



الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم الأغذية

إنتاج إنزيم الأسبارجيناز من بكتريا *Bacillus spp* واستخدامه في الحد من الأكريلاميد المتشكل في الأغذية المقلية

**Asparaginase production by *Bacillus spp* and its application
in reducing acrylamide formation in fried food**

رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية
(تخصص علوم الأغذية)

إعداد المهندسة

فيقيان رمزي ضيف الله

المشرف المشارك

أ.د. لينه الأمير
أستاذ مساعد في الهيئة العامة للتقانة الحيوية

المشرف العلمي

أ.د. صباح يازجي
أستاذ في قسم علوم الأغذية

2021م

قدمت هذه الدراسة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في قسم علوم الأغذية في

كلية الزراعة ، جامعة دمشق، وأجيزت من قبل لجنة الحكم بتاريخ 5 / 10 / 2021

This thesis has been submitted as a partial fulfillment of the requirements
for the Ph. D. degree in Food Science Department, Faculty of Agriculture,
Damascus University.

The thesis has been approved by referee committee.

لجنة الحكم

أ. د. عصام قاسم

أ. د. محمد خير طحلة

أ. د. عبد الوهاب مرعي

أ. د. عبد الحكيم عزيزية

أ. د. صباح اليازجي

شهادة

نشهد أن العمل الموصوف في هذه الدراسة " إنتاج إنزيم الأسبارجيناز من بكتريا *Bacillus spp* واستخدامه في الحد من الأكريلاميد المتشكل في الأغذية المقلية " هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة فريقيان رمزي ضيف الله بإشراف الدكتورة صباح اليازجي (قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق) ، والدكتورة لينه الأمير (الهيئة العامة للتقانة الحيوية)، وإن أية معلومات أو نتائج أخرى ذكرت قد نسبت إلى مصادرها ومؤلفيها في النص وفي قائمة المراجع.

الإشراف	المرشحة
أ.د. صباح اليازجي	فريقيان رمزي ضيف الله
أ.د. لينه الأمير	

Certification

It is hereby certified that the work described in this thesis “**Asparaginase production by *Bacillus spp* and its application in reducing acrylamide formation in fried food**” is a result of Ms. Vivian Daifallah own investigations under the supervision of Professor Dr. Sabah Yazajy (Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University) and Dr. Lina Al-Amir (National Commission for Biotechnology), References to other researchers works have been fully acknowledged in the text and in the reference list.

The Candidate

Supervisors

Vivian Ramzi Daifallah

Prof. Dr. Sabah Yazajy

Prof. Dr. Lina Al-Amir

تصريح

أصرح بأن هذا البحث " إنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus spp* واستخدامه في الحد من الأكريلاميد المتشكل في الأغذية المقلية " لم يسبق أن قدم للحصول على أية درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك.

المرشحة

ثيفيان رمزي ضيف الله

Declaration

I hereby declare that this work “**Asparaginase production by *Bacillus spp* and its application in reducing acrylamide formation in fried food**” has not been accepted for any degree, nor submitted concurrently for any other degree.

The Candidate

Vivian Ramzi Daifallah

كلمة شكر

دائماً سطور الشكر تكون في غاية الصعوبة عند صياغتها، ربما لأنها تشعرنا دوماً بقصورها وعدم إيفائها حق من نهديه هذه الأسطر.

لايسعني في نهاية هذا العمل إلا أن أقدم كل الشكر والحب والتقدير للدكتورة الغالية صباح اليازجي لما بذلته من تعب وجهد خلال السنوات الماضية، فلها مني أصدق الدعوات بدوام الصحة والعافية. أعذب كلمات الشكر والامتنان للدكتورة الغالية **لينه الأمير** التي قدمت وبذلت الكثير للمساهمة في نجاح هذا العمل، وتلك الأسس التي شاركتني في وضعها تشهد على فيض عطائها وجميل صنيعها. كما أتقدم بالشكر الجزيل للسادة أعضاء **لجنة الحكم** لمساهمتهم في تحقيق الغاية المرجوة من هذا العمل وتصحيح عثراته ليظهر بالشكل الأمثل .

كما أتقدم بالشكر والتقدير إلى كلية الزراعة متمثلة بالسيد **العميد والوكيل العلمي والكادر التدريسي** وأخص بالذكر قسم علوم الأغذية متمثلة برئيس القسم الدكتور **أحمد هداي**، والدكتور **جهد سمعان** لتقديره العون والمساعدة في إجراء الدراسة الإحصائية دون انتظار الشكر والامتنان.

تتناثر الكلمات حبراً وحباً على صفحات الأوراق **للهيئة العامة للتقانة الحيوية وكادرها الإداري والعلمي** متمثلة بالدكتور **عصام قاسم**، ورئيس قسم التقانات الحيوية الصناعية والغذائية الدكتور **بسام العقلة** والمديرة الإدارية **مدام رنا صالح**، لاحتضانها هذا البحث ودعمها المادي والمعنوي.

