مجلة جامعة النهرين العلوم المجلد ١٥ العدد(٤) كانون الأول، ٢٠١٢ ص ٤٣-٥٢

تنقية وتوصيف انزيم Asparaginase من *Proteus vulgaris*

لميس محمد رياض عباس
قسم التقنيات الإحيائية ، كلية العلوم ، جامعة بغداد.

الخلاصة

استخلص انزيم Asparaginase من بكتريا Proteus vulgaris واجريت عملية التنقية الجزئية للانزيم وبخطوات عدة شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم وبنسب اشباع مختلفة. بينت النتائج ان افضل نسبة اشباع كانت 80% اذ بلغت الفعالية النوعية 0.86 وحدة/ ملغرام بروتين، ثم تلتها التنقية باستخدام عمود المبادل الآيوني DEAE-Cellulos، وكانت الفعالية النوعية2.7 وحدة/ ملغرام بروتين، ثم خطوة الترشيح الهلامي باستخدام هلام السيفادكس G-200 وقد بلغت الفعالية النوعية للانزيم المنقى 6 وحدة / ملغرام بروتين. اظهرت نتائج توصيف الانزيم ان الرقم الهيدروجيني الامثل ودرجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم 7.5،37مْ على التوالي والرقم الهيدروجيني الامثل للثبات بين 7.5-8.5. قدرت طاقة التنشيط (Ea) لتحويل المادة الاساس الى ناتج بفعل الانزيم بحوالي 6825 سعرة/ مول و وجد ان الثبات الحراري للانزيم يتراوح بين 20–37مْ. اظهر الانزيم تخصص مطلق تجاه مادة التفاعل Asparagine، تم تقدير قيمة ثابت ميكالس (km) والسرعة القصوى Vmax للانزيم با ستخدام الاسباراجين كمادة تفاعل، قدرت قيمة ميكالس مينتن بحدود 2.85×10^{-3} مولار و السرعة القصوى بـ 0.25×10^{-3}مولار/ دقيقة. جرى اختبار تأثير بعض الأملاح اللاعضوية وبعض العوامل المختزلة والكلابية على فعالية الانزيم، اوضحت النتائج عدم تاثر الانزيم بصورة معنوية بكلوريد الصوديوم والبوتاسيوم وابدى تحمل نسبي لكلوريد الكالسيوم و المغنيسيوم واحتفظ بكامل فعاليته عند حضنه مع كبريتات الحديد والمركب الكلابي EDTA، لوحظ انخفاض في فعالية الانزيم عند معاملته بـ 2-mercaptoethanol و Cystien بنسبة 16,13% على التوالي عند التركيز 10 ملي مولاراما كلوريد النحاس ادى الى تثبيط كلي لفعالية الانزيم.

مفتاح الكلمات: الاسباراجينيز، تنقية، توصيف، انتاج.

المقدمة

ينتمي انزيم الاسباراجينيز Asparaginase (Asparagine amidohydrolase; E.C.3.5.11) الى مجموعة انزيمات التحلل المائي، يعمل هذا الانزيم في وجود الماء على تحليل الحامض الاميني Asparagine الى حامض الاسبارتك Aspartic acid و Amonia. يوجد انزيم الاسباراجينيز في انسجة العديد من الحيوانات، النباتات وبعض القوارض وفي البكتريا، وتعد هذه الاخيرة المصدر الاساسي للانزيم [1].

هناك العديد من الاحياء المجهرية تنتج انزيم الاسباراجنيز مثل بكتريا *Erwinia chrysanthemi* [2]، وبكتريا *E.coli* [3]، بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* [4]، وبكتريا *Thermus thermophilus* [5] وبكتريا *Proteus vulgaris* [6]، بكتريا *S.aureus* [7] *Bacillus subtilis*[8].

ويقع الانزيم إما داخل الخليةintracellular enzyme او يفرز خارج الخلية extracellular enzyme و يعتمد ذلك على طبيعة الكائن المجهري. وجد ان افراز انزيم الاسباراجينيز يكون داخلي ضمن الفراغ البيريبلازمي Periplasmic space بالنسبة لخلايا *Erwinia aroideae* [9] وضمن السايتوبلازم (Cytoplasmic enzyme) في *Cutrobacter* [10]، ومن جهة اخرى فقد اوضح [11] ان افراز انزيم الاسباراجنيز في بعض انواع الفطريات والبكتريا والخمائر يتم الى خارج الخلية، ففي العديد من الانواع التابعة للجنسين *Streptomyces* و *Nocardia* يكون فيها الافراز خارج خلوي كذلك بالنسبة للخميرة *Candida utilis* والفطر *Penicillium claviforme* و الانواع التابعة للجنس *Fusarium* [12]، وفطر *Aspergillus terreus* [13] بينما لوحظ عدم وجود الانزيم في الانسان [1].

يمتلك انزيم الاسباراجنيز دور مهم في علاج مرض السرطان في الانسان بشكل اساسي في علاج مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد Acute lymphoblastic leukemia (ALL) [14] ومرض reticlesarcoma، و mphosarcoma و melanosarcoma ايضا في علاج Hodgkin disease، ان دور انزيم الاسباراجينيز في علاج الخلايا اللمفية السرطانية يعتمد على حقيقة ان هذه الخلايا لا تمتلك القدرة على بناء Asparagine و تعتمد على مصادر خارجية للحصول على هذا الحامض الاميني، على العكس من ذلك فان الخلايا الطبيعية قادرة على تخليق هذا الحامض الاميني [15].

وردت عدة طرائق لاستخلاص انزيم الاسباراجينيز سواء كان ذلك من خلايا الاحياء المجهرية او الانسجة الحيوانية فقد استخدمت طريقة التحليل باستخدام الموجات الصوتية الفائقة sonifcation لاستخلاص الانزيم من العديد من المصادر الميكروبية مثل خلايا *E.coli* [16]، وبكتريا *Proteus vulgaris*[6] وخلايا *Corynebacterium glutamicum* [17]، واستخدمت طريقة التجنيس (Homogenization) بوجود الكحول الاثيلي لاستخلاص الانزيم من خلايا *E.coli* [18] و كذلك من الخلايا الكبدية لخنزير غينيا في محلول ملحي متعادل [19]. ونظرا للاهمية العلاجية لانزيم الاسباراجينيز وللاهتمام البالغ الذي يوليه له مختلف المراكز البحثية، فقد هدف هذا البحث الى استخلاص و تنقية الانزيم من بكتريا *Proteus vulgaris* ودراسة صفاته الكيموحيوية.

