بفارق 5 درجات حرارية من وسط لآخر مدة 24 ساعة لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في التجارب السابقة.

ز- تأثير التهوية في انتاج انزيم L-asparaginase

تم حضن الاوساط الملقحة بخلايا البكتريا قيد الدراسة في حاضنة هزازاة وبسرع مختلفة هي

50 ، 150 ، 200 دورة / دقيقة ، وتركت معاملة اخرى بدون تحريك ، مدة 24 ساعة وعلى درجة 28ْم مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة من التجارب السابقة.

ح- تأثير فترة الحضن في انتاج انزيم L-asparaginase

تم متابعة انتاج الانزيم من البكتريا قيد الدراسة بمدد حضن مختلفة تراوحت بين 24 ساعة و 96 ساعة على درجة 28ْم مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة من التجارب السابقة.

ط - دراسة تأثير حجم اللقاح الامثل لانتاج الانزيم

أستخدمت تراكيز مختلفة من لقاح البكتريا قيد الدراسة و المنشطة حديثا لتلقيح وسط الانتاج ، إذ نقل 0.5 ، 1 ، 1.5 ، 2 ، 2.5 مل من هذا اللقاح (الحاوي على $3x10^6$ وحدة تكوين مستعمرة / مل) الى دوراق تحوي 50 مل من وسط الانتاج للحصول تراكيز من اللقاح بنسبة تراوحت بين 1- 5 % من حجم الوسط بهدف تحديد التركيز الامثل من اللقاح لانتاج الانزيم مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في التجارب السابقة.

ي - تأثير الاملاح على انتاج انزيم L-asparaginase

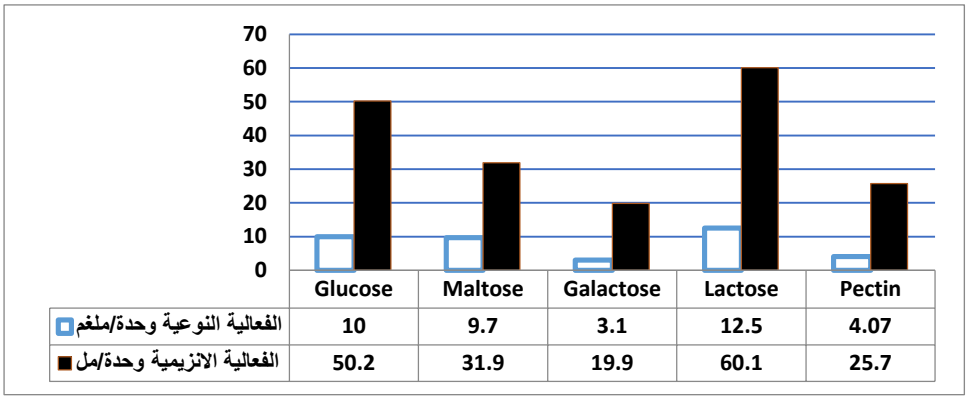
أضيفت الى وسط الانتاج المذكور آنفا YMA مصادر معدنية بتركيز 0.3% شملت KCl , Sodium acetate , NaCl كلاً على انفراد في حين تركت معاملة اخرى من دون أضافة ألاملاح مع مراعاة الظروف المثلى كافة المتحققة من التجارب السابقة.

النتائج والمناقشه

1- مصدر الكربون الامثل لانتاج انزيم L-asparaginase

استعملت في هذه التجربة خمسة مصادر كاربونية لانتاج انزيم الاسبارجنيز شملت اللاكتوز والكلوكوز والكالاكتوز والمالتوز والبكتين بنسبة 1% واظهرت النتائج ان اعلى فعالية انزيمية ونوعية تم الحصول عليها بأستخدام سكر اللاكتوز، اذ بلغت الفعالية الانزيمية 60.1 وحدة/مل والفعالية النوعية 12.5 وحدة/ملغم بلية الكلوكوز والمالتوز والبكتين واخيرا الكالاكتوز شكل (1). وبناءً على هذه النتائج فقد استعمل اللاكتوز مصدراً للكاربون في وسط انتاج الانزيم في المراحل اللاحقة من الدراسة كونه يحفز على انتاج الانزيم بمعدلات عالية مقارنه مع مصادر الكاربون الاخرى.

وتتفق النتائج الحالية مع ما وجده [3] من ان اضافة سكر اللاكتوز الى وسط الانتاج حققت اعلى انتاج للانزيم L-asparaginase من بكتريا *Erwinia* مقارنة مع السكريات الاخرى وقد يتحكم اللاكتوز بالجين الذي يشفر لانتاج انزيم الاسبارجينيز. في حين اشار[44] الى ان الجين الذي يشفر لانتاج انزيم الاسبارجينيز (*ans B*) في بكتريا *E. coli* يمكن السيطرة عليه عن طريق التحكم بمصادر الكاربون المستخدمة في الوسط وان أفضل تلك المصادر هو المالتوز . وتتفق هذه النتيجة ايضا مع ما ذكره [42] الى ان المالتوز يعد المصدر الافضل في انتاج انزيم الاسبارجنيز من بكتريا Erwinia carotovora . في حين وجد [40] أن النشاء يعّد المصدر الكربوني الافضل من بين 15 مصدراً كربونياً تم اختبارها في انتاج أنزيم الاسبارجينيز من عزلة من بكتريا Bacillus cereus MNTC-7 إذ بلغت الفعالية الانزيمية عندها 97. 5 وحدة / مل. ويُعَّد هذا التباين في الفعالية الانزيمية مع اختلاف المصادر الكربونية مقبولاً بسبب اختلاف المصادر الميكروبية المنتجة للانزيم .

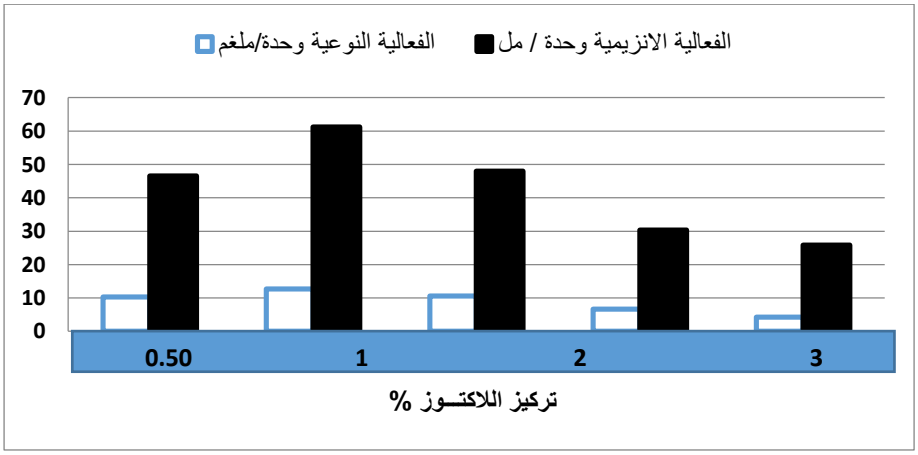


	Glucose	Maltose	Galactose	Lactose	Pectin
الفعالية النوعية وحدة/ملغم	10	9.7	3.1	12.5	4.07
الفعالية الانزيمية وحدة/مل	50.2	31.9	19.9	60.1	25.7