أتقدم بالشكر للدكتورة **ناريمان نعمة** من كلية الزراعة -جامعة البعث كما أتقدم بالشكر لجميع زملائي الذين لم يخلوا بتقديم العون والمساعدة وأخص بالشكر صديقتاي الغاليتان الأقرب إلى قلبي **منى الوزير** و**أمانى عيسى** وصديقتي **نور الهدى العيسى** و**ألين صالحاني** و**بثينة السلامة** و**جنان محمود** والصديقان **هذيل الجماس** و**أحمد تريسي**.

الشكر والمحبة لكل الذين يتركون بنا أشياء جميلة تجعلنا نبتسم حين نذكرهم. أقدم ثمرة سهر الليالي والسنين إلى من كانوا سنداً لي في مسيرتي، إلى من ألهموني حبّ الكفاح والعمل المستمر، إلى من ساروا معي نحو الهدف خطوة بخطوة بكل حبّ، إلى من كانوا جيشي الوحيد، إلى **أمي الغالية وأخوتي ألين وماهر وكارلا ونتالي**، إلى رفيق دربي الغالي **بشار** ونبضات قلبي **كارلا وأديانا**، وإلى الغائبين الحاضرين في قلبي وذاكرتي دائماً وأبداً إلى روح **أبي وأخي شربل**.

فريقيان

فهرس المحتويات

الصفحة	الموضوع
1	الملخص
3	أولاً- المقدمة
4	ثانياً- مبررات البحث
4	ثالثاً- أهداف البحث
5	الفصل الأول: الدراسة المرجعية
5	أولاً- كيمياء الأنزيمات
7	ثانياً- تسمية الأنزيمات وتصنيفها
9	ثالثاً- لمحة تاريخية عن إنزيم الأسبارجينااز
10	رابعاً- مصادر إنزيم الأسبارجينااز
11	خامساً- مجموعة بكتريا <i>Bacillus</i>
12	سادساً- آلية عمل إنزيم الأسبارجينااز وخواصه
14	سابعاً- عزل وتنقية البكتريا المنتجة للأسبارجينااز
15	ثامناً- غربة العزلات
15	1- الغربة الأولية
16	2- الغربة الثانوية
16	تاسعاً- تشخيص العزلات المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز
16	عاشراً- استخلاص الأنزيم
16	حادي عشر- تقدير الفعالية الإنزيمية
17	ثاني عشر- العوامل المؤثرة على إنزيم الأسبارجينااز
17	1- تأثير درجة الحرارة
17	أ- درجة حرارة إنتاج الإنزيم.
17	ب- درجة الحرارة المثلى لنشاط الإنزيم.
18	ت- درجة حرارة حفظ الإنزيم.
18	2- تأثير الرقم الهيدروجيني
18	3- تأثير زمن التخمير (مدة التحضين)
19	4- تأثير المصدر الكربوني
20	5- تأثير مصدر النيتروجين
20	6- تأثير التهوية (سرعة الدوران)
21	ثالث عشر- فصل وتنقية الأنزيم

24	1-تقدير البروتين
25	رابع عشر- الصفات الحركية لعمل إنزيم الأسبارجينااز
25	1- تأثير درجة الحرارة في فعالية الأنزيم
25	2- تأثير درجة الحرارة في ثباتية الإنزيم وتخزينه
26	3- تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الإنزيم
26	4- تأثير الرقم الهيدروجيني في ثباتية الإنزيم
27	5- تأثير الأملاح والشوارد المعدنية
28	6- تأثير الركيزة
28	خامس عشر- الأهمية التطبيقية لإنزيم الأسبارجينااز
28	1-أهمية الأسبارجينااز في التطبيقات الغذائية
31	2- أهمية الأسبارجينااز في التطبيقات العلاجية
33	الفصل الثاني: مواد البحث وطرائقه
33	أولاً- مواد البحث والأجهزة المستخدمة
33	1-الأجهزة المستخدمة في البحث
34	2-الأوساط الزرعية
34	❖ الوسط الصلب لعزل البكتريا المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز
34	❖ الوسط السائل لعزل البكتريا المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز
34	❖ وسط الأساس السائل لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز
35	3-طرائق العمل
35	❖ عزلات بكتريا <i>Bacillus</i>
35	❖ تصنيف بكتريا <i>Bacillus</i>
35	☒ دراسة بعض الخواص المزرعية والمجهريه والبيوكيميائية للمستعمرات الناتجة
35	✓ الخواص المزرعية
35	✓ الخواص المجهريه
35	✓ الاختبارات البيوكيميائية
37	❖ انتخاب السلالات المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز
37	☒ الغرلة الأولى
38	☒ الغرلة الثانوية
38	❖ تقدير الفعالية الأنزيمية لإنزيم الأسبارجينااز
39	☒ المنحنى القياسي لمحلول سلفات الأمونيوم
40	❖ أمثلة ظروف إنتاج إنزيم الأسبارجينااز
40	☒ قدرة العزلة البكتيرية <i>B.licheniformis</i> على استهلاك السكريات كمصدر وحيد للكربون
40	☒ تأثير المتغيرات المدروسة في إنتاجية إنزيم الأسبارجينااز