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على بكتريا *Proteus vulgaris* المشخصة من مركز بحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين.

تم تنشيط البكتريا بتحضير اللقاح بنقل ملئ عروة الناقل من العزلة البكترية الى دورق يحتوي 100 مللتر nutrient broth وتم الحضن في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/ دقيقة بدرجة حرارة 30مْ لمدة 20ساعة. تم انتاج الانزيم بتلقيح وسط الانتاج بنسبة 10% من اللقاح (الوسط مكون من nutrient broth الحاوي 3% من مستخلص corn steep liquer والمعامل كما موصوف في [6])، عدل الرقم الهيدروجيني للوسط الى 7 وعقم بالموصدة قبل اجراء عملية التلقيح ثم حضن الوسط في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/ دقيقة بدرجة حرارة 30مْ لمدة 20 ساعة. نبذت الخلايا البكتيرية النامية بعد فترة الحضن بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة اهمل الراشح وغسل الراسب الذي يمثل الخلايا البكتيرية مرتين بمحلول 0.9% saline solution علق راسب الخلايا في 50 مللتر ماء مقطر. عرض عالق الخلايا الى جهاز التكسير بالامواج الصوتية الفائقة لتكسير الخلايا وشغل الجهاز بطاقته القصوى بتسليط 10 ذبذبة/ ثانية مدة 20 دقيقة في حمام ثلجي 4مْ كررت هذه العملية 5 مرات مع اوقات توقف مدة 1 الى 2 دقيقة لتلافي ارتفاع درجة حرارة المزيج عن 4مْ، نبذ عالق الخلايا المتكسرة بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 10000 دورة/ دقيقة و بدرجة حرارة 4مْ لمدة 15 دقيقة، اخذ الرائق الذي يمثل الانزيم الخام واهمل الراسب [6].

قياس فعالية الانزيم

تم تقدير فعالية الانزيم بمزج 0.5 مللتر من 0.08 مولار L-asparagine و 1 مللتر من 0.05 مولار Tris-base ذي الرقم الهيدروجيني8.4 مع0.5 مللتر من النموذج الانزيمي، حضن مزيج التفاعل في حمام مائي 37مْ لمدة 15 دقيقة بعد انقضاء مدة الحضن (زمن التفاعل) تم ايقاف التفاعل باضافة 0.5 مللترمن 15% Trichloro acetic acid، تم نبذ العينة مركزيا بسرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة بدرجة 4مْ اهمل الراسب ثم نقل الرائق الى انبوبة اختبار ليتم تقدير محتواه من الامونيا بطريقة النسلرة المباشرة [20]. تعرف الوحدة الانزيمية IU هي كمية الانزيم التي تحرر 1 مايكرومول من الامونيا خلال دقيقة واحدة ضمن ظروف التجربة [6].

حسبت فعالية الانزيم (وحدة/مللتر) وفق المعادلة[21]

$$\text{الفعالية (وحدة/ مللتر)} = \frac{\text{تركيز الامونيا المتحررة (مايكروغرام/ مللتر)}}{\text{زمن التفاعل (دقيقة)} \times 14}$$

قدر تركيز البروتين وفق طريقة برادفورد [22].

تنقية الانزيم

استخدمت خطوات عدة لتنقية الانزيم المستخلص شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم استعملت نسب اشباع مختلفة (100,80,60,40,20)% من كبريتات الامونيوم اذ اختبرت هذه النسب المختلفة كلا على حدة لحين الحصول على نسبة اشباع الافضل، اذيب الراسب من مختلف نسب الاشباع كل على حدة في اقل حجم من دارئ الترس بتركيز 0.05 مولار ذي رقم هيدروجيني 8.4 و جرت عملية الديلزة حيال عدة تبديلات من محلول دارئ الترس لمدة 24 ساعة، قدرت الفعالية الانزيمية و تركيز البروتين في النموذج لكل نسب الاشباع و حفظ النموذج الذي اعطى اعلى فعالية بدرجة −20مْ لحين اجراء خطوات عملية التنقية الاخرى. تلتها خطوة كروماتوغرافيا التبادل الايوني حضر المبادل الايوني ثنائي اثيل امينواثيل سللوز DEAE-cellulose بناءا على الطريقة الموصوفة من قبل [23]، بابعاد (2.5×17) سم وتمت موازنته بمحلول دارئ الترس 0.05 مولار ذي الرقم الهيدروجيني 8.2، تم الاسترداد بمحلول الدارئ نفسه بتدرج ملحي من NaCL (0-1) مولار وسرعة جريان 30 مللتر/ ساعة وبواقع 3 مللتر/جزء.

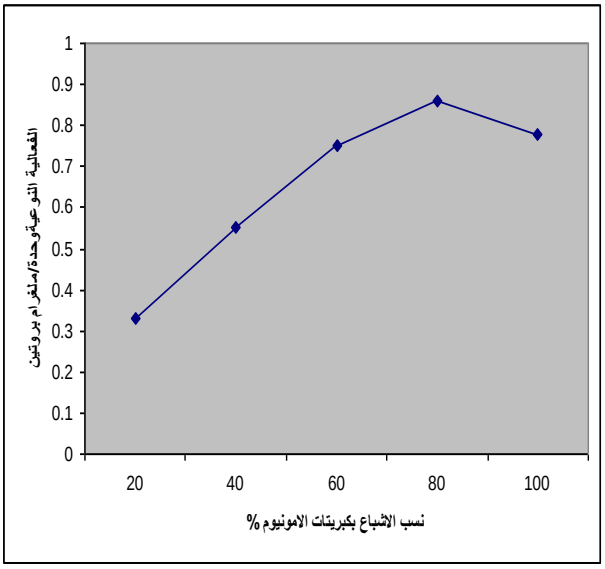
اجري الترشيح الهلامي للاجزاء الفعالة المنفصلة من عمود DEAE-cellulose بعد تركيزها بالسكروز، مرر عبر عمود السيفادكس G-200 الذي حضر باتباع تعليمات الشركة المجهزة Pharmacia fine chemical بابعاد (1.5×38) سم، تمت الموازنة بمحلول دارئ الترس 0.05مولار ذي الرقم الهيدروجيني 8.2 مولار وسرعة جريان 30 مللتر/ ساعة و بواقع 3 مللتر/جزء.