شكل (1): تأثير مصدر الكاربون في انتاج انزيم الاسبارجنيز من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 على اساس الفعالية الانزيمية وحدة / مل والفعالية النوعية وحدة/ملغم ، بعد الحضن على درجة 28م مدة 24 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة / دقيقة و pH الوسط = 7 ، وحجم اللقاح 2% الحاوي على ($3x\ 10^6$ وحدة تكوين مستعمرة / مل)

2- التركيز الامثل للاكتوز

درس تأثير تراكيز مختلفة من سكر اللاكتوز في انتاج انزيم الاسبارجنيزمن بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 قيد الدراسة ، إذ استعمل تركيز 0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4 % وبينت النتائج الموضحة في شكل (2) ان افضل تلك التراكيز هو 1% إذ بلغت الفعالية الانزيمية 61.2 وحدة/مل والفعالية النوعية 12.7 وحدة/ملغم وأدى زيادة تركيز اللاكتوز عن هذا الحد الى انخفاض في الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية اذ بلغت الفعالية الانزيمية عند تركيز 4% مايعادل 25.8 وحدة/مل والفعالية النوعية 4.3 وحدة/ملغم . وقد يعود السبب الى ان زيادة تركيز السكر تؤدي الى ارتفاع الضغط الازموزي للخلايا وانخفاض قيمة النشاط المائي Water activity الامر الذي ينعكس على كفاءة البكتريا في انتاج الانزيم. تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما وجده [24]من أن استخدام سكر اللاكتوز وبتركيز 1% كمصدر للكاربون في انتاج انزيم L-asparaginase من بكتريا *E. coli* K-12 حقق اعلى انتاجية للانزيم مقارنة باربعة مصادر كربونية اخرى شملت على المالتوز والفركتوز السكروز والكلوكوزكل على انفراد أو خلائط منهما. كما ذكر [42] ان اعلى انتاجية لانزيم الاسبارجنيز من بكتريا *Erwinia carotovora* كانت بأستعمال سكر المالتوز أيضا بتركيز 1% .

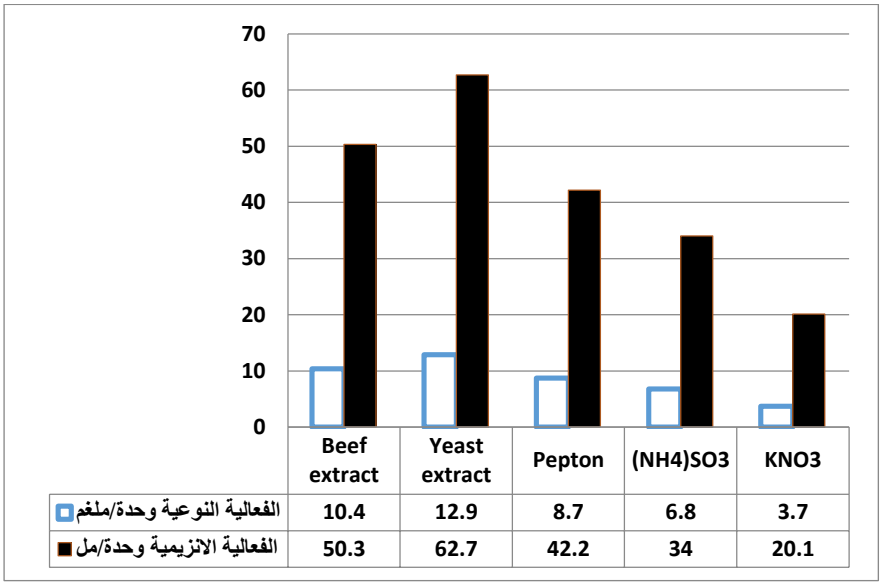


شكل (2): تأثير تراكيز متدرجة من سكر اللاكتوز في انتاج انزيم الاسبارجنيز من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 على اساس الفعالية الانزيمية وحدة / مل والفعالية النوعية وحدة/ملغم، بعد الحضن على درجة 28م مدة 24 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة / دقيقة و pH الوسط = 7 وحجم اللقاح 2%(الحاوي على ($3x\ 10^6$ وحدة تكوين مستعمرة / مل)

3- مصدر النتروجين الامثل لانتاج انزيم L-asparaginase

اختبر عدد من المصادر العضوية واخرى غير عضوية لدراسة تأثيرها في انتاج إنزيم L-asparaginase من العزلة المحلية *Erwinia carotovora* AH88 ووجد ان افضل تلك المصادر يتمثل بمستخلص الخميرة Yeast extract اذ بلغت الفعالية الانزيمية 62.7 وحدة/مل والفعالية النوعية 12.9 وحدة/ملغم يلي ذلك Beef extract والببتون بينما انخفضت الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية في الاوساط الحاوية على المصادر غير العضوية بشكل كبير اذ بلغت الفعالية الانزيمية 34 و20.1 وحدة /مل عند استعمال كبريتات الامونيوم ونترات البوتاسيوم على التوالي ، فيما بلغت الفعالية النوعية باستعمال هذه المصادر 6.8 و 3.7 وحدة /ملغم على التوالي أيضاً شكل 3 . وعلى ضوء هذه النتائج فقد عدت المصادرالنتروجينية العضوية بشكل عام أفضل من المصادر النتروجينية غير العضوية في انتاج الانزيم من العزلة المحلية *Erwinia carotovora* AH88 وقد يعود السبب في ذلك الى كون المصادر النتروجينية العضوية تدخل في بناء المكونات البروتينية ومن ضمنها الانزيم والتي تحتاجها الخليه كما ان مستخلص الخميرة يعد افضل المصادر النتروجينية العضوية كونها تعتبر مصدرا غنيا بالنتروجين والفيتامينات التي تلعب دورا مهما في التحكم بالعديد من المسارات الايضية لبناء البروتينات وغيرها من المكونات الخلوية، لذلك فقد استعمل مستخلص الخميرة مصدراً للنتروجين في الوسط المعَد لانتاج انزيم الاسبارجنيز في التجارب اللاحقة من هذه الدراسة.