42	❖ تنقية إنزيم الأسبارجينااز
42	☒ الحصول على المستخلص الخام للإنزيم
43	❖ مراحل تنقية الأسبارجينااز
43	☒ المعاملة بالأسيتون
43	☒ التنقية باستخدام أعمدة الكروماتوغرافيا
43	✓ عمود الـ Sephadex G-100
44	✓ DiethyleAminoethyle – Sepharose (DEAE – Sepharose)
44	❖ تقدير البروتين
45	☒ المواد والمحاليل المستخدمة
45	☒ تحضير المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين
46	☒ تقدير تركيز البروتين في المستخلص الإنزيمي وبعد كل مرحلة من مراحل التنقية
46	❖ طريقة الرحلان الكهربائي للبروتين باستخدام طريقة
47	☒ المواد والمحاليل المستخدمة
48	☒ طريقة الرحلان الكهربائي لإنزيم الأسبارجينااز باستخدام SDS-PAGE
50	❖ دراسة بعض الصفات الحركية لإنزيم الأسبارجينااز المنقى المفرز من بكتريا <i>Bacillus licheniformis</i>
50	☒ تأثير درجة الحرارة في فعالية الإنزيم المنقى
50	☒ الاستقرار الحراري
50	☒ تخزين الإنزيم الخام
50	☒ تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الإنزيم المنقى
51	☒ الاستقرار الحمضي
52	☒ تأثير تركيز الركيزة في فعالية الإنزيم المنقى
52	☒ تأثير بعض الشوارد المعدنية ومادتي EDTA و MgCL2 في فعالية الإنزيم المنقى
52	❖ التطبيقات العملية للأسبارجينااز
52	☒ المواد والأجهزة المستخدمة في تقدير الأكريلاميد
52	☒ تحضير العينات ومعاملتها بالإنزيم
53	☒ الكشف عن الأكريلاميد
53	☒ استخلاص الأكريلاميد من العينة المدروسة (Acrylamide extraction)
53	☒ التحليل الكروماتوغرافي للأكريلاميد
53	☒ المنحنى المعياري للأكريلاميد (Calibration curve)
54	☒ حد الكشف في جهاز HPLC (Limit of detection)
54	☒ تحديد المسترجع (Recovery)
54	❖ التحليل الإحصائي
55	الفصل الثالث: النتائج والمناقشة

55	أولاً- غربلة عزلات محلية من <i>Bacillus</i> لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز
55	1- الغربلة الأولية
55	❖ الغربلة الأولية على وسط M9 الصلب
57	❖ الغربلة الأولية على وسط M9 السائل
58	2- الغربلة الثانوية
58	❖ تقدير تركيز الأمونيا من المنحني القياسي لسلفات الأمونيوم
60	❖ قياس فعالية إنزيم الأسبارجينااز
62	ثانياً- تصنيف العزلة الأكفأ من جنس <i>Bacillus</i>
62	❖ الخواص الشكلية للبكتريا
62	❖ الخواص البيوكيميائية للبكتريا
63	❖ قابلية تخمر السكريات من قبل العزلة الأكفأ
64	ثالثاً- تعيين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز باستخدام التصميم الاحصائي RSM
64	❖ قدرة العزلة البكتيرية <i>B.licheniformis</i> على استهلاك السكريات كمصدر وحيد للكربون
64	❖ تأثير المتغيرات المدروسة على إنتاجية إنزيم الأسبارجينااز
66	❖ تحليل التجربة
68	❖ الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم
68	☒ تأثير درجة الحرارة في إنتاج الأسبارجينااز
69	☒ تأثير الرقم الهيدروجيني pH في إنتاج الأسبارجينااز
70	☒ تأثير سرعة الدوران (التهوية) في إنتاج الأسبارجينااز
70	☒ تأثير مصدر الكربون (الغلوكوز) في إنتاج الأسبارجينااز
70	☒ تأثير مصدر النيتروجين (مستخلص الخميرة) في إنتاج الأسبارجينااز
71	رابعاً- تنقية إنزيم الأسبارجينااز
71	1. المنحني القياسي لتقدير البروتين
72	2. ترسيب بروتين الإنزيم بالأسيتون
72	3. الفصل على عمود Sephadex G-100
73	4. الفصل على عمود DEAE-Sepharose
75	خامساً- تعيين الوزن الجزيئي لبروتين الأسبارجينااز باستخدام SDS-PAGE:
77	سادساً- دراسة بعض الصفات الحركية لإنزيم الأسبارجينااز المنقى المنتج من بكتريا <i>Bacillus licheniformis</i>
77	1. درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم المنقى
78	2. تحديد مجال الثبات الحراري لفعالية الإنزيم
79	3. درجة الحرارة المثلى لتخزين الإنزيم الخام
80	4. الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم المنقى
81	5. تحديد مجال الثباتية الحمضية لفعالية الإنزيم المنقى