توصيف انزيم الاسباراجنيز

اتبعت التجارب الموصوفة من قبل مقران [21] في توصيف الانزيم والتي شملت دراسة الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبوتية الانزيم ، تاثير درجة الحرارة على فعالية الانزيم وتقدير طاقة التنشيط، الثبات الحراري، تقديرالثوابت الحركية، تاثير بعض المواد والعوامل المختزلة والكلابية في فعالية الانزيم.

النتائج و المناقشة

استخلص انزيم الاسباراجنيز من خلايا بكتريا *Proteus vulgaris* باستعمال جهاز الذبذبات الصوتية الفائقة كانت الفعالية النوعية للانزيم الخام 0.54 وحدة/ ملغرام بروتين (جدول1)



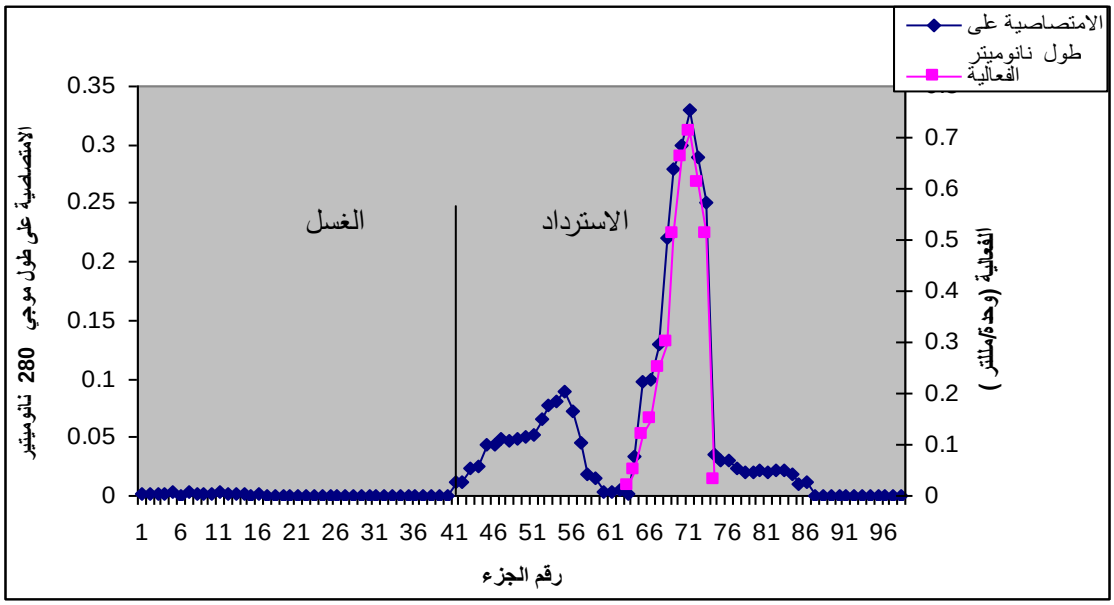
الشكل (1) ترسيب انزيم الاسباراجنيزالمنتج من بكتريا *Proteus vulgaris* باستخدام كبريتات الامونيوم.

اظهرت نتائج عملية الترسيب باستعمال كبريتات الامونيوم بان افضل نسب الاشباع كانت 80% (شكل1). اذ اعطى اعلى فعالية نوعية بلغت 0.86 وحدة/ ملغرام بروتين (جدول 1). في دراسة اخرى [24] فقد استعمل نسبة اشباع 55% وحصل على فعالية نوعية 4.2 وحدة/ ملغرام بروتين، في حين استعمل الباحث [4] كبريتات الامونيوم في ترسيب انزيم الاسباراجنيز المنتج من *Pseudomonas aeruginosa* بنسبة اشباع 80% وقد حصل على فعالية نوعية 93.7 وحدة/ ملغرام بروتين. ان فعالية الانزيم الناتج يعتمد على اختلاف العزلة البكتيرية و الوسط الزرعي المستعمل في انتاج الانزيم [20].

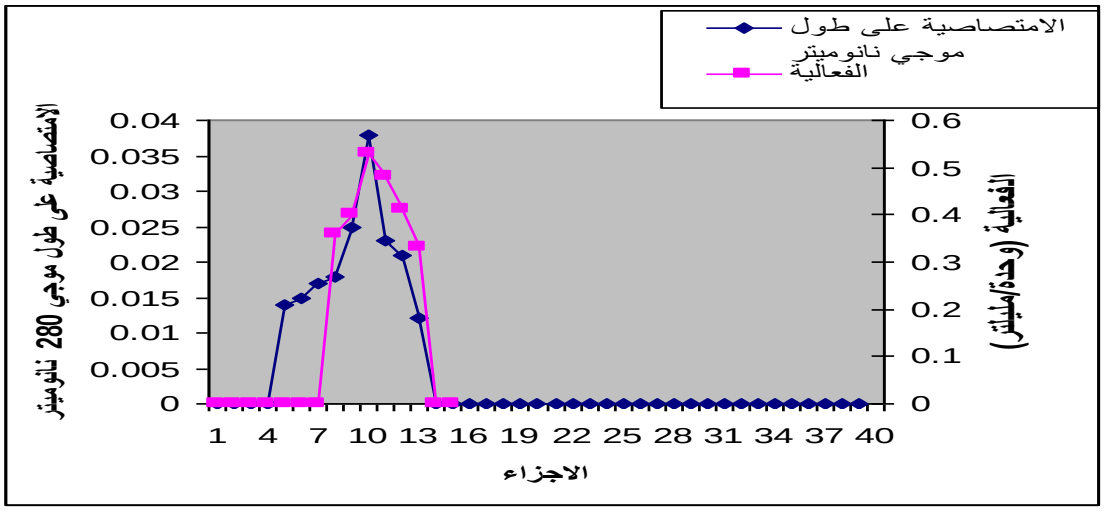
تبين نتائج التنقية بعمود كروماتوغرافي التبادل الايوني (شكل 2) ظهور قمتين بروتينية عند استرداد البروتينات المرتبطة باستعمال محلول كلوريد الصوديوم مع ظهور الفعالية الانزيمية عند الاجزاء المستردة للقمة (69-73) مما يدل ان انزيم الاسباراجنيز المنتج يحمل محصلة شحنة سالبة معاكسة شحنة المبادل الايوني ساعدت في ارتباطه بالمجاميع الموجبة التي يمتلكها المبادل الايوني. جمعت