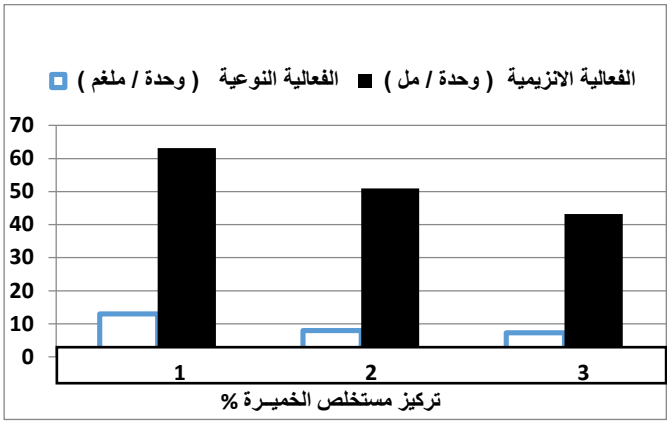
يتضح من النتائج ان انتاج انزيم L-asparaginase من البكتريا قيد الدراسة يتطلب تجهيز وسط الانتاج بالنتروجين العضوي وهذا يتفق مع ما وجده [12] من ان اعلى انتاجيه للانزيم تتحقق عند استخدام الوسط السائل المغذي الحاوي على الحوامض الامينية والفيتامينات والاملاح التي تحفز على انتاج الانزيم ، كما تتفق هذه النتائج مع ما وجده [29] ان الببتون كان المصدر النتروجيني الافضل مقارنة بخلاصة الخميرة وخلاصة اللحم في انتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *Streptomyces ginsengisoli* . وعلى خلاف ذلك فقد اشار [3] الى ان افضل انتاجية لانزيم الاسبارجنيز من بكتريا *Erwinia carotovora* كانت عند استخدام المصدرالنتروجيني اللاعضوي المتمثل بكبريتات الامونيوم . وقد يرتبط هذا الاختلاف في نوع المصدر النتروجيني بنوع الكائن المجهري المنتج للانزيم وما له من علاقة بعمليات الايض التي تتحكم بانتاج الانزيم .



شكل(3): تأثير مصدر النتروجين في انتاج انزيم الاسبارجنيز من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 وبأستعمال اللاكتوز وبتركيز 1% مصدراً للكاربون على اساس الفعالية الانزيمية وحدة / مل والفعالية النوعية وحدة/ملغم ، بعد الحضن على درجة 28م مدة 24 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة / دقيقة و pH الوسط = 7 وحجم اللقاح 2% الحاوي على ($3x\ 10^6$وحدة تكوين مستعمرة / مل)

4- التركيز الامثل لمستخلص الخميرة Yeast extract

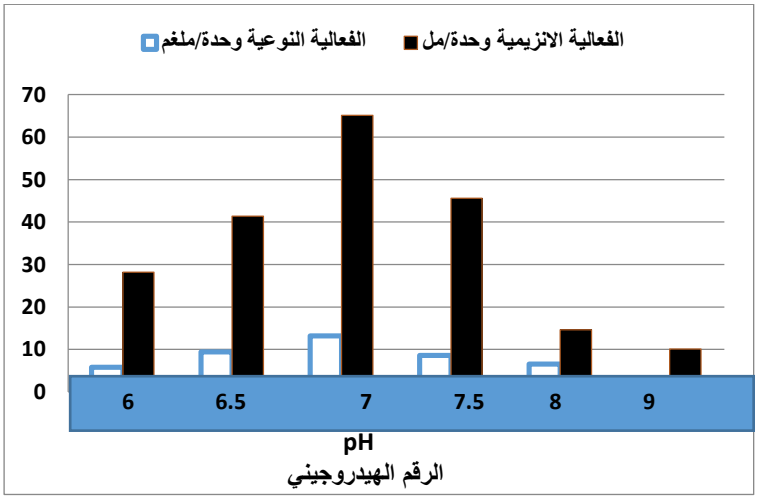
درس تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة في انتاج انزيم الاسبارجنيزمن بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 قيد الدراسة ، إذ استعمل تركيز 1 ، 2، 3 % وبينت النتائج الموضحة في شكل (4) ان افضل تلك التراكيز هو 1% إذ بلغت الفعالية الانزيمية 63.2 وحدة/مل والفعالية النوعية 13 وحدة/ملغم وهي تمثل قيم الفعالية الانزيمية والنوعية نفسها تقريبا التي تم الحصول عليها في التجارب السابقة بسبب عدم اختلاف تركيز مستخلص الخميرة في هذه التجربة قبل تحديد الظروف المثلى ، علما أن زيادة تركيز مستخلص الخميرة ادت الى انخفاض في الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية اذ بلغت الفعالية الانزيمية 43.2 وحدة/مل والفعالية النوعية 7.3 وحدة/ملغم عند التركيز 3% ، وقد يعود سبب هذا الانخفاض الى الاختلال في نسبة الكاربون : النتروجين التي تؤدي دوراً مهماً في التحكم في النمو والتكاثر وانتاج المركبات الايضية في الاحياء المجهرية [17]. تتفق هذه النتائج مع ما ذكره [7] الذي اشار الى هبوط الفعالية الانزيمية للاسبارجينيزالمنتج من بكتريا Streptomyces gulbargensis عند زيادة تركيز خلاصة الخميرة من0.5 % الى 1.25% إذ بلغت الفعالية الانزيمية 15.8 وحدة /مل بعد ان كانت21.0 وحدة /ملل. وفي هذا السياق فقد اشار [42] أيضا ان الفعالية الانزيمية لانزيم الاسبارجينيز المنتج من بكتريا Erwinia carotrovora تتحكم فيها نسبة خلاصة الخميرة الى سكر المالتوز فضلا عن وجود المادة الحاثة الحامض الاميني الاسبارجين(1.7 ، 1.1 ، 0.19 % على التوالي) إذ بلغت اقصى فعالية انزيمية 107.4 وحدة/مل.



شكل (4): تأثير تراكيز متدرجة من مستخلص الخميرة في انتاج انزيم الاسبارجنيز من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 مقدرة على اساس الفعالية الانزيمية وحدة / مل والفعالية النوعية وحدة/ملغم ، بعد الحضن على درجة 28م مدة 24 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة / دقيقة و pH الوسط = 7 وحجم اللقاح 2% الحاوي على ($3x\ 10^6$) وحدة تكوين مستعمرة / مل)

5- الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج انزيم L- asparaginase

درس تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط في انتاجية انزيم L-asparaginase من خلال استخدام مدى من ارقام هيدروجينية متدرجة تراوحت بين 6-9 وبفارق نصف درجة من وسط لآخر وتبين من خلال التجربة شكل(5)، ان افضل رقم هيدروجيني لانتاج الانزيم كان عند الرقم الهيدروجيني المتعادل 7 إذ قدرت الفعالية الانزيمية عنده (65.1) وحدة /مل والفعالية النوعية 13.2 وحدة / ملغم. وتتفق هذه الناتئج مع ما وجده [42] من ان الفعالية الانزيمية لانزيم الاسبارجنيز المنتج من بكتريا *Erwinia carotovora* كانت عند اقصاها عندما كان pH الوسط مساوياً الى 7.0 في حين اشار [11،6] الى ان الـ pH الامثل لانتاج انزيم L-asparaginase من العزلة *E. coli* والبكتريا الخيطية *Actinomycetes* على التوالي يكون عند pH = 7.5، وعلى خلاف هذه النتائج فقد وجد [9] ان الـ pH الامثل لانتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* 50071 هو 9 . إن الرقم الهيدروجيني احد العوامل البيئية التي ينبغي التحكم بها لتحقيق مستويات عالية من انتاج الانزيمات الميكروبية وليس من الضرورة ان يتوافق الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج انزيم من الاحياء المجهرية مع الرقم الهيدروجيني الامثل لنمو تلك الاحياء توافقاً تاماً لاسباب تتعلق بالجوانب الفسلجية والوراثية لكل من نمو الكائن وانتاج الانزيم المطلوب بأختلاف الظروف البيئية والاحياء المجهرية المستخدمة في الانتاج [5] .

