دراسة تاثير المثبطات الفلزية ولافلزية على البيتالاكتميز المنقى من العزلة المحلية *K. pneuminae* K8 بطريقة ثنائية الطور

عصام فاضل الجميلي ، زهير علي شفيق الطائي و منتهى عبد الكريم الصفار*
فرع التقنية الاحيائية ، معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدر اسات العليا ، جامعة بغداد.
* قسم صحة المجتمع ، المعهد التقني الطبي ، باب المعظم.

الخلاصة

تمت تنقية البيتالاكتميز المستخلص من العزلة المحلية *K. pneuminae* باستخدام الانظمة ثنائية الطور إذ ظهرت اعلى فعالية للبيتالاكتميز للطور العلوي للنظام المحتوي على 0.2مو لار فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وفعالية نوعية مقدارها 4.5 وحدة/ ملغرام بروتين .

بلغت قيمة معدل ثابت ميكالس منتن للانزيم 0.35 ملي مولار ومعدل السرعة القصوى 0.203 ملي مولار. دقيقة $^{-1}$ ومعدل ثابت الحفز بلغ 0.114 دقيقة$^{-1}$. كما درس تاثر الايونات المعدنية على الانزيم فوجد ان اعلى تثبيط للفعالية كانت بوجود ايونات الحديدوز اذ تم تثبيطها لاتنافسيا ودرس تاثير العوامل الكلابية والمختزلة اذ تم تثبيط الانزيم تنافسيا بوجود 2 -مركبتوا إيثانول ولم يثبط بوجود EDTA كما ثبط الانزيم تنافسيا باستعمال مادة السلفونأمايد فيما ظهر تاثير حامض الكلافينولينك ضعيفا تجاه الانزيم.

مفتاح الكلمات : البيتا لاكتميز، الانظمة ثنائية الطور، العوامل الكلابية والمختزلة، ثابت ميكالس منتن.

المقدمة

تمتاز معظم انزيمات البيتالاكتميز (EC.3.5.2.6) الى قابليتها للتحلل المائي للمضادات الحيوية ممايزيد من ضراوتها وقابليتها على احداث الاوبئة داخل المستشفيات (2; 1).

صنفت انزيمات البيتالاكتميز اعتمادا على اليات عملها الى A و B و C يمتاز الصنف A بانه يستطيع تحلل مجموعة المضادات الحاوية على حلقة البيتالاكتام الثابتة stable B -lactam ولكن مقاومته الهدمية تجاه Benzyl pencillin و Ampicillin تكون اقل ولايثبيط بواسطة حامض الكلافينولنيك ويكون في الغالب بلازميدي المشأ (3;4).

اما مجموعة البيتالاكتميز صنف B فهي من نوع الانزيمات المعدنية والتي تحتاج الى ايونات الزنك (Zn^{+2}) في الموقع الفعال ويكون احيانا كرموسومي وانواع اخرى تكون بلازميدية المنشأ مما يمنحه القابلية على الانتقال الى انواع بكتيرية آخرى ويسبب انتشار المقاومة التي يمنحها هذا الانزيم ضد المضادات الحيوية مثل Carbapenem (5;6;7).

اما صنف C فلة القابلية على تحطيم السيفالوثين Cephalothin وللسيفالوردين Cephaloridine اسرع من تحطمة لمجموعة البنسلينات وقلما يثبيط هذا الانزيم من قبل حامض الكلافينولينك (8;9).

تهدف الدراسة الحالية الى تنقية البيتالاكتميز باستخدام الانظمة ثنائية الطور وتاثير الفعالية التثبيطية للايونات المعدنية والمركبات الكلابية والمختزلة عليه.

المواد وطرائق العمل

تم استخلاص البيتالاكتميز من العزلة المحلية من بكتريا *K pneumoniae* المعزولة من اشخاص مصابين بالتهاب المجاري التنفسية، حسب الطريقة الموصوفة من قبل (10).

قياس فعالية البيتالاكتميز

اتبعت الطريقة الموصوفة من Bhat وجماعته (11) المحورة عن طريقة Novick (12) وتعرف وحدة الفعالية الانزيمية بانها كمية الانزيم اللازمة لتحليل 1 مايكرومول من مادة الاساس في الدقيقة تحت ظروف القياس.

تركيز البروتين

استخدمت الطريقة الموصوفة من Bradford (13) في تقدير تركيز البروتين في المحلول الانزيمي.

تنقية الانزيم

حضر النظام المائي ثنائي الطور دكستران (Dextran 150-T (T-150 20%، فنيل بايروليدون المتعدد 15%. Polyvinyl pyrrolidone (PVP) تبعا" للطريقة الموصوفة في (14) لانتخاب النظام الذي يعطي فصلا" جيدا" للطورين:

نظام الدكستران (Dextran T-150) والمحضر بتركيز 20% مع الفينل بايروليدون المتعددة -MW:25.000) Polyvinyl pyrro;idone (30.000 بنسبة 1:1 (وزن: وزن)، أضيف للنظام تراكيز متدرجة من ملح فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدرجين بتراكيز مختلفة تراوحت بين (0.0-0.2 مولار)، انتخب التركيز الذي أعطي فصلا" جيدا" وأضيف له محلول الانزيم بنسبة تركيز 100 مايكروليتر وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في كلا" الطورين العلوي والسفلي. وتم حساب معامل الفصل (K) من النسبة بين الفعالية الانزيمية في الطبقة العليا على الفعالية الانزيمية في الطبقة السفلى.