83	6. تأثير تركيز الركيزة في فعالية الأنزيم المنقى
83	7. تأثير بعض الشوارد المعدنية في فعالية الأنزيم المنقى
84	8. تأثير مادتي EDTA و $MgCl_2$ في فعالية الأنزيم
86	سابعا- التطبيقات العملية للأنزيم
86	1. قيم ميول منحنى المعايرة
87	2. حد الكشف في جهاز HPLC
87	3. محتوى الأكريلاميد في العينات الغذائية
87	❖ محتوى الأكريلاميد في البطاطا المقلية
89	❖ محتوى الأكريلاميد في البطاطا المقرمشة (الشيبس)
90	❖ محتوى الأكريلاميد في الدونات
91	4. قيمة المسترجع
92	ثامناً- الاستنتاجات
93	تاسعاً- التوصيات
94	المراجع العلمية
94	أولاً- المراجع العربية
95	ثانياً- المراجع الأجنبية
105	الملخص الانكليزي

فهرس الجداول

الصفحة	العنوان	الجدول
11	بعض الأحياء الدقيقة المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز	1
14	الأوزان الجزيئية لإنزيم الأسبارجينااز المنتج من بعض أنواع الأحياء الدقيقة	2
33	الأجهزة المستخدمة في البحث	3
39	تراكيز محلول سلفات الأمونيوم القياسي	4
41	المتغيرات المدروسة ومستوياتها باستخدام البرنامج الإحصائي Minitab	5
42	التصميم الإحصائي للتجارب	6
45	تراكيز محلول BSA القياسي	7
48	مكونات هلامة الفصل وهلامة الرص والأحجام المستخدمة	8
51	المكونات اللازمة لحضير موكي الخلات في درجات الحموضة pH من 3-5 ونسب المحاليل المستخدمة	9
51	المكونات اللازمة لتحضير موكي فوسفات الصوديوم في درجات الحموضة pH من 6-8 ونسب المحاليل المستخدمة	10
51	المكونات اللازمة لتحضير موكي الغلايسين في درجات الحموضة pH من 9-11 ونسب المحاليل المستخدمة	11
56	كفاءة تحليل العزلات البكتيرية على وسط M9 الصلب الحاوي على صبغة الفينول الأحمر (2.5%) بكمية 0.28 مل	12
58	كثافة نمو ودرجة التلون الوردي الناتج عن العزلات البكتيرية لمعرفة قدرتها على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز	13
59	قيم الامتصاصية لتراكيز سلفات الأمونيوم المستخدمة في رسم المنحني القياسي	14
61	الفعالية الإنزيمية لعزلات بكتيريا <i>Bacillus</i> مقدرة بالوحدة/مل	15
63	بعض الاختبارات البيوكيميائية للعزلة (3)	16
63	قابلية العزلة رقم (3) على استخدام وتمثيل السكريات	17
65	فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنتج من عزلة <i>Bacillus licheniformis</i> بعد تعريضه لعدة متغيرات	18
67	التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات المدروسة في فعالية إنزيم الأسبارجينااز	19
68	التحليل الإحصائي لتباين المتغيرات المدروسة التي تؤثر في فعالية إنزيم الأسبارجينااز	20
74	مراحل التنقية لإنزيم الأسبارجينااز المنتج من <i>Bacillus licheniformis</i>	21
87	نتائج تحليل الأكريلاميد في عينات البطاطا المقلية	22
89	نتائج تحليل الأكريلاميد في عينات البطاطا المقرمشة (الشيبس).	23
90	نتائج تحليل الأكريلاميد في عينات الدونات	24