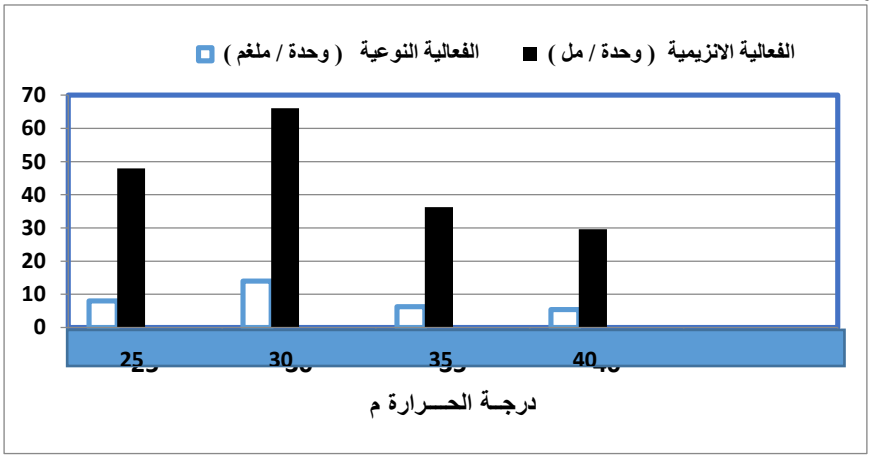


شكل (5): تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج انزيم الاسباراجنيز من البكتريا *Erwinia carotovora* AH88 وبأستعمال اللاكتوز بتركيز ومستخلص الخميرة بتركيز1% مصدراً للكربون والنتروجين على التوالي مقدرة على اساس الفعالية الانزيمية وحدة/مل والفعالية النوعية وحدة / ملغم ، بعد الحضن على درجة 28م مدة 24 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة / دقيقة وحجم اللقاح 2% الحاوي على ($3\ x\ 10^6$) وحدة تكوين مستعمرة / مل).

6- درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم L-asparaginase

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل 6 ان درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 هي 30°م إذ بلغت الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية 66.1 وحدة /مل و 15 وحدة/ ملغم على التوالي، وتمثل هذه الدرجة الحرارية مقاربة للتي اعتمدت منذ بدء تجارب تحديد الظروف المثلى للانتاج في هذه الدراسة وكانت 28 م، ومن الجدير بالذكر فقد كان لارتفاع او انخفاض درجة الحرارة عن 30 مْ تأثير سلبي في خفض الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية ، إذ انخفضت الفعالية الانزيمية والنوعية عند درجة الحرارة 40 مْ الى 29.6 وحدة /مل و 5.4 وحدة/ملغم على التوالي. كما انخفضت الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية عند درجة الحرارة 25°م الى 47.9 وحدة/مل و 8 وحدة/ ملغم على التوالي. ويمكن تفسير ذلك بان ارتفاع درجة الحرارة او انخفاضها قد يؤثر على فسلجة الخلية وبالتالي فقدان الخلايا لحيويتها ومن ثم هبوط انتاج

الانزيم وانخفاض فعاليته [2], وعلى ضوء هذه النتائج فقد عدّت درجة الحرارة 30مْ هي الدرجة الحرارية المثلى لانتاج الانزيم في الخطوات اللاحقة من هذه الدراسة .

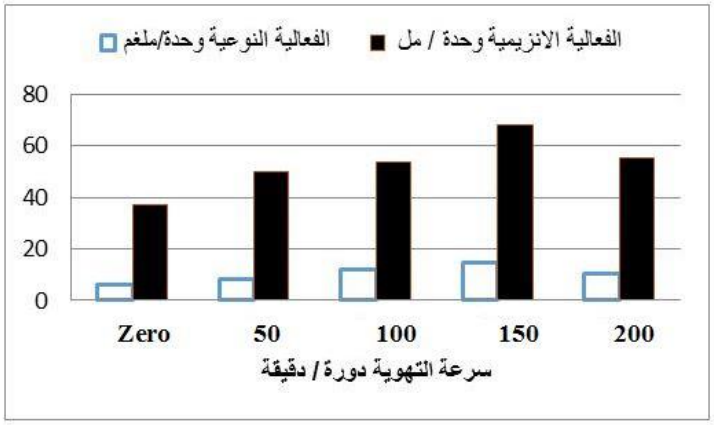


شكل (6): تأثير درجة الحرارة في انتاج انزيم الاسبارجنيز من البكتريا *Erwinia carotovora* AH88 مقدرة على اساس الفعالية الانزيمية وحدة/مل والفعالية النوعية وحدة /ملغم ، وبأستعمال اللاكتوز بتركيز 1% ومستخلص الخميرة 1% مصدرا للكاربون والنتروجين على التوالي ، والرقم الهيدروجيني للوسط 7 في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة / دقيقة مدة 24 ساعة. وحجم اللقاح 2% الحاوي على ($3X10^6$ وحدة تكوين مستعمرة / مل

وقد تباينت الدراسات في تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم الاسبارجنيز فقد ذكر [6] ان الدرجة الحرارية المثلى لانتاج L-asparaginase من عزلة محلية من بكتريا *Psedomonas aeruginoa* المعزولة من حالات مرضية هي 37ْم كونها معزولة من جسم الانسان، في حين تمكن [16] من انتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *Erwinia Carotovora* في وسط انتاج مكون من Nutrient المدعم بالببتون 0.5% وملح 0.5 % وبدرجة حرارة 25ْم. وحصل [42] على النتيجة نفسها ، إذ وجد ان الحرارة المثلى لانتاج انزيم L-asparaginase من بكتريا *Erwinia Carotovora* MTCC 1428 قد بلغ اقصاه عند درجة الحرارة 25 مْ على الرغم من استخدامه مدى واسع من درجات الحرارة تراوح بين 22 الى 37ْ م. وقد يعود هذا التباين في درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم الى اختلاف نوع الكائن المجهري وقابليته على تكييف انظمته الفسلجية لاداء وظائفه بأفضل صورة تبعاً لظروف بيئته الاصلية التي عزل منها [20].

7- تأثير التهوية في انتاج انزيم L-asparaginase

اظهرت النتائج الموضحة في شكل (7) تأثير التهوية في انتاجية الانزيم من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88، وجد أن أعلى انتاجية