تقدير الثوابت الحركية للانزيم

حضرت تراكيزمختلفة من مادة الاساس بنسلين جي (0.5–50) ملي مولار، حسبت السرعة الاولية لتفاعل الانزيم تجاه مادة الاساس لكل تركيز من تراكيز مادة الاساس.

قدرت قيم ثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} للتفاعلات الانزيمية من رسم العلاقة بين السرعة الاولية v وتركيز مواد الاساس تبعا لأربع طرائق (14) وتضمنت:-

1-طريقة لاينوفير–بيرك(Lineweaver-Burk Plot).

2- طريقة هانس–وولف (Hans-Woolf Plot).

3-طريقة وولف- اوغستنسون (Woolf–Augustinsson plot)

4-طريقة ايدي–سكاتجارد(Eadie –Scatchard Plot)

كما وحسبت قيمة الثابت الحفزي K_{cat} لتفاعل الانزيم تجاه مادة الاساس بتطبيق المعادلة الآتية :

$$V_{max}=K_{cat}\ (Et)$$

(Et) التركيز الكلي للانزيم

دراسة تأثير بعض المثبطات في فعالية الانزيم

أ- تأثير الايونات الفلزية في تثبيط الانزيم

حضرالمحلول الخزين لكلوريدات الفلزات الآتية كلوريد النحاسيك، كلوريد الحديدوز، كلوريد الكالسيوم ويوديد البوتاسيوم بتراكيز 10 ملي مولار وقد اجريت التخافيف اللازمة للمحلول الخزين وتم مزجها مع المحلول الانزيمي بنسبة 1:1 للحصول على التراكيز (0.5 و1 و1.5و2 و2.5 و3 و 4 و5 و10) ملي مولار، حضن محلول الانزيم مع محاليل المواد المذكورة مسبقا" في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م لمدة 5 دقائق بعدها قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية للانزيم. كما حضن المحلول الانزيمي بدون معاملته بمحاليل المواد المذكورة في اعلاه بدرجة 37 م لمدة 5 دقائق وقدرت الفعالية الانزيمية لتفاعل السيطرة. وحسبت الفعالية الانزيمية المتبقية.

ب- تأثير المواد المختزلة والكلابية في تثبيط الانزيم

حضر المحلول الخزين للمواد 2 – مركبتو أيثانول واثلين داي أمين تترا أستك أسد EDTA بتركيز 20 ملي مولار وقد اجريت التخافيف اللازمة للمحلول الخزين وتم مزجها مع المحلول الانزيمي بنسبة 1:1 للحصول على التراكيز (0.5و1و1.5و2و2.5و3و4و5و10) ملي مولار، حضن محلول الانزيم مع محاليل المواد المذكورة مسبقا" في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م لمدة 5 دقائق بعدها قدرت الفعالية الانزيمية. كما حضن المحلول الانزيمي بدون معاملته بمحاليل المواد المذكورة في اعلاه بدرجة 37 م لمدة 5 دقائق وقدرت الفعالية الانزيمية لتفاعل السيطرة.

ج- تأثير السلفونامايد في تثبيط الانزيم

حضر المحلول الخزين للسلفونامايد بتركيز20 ملي مولار وقد اجريت التخافيف اللازمة للمحلول الخزين وتم مزجها مع المحلول الانزيمي بنسبة 1:1 للحصول على التراكيز (0.5 و1و1.5و 2 و2.5 و3 و 4 و5 و10) ملي مولار، حضن محلول الانزيم مع محاليل المواد المذكورة مسبقا" في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م لمدة 5 دقائق بعدها قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية للانزيم. كما حضن المحلول الانزيمي بدون معاملته بمحاليل المواد المذكورة في اعلاه بدرجة حرارة 37م لمدة 5 دقائق وقدرت الفعالية الانزيمية لتفاعل السيطرة.

د- تأثير حامض الكلافينولينك في تثبيط الانزيم

حضر المحلول الخزين لحامض الكلافينولينك بتركيز 20 ملي مولار وقد اجريت التخافيف اللازمة للمحلول الخزين وتم مزجها مع المحلول الانزيمي بنسبة 1:1 للحصول على التراكيز (0.5 و1 و1.5 و2 و2.5 و3 و4 و5 و10) ملي مولار، حضن محلول الانزيم مع محاليل المواد المذكورة مسبقا" في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م لمدة 5 دقائق بعدها قدرت الفعالية الانزيمية المتبقية للانزيم. كما حضن المحلول الانزيمي بدون معاملته بمحاليل المواد المذكورة في اعلاه بدرجة حرارة 37 م لمدة 5 دقائق وقدرت الفعالية الانزيمية لتفاعل السيطرة .

النتائج والمناقشة

استخدمت تقنية الفصل بالانظمة المائية ثنائية الطور في هذه الدراسة نظرا لما لها من مزايا ايجابية كسهولة تحضيرها واقتصاديتها، تعتمد الطريقة على ظاهرة انفصال الاطوار (Phase partition) والتي تحدث عند وجود بولي فنيل بايروليدين (pvp) والدكستران بتراكيز مناسبة تكفي لتكوين طبقتين الطبقة العليا بولي فنيل بايروليدين والطبقة السفلى دكستران (16).

تبين الاشكال (1 و2) اختلاف الفعالية النوعية ومعامل الفصل (Partition coefficient) (K) في طوري النظام المائي الثنائي الطور المستخدم في هذه الدراسة مع اختلاف تركيز الملح المضاف للنظام. اذ إن توزيع البروتينات يتاثر بعدة عوامل منها قيمة الرقم الهيدروجيني للنظام بسبب تاثيرها في تاين السلاسل الجانبية للحوامض الامينية وتغيرات الشكل لجزيئة البروتين والتركيب الايوني للنظام ونظراً لاهمية تاثيرات الايونات في ذوبان البروتينات ووجود المبادلات الايونية الذائبة وعدم تأثير درجة الحرارة في كفاءة التوزيع لذا أسهم هذا النظام في حماية البروتينات من المسخ (14).