الاجزاء التي تمتلك فعالية انزيمية و ركزت وبلغت الفعالية النوعية 2.7 وحدة/ملغرام بروتين وبعدد مرات تنقية 5 مرة وحصيلة انزيمية مقدارها 41.3% (جدول 1).

مرر المحلول الناتج من خطوة المبادل الايوني بعد تركيزه في عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-200 ولوحظ وجود قمة للبروتين عند قياسها على طول موجي 280 نانوميتر تمتلك فعالية انزيمية تركزت في الاجزاء (8-13) (شكل3) و التي تم جمعها و تركيزها، وكانت الفعالية النوعية لها 6 وحدة/ ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية 11.1 مرة وحصيلة انزيمية 20.5%. في دراسة اجراها الباحث مقران [21] لانتاج انزيم الاسباراجنيز من العزلة المحلية *E.coli* استعمل عمود Sephadex G-200 في خطوة الترشيح الهلامي حيث حصل على فعالية نوعية لانزيم الاسباراجنيز 22.68 وحدة/ ملغرام بروتين وبعدد مرات تنقية 10.21 مرة وحصيلة انزيمية 43.83 %.



الشكل (2) كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقيةالاسباراجنيز المستخلص من بكتريا *Proteus vulgaris* باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-cellulose (2.5×17) سم الذي تمت موازنته بمحلول دارئ الترس 0.05مولار ورقم هيدروجيني 8.2، ثم الاسترداد بمحلول الدارئ نفسه مع تدرج ملح كلوريد الصوديوم من 0-1 مولار وبسرعة جريان30 مليلتر/ساعة (حجم الجزء 3 مليلتر).



الشكل (3) الترشيح الهلامي لتنقيةالاسباراجينيز المستخلص من بكتريا Proteus vulgaris باستعمال عمود هلام Sephadex G-200 (1.5×38) سم الذي تمت موازنته بمحلول دارئ الترس 0.05مولار ورقم هيدروجيني 8.2 وبسرعة جريان 30 مليلتر/ساعة (حجم الجزء 3 مليلتر).

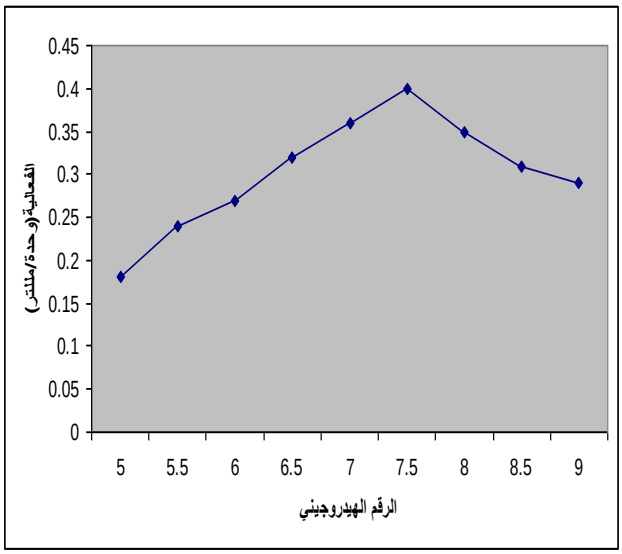
الجدول (1)

مراحل تنقية الاسباراجينيز من بكتريا *Proteus vulgaris*.

خطوة التنقية	الحجم (ملتر)	الفعالية الأنزيمية وحدة/ مل	تركيز البروتين ملغم/ ملتر	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغرام بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الأنزيمية (%)
المستخلص الأنزيمي الخام	25	0.928	1.7	0.54	23.2	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم (80 %)	18	0.89	1.03	0.86	16.2	1.6	69.8
كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام DEAE Cellulose	15	0.64	0.12	2.7	9.6	5	41.3
الترشيح الهلامي باستخدام-Sephadex G 200	10	0.48	0.08	6	2.88	11.1	20.5

توصيف الانزيم

اظهرت النتائج ان اعلى فعالية انزيمية كانت عند الرقم الهيدروجيني 7.5(شكل 4) قدرت بـ 0.4 وحدة/ مللتر و تبدا الفعالية الانزيمية بالانخفاض عند قيم الرقم الهيدروجيني التي تقع على جانبي الرقم الهيدروجيني الامثل، كذلك يتضح ان الانزيم يميل للعمل بشكل افضل عند القيم المتعادلة و القريبة من التعادل للرقم الهيدروجيني الامثل، ان معظم الدراسات التي تناولت تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل للاسباراجنيز من مصادر مجهرية مختلفة اشارت الى انه يقع ضمن الحدود القاعدية، اذ سجل الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الاسباراجنيز المنقى من بكتريا *Erwinia aroidea* مدى يتراوح بين 7-9 ويفقد الفعالية عند 4.5 [25]، وفي دراسة اخرى على انزيم الاسباراجنيز المنقى من بكتريا *E.coli* اوضحت النتائج ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم عند الرقم الهيدروجيني 7.5 [26].