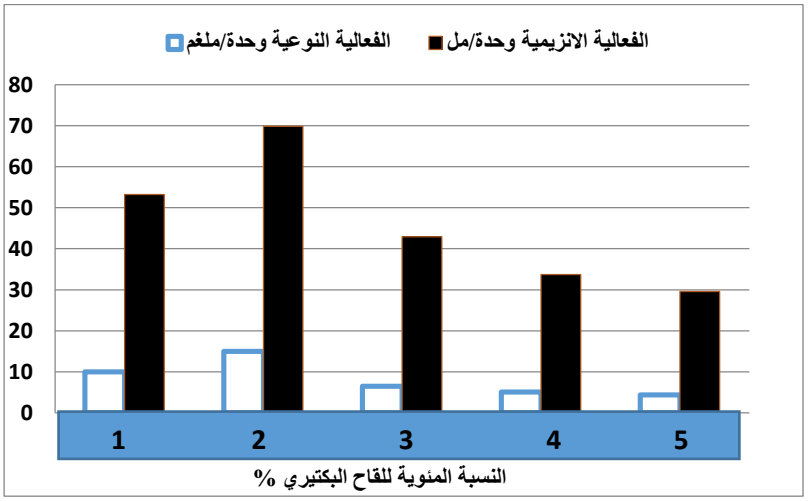
شكل (7): تأثير سرعة التهوية في انتاج انزيم الاسبارجنيز من البكتريا *Erwinia carotovora* AH88 مقدرة على اساس الفعالية الانزيمية وحدة/مل والفعالية النوعية وحدة /ملغم ، وبأستعمال اللاكتوز بتركيز 1% ومستخلص الخميرة 1% مصدرا للكاربون والنتروجين على التوالي والرقم الهيدروجيني للوسط 7 ودرجة الحرارة 30 م مدة 24 ساعة، وحجم اللقاح 2% الحاوي على $3x10^6$وحدة تكوين مستعمرة / مل)

انزيمية كانت عند حضن البكتريا في حاضنة هزازة على سرعة 150 دورة /دقيقة وبلغت الفعالية الانزيمية عندها 68.3 وحدة/مل والفعالية النوعية 14.5 وحدة/ملغم ، إلا ان زيادة سرعة الهزاز الى 200 دورة / دقيقة تسببت في انخفاض الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية وبلغت 55.2 وحدة /مل و 10.6 وحدة/ملغم على التوالي ، في حين تراوحت الفعالية الانزيمية بين 45.7 - 36.9 وحدة/مل عند السرعة 0-100 دورة /دقيقة. يظهر من خلال النتائج ان ابقاء الوسط ساكناً أو قلة التهوية ينتج عنه انخفاض الفعالية الانزيمية والنوعية كما ان زيادة التهوية عن الحدود الحرجة ادت ايضاً الى انخفاض في الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية وقد يعود هذا التباين الى تأثير التهوية بتغيير المسارات الايضية وتباين الكتلة الحيوية المتكونة للبكتريا المنتجة للانزيم. وقد تباينت الدراسات في تحديد ظروف التهوية في الحاضنة الهزازة لانتاج انزيم الاسبارجنيز، فقد ذكر [33] ان أفضل انتاج لانزيم الاسبارجنيز من عزلة مأخوذة من التربة تحت ظروف التهوية الجيدة كانت عند 150 دورة/دقيقة، كمااستخدم [24] سرعة تحريك تراوحت بين 50 – 300 دورة / دقيقة، فوجد ان اقصى انتاج لانزيم الاسبارجينيز من بكتريا *E. coli* – K-12 كانت عند سرعة تحريك 200 دورة / دقيقة،

إذ بلغت عندها الفعالية الانزيمي 3. 8 وحدة /مل. كما تمكن [10] من الحصول على اقصى انتاج من انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *Pectobacterium carotovorum* بعد حضنها في ظروف هوائية وعلى سرعة تهوية 180 دورة / دقيقة مدة 10 – 12 ساعة. وعلى النقيض من ذلك فقد اشار [34] الى ان افضل انتاج لانزيم الاسبارجنيز من بكتريا *E.coli* كان تحت الظروف اللاهوائية وعزي ذلك الى الدور التثبيطي الذي يؤديه الاوكسجين تجاه انتاج الانزيم.

8- تأثير حجم اللقاح في انتاج انزيم L-asparaginase

يعُد تركيز اللقاح الذي يضاف الى وسط الانتاج احد العوامل المهمة في تحديد كمية المركبات الايضية التي تنتجها الاحياء المجهرية فضلاً عن نشاط البكتريا وحيويتها. يوضح شكل (8) تأثير حجم اللقاح من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 المضاف الى وسط انتاج الانزيم بنسب تراوحت بين 1 – 5% من حجم الوسط. لوحظ زيادة الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية عن استخدام نسبة 2% من حجم اللقاح مقارنة مع المعاملات الاخرى، إذ بلغت عندها الفعالية الانزيمية 69.8 وحدة / مل والفعالية النوعية 15 وحدة / ملغم على التوالي وعند زيادة حجم اللقاح الى 5% انخفضت الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية 30.6 وحدة / مل و 4.4 وحدة / ملغم على التوالي ايضا. وقد يعود سبب هذا الانخفاض الى زيادة تنافس الاحياء المجهرية على مكونات الوسط الامر الذي انعكس سلباً على خفض المنتج من الانزيم [2] وعلى ضوء هذه النتائج فقد وقع الاختيار على حجم اللقاح 2% كأفضل معاملة لانتاج انزيم الاسبارجنيز من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 ضمن ظروف التجربة. وتتفق هذه النتائج مع ما وجده [24] إذ اشار الى ان انتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *E. coli* K-12 يزداد مع زيادة حجم اللقاح من 5 - 10 %، بعد ذلك يبدا انتاج الانزيم بالتدهور وصولا الى تركيز 15 %. كما يؤيد ذلك ماذكره [27] الذي اشارالى ان انتاج انزيم الاسبارجينيز يزداد مع زيادة حجم اللقاح لعفن *penicillum* sp. من تركيز 0.25 مل الى 1.0 مل حيث ارتفعت الفعالية الانزيمية من 77.0 وحدة / مل الى 167 وحدة / مل وانخفضت الفعالية الانزيمية الى 115 وحدة / مل عند زيادة حجم اللقاح الى 1. 25 مل مما يشير الى ان زيادة كثافة اللقاح لاتؤدي الى تطور الفعاليات التخمرية لان هناك عوامل اخرى متعلقة بنوع الكائن المجهري وبظروف العملية التخمرية الكيمياوية والفيزياوية هي التي تؤثر على زيادة انتاج الانزيم [41]. وفي نفس السياق فقد استخدم [11] حجم لقاح من بكتريا *Pectobacterium carotovorum*. تراوح بين 0.5 - 5 % وحصل على اعلى انتاج من انزيم الاسبارجينيز بفعالية انزيمية بلغت 19.36 وحدة / مل عندما كان حجم اللقاح 2. 75 % ، مما يشير مرة اخرى الى ان الزيادة في حجم اللقاح لاتؤدي بالضرورة الى زيادة الانتاج.