يلاحظ من الشكل (1) تغير معامل الفصل (K) الذي يعبر عنه لتحديد كفاءة فصل المواد بهذه الانظمة وهو يمثل النسبة بين الفعالية او التركيز للمواد المفصولة في الطبقتين العليا والسفلى (17)، بتغير تركيز الملح المضاف ظهر اعلى معامل للفصل (3.16) عند احتواء النظام على فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين بتركيز (0.05) مولار وظهرت اعلى فعالية للبيتالاكتميزفي الطور العلوي للنظام المحتوي على (0.2) مولار فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين.

يبين الشكل (2) ظهور أعلى فعالية نوعية للبيتالاكتميز في النظام المائي في الطور العلوي عندما احتوى 0.2 مولار من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين إذ بلغت 4.5 وحدة/ ملغم بروتين وكمية قليلة للفعالية النوعية في الطور السفلي إذ بلغت 1.9 وحدة/ ملغم بروتين وكفاءة فصل عالية (2.25) مقارنة بباقي التراكيز مما يفسر ان ملح فوسفات البوتاسيوم وبتركيز 0.2 مولار اكثر ملائمة لفصل انزيم البيتالاكتميز.

ويمكن تفسير الاختلاف في فعالية الانزيم مع تباين تركيز الملح الى اختلاف توزيع الانزيم بين الطورين بسبب اختلاف توزيع الشحنات للبروتين وصفات الكراهية للماء Hydrophobility (18,19).

تم تقدير ثابت ميكالس منتن K_m والسرعة القصوى V_{max} والثابت الحفزي K_{cat}(Catalytic rate) للبيتالاكتميز باستخدام البنسلين جي مادة أساس باستخدام اربعة طرائق لرسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز مادة الاساس لتعيين هذه القيم. اظهرت النتائج تقارب بين قيم الثوابت الحركية المستحصلة من الطرائق الاربعة المذكورة في (جدول 1)، اذ بلغ معدل القيم لتلك الثوابت الحركية K_m وV_{max} 0.35 ملي مولار و0.203 ملي مولار. دقيقة$^{-1}$ على التوالي وكذلك تم تعيين قيمة K_{cat} للانزيم من المعادلة:

$$V_{max}=K_{cat}\ .\ [Et]$$

إذ بلغت 0.114 دقيقة$^{-1}$ عند استخدام البنسلين – جي كمادة اساس والذي يعتمد عليه للمقارنة بين الانزيمات الماخوذة من مصادر مختلفة والتي تحفز تفاعلاً معيناً، ولمقارنة تفاعلات الانزيم تجاه مواد اساس مختلفة، ويمثل مقلوب هذا الثابت الزمن الذي تستغرقه دورة حفزية واحدة (14). ويتراوح عموماً بين (50–70) دقيقة$^{-1}$، وقد توصل Yuan وجماعته عام 2000 عند دراسة البيتالاكتميز المنتج من البكتريا *K. pneumonia* المعزولة من مرضى العناية المركزية في امستردام ان البنزايل بنسلين والامبسلين والبيراسلين لها فعالية انزيمية عالية و K_m قليلة مقارنة بالسيفالوردين وان قيمة V_{max} للسيفالوردين تمثل 27% من قيمة V_{max} للبنزايل بنسلين.

تاثير الايونات الفلزية في تثبيط الانزيم

دُرس تأثير الايونات المعدنية في تثبيط فعالية البيتالاكتميز المنتج من البكتريا قيد الدراسة بحضن الانزيم مع محاليل كلوريدات المعادن (الحديد، النحاس، الكاليسيوم والبوتاسيوم) بدرجة 37 م لمدة نصف ساعة (الشكل 3)، ولوحظ انخفاض في فعالية الانزيم بدرجة كبيرةعند معاملته مع أيونات الحديدوز اذ بلغت الفعالية المتبقية للانزيم 7% و4% عند معاملته بتراكيز 5 و10 ملي مولار على التوالي وهو اعلى تثبيط ظهر في هذه الدراسة اما ايونات النحاس فقد أدت ايضاً الى تثبيط واضح في فعالية الانزيم وكانت الفعالية الانزيمية المتبقية 11% و10% بتركيز 5 و 10 ملي مولار على التوالي، وهذا يتفق مع ما ذكره Arakawaوجماعته (2) عند استعماله كلوريد النحاس وكلوريد الحديدوز التي ثبطت البيتالاكتميز المنقى من بكتريا *K. pneumonia* خارج الخلية بينما ظهر تاثير املاح الزئبق بشكل كبير تجاه الانزيم ولكن لا يوصى به بسبب تأثيره السام على الانسان. اما ايونات الكالسيوم فقد ادت ايضاً الى تثبيط فعالية الانزيم وكانت الفعالية المتبقية 26% و17% عند التراكيز 5 و10 ملي مولار على التوالي. اما يوديد البوتاسيوم فقد بلغت الفعالية المتبقية 1.2% و 1.4 % عن حضن الانزيم بهذه المادة عند التركيز 5 و10 ملي مولار على التوالي.

من هذا يستدل على ان الايونات المعدنية لها تأثير واضح في تثبيط فعالية الانزيم ويختلف باختلاف نوعها وتركيزها وغالباً ما يزداد تأثير الايونات مع زيادة تركيزها. أن الانخفاض الحاصل في الفعالية الانزيمية يمكن أن يعزى الى تكوين معقدات مع المجاميع الفعالة للانزيم مما يؤدي الى اعاقة ارتباط الانزيم بمادة الاساس وتأثيره في حفز الانزيم مما يعيق تحويل مواد التفاعل الى ناتج (14).