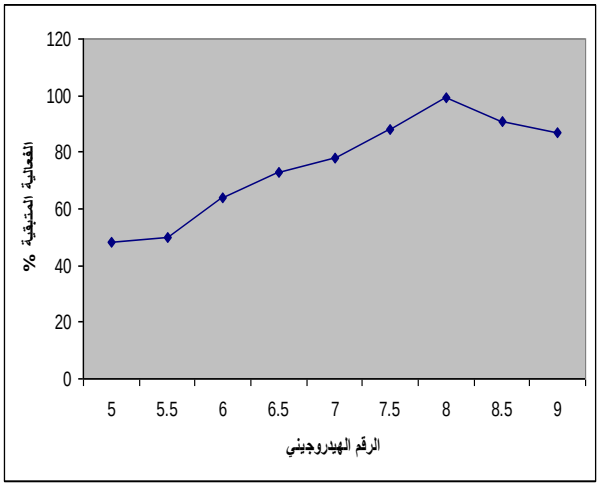


الشكل (4) تاثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الاسباراجينيز المنقى من بكتريا *Proteus vulgaris*.

يمتلك الانزيم ثباتا تجاه الرقم الهيدروجيني بين 7.5-8.5 (شكل 5) مع ملاحظة ان اعلى قيمة للثبات كانت عند الرقم الهيدروجيني 8 في حين يبقى الانزيم محتفظ بـ 48% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 5.

هناك بعض الدراسات التي تناولت الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الاسباراجنيز المنتج من اجناس بكتيرية اخرى، فالرقم الهيدروجيني 8 يعد الامثل لثبات فعالية الاسباراجينيز المنتج من بكتريا *E.coli* [21]، في حين اشارت دراسة اخرى على انزيم الاسباراجنيز المنقى من العزلة المحلية

Serratia marcescens ان الانزيم يحتفظ باكثر من 75% من الفعالية عند مدى ارقام هيدروجنية تتراوح بين 6-10 [24].



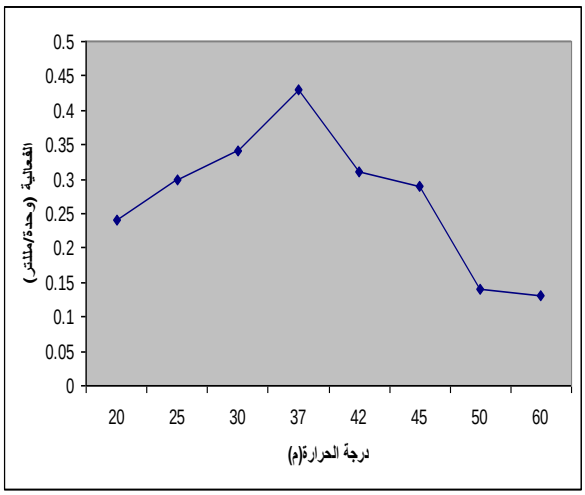
الشكل (5) تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الاسباراجينيز المنقى من بكتريا *Proteus vulgaris*.

عند تحديد درجة الحرارة المثلى للفعالية، لوحظ ارتفاع تدريجي في قيم الفعالية الانزيمية بارتفاع درجة الحرارة الى ان تبلغ اقصاها 0.43 وحدة/ مللتر عند 37مْ ثم تاخذ بالانخفاض بشكل تدريجي بارتفاع درجة الحرارة عن هذا الحد (شكل 6).

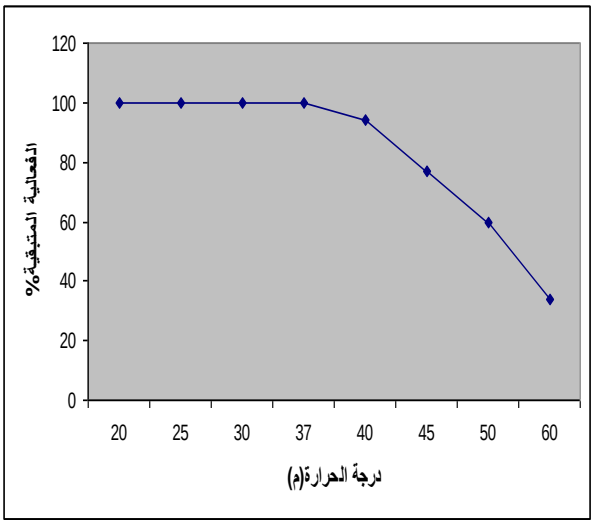
تتفق النتائج المحصل عليها مع ما اشارت اليه العديد من الدراسات التي تناولت تاثير درجة الحرارة المثلى في فعالية انزيم الاسباراجنيز، اذ وجد ان درجة الحرارة المثلى التي اعطت اقصى فعالية للانزيم المنقى من خلايا بكتريا *E.coli* هي 37مْ [21]. كذلك تم حساب طاقة التنشيط (Ea) لتحويل المادة الاساس الى ناتج بفعل الانزيم وقد قدرت قيمة طاقة التنشيط بحوالي 6825 سعرة/ مول، ان طاقة التنشيط للتفاعلات الكيميائية بضمنها التفاعلات الانزيمية تتراوح بين 6000-15000 سعرة/ مول. وللانزيمات دور مهم في خفض طاقة التنشيط، لذلك فان سرعة التفاعلات الانزيمية تكون اعلى من سرعة التفاعلات غير الانزيمية، وكلما كانت طاقة التنشيط قليلة كان الانزيم ذا قدرة عالية على تحويل المادة الاساس الى ناتج وكان التفاعل اسرع [27].

اشارت نتائج هذه الدراسة الى ان الانزيم احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارية محصورة بين (20-37)مْ لمدة 30 دقيقة (شكل 7) و بعد ذلك تبدا الفعالية الانزيمية بالتناقص بشكل سريع الى ان تبلغ ادناها عند 60مْ حيث يفقد الانزيم عند هذه النقطة حوالي 66% من فعاليته الاصلية ويبقى الانزيم محتفظ بحوالي 60,77,94% من فعاليته االاصلية عند درجات الحرارة 50,45,40مْ.

لقد اثبتت الدراسات الاخرى ان فعالية انزيم الاسباراجنيز المنقى من خلايا *Serratia marcescens* ATCC60 له ثبات حراري ضمن المدى 52-62مْ لمدة 30 دقيقة وعند 72مْ يفقد الانزيم فعاليته كليا [28]. واشارت دراسة اخرى الى ان الانزيم احتفظ بكامل فعاليته 100% بحضنه عند درجات الحرارة المحصورة بين25-40مْ عند حضن الانزيم لمدة ساعة [24].