فهرس الأشكال

الشكل	العنوان	الصفحة
1	آلية عمل إنزيم الأسبارجينااز	13
2	تفاعل الحمض الأميني الاسبارجين مع السكريات المرجعة بوجود الحرارة وتشكل الأكريلاميد	28
3	البروتينات القياسية المستخدمة في الرحلان الكهربائي (BlueElf prestained protien)	49
4	قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز على وسط M9 الصلب	57
5	المنحني القياسي لسلفات الأمونيوم باستخدام طريقة نسلر	60
6	فعالية الأسبارجينااز لعزلات بكتريا <i>Bacillus</i> مقدرة بالوحدة/مل	62
7	أشكال خلايا البكتريا بعد التلوين وكما ظهرت باستخدام المجهر الضوئي	62
8	الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتيريا <i>Bacillus licheniformis</i> بواسطة البرنامج الإحصائي RSM	68
9	المنحني القياسي للبروتين باستخدام ألبومين المصل البقري (BSA)	71
10	نتائج تنقية الأسبارجينااز باستخدام هلامة Sephadex G-100	72
11	نتائج تنقية الأسبارجينااز باستخدام هلامة DEAE-Sepharose .	73
12	نتائج الرحلان الكهربائي للأجزاء الناتجة عن مراحل التنقية	75
13	المنحني القياسي الناتج عن الرحلان الكهربائي للبروتينات المعروفة الوزن الجزيئي على هلامة SDS-PAGE	76
14	تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى	77
15	تأثير درجة الحرارة في ثبات فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى	79
16	تأثير درجة حرارة التخزين في فعالية إنزيم الأسبارجينااز الخام	80
17	تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى	81
18	تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى	82
19	تأثير تركيز الركيزة (الأسبارجين) في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى	83
20	تأثير بعض الشوارد في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى	84
21	تأثير مادة $MgCl_2$ في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى	85
22	تأثير مادة EDTA في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى	86
23	معادلة المنحني المعياري للأكريلاميد	87

قائمة الاختصارات

APS	Ammonium persulphate
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
BSA	Bovine serum albumin
DEAE- Sepharose	DiethylAminoethyl –Sepharose
FDA	Food and Drug Adminstration
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LD50	Lethal Dose 50
M	Molar
nm	Nano meter
Rf	Relative mobility
RSM	Response Surface Methodology
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TCA	Tricarboxylic acid
TEMED	N,N,N,N-tetra mmethyl ethylene diamine
U	Unit
UV	Ultra Violet

الملخص

حُصل على 23 عزلة من بكتيريا *Bacillus spp* من الهيئة العامة للتقانة الحيوية مصنفة إلى مستوى الجنس وهي معزولة من ترب محلية مختلفة. عُزلت العزلات لتقييم مقدرتها على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز باستخدام وسط M9 بوجود مشعر الفينول. استخدمت أوساط سائلة لتقييم الفعالية الإنزيمية حيث قدرت الفعالية الإنزيمية بطريقة لونية باستخدام كاشف نسلر باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 450 نانومتر. أختيرت العزلة (3) وهي الأكفأ وتم تحديد نوعها بالاعتماد على تصنيف Bergey من حيث الصفات الشكلية والحيوية. وتبين أنها تنتمي للنوع (*Bacillus licheniformis*). أجريت أمثلة ظروف إنتاج إنزيم الأسبارجينااز المُنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* باستخدام مادة الأسبارجين كركيزة وفق طريقة التخمير المغمر، باستخدام برنامج التحليل الإحصائي Minitab والتصميم الإحصائي (RSM) Response Surface Methodology وقد أعطت العزلة المدروسة أعلى فعالية للإنزيم عند حرارة الحضانة 30°م، pH 9، وسرعة دوران 150 دورة/دقيقة، بتركيز 1.5% لمصدر الكربون (الغلوكوز)، وتركيز 2.5% لمصدر النيتروجين (مستخلص الخميرة) حيث بلغت الفعالية عند هذه الظروف 1481.92 وحدة/مل.

أجريت عملية التنقية لإنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* بدءاً من الترسيب بالأسيتون بتركيز 80% ثم باستخدام عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 ثم عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Sepharose. بلغ الوزن الجزيئي 34.4 كيلو دالتون عند استخدام هلام SDS-PAGE.

درس تأثير كل من درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وتركيز الركيزة (asparagine) وتركيز بعض الشوارد المعدنية (Cu^+ ، Na^+ ، Hg^{+2} ، Mg^{+2} ، Mn^{+2} ، Ag^+ ، Ca^{+2} ، Co^{+2} ، Fe^{+3} ، Zn^{+2}) في فعالية إنزيم الأسبارجينااز النقي المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* المعزولة من تربة محلية. وجد أن الفعالية العظمى للإنزيم كانت عند درجة الحرارة 60°م والرقم الهيدروجيني 9 وتركيز 1 مول/مل من الركيزة (الأسبارجين) وقد بقي الأنزيم مستقراً ضمن مجال درجة الحرارة 30-60°م والرقم الهيدروجيني 8-9 لمدة 60 دقيقة. كما تبين أن الشوارد المعدنية (Co^{+2} ، Mn^{+2} ، Ag^+ ، Na^+ ، Fe^{+3})، Mg^{+2} بتركيز 1 ميلي مول/مل أدت إلى زيادة نشاط إنزيم الأسبارجينااز، بينما الشوارد المعدنية (Zn^{+2} ، Hg^{+2} ، Ca^{+2} ، Cu^{+2}) بتركيز 1 ميلي مول/مل أدت إلى خفض نشاط إنزيم الأسبارجينااز. أعطى

تركيز 1 ميلي مول/مل من مركب $MgCl_2$ أعلى نشاط إنزيمي، بينما مركب EDTA بتركيز 0.8 ميلي مول/مل أدى إلى خفض نشاط الإنزيم.