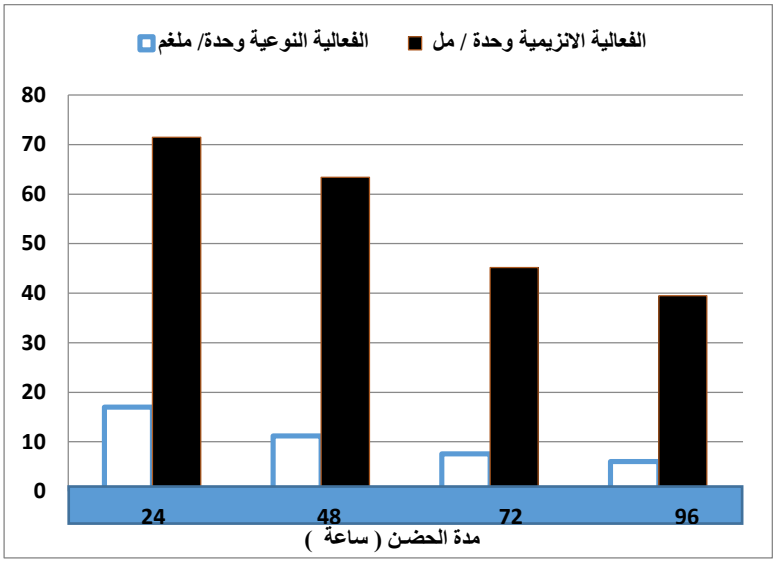
شكل (8): تأثير حجم اللقاح في انتاج انزيم الاسبارجنيز من البكتريا *Erwinia carotovora* AH88 مقدرة على اساس الفعالية الانزيمية وحدة/مل والفعالية النوعية وحدة / ملغم وبأستعمال اللاكتوز بتركيز 1% ومستخلص الخميرة 1% مصدرا للكاربون والنتروجين على التوالي ، والرقم الهيدروجيني للوسط 7 ، ودرجة حرارة 30مْ مدة 24 ساعة، وسرعة التهوية 150 دورة / دقيقة .

9- دراسة تأثير فترة الحضن في انتاج أنزيم L-asparaginase

اجريت هذه التجربة لتحديد الوقت الامثل لانتاج انزيم الاسبارجنيز من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 والتي تم تحديدها على ضوء الفقرات السابقة من هذه الدراسة من اجل تحديد الزمن الامثل لانتاج الانزيم . حضنت النماذج بمدد تراوحت بين 24 - 96 ساعة مع تقدير الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية كل 24 ساعة. أظهرت النتائج الموضحة في شكل (9) ان مدة الحضن 24 ساعة كانت هي الافضل اذ بلغت الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية 71.5 وحدة / مل و 17وحدة / ملغم على التوالي، في حين لوحظ انخفاض الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية مع الاستمرار في الحضن وبلغت عند حدها الادنى عند الحضن لفترة 96 ساعة إذ بلغت الفعالية الانزيمية 39.5 وحدة /مل والفعالية النوعية 6 وحدة / ملغم. وعلى ضوء هذه النتائج فقد عدت مدة الحضن المثلى لانتاج انزيم الاسبارجينز من بكتريا *Erwinia carotovora* AH88 هي 24 ساعة ذلك لان اطالة مدة الحضن تُعد غير مجدية اقتصادياً ولاسيما مع تراجع قيم الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية. ان تدهور انتاجية الانزيمات من الاحياء المجهرية بعد مدة الحضانة المثالية قد يعزى الى دخول البكتريا مرحلة الثبوت العددي او مرحلة الهلاك ولاسيما في المزارع المغلقة بسبب نفاذ مكونات الوسط وحدوث مجموعة من التغييرات فيها والتي قد تؤدي الى تحلل الخلايا وتحرير الانزيمات المحللة للبروتينات ومنها الانزيم المطلوب انتاجه ومن ثم هبوط فعاليته لذلك ينصح بوقف عمليات التخمر قبل الوصول الى مرحلة تحلل الخلايا عندما يراد تحضير الانزيمات ولاسيما الداخلية منها تحت الظروف المثالية لانتاجها [2].

وتباينت الدراسات في تحديد الزمن الامثل لانتاج الانزيم من احياء مجهرية مختلفة وتحت ظروف بيئية مختلفة، فقد وجد [33] ان افضل مدة حضن لإنتاج انزيم L-asparaginase من بكتريا *Erwinia carotovoraa* كانت بعد مرور 72 ساعة من الحضن في درجة 28˚ م وعند pH 7 ، الا

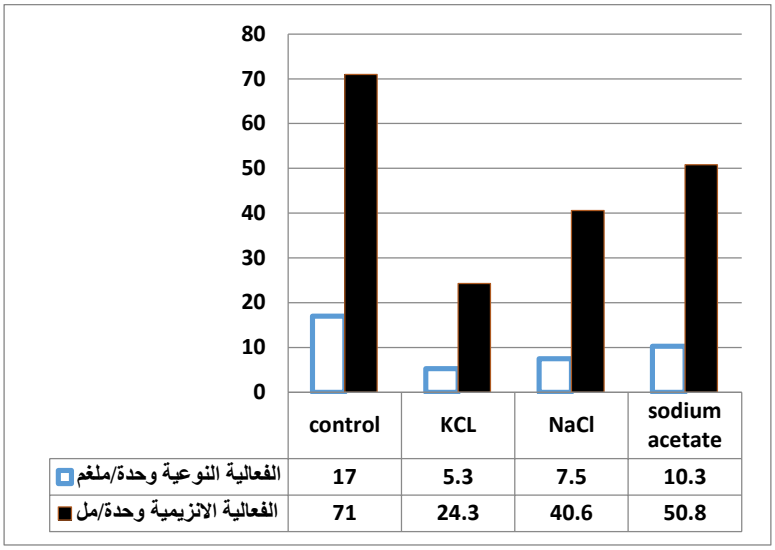
ان الانتاجية تبدا بالهبوط بعد مرور 96 ساعة تحت ظروف الحضن نفسها. في حين اوضح [39]ان المدة المثلى لانتاج الانزيم المذكور تبلغ 8 ساعات من الحضن تحت ظروف التجربة. وقد فسر [40] هبوط انتاجية انزيم الاسبارجينيز مع اطالة مدة الحضن لبكتريا *Serratia marcescens* NCIM 2919 الى حدوث تغيرات في وسط الانتاج جراء نشاط البكتريا مثل تغير في pH الوسط ونفاذ المكونات الغذائية للوسط وموت الخلايا وتحللها وتحرر انزيمات المحللة للبروتينات (البروتيزات). في حين تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده [42] اذ اشار الى ان افضل مدة زمنية للحضن هي 24 ساعة، إذ بلغت الفعالية لانزيم الاسبارجينيز المنتج من بكتريا *Erwinia carotovora* عند اقصاها 108.06 وحدة / مل.



شكل (9): تأثير مدة الحضن في انتاج انزيم الاسبارجنيز من البكتريا *Erwinia carotovora* AH88 مقدرة على اساس الفعالية الانزيمية وحدة/مل والفعالية النوعية وحدة / ملغم وبأستعمال اللاكتوز بتركيز 1% ومستخلص الخميرة 1% مصدرا للكاربون والنتروجين على التوالي ، والرقم الهيدروجيني للوسط 7 ، ودرجة حرارة 30مْ وبسرعة تهوية 150 دورة / دقيقة ، وبحجم لقاح 2%. الحاوي على (10^6 x 3 وحدة تكوين مستعمرة / مل).