الشكل (6) تأثير درجات الحرارة على فعالية الاسباراجينيزالمنقى من بكتريا *Proteus vulgaris*.

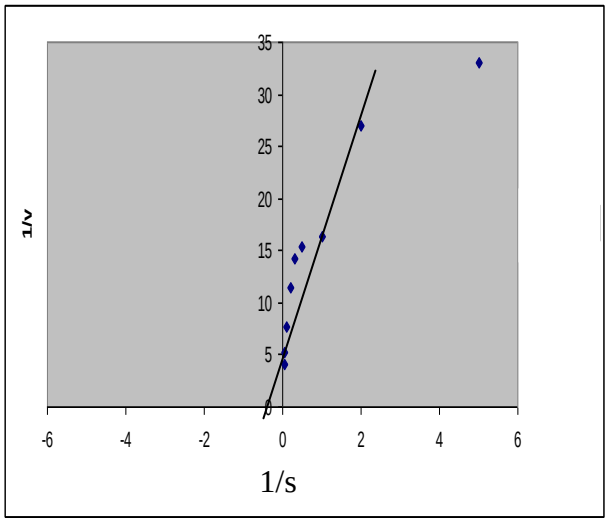


الشكل(7) الثبات الحراري للاسباراجنيز (المنقى) المستخلص من بكتريا *Proteus vulgaris*.

اجريت دراسة مدى تخصص انزيم الاسباراجنيز المنقى من خلايا العزلة المحلية *Proteus vulgaris*، اختيرت عدة مواد شملت الاسباراجين و حامض الاسبارتيك و حامض الكلوتاميك و بتركيز 0.1 و1 ملي مولار لكل منها. تشير النتائج المحصل عليها الى عدم قدرة انزيم الاسباراجنيز قيد الدراسة على تحليل اي من الحامضين الكلوتاميك اوالاسبارتك وعند كلا التركيزين حيث كانت الفعالية صفر. تدل هذه النتائج على وجود تخصص عال جدا لانزيم الاسباراجنيز تجاه الحامض الاميني الاسباراجين مقارنة ببقية الاحماض الامينية قيد الدراسة. تتفق النتائج المحصل عليها مع ما ورد في الدراسة التي قام بها الباحث[21].

بصورة عامة تختلف انزيمات الاسباراجينيز المنتجة من مصادر مختلفة في مدى تخصصها تجاه مادة التفاعل، وقد يعزى تخصص الانزيم تجاه مواد تفاعل معينة الى التخصص الفراغي ثلاثي الابعاد لارتباط مادة التفاعل في الموقع الفعال للانزيم، حيث يجب ان يكون الارتباط في هيئة معينة تضمن للانزيم القيام بالفعل الحفزي. لقد اشارت احدى الدراسا ت الى شرط وجود مجموعة كربوكسيل حرة في مادة التفاعل حتى يتمكن انزيم الاسباراجينيز المنتج من *E.carotovora* من تحليلها مائيا، كما ان مجموعة الفا-امينو ليست ضرورية لحدوث التفاعل غير ان وجودها و بالترتيب الملائم مع مجموعة الكربوكسيل يؤدي الى زيادة ثبات معقد (الانزيم – مادة التفاعل) وذلك في الاحماض الامينية التي تدير الضوء المستقطب جهة اليسار فقط (L-configuration) و هذا ما قد يعكس ضعف قدرة هذا الانزيم الى تحليل كل من D-asparagine,D-glutamine [29].

تم تقدير قيمة ثابت ميكالس (km) والسرعة القصوى Vmax لانزيم الاسباراجينيزالمنقمن خلايا العزلة المحلية *Proteus vulgaris* باستعمال الحمض الاميني L-asparagine كمادة تفاعل وحسب طريقة لاينوفير– بيرك Line weaver–Burk reciprocal plot برسم العلاقة بين مقلوب سرعة التفاعل 1/v ومقلوب تركيز المادة الاساس 1/s(شكل رقم 8). حيث قدرت قيمة ميكالس مينتن بحدود 2.85×10^{-3} مولار و السرعة القصوى بـ 0.25×10^{-3}مولار/ دقيقة.



الشكل(8) الثوابت الحركية لأنزيم الأسباراجنيز المنقى جزئيا من بكتريا *Proteus vulgaris* تجاه الحامض الأميني L-asparagine حسب طريقة Lineweaver – Burk plot.

تدل قيمة ثابت ميكالس مينتن المستخرجة ان الانزيم قيد الدراسة له الفة عالية تجاه مادة التفاعل، وان قيم km الواطئة لمادة اساس معينة تعكس الفة الانزيم العالية تجاهها[30].

تم دراسة تاثير بعض المركبات و المتمثلة في عدد من الاملاح اللاعضوية فضلا عن بعض العوامل المختزلة و الكلابية و بتراكيز مختلفةعلى فعالية انزيم الاسباراجينيز المنقى من خلايا *Proteus vulgaris*، الاملاح اللاعضوية التي شملتها هذه الدراسة تمثلت في كلوريد الكالسيوم، كلوريد المغنيسيوم، كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم و كبريتات الحديد و كبريتات النحاس وبتراكيز 1و10 ملي مولار.

تشيرالنتائج المبينة في جدول (2). الى عدم تاثر الانزيم باي من كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم حيث بقي الانزيم محتفظ بحوالي 90,95.53% من فعاليته الاصلية عند التركيز 10 ملي مولار، وعند معاملة الانزيم بكلوريد الكالسيوم كانت الفعالية الانزيمية المتبقية 95% من فعاليته النسبية عند التركيز 1 ملي مولار. وادت ايونات الحديد الى احتفاظ الانزيم تقريبا بكامل فعاليته اذ احتفظ الانزيم 99 و99.8% من فعاليته عند التراكيز1,10 ملي مولار.

لوحظ انخفاض فعالية الانزيم عند معاملته بايونات النحاس الذي ادى الى تثبيط كلي لفعالية الانزيم، في حين

ادت ايونات المغنيسيوم الى فقدان 30% من فعالية الانزيم عند التركيز 10ملي مولار.