تاثير المواد المختزلة والكلابية في تثبيط البيتالاكتميز

تتأثر فعالية البيتالاكتميز عند حضنه مع المركبات المختزلة مثل 2- مركبتوأيثانول (2-mercaptoethanol) بدرجة كبيرة وبتراكيز قليلة جداً مما يدل ان البيتالاكتميز قيد الدراسة يحتوي على مجموعة الثايول في الموقع الفعال ولا يحتوي على السستائين حيث بلغت فعالية الانزيم المتبقية 36% عند حضنه بتركيز 0.5 ملي مولار الشكل (4) ويتفق هذا مع ما توصل اليه، Arakawa وجماعته (2) عند استعماله مركبات الثايول ومن ضمنها 2-مركبتوا يثانول مثبطاً للبيتالاكتميز لبكتريا *K. pneumonia* خارج الخلية وتوصل الى نتائج واضحة ومميزة. والشكل (5) يوضح تأثير هذا المركب تنافسيا" مع الانزيم بينما يعد الـ EDTA (Ethylenediaminetetra acetic Acid) من المركبات المخلبية (Chelating agents) قابلة للذوبان في الماء لها القابلية على تكوين مركبات معقدة مع الايونات المعدنية الموجبة فقط في الخلية لم يثبط EDTA سوى 8% فقط من الفعالية الانزيمية للبكتريا *K. pneumoniae* وبتركيز10 ملي مولار الشكل (6) وهي نتيجة ضعيفة جدا مما يدل على إن الانزيم الذي تنتجه هذه العزلة من صنف (A) والذي يشفر لانتاجه جين محمول على الجينات القافزة Tn والبلازميدات plasmids والكروموسومات chromosomes ولا ينتمي الى مجموعة البروتيزات المعدنية Metallo proteases.

اظهرت النتائج تأثر فعالية الانزيم عند حضنه مع تراكيز مختلفة من مادة السلفونامايد فعند المعاملة بتركيز 0.5 ملي مولر لوحظ انخفاض شديد بالفعالية المتبقية للانزيم عند زيادة تركيز السلفونأمايد اذ بلغت الفعالية المتبقية 69% تقريباً ثم انخفاض تدريجي عند حضن الانزيم مع 1 ملي مولار اذ كانت 54%. ان البيتالاكتميز هو من البروتيزات السيرينية التي تتصف بوجود مجموعة هيدروكسيل السيرين في موقعها الفعال وتثبيط هذه الانزيمات تنافسياً مع السلفونامايد إذ يرتبط مع هيدروكسيل السيرين ومن ثم اعاقة الموقع الفعال عن الارتباط بمادة الاساس (20) الاشكال (7 و8).

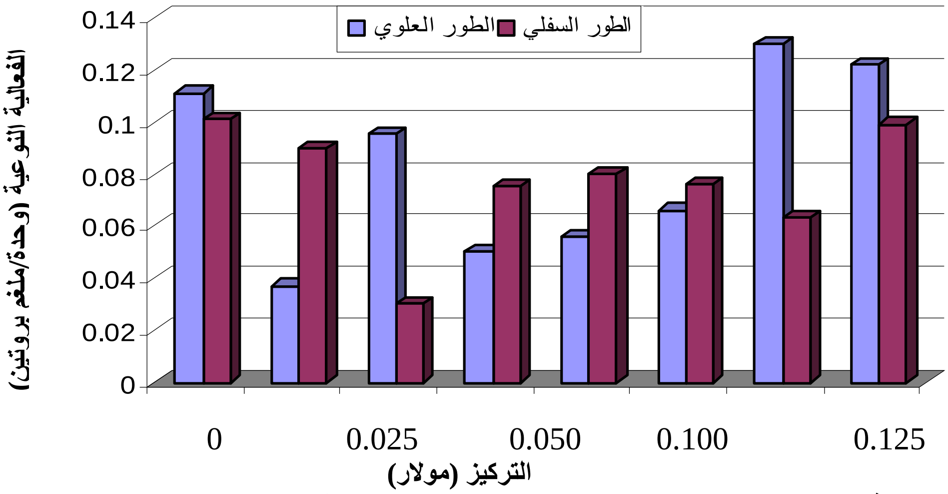
اظهرت النتائج لهذه التجربة تأثر فعالية الانزيم عند حضنه مع تراكيز مختلفة من حامض الكلافينولينك فعند المعاملة بتركيز 0.5 ملي مولر لوحظ انخفاضاً ضعيفاً جدا" بالفعالية المتبقية للانزيم بلغ 4%وعند زيادة تركيز ه لحد 5 ملي مولار انخفضت الفعالية الانزيمية تدريجيا" حتى بلغت الفعالية المتبقية 69% تقريباً ثم انخفاض ضعيف جدا" عند حضن الانزيم مع 10 ملي مولار اذ كانت 66%. الشكل(9). ويعد الانزيم الذي تنتجه العزلة المحلية *K. pneumoniae* من الصنف (B,C) حسب تصنيف (Ambler) حسب ماذكره (21) حيث ان التثبيط كان ضعيفا بوجود هذا المركب أذ ثبطت 34%من فعالية لانزيم بتركيز 10 ملي مولار خارج الخلية (*in vitro*) وهي نتيجة