تمَّ اختبار كفاءة الأسبارجينااز المنقى والمنتج من بكتيريا *Bacillus licheniformis* في تخفيض كمية الأكريلاميد الناتج عن تفاعل ميلارد نتيجة عملية القلي لمجموعة من الأغذية تضمَّنت البطاطا المقلية، والشيبس، والدونات. وقيست كمية الأكريلاميد المتشكلة بعد عملية القلي في العينات المعاملة بالأسبارجينااز وقورنت بالكمية المتشكلة في عينات الشاهد غير المعاملة بالإنزيم. وقد أظهرت النتائج انخفاض كمية الأكريلاميد المتشكل في العينات المعاملة بالأسبارجينااز بنسب 50.17% و 46.76% و 40.63% في كل من البطاطا المقلية والشيبس والدونات على التوالي بالمقارنة مع عينات الشاهد غير المعاملة.

الكلمات المفتاحية: تشخيص، *Bacillus licheniformis*، أسبارجين، أسبارجينااز، فعالية إنزيمية، ظروف مُثلى، تخمير مغمور، تنقية، وزن جزيئي، ثباتية إنزيمية، أكريلاميد، تفاعل ميلارد

أولاً- المقدمة:

شهدت العقود الأخيرة من القرن الماضي تطوراً كبيراً في إنتاج الإنزيمات، وخاصة ذات المصادر الميكروبية، وبرغم محدودية الأحياء الدقيقة المستخدمة في الإنتاج الصناعي للإنزيمات إلا أن التوجه يزداد يوماً بعد آخر في استغلال التطورات الهائلة في مجالات التقانات الحيوية لإنتاج إنزيمات بمواصفات وكميات تلبي احتياجات الأسواق العالمية. تعد الإنزيمات عوامل محفزة مسؤولة عن عدد من التحولات الكيميائية الضرورية لاستمرارية الحياة، كما أن لها دوراً هاماً في تطبيقات التقانات الحيوية من خلال استخدامها في الصناعات المختلفة من الغذائية والدوائية والتجميلية والنسجية ... إلخ.

نالت قدرة الأحياء الدقيقة على إنتاج مواد ذات أهمية تطبيقية كالإنزيمات والمضادات الحيوية، وغيرها من المركبات اهتمام العديد من الباحثين لاكتشاف وعزل سلالات مختلفة من هذه الأحياء ذات الكفاءة العالية في إنتاج الإنزيمات واستخدامها في العديد من المجالات. تمتاز الأحياء الدقيقة مقارنة بالكائنات الأخرى كالحوانية والنباتية بسرعة النمو والتكاثر وقدرتها على إنتاج الإنزيمات، ورخص المواد الأولية لتتميتها، فضلاً عن إمكانية تحسين إنتاج هذه الإنزيمات من خلال التحكم بشروط الوسط للوصول إلى الظروف البيئية والتغذوية المثلى للإنتاج، وكذلك تتفوق الأحياء الدقيقة بإنتاجها أنواعاً كثيرة ومختلفة من الإنزيمات مقارنة بتلك التي يمكن الحصول عليها من المصادر الحيوانية والنباتية وينتج إنزيم الأسبارجينااز من قبل أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة كالبكتريا والخمائر والفطريات، وتشكل البكتريا مصدراً رئيسياً لإنتاج الإنزيم، ولاسيما البكتريا التي تعد مصدراً غنياً في إنتاج الإنزيمات الصناعية والدوائية.

يتبع إنزيم الأسبارجينااز إلى إنزيمات الحلمهة، فهو يعمل على حلمهة الحمض الأميني الأسبارجين إلى حمض الإسبارتيك والأمونيا. يتمتع إنزيم الأسبارجينااز ذو المصدر الميكروبي بأهمية قصوى لما يمتاز به من خصائص متعددة جعلته يؤدي دوراً مهماً في التطبيقات المختلفة من النواحي الغذائية والدوائية، إذ يعمل الإنزيم في المجال الغذائي على تقليل كمية الأكريلاميد المتشكل في الأغذية الحاوية على السكريات عند تعريضها للحرارة العالية ولاسيما أغذية الأطفال، والذي يعد إحدى المسببات الرئيسية لحدوث السرطان أما في المجال الدوائي فيستخدم الإنزيم من أجل الحصول على أدوية لمعالجة مرض السرطان.