تشير الابحاث السابقة الى اختلاف حساسية الانزيم تجاه الاملاح اللاعضوية باختلاف مصدره، فقد اشار [31] الى كون معظم الايونات الموجبة مثل المغنيسيوم غير ضرورية لفعالية انزيم الاسباراجنيزالمنتج من خلايا *E.coli*. في حين اشارت دراسة اخرى الى ان الايونات الموجبة احادية التكافؤ مثل الصوديوم+Na تعمل بصورة عامة على زيادة الفعالية للعديد من الانزيمات وفي حالة انزيم الاسباراجنيز فان مثل هذا التاثير لم يلاحظ سوى من الانزيم المنتج من كل من *B.coagulans* و *B.kaustophilus*، وقد يعزى التاثير الملاحظ لهذه الايونات على الفعالية الى الدور الذي تلعبه في الحفاظ على البنية الفراغية الملائمة لاحداث التاثير الحفزي للانزيم، كذلك لوحظ وفي العديد من الدراسات ان غياب بعض الايونات يؤدي الى تفكك الانزيم الى الوحدات المكونة له و بالتالي فقدان الفعالية [32]. و لوحظ في العديد من الدراسات ان فعالية انزيم الاسباراجنيز ينخفض بشكل ملحوظ بزيادة القوة الايونية وخاصة مع ايونات المغنيسيوم [33].

جدول (2)

تأثير بعض الأملاح في فعالية إنزيم الأسباراجينيز المنقى من *Proteus vulgaris*.

المادة	التركيز (ملي مولار)	الفعالية المتبقية%
كلوريد الكالسيوم	1	95
	10	71.85
كلوريد المغنيسيوم	1	83
	10	70
كلوريد الصوديوم	1	97.48
	10	95.53
كبريتات النحاس	1	0
	10	0
كبريتات الحديد	1	99.8
	10	99
كلوريد البوتاسيوم	1	91.3
	10	90

لم تتاثر فعالية انزيم الاسباراجينيز المنقى جزئيا عند خزنه مع العوامل الكلابية مثل اثلين ثنائي امين رباعي حامض الخليك EDTA بتركيز 10,1 ملي مولار وهذا دليل على انه ليس من الانزيمات الفلزية التي تحتاج الى وجود فلزات معينة في فعاليتها، وعندما عومل الانزيم بـ 2- مركبتوايثانول 2-mercaptoethanol بالتراكيز 10,1 مولار لوحظ فقدان 87,75 % على التوالي من الفعالية الانزيمية (جدول 3).

كذلك لوحظ انخفاض الفعالية الانزيمية عند معاملة الانزيم بـ السيستا يين حيث لوحظ يفقد حوالي 84% من فعاليته الاصلية عند التركيز 10 ملي مولار. ويعمل السيستايين على اختزال الاواصر ثنائية الكبريت في جزيئة الانزيم.

جاءت هذه النتائج مطابقة لما حصل عليه مقران [21]، اذ ادى المركب 2- مركبتوايثانول بتركيز 4,2,1,0.5 ملي مولار الى خفظ فعالية الاسباراجين المنقى من خلايا *E.coli* 13.93% اما المركب الكلابي EDTA بتركيز 4 ملي مولارفلم يؤثر على فعالية الانزيم اذ يبقى محتفظ بـ 98% من فعاليته، في حين مركب السيستاين ادى الى خفض الفعالية الانزيمية للانزيم حيث بقي الانزيم محتفظ بـ 55.73% من فعالية عند معاملته بالسيستايين بتركيز 4 ملي مولار.

جدول (٣)

تأثير بعض العوامل المختزلة و الكلابية في فعالية إنزيم الأسباراجينيز المنقى من بكتريا *Proteus vulgaris*.

المادة	التركيز (ملي مولار)	الفعالية المتبقية %
معاملة سيطرة	–	100
2- mercapto ethanol	1	25
	10	13
EDTA	1	100
	10	100
Cystein	1	96
	10	16

Reference

[1] Cornea, C.P.; Lupescu I.; Vatafu, I.; Caraiani, T.; Savoiu, V.G.; Campe anu, G.H.; Grebenisan, I.; Negulescu, G.H.P. and Constantinescu, D. "Production of L-

asparaginaseII by recombinant *Escherichia coli* cells". Roum. Biotechnol. Lett. 7(3): 717-722, 2002.

[2] Kotzia, G.A. an N. E.Labrou, "L-asparaginase from *Erwinia chrysanthem* 3937: cloning expression and characterization". J. Biotechnol., 127:657-669, 2007.

[3] Khushoo, A., Y.Pal, B.N. Singh and K. J. Mukherjee, "Extracellular expression and single steppurfcation of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginaseII". Protein expression purification., 38:29-36, 2004.

[4] El-Bessoumy, A., A.; Sarhan,M.; Mansour, J., "Production Isolation, and Purfcation of L-asparaginas from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation" .Biochem Mole. Biol.37 (4): 387-393, 2004.

[5] Prista, A. A. and Kyriakidis, D. A.. "L-asparaginase of *Thermus themophilus* : Purification, identification of essential amino acids for its catalytic activity". Mol. Cell Biochem. 216(1-2):93-101, 2001.

[6] Tosa, T.; Sano, R.; Yamamato, K.; Nakamura, M.; Ando, K, and Chibata, I." L-asparaginase from *Proteus vulgaris*". Appl. Microbiol. 22 (3): 387-392 , 1971.

[7] Muley, R. G., Sarker, S., Ambedkar, S. and Nail, S. R "Influence of alkali treated corn steep liquor containing mediumon protein production by *Staphylococcus aureus*". *Folia Microbiology*, 43, 31-4.,1998.

[8] Fisher, S.H. and Lewis, V.W.Jr.. "*Bacillus subtilis.* 168 contans tow differentially regulated genes encoding L-asparaginase". J.Bact. 184 (8): 2148 – 2154, 2002.

[9] Liu, F.S. and Zajic, J.E.. "Purification and properties of L- sparaginase of *Erwinia aroideae*" a.Can. J. Microbiol. 18: 1953-1957, 1972.