ضعيفة اذا ما قورنت مع اضافة المركب داخل الخلية (*in vivo* حيث تكمن قدرته على تجاوز الجدار الخلوي والوصول الى الغشاء البلازمي وارتباطه مع البيتالاكتاميز الذي تنتجه الخلية وبالتالي تمكين مضادات الحيوية من التاثير في البكتريا (22) لذا يستخدم حامض كلافينوليتك تازريا مع مضادات الحيوية Ampicillin, Amoxcillin لكي يكون ذا تاثير واسع على البكتريا اذا ما قورن مع أضافته لوحده (23)، .إن آلية عمل كلافولينك التثبيطية هي بتداخله مع الحامض الاميني السيرين ثم ترتبط الجزيئة باللايسين وهو الحامض الاميني الذي يقع على بعد حامضين امينيين من السيرين مما يسبب إلى انتاج معقد–انزيم–جزيئة ثانية. وتختلف درجة ومعدل التثبيط حسب مصدر الانزيم (22).

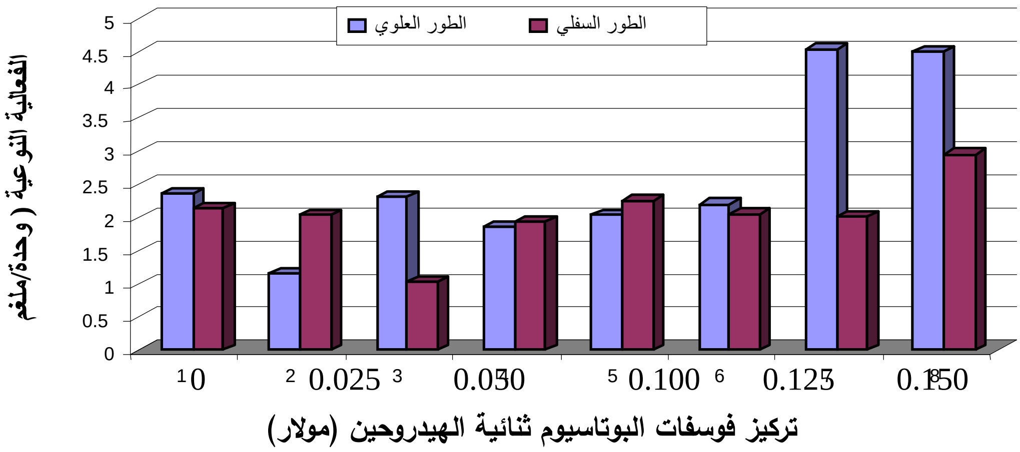
جدول (1)

الثوابت الحركية للبيتالاكتميز المنقى من بكتريا *K. pneumonia*.

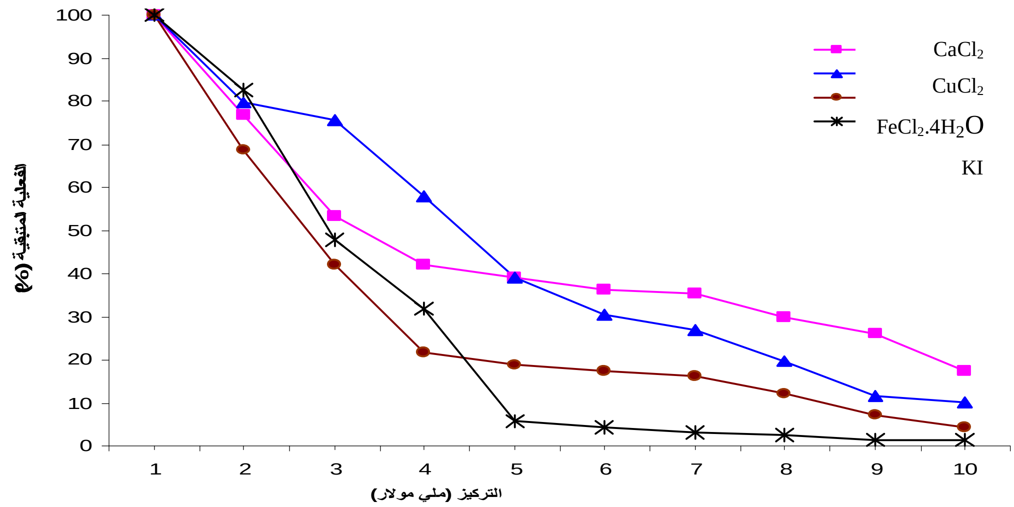
ت	طريقة التقدير	K_m (mM)	V_{max} (mM. min^{-1})	K_{cat} (min^{-1})
1	طريقة لاينوفير – بيرك	0.333	0.2	0.119
2	طريقة هانس –وولف	0.3	0.19	0.121
3	طريقة وولف – اوغستون–هافستي	0.38	0.2	0.115
4	طريقة ايدي – سكاتجارد	0.39	0.225	0.102
	المعدل	0.35	0.203	0.114