ثانياً - مبررات البحث :

نظراً للأهمية التطبيقية الغذائية والدوائية لإنزيم الأسبارجينااز ولعدم توفر الإنزيم تجارياً في الأسواق المحلية، اتجهت الدراسة نحو إنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus* وتطبيقه في الصناعات الغذائية .

ثالثاً - أهداف البحث :

هدفت الدراسة إلى:

1. غرلة العزلات البكتيرية التابعة لجنس *Bacillus* المعزولة من ترب محلية وتشخيص العزلة الأكفأ في إنتاج الأسبارجينااز.
2. الحصول على ظروف مثلى لنمو البكتريا وإنتاج الأسبارجينااز (درجة الحرارة، درجة الحموضة، سرعة دوران، تأثير المصدر الكربوني، تأثير مصدر النيتروجين) باستخدام التصميم الإحصائي RSM (Response Surface Methodology).
3. تنقية إنزيم الأسبارجينااز ودراسة ثباتية الإنزيم النقي.
4. تطبيق الإنزيم النقي في الصناعات الغذائية لتحديد مدى قدرته في تخفيض الأكريلاميد المتشكل في الأغذية النشوية المقلية.

الفصل الأول: الدراسة المرجعية:

أولاً- كيمياء الأنزيمات:

تعد البروتينات مركبات عضوية معقدة تتكون من عدد من الأحماض الأمينية المرتبطة بروابط ببتيدية، وتتواجد في جميع الكائنات الحية الحيوانية والنباتية والأحياء الدقيقة، ويعود التنوع في البروتينات إلى الاختلاف في تسلسل الأحماض الأمينية وعددها وأنواعها، حيث تعتبر البروتينات ذات أهمية كبيرة لكونها تدخل في تركيب المادة الحية. أثبتت الطبيعة البروتينية للإنزيمات في نهاية الربع الأول من القرن العشرين، ودخلت حيز الاستخدام التجاري والصناعي والطبي والغذائي (Genton et al., 2010, 413). عرفت أهمية الإنزيمات منذ آلاف السنين، حيث استخدمها الإنسان قديماً على هيئة أنسجة نباتية أو حيوانية غنية بالإنزيمات، أو على هيئة أحياء دقيقة في صناعة الخبز، الخل، النبيذ، منتجات الحليب، وغيرها، يعتبر تخمر السكر إلى كحول باستخدام الخميرة من أقدم الأمثلة على الصناعات الحيوية، إلا أنه لم يتم فهم آلية عمل الإنزيمات حتى القرن التاسع عشر، وذلك لعدم إمكانية تحضير إنزيمات بصورة نقية لدراسة صفاتها وآلية عملها. ساهم التقدم العلمي في عدة مجالات في تحديد التركيب الكيميائي للإنزيمات وبنيتها وصفاتها الحركية واستخداماتها التطبيقية، وأطلق عليها من قبل العالم Willy Kuhne عام 1876 مصطلح إنزيم، الذي يعني باللغة الإغريقية "داخل الخميرة" In yeast فالمقطع "in" يعني "في" والمقطع "zyme" الكائن الحي، حيث كانت الخميرة هي المادة الرئيسية للأبحاث آنذاك لأهميتها في صناعات التخمر. تمت أول عملية عزل للإنزيمات عام 1833 من قبل العالمان الفرنسيان Payen و Persoz حيث تمكنا من عزل مركباً أنزيمياً من المالت (الشعير المنبت) استطاع تفكيك جزيئة النشاء ثم توالى الدارسات التي قادت إلى ظهور مدرستين مختلفتين الأولى يقودها عالم الأحياء الدقيقة Pasteur، والثانية يقودها الكيميائي Liebig، تدعم المدرسة الأولى النظرية الحيوية للإنزيمات التي مفادها ضرورة وجود الخميرة الحية في الوسط لكي يحدث التخمر أما الثانية فتبنت النظرية غير الحياتية التي تفيد بعدم ضرورة وجود الكائن الحي، ولم يتم حسم النقاش إلا عندما أثبت العالم Buchner عام 1897 أن مستخلص الخميرة بدون خلايا قادر على تحويل الغلوكوز إلى إيتانول وثاني أكسيد الكربون تماماً كما تفعل الخميرة الحية، وهذا يعني أن عملية التخمر تجري بوجود مادة غير حية داخل الخلية، وليست بسبب الخلية الحية نفسها، وسميت هذه المادة بالإنزيم (2004,