[10] Bascomb, S.; Banks, G.T.; Skarstedt, M. T.; Fleming, A.; Bettelheim, K.A. and Connors, T.A."The properties and large-scale production of L-asparaginase from Citrobacter". J. gen. icrobiol. 91:1-16, 1975.

[11] Arima, K.; Sakamoto, T.; Araki, C. and Tamura, G. Production of extracellular L-. asparaginases by microorganisms. Agric. Biol. Chem. 36:356-361, 1972.

[12]Imada, A.; Igarasi, S.; Nakahama, K. and Isono, M.. "Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms". J. Gen Microbiol. 76:85-99, 1973.

[13] Baskar,G.; Renganathan, S.,. "Statistical screening of process variable for the production of L-asparaginase from corn flour by Aspergillus terreus MTCC 1782 in submerge dfermentation" .Indian 2(5):45-48, 2009.

[14] Verma, N. *etal*. "L-sparaginase apromising chemotherapeutic agent" .Critl. Rev. Biotechnol. 27(1):45-62, 2007 .

[15] Duval, M., S.Suciu, A.Festor, X .Rialland and B.Nelken *etal.*, "comparision of *Escherichia coli* asparaginase with *Erwinia*- asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignoncis .Results of a randomized European organization for research and treatment of cancer-children,s Leukemia groub phase "3 trial. Blood, 94:2734-2739, 2002.

[16] Bilimoria, M.H. "Conditions for production of L-asparaginase 2 by coli form bacteria". App. Microbiol. 18 (6): 1025-1030, 1969.

[17] Mesas, J.M.; Gil, J.A. and Martin, J.F. "Characterization and partial purification of L-asparaginase from *orynebacterium glutamicum"*. J. Gen. Microbiol. 136: 515-519, 1990.

[18] Roberts, J.; Burson, G. and Hill, J.M. "New procedures for purification of L-asparaginase with high yield from *Escherichia coli*." J. Bact. 95(6): 2117-2123, 1968.

[19] Rogez, J.C.; Plaquet, R. and Biserte,G. "Guinea pig liver L- asparaginase: separation, purification, and intracellular localization of two distinct enzymatic activities". Biochem. Bioph. Acta. 410: 370-381., 1975.

Boeck,L.D. and Squires, R.W.."Crystalline L-asparaginase from *Escherichia coli* B. Purification and chemical characterization". J. Biol. Chem. 245:3708-3715, 1970.

[32] Al-Selami, A.A. (1972). "Purification and properties of L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1) from *Bacillus kaustophilus*". Ph.D. Thesis. Utah State University.

[33] Dunlop, P.C.; Meyer, G.M.; Ban, D. And Roon, R.J. "Characterization of two form of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Biol.Chem. 253(4): 1297-1304**,** 1978.

Abstract

The enzyme was extracted from *Proteus vulgari*s and partially purified by many steps including precipitation with ammonium sulfate by using different saturation percentages; the optimum percent was 80% gave value of specific activity 0.86 U/mg protien. then ion exchange chromatography by DEAE-cellulose column, the specific activity 2.7 U/mg protien, and gel filtration using Sephadex G-200 column specific activity 6U/mg protein

. Characterization showed that the optimum pH and temperature for enzyme activity 7.5,37◌̊C respectively, and the optimum pH for enzyme stability between 7.5-8.5and the value of activation energy for conversion substrate to product 6825 Cal/mole. The enzyme stable between 20-37◌̊C. the enzyme has an absolute specificity toward Asparagine. The kinetic constants were determined, Km $2.85\times10^{3-}$M and Vmax $0.25\times10^{3-}$ M/min when Asparagine was used as a substrate. The effect of (some inorganic salts, chelating and reducing agent) on enzyme activity, the results showed that non sodium chloride and potassium chloride affect significantly the activity. the enzyme appear to be resistant to calcium chloride and magnesium chloride and keep full enzyme activity in the presence of EDTA and $FeSO_4$, the results showed that the activity of enzyme lost 16,13% respectively in the presence of Cystien and 2-mercaptoethanol at 10 mM while chloride of Copper had complete inhibitory effect of enzyme activity.

[20] Cedar, H. and Schwartz, J.H.. "Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*." J. Bact. 96(6): 2043-2048, 1968.

[21] مقران، سليم عبد الحميد (2003). انتاج وتنقية و توصيف الاسباراجنيز II من عزلة محلية لبكتريا *Escherichia coli* .رسالة دكتوراه. كلية العلوم.جامعة بغداد.

[22] Bradford, M.. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding". Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976.

[23] Whitaker, J.R. and Bernard, R.A.. "Experiments For An Introduction To Enzymology" The Wibber Press. Davis. 1972.

[24] العزاوي، علياء معن (2005). انتاج وتوصيف انزيم الاسباراجنيز L-asparaginase من العزلة المحلية لبكتريا *Serratia marcescens* المعزولة محليا. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.

[25] Brokotaky, B. and Bezbaruah R.L.. "Production and properties of aspraginase from new *Erwinia sp"*. Folia Microbial. 47(5) : 473 – 476, 2002.

[26] Youssef, M.; Omair. M. "Cloning, purfcation, characterization and immobilization of L-asparaginaseII from E.coli. " Asian J. of Biochemistry .3 (6): 337-350**.,** 2008.

[27] White, A.; Handler, P. and Smith, E.. "Principle of Biochemistry". M.C. Grow. Hill Book company. Ablakiston Puplication. New York, 1973.

[28] Novak,E.K. and Phillips, A. W.."L-glutamine as a substructure for L-asparaginase from *Serratia marcescens*", J. Bact. 117(5):593-600, 1974.

[29] Howard, J.B.; and Carpenter, F.H.." L-asparaginase from *Erwinia carotovora"*. J. Biol. Chem. 247(4): 1020-1030, 1972**.**

[30] Segel, I.H.. "Biochemical Calculation". Jhon Wiley and sons. Inc. NewYork, 1976.

[31] HO,P.P.K.; Milikin,E.B.; Bobbitt,J.L.; Grinnan,E.L.; Burck, P.J.; Frank, B.H.;

Keywords: Asparaginase, Purification, characterization, Production.