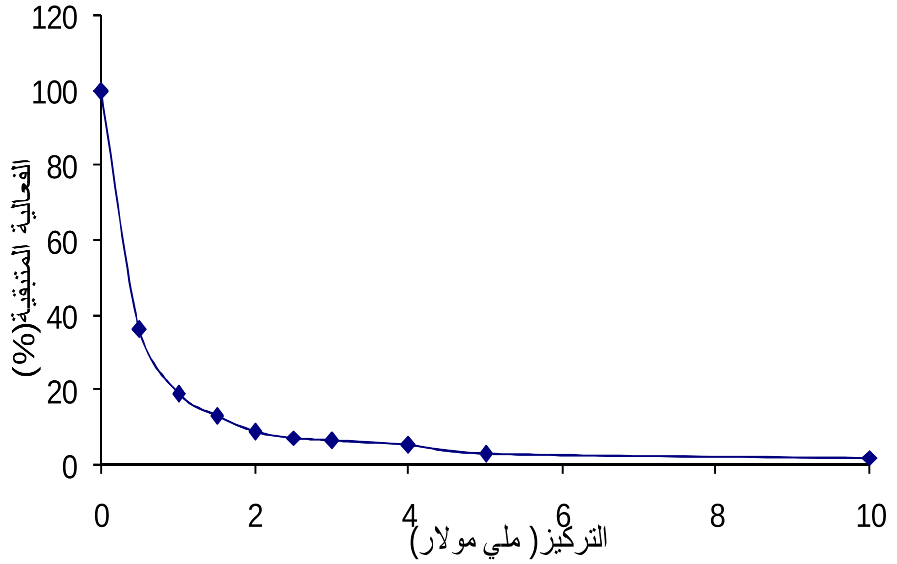
الشكل(1) الفعالية النوعية للبيتالاكتميز المعزول من بكتريا *K. pneumonia* في النظام ثنائي الطور المتكون من (20%) pvp (15%) Dextran عند اضافة تراكيز مختلفة من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين.



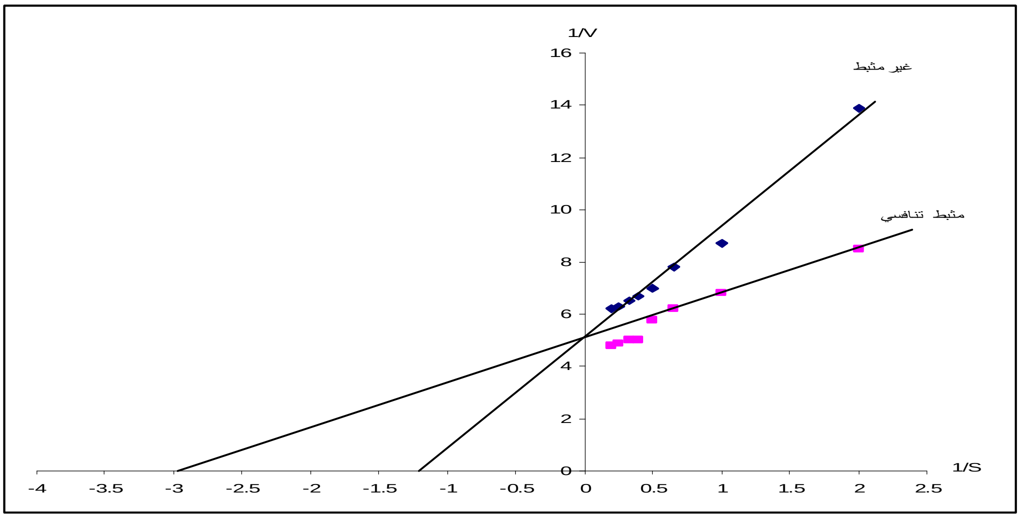
الشكل(2) الفعالية النوعية للبيتالاكتميز المعزول من بكتريا *K. pneumonia* في طوري النظام المائي ثنائي الطور المكونات (pvp, (20%) Dextran 15%) عند اضافة تراكيز مختلفة من فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين.



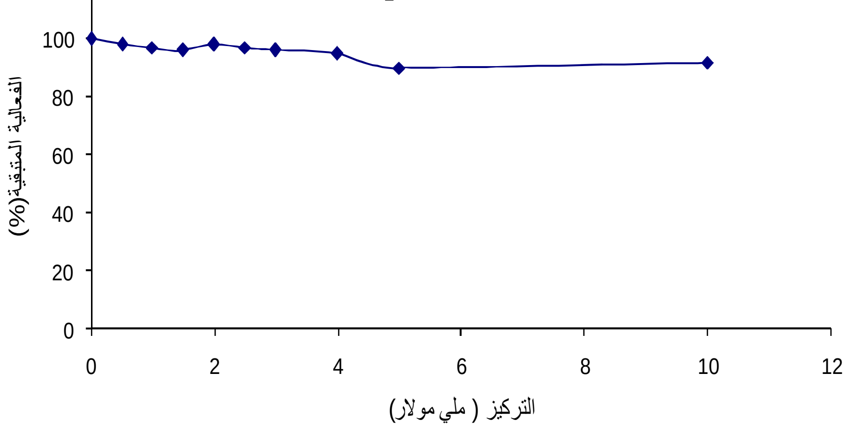
الشكل(3) تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الايونات المعدنية في تثبيط فعالية البيتالاكتميز المعزول والمنقى من بكتريا *K. pneumonia*.



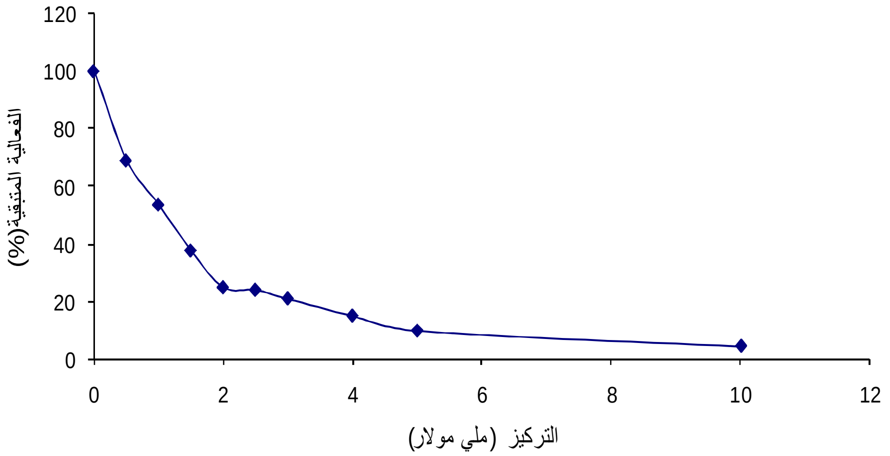
الشكل (4) تأثير إضافة تراكيز مختلفة من 2ـمركبتوا إيثانول على فعالية البيتالاكتميز والمنقى من بكتريا ***K. pneumonia***.