10 - دراسة تأثير الاملاح في انتاج انزيم L-asparaginase

أظهرت النتائج الموضحة في شكل (10) ان انتاجية انزيم الاسبارجنيز من العزلة المحلية *Erwinia carotovora* AH88 تتأثر سلباً بأستعمال كلوريد البوتاسيوم والصوديوم إذ بلغت الفعالية الانزيمية 24.3 و 40.6 وحدة / مل على التوالي ، كما بلغت الفعالية النوعية 5.3 و 7.5 وحدة / ملغم على التوالي أيضا، في حين كان لاستعمال املاح خلات الصوديوم دورا اقل تأثيراً في انتاجية الانزيم مقارنة بكلوريدات البوتاسيوم والصوديوم اذ بلغت الفعالية الانزيمية 50.8 وحدة/مل والفعالية النوعية 10.3 وحدة/ملغم على التوالي، أما معاملة السيطرة وهي المعاملة الخالية من الآيونات المعدنية فقد بلغت الفعالية الانزيمية فيها 71 وحدة / مل والفعالية النوعية 17 وحدة / ملغم على التوالي وعلى ضوء هذه النتائج فقد عدّت المعاملة الخالية من الآيونات المعدنية هي الأفضل في انتاج انزيم الاسبارجنيز من البكتريا *Erwinia carotovora* AH88 ، وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره [45] الذي اشار الى ان املاح كلوريدات وكبريتات الصوديوم في وسط انتاج L-asparaginase ادت الى تثبيط انتاج انزيم الاسبارجينيز من بكتريا *E.coli* MM-3 مقارنة بأستخدام املاح فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين، كما اشار [3] الى أن انتاجية بكتريا *Erwinia carotovora* تتأثر سلبا باستخدام جميع الاملاح المعدنية العضوية مثل سترات وخلات الصوديوم واللاعضوية مثل كلوريدات الصوديوم والبوتاسيوم، علما بان سترات وخلات الصوديوم كان تاثيرها اقل مقارنة مع الاملاح الاخرى، في حين اشار [8] الى ان وجود تراكيز معينة من املاح الصوديوم في وسط انتاج انزيم L-asparaginase يعد ضرورياً لانتاج هذا الانزيم من بكتريا *Streptomyces* المعزولة من مياه البحيرات المالحة . قد يعود هذا التباين في حاجة الاحياء المجهرية من الانواع المختلفة من الاملاح العضوية أو اللاعضوية في انتاج انزيم الاسبارجينيز الى الاختلاف في فسلجة الخلايا واختلاف المسارات الايضية التي تتحكم بمجمل فعالياتها الحيوية بضمنها انتاج الانزيم وحسب نوع الكائن المجهري.



شكل (10): تأثير الاملاح في انتاج انزيم الاسبارجنيز من البكتريا *Erwinia carotovora* AH88 مقدرة على اساس الفعالية الانزيمية وحدة/مل والفعالية النوعية وحدة / ملغم وبأستعمال اللاكتوز بتركيز 1% ومستخلص الخميرة 1% مصدرا للكاربون والنتروجين على التوالي , والرقم الهيدروجيني للوسط 7, ودرجة حرارة 30مْ مدة 24 ساعة وسرعة نهوية 150 دورة / دقيقة ، وبحجم لقاح 2% الحاوي على 10^6 3X وحدة تكوين مستعمرة/ مل

الاستنتاجات والتوصيات

امكن رفع كفاء ة العزلة *Erwinia carotovora* AH88 في انتاج انزيم الاسبارجينيز بتحديد الظروف المثلى للانتاج التي تمثلت باستخدام اللاكتوز مصدرا للكاربون وبتركيز 1 % وخلاصة الخميرة بتركيز 1 % مصدرا للنتروجين فضلا عن وجود الاسبارجين كمادة حاثة ، في وسط من مزارع مغمورة برقم هيدروجيني يعادل 7 وبدرجة حراة 30°م ومدة حضن 24 ساعة وبتركيز لقاح 1% (محتويا على $3x10^6$ وحدة تكوين مستعمرة / مل) وسرعة تهوية 150 دورة / دقيقة , عليه نوصي امكانية استخدام العزلة المحلية *Erwinia carotovora* AH88 في انتاج انزيم الاسبارجينيز لغرض استخدامه في تخفيض نسبة الاكريلامايد في عدد من الاغذية النشوية Starchy food ولاسيما البطاطا المقلية والبطاطا المحمصة والفلافل والمخبوزات لما تحتويه هذه المنتجات من نسب عالية من الاكريلامايد نتجة تعرضها اثناء التصنيع للمعاملات الحرارية العالية .

المصادر

1. الاوسي، انفال خالد فيصل. (2014). انتاج انزيم L-Asparaginase من عزلة محلية من بكتريا Erwinia caratrovora AH 88 ودراسة تاثيره في تخفيض الاكريلامايد . رسالة ماجستير . جامعة بغداد / كلية الزراعة / العراق.

2. الخفاجي، زهرة محمود . (1990). التقنية الحيوية – مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر. جامعة بغداد (تأليف).

3. العاني، محمد قيس. (2005). أنتاج انزيم (L-asparaginase amidohydrolase) L-asparaginase من بكتريا *Erwinia carotovora* MM-3 وتنقيته واستخدامه في تثبيط الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي، اطروحة دكتوراه - كلية العلوم - جامعة الانبار- العراق .

4. الدليمي، خلف ألصوفي. (2002). الانزيمات الميكروبية والتقانات الاحيائية. جامعة فيلادلفيا. الاردن.

5 . محي الدين، محمد عمر. (1988). تنقية وتوصيف انزيم البروتييز الحامضي-بديل المنفحة – المنتج من العفن Rhizomucor miehei MO-46 بطريقة تخمرات الحالة الصلبة. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة- جامعة بغداد – العراق.

6 . مقران، سليم عبد الحميد. (2003). دراسة كيميوحيوية لانزيم الاسبارجنيز المنتج من عزلة محلية لبكتريا *Escherichia coli* . أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بغداد. العراق.

7. Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayan, A. and Lingappa, K. (2010). Production, purification and characterization of L-asparaginase from Streptomyces gulbargensis. Brazilian journal of microbiology. 41: 173-178.

8. Annie, M., Dhevendaram, K., Georgekutty, M. and Natarajan, P. (1994). Studies on *Streptomyces* producing L-asparaginase which associated with fish & shell fish of Veli lake. India J. Mar. Sci. 23:204-210.

9. Ashraf, A., El-Bessoumy, M., Ohamed, S. and Jehan, M. (2004). Purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation . Journal of biochemistry and molecular biology. 37(4): 387-393

10. Barkha, S. and Kamendra, S. (2013) .Optimization of culture variables for the production of L- asparaginase from *Pectobacterium carotovorum.* African journal of biotechnology. 12: 6959-6967

11. Basha, N. S., Rekha, R., Komala, M. and Ruby, S. (2009). Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: purification and characterisation. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 8: 353-360.

12. Cornea, C., Lupescu, I., Caraian, T. and Constantinescu, D. (2002). Production of L-asparaginase II by recombinant *Escherichia coli* cells. Roum. Biotechnol. Lett. 7: 717-722.

13. Deokar, V.D., Vetal, M.D. and Lambert, R. (2010). Production of intracellular L-asparginase from *Erwinia caratovora* and its statistical optimization using response surface methodology. *International journalof chemical sciences and Application*. 1:25–26.