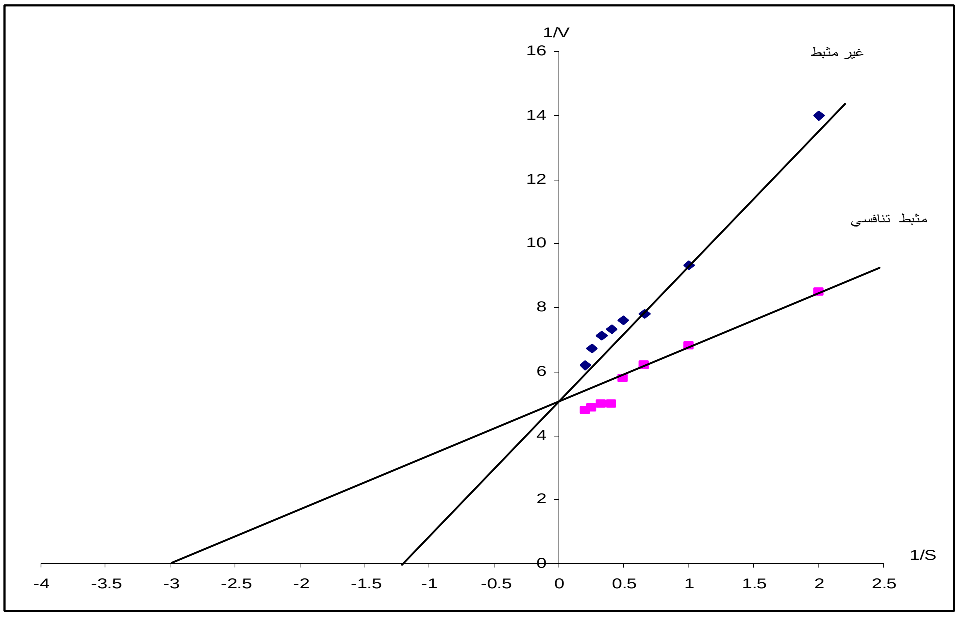
الشكل (5) تاثير التثبيط التنافسي للمركب 2ـمركبتوا إيثانول على فعالية الانزيم البيتالاكتميزوالمنقى من بكتريا ***K. pneumonia***.



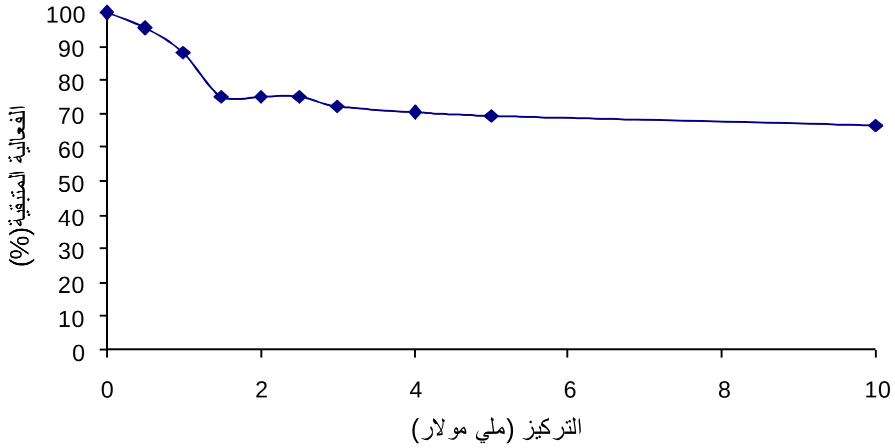
الشكل (6) تأثير اضافة تراكيز مختلفة من EDTA على فعالية البيتالاكتميز المنقى من بكتريا ***K. pneumonia***.



الشكل (7) تأثير اضافة تراكيز مختلفة من السلفونأمايد على فعالية البيتالاكتميز المنقى من بكتريا *K. pneumonia*.



الشكل (8) تأثير التثبيط التنافسي لمركب السلفونامايد على فعالية البيتالاكتميز المنقى من بكتريا *K. pneumonia*.



الشكل (9) تأثير اضافة تراكيز مختلفة من **Clavulanic acid** على فعالية البيتالاكتميز المنقى من بكتريا *K. pneumonia*.