14. Dhevendaran, K. and Anithakumari, Y. (2002). L-Asparaginase activity in growing conditions of *Streptomyces* spp. associated with *Therapon jarbua* and *Villorita cyprinoids* of Veli lake, south India. Fishery technology. 39(2):155-159

15. Duval, M., Suciu, S., Ferster, A., Rialland, X. and Lutz, P. (2002). Comparison of *E.coli* – asparaginase with *Erwinia* –asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignance: result of a randomized European organisation for Research and treatment of cancer children's leukemia group phase 3 trial *Blood*. 99 (8): 2734-2739.

16. Ferrara, M. and Severino, N. (2006). Asparginase production by a recombinant *Picha pastoris* strain harbouring *Saccharomyces* ASP3. Enzyme Microb. Tech. 39: 1457 – 1463.

17. Franck, T., Louis, L. and Alain, V. (1999) . Model of bacterial growth influenced by substrate C:N ratio and concentration. Aquatic TIC Microbial Ecology. 19: 105 -118.

18. Hymavathi, M., Sathish, T., Brahmaiah, P. and Prakasham, R. (2010). Impact of carbon and Nitrogen source on L- Asparginase production by Isolated *Bacillus circulans*MTCC8574: Application of saturated Plackett Burman Design. Chem. Biochem. Eng. Q. 24 (4): 473- 480.

19. Ibrahim, Y.E. and Al-saleh, M. A. (2010). Isolation and characterization of *Erwinia herbicola* associated with internal discoloration of tomato fruits (Lycopersicon esculentum Mill) in saudi Arabia. Emir. J. Food Agric. 22 (6): 475-48.

20. Jerlstrom, P.G., Bezjak, D., Jennings, M. and Beacham I. (1989). Structure and expression in *Escherichia coli* K-12 of the L-asparaginase I-coding *ansA* gene and its flanking regions. Gene. 78: 37-46.

21. Kamble, K., Bidwe, P., Muley, V., Kamble, L., Bhadange, D. and Musaddiq, M. (2012) . Characterization of L asparaginase producing bacteria from water, farm and saline soil. Bioscience Discovery. 3:116-119.

22. Kotra, S., prudvi, N., Sad, K. and Mannava, K. (2013). Cost effective process for the production of fungal L-asparaginase from penicillum SPS. isolated from soil sample. Mintage journal of pharmaceutical and medical science. 2 (1): 45-50.

23. Kuldeep, K., Suninda, I., Punia S. and Neelam, V. (2012). Media optimization for the production of anti-leukemic enzyme L Asparaginase from *E. coli* K-12. Annals of Biological Research. 3 (10):4828-4837.

24. Kumar, K., Punia, S. and Neelam, V. (2012). Media optimization for the production of anti-leukemic enzyme L-Asparaginase from *E. coli* K-12. Annals of Biological Research. 3: 4828-4837.

25. Luhana, K., Dave, A. and Patel, K. (2013). Production, purification & characterization of extracellular L-asparaginase (anti cancerous enzyme) from Aspergillus niger. International j. of chemical tech. application. 2:14-25.

26. Moorthy, V., Ramalingam, A., Sumantha, A. and Shankaranaya, R. (2010) . Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. African Journal of Microbiology Research. 4: 1862-1867.

27. Mushtaq, M.S., Sunil, P. and Siddalingeshwara, K. (2012) .Optimization of fermentation conditions for the biosynthesis of L-Asparaginase by *Penicillium sp*. J. Acad. Indus. Res. 1: 180 – 182.

28. Narayana, K., Kumar, K. and Vijayalakshmi, M. (2008). L- asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. Indian Journal of Microbiology. 48(3):331–336

29. Neelima, D., Prachi, C. and Manasi, A. (2014). Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. The Scientific World Journal Volume 2014, Article ID 895167, 6 pages, Hindawi Publishing Corporation.

30. Pieters, R., Hunger, S., Boos, J., Rizzari, C., Silverman, L. and Baruchel, A. (2011). L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. Cancer. 117:238-49.

31. Prista, A., Choli-Papadopoulou, T. and Kyriakidis, D. A. (1998). Studies on the primary structure of L-asparaginase from *Thermus thermophilus*. J. Pro. Chem. 17(6): 548-549.

32. Puangmali, Y. (2002). Isolation and selection of some herbal endophytic bacteria capable of producing L-asparginase. M. SC. Thesis in Biotechnology. Utha University, U.S.A.

33. Ramraj, U., Saxena, A. and Kango, N. (2012). Screening and production of tumour inhibitory L-asparaginase by bacteria Isolated from soil. Asian Journal of pharmaceutical and clinical research. 5: 135-137.

34. Rebecca, C., Caitlin, D., Kwan, J. and Pamela, L. (2010). Assessment of periplasmic enzyme isolation methods: isolating L-Asparaginase from *Escherichia coli* using microwave irradiation. Journal of experimental microbiology and immunology. 14: 1- 6.

35. Renuka, D., Santhi, R., Sheeba, D., Sangeetha, R., Prabisha, T. and Pooja, S. (2012). Isolation, production and partial purification of l-asparaginase from *Serratia marcescens*. International Journal of Recent Scientific Research . 3 (12): 1008- 1012.

36.Richa, J., Zaidi, K., Verma, Y. and Saxena, P. (2012). A promising enzyme for treatment of cute lymphoblastic leukemia . People's Journal of scientific research.5: 29-35.

37. Sangita, G., Murthy, S., Govindasamy, S. and Chandrasekaran, M. (2013). Optimization of L-asparaginase production by *Serratia marcescens* NCIM 2919 under solid state under solid state fermentation using coconut oil cake.Chemical Processes.1:9.

38. Savitri, S., Asthana, N. and Azmi, W. (2003). "Microbial L-asparaginase: a potent antitumour enzyme,"Indian Journal of Biotechnology, 2: 184–194.

39. Srita, D., Aditya, K., Ashutosh ,K. and Wamik, A. (2012). Bench – Scale production of L- Asparaginase from *Erwinia carotrovora* in labrotary Fermenter . International journal of life science and Pharma research, 2: 25- 35.

40. Sunitha, M., Ellaiah ,P. and Bhavani, R. (2010). Screening and optimization of nutrients for L-asparaginase production by *Bacillus cereus* MNTG-7 in SmF by plackett-burmann design. African Journal of Microbiology Research, 4 : 297-303.

41. Tunga, R., Banerjee, R. and Bhattacharya, B. (1999). Some studies on optimization of extraction process for protease for production in S.S.F. Bioproc. Engg. 20: 485-489.

42. Vaibhav, D., Vetal, M. and Rodrigues, L. (2010). Production of intracellular L- Asparaginase from *Erwinia carotrovora* and its statistical optimization using response surface methodology (RSM). International Journal of Chemical Sciences and Applications. 1: 25-36.

43. Warangkar, S. C. and Khobragade, C. N. (2009). Screening , enrichment and media optimization for L- Asparaginase production . Journal of cell and tissue research Vol. 9: 1963-1968.

44. Younes, G., Alireza, E., Sara, A., and Aboozar, K. (2008). An optimized medium for screening of L-Asparaginase production by *Escherichia coli*. American journal of biochemistry and biotechnology, 4: 422-424.

45. Zhao, F. and Yu, J. (2001). L-Asparaginase release from *Escherichia coli* cells with K2HPO4 & Triton X-100. Biotechnology. Prog. 17:490-494.