المصادر

[1] Queenan, A.M. and Bush, K. (2007). Carbapenemases: the lersatile (beta-lactamases). Clin. Microbiol. Rev. 20.pp: 440-458.
[2] Arakawa, Y.; Shibata,N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H. and Goto, M. (2000). Convenient test for screening metallo β–lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J. of Clinical Microbiology. 38. pp: 40-43.
[3]Rasmussen, B. A. and Bush, K. (1997). Carbapenem hydrolyzing β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 41.P: 223-232.
[4]Badarau,A., Damblon, C. and Page, M.L. (2007). The activity of the dinuclear cobalt-β-lactamase from *Bacillus cereus* in catalyzing the hydrolysis of β-lactams. Biochem. J. 401. pp: 197-203.
[5] Arakawa, Y.; Naohiroshibata, Keigoshibay-ama, Hiroshi K.; Tetsuya Y.; Hiroshi F. and Masafumi, G. (2000). Conenient test for screening metallo-B-lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds.J.of Clinical Microbiology.38:1. pp:.40-43.
[6] Hemalatha, V.; Padma, M.; Umasekar, T.M.Vinodh and Arunkumar, A.S. Arunkumar. (2007). Detection of Ampc beta lactamases production in *E. coli* and *Klebsiella* by an inhibitor based method. Indian J. Med. Res. 126, pp: 220-223.
[7] Marchaim, D; Navon-Venezia,S; Schioaber, M.J.and Carmeli,Y. (2008). Isolation of lmipenem resistant enterobacter species: Emergence of KPC-2 carbapenemase, Molecular characterization, Epidemiology and Outcomes. Antimicrob. Agent Chemother. 52. pp: 1413-1418.
[8] Kassis-Chikhani, N.; Decre,D.; Gautier, V.; Burghoffer, B. Saiba, F.; Mathieu,D.; Samuel, D.; Castaing, D.; Petit, J.; Dussaix, E.; Arlet, G. (2006). First outbreak of multidurg –resistant *Klebsiella pneurmoniae* carrying blaVIM-1 and bla SHV-5 in a french university hospital. J. Antimicrob. Chemother. 57: pp: 493-500.
[9]Sekiguchi, J.I.; Asagi, T.; Miyoshi-Akiyama,T.; Kasai,A.; Mizuguchi, Y. Araake, M.; Fujino, T.; Kikuchi, H. Sasaki, S.; Watari, H.;Kojima,T.; Miki,H.; Kanemitsu, K.; Kunishima, H.; Kikucji, Y.; Kaku, M.; Yoshikura, H.; Kuratsuji, T. and Kirikae, T. (2007). Outbreaks of multi durg-resistant *Pseudomonase aeruginosa* in community hospitals in Japan. J. Clin. Microbial. 45: pp: 979-989.
[10]Dale J.W. and Smith, J.T. (1971). The purification and proprieties of β-lactamases specified by the resistance factor R-1818 in *E.coli* and *Proteus mirabilis*. Biochem. J. 123: pp: 493-500.
[11] Bhat, K.; Hegde,B.K. and Shivananda,P.G. (1994). Effect of trace metals on production of exoprotein and β -lactmases by *Staphylococcus aureus*. India J. Experimental Biology. 32. pp: 492-494.
[12] Novick, R.P. (1962). Micro iodometeric assay for penicillinase. Biochemical. J. 83.pp: 236-239.
[13] Bradford, M.M. (1976) .A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizating the principle of protein –dye binding. Analyt .Biochem. 72. pp: 248-255.
[14] Segel, I.H.(1975_a) *Biochemical Calculation* 2nd edition Wiley Publication , p. 278.
[15] Segel, I.H.(1975_b) *Enzyme Kinetics* Wiley –Inter-Science Publication .
[16] Monosan, P.; Paul,F.; Auriol, D. and Lopez, A. (1987). Dextran synthesis using immobilized *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. In: Methods in Enzymology. (ed. Mosbach, K.) Vol.136. pp: 239-254. Academic Press. New York.
[17] Mattiasson, B. (1988). Bioconversions in aqueous two-phase systems: An-alternative to convertional immobilization. In: Methods in Enzymology . Immobilized Enzymes & Cells (ed. Mosbanch, K.) Vol. 137.pp: 657-667. Academic press.Inc.
[18] Johnson, J.R.; Moseley, S.L.; Roberts, P.L. and Shaman, W. E. (1988). Aerobact in other virulence factors genes , among strains of *Escherihia Coli* Causing Urosepsisi association with patient characteristics .Infect. Immuno.56:405-412.
[19] Baskir, S.N., Hatton, T.A. and suter, U.W.(1989) .Protein partitioning in two

phase aqueous polymer systems. Biotechnol. Bioeng. 34(4):541-558.

[20] دلالي، باسل كامل. 1983. فهم الانزيمات. جامعة الموصل. طبع بمطابع جامعة الموصل مديرية مطبعة جامعة الموصل.

[21] Rolinson, G.N. (1998). Forty years of Beta – Lactam. Research .J. antimicrobi-Chemother. 41:589-603.

[22] Neu, H.C.1985a .Contribution of Beta-Lactamases to bacterial resistance and mechanism to inhibit Beta – Lactamases, The American Journal of Medicine 79 (suppl 58):2-11.

[23] Arakawa, Y.; Horii, T.; Ohta, M.; Ichiyama, S.; Wacharotayankun, R. and Kato, N.(2003)

[24] Plasmid- mediated Amp C-Type β -Lactamase isolated from *K. pneumoniae* confers resistance to Broad –Spectrum β -Lactam, including moxalactam. Antimicrob. Agents and chemother. 37(5): 984-990.

Abstract

Two- phase systems were used purification step in which a higher ß-Lactamase (activity) was show in the upper phase for the system that contain (0.2)M potassium dihydrogen phosphate and specific activity of (4.5)U/mg of protein .

Mechalis Menton constant value for the enzyme was found to (0.35)mM with a maximum velocity of (0.203)mM.min^{-1} and the average of catalytic constant was (0.114)min^{-1} .also the effect of metallic ions influence on the enzyme was studied and found that maximum inhibition for it was estimated with the presence of Fe^{+2} ions and its inhibition was noncompetitive inhibition and the study the effect of chelating and reducing agents in which the enzyme was competitively inhibited in the presence of 2-mercaptoethanol and no inhibition was determined in the presence of EDTA, also the enzyme was competitively inhibited using sulfonamide, and also the effect of Cluvlanic acid was very weak against the enzyme .