(Purves et al., 139). تمتلك جميع المحفزات الحيوية الكيميائية طبيعة بروتينية إلا أنها ليست جميعها إنزيمات (Raymond et al., 2006, 273). تم التعرف على الطبيعة البروتينية للإنزيمات في بداية عام 1800م، حيث كشفت البنية الببتيدية للبروتين، والتي يعود الفضل فيها إلى Fischer and Hofmeister. لم تكن التقنيات تسمح في الحصول على الإنزيمات بشكل نقي، كما أنه لم يكن هناك إجماع على أن الإنزيمات هي بروتينات حتى عام 1926م عندما عمل Sumner على بلورة إنزيم اليوريز، وفي عام 1930 عزل Northrop وآخرون إنزيم الببسين حيث أثبتوا أيضاً الطبيعة البروتينية للإنزيمات. تم التعرف على أغلب الحموض الأمينية في بداية القرن العشرين بعد أن توفرت تقنيات وطرائق حديثة لتحليل الحموض الأمينية، حيث حقق Stein و Moor قفزة كبيرة عندما تمكنا من فصل الأحماض الأمينية باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الشاردي، كما تم تحديد تسلسل الحموض الأمينية للأنسولين من قبل Anger و Tuppy في عام 1950م. يطلق على المعقد الإنزيمي بالإنزيم الكلي Holoenzyme عندما يتكون من جزء بروتيني Apoenzyme وجزئية عضوية منخفضة الوزن الجزيئي هي المساعد الإنزيمي Coenzyme أو المجموعة الملحقة Prosthetic group:

$$\text{Holoenzyme} \leftarrow \text{Coenzyme} + \text{Apoenzyme}$$

(Berg et al., 2006, 303)

تعد الإنزيمات من أهم العوامل البيولوجية المساعدة في الصناعات الكيميائية، والغذائية بسبب تخصصها وكفاءتها العالية، وهي عموماً من العوامل المحفزة (Ashie.2003,44)، وذات طبيعة بروتينية وتكون مسؤولة عن عدد من التحولات الكيميائية الضرورية لاستمرارية الحياة، وعادة ما يقوم كل إنزيم بتحفيز خطوة محددة من خطوات المسارات الاستقلابية في الكائنات الحية (Bruice and Benkovic, 2000,6267). وللإنزيمات تطبيقات صناعية عديدة، كاستخدام إنزيمات الأميلاز في صناعة النبيذ والخبز والنسيج (Pandey, 2004,309)، كما استخدمت إنزيمات البروتياز في التخمير وتطرية اللحوم وفي صناعة المنظفات الصناعية (Godfrey and West, 1996,1)، في حين استخدمت إنزيمات الرينين في صناعة الجبن (Shieh et al., 2009,85)، إضافة إلى ذلك أنتج الإيثانول من السيلولوز الخشبي (Zaldivar et al., 2001,17). حالياً تستخدم العديد من الإنزيمات في الصناعات الدوائية كالأسبارجيناز (Narayana et al., 2008,331; Broom.,1963,99).

ثانياً - تسمية الأنزيمات وتصنيفها:

ازدادت أعداد الإنزيمات المكتشفة بشكل كبير بعد عام 1950 م، وأعطيت أسماء مختلفة لكل إنزيم تمت دراسته من قبل باحثين مختلفين. لم تكن تشير إلى طبيعة التفاعل الذي يقوم الإنزيم بتحفيزه، وكان من الضروري إيجاد نظام موحد لتسمية الإنزيمات، لهذا عمل الاتحاد العالمي للإنزيمات (International Commission on Enzymes) منذ عام 1961م وتحت رعاية الاتحاد العالمي للكيميائيين الحيويين (IUB) International Union of Biochemistry على تحديد أسس تصنيف وتسمية الإنزيمات، وتعريف وحدة الفعالية لكل منها وطرائق تقدير فعاليتها. تسمى الإنزيمات عادة حسب التفاعل الذي تحفزه، وتضاف اللاحقة ase إلى نهاية اسم الركيزة أو إلى نوع التفاعل الذي يتم تحفيزه وتستثنى من هذه القاعدة بعض الإنزيمات التي اكتشفت قديماً مثل أنزيمات الببسين والتربسين والرينين (Dunaway, 2008,1599).

يمتلك إنزيم الأسبارجيناز تسميات عديدة منها (Colaspase, Elasper, Leunase, Crasnitin (L-asparaginase, α -asparaginase ولكن الاسم الأكثر شيوعاً له، والذي أطلقته لجنة الإنزيمات التابعة للاتحاد العالمي للكيميائيين الحيويين تسمية إنزيم L-asparaginase ذو الرقم (EC 3.5.1.1) وعلى أساسه سمي الإنزيم بهذا الاسم (NC- IUBMB,2017,86).

وصنفت الإنزيمات حسب آلية عملها إلى ست مجموعات رئيسية (Moss, 2006):

1. إنزيمات الأكسدة والإرجاع Oxidoreductases: تحفز تفاعلات الأكسدة والإرجاع، حيث يتم من خلالها انتقال الإلكترونات، ومن الأمثلة عليها إنزيم Oxidase.
2. إنزيمات النقل Transferases: تحفز هذه الإنزيمات نقل مجموعات وظيفية محددة من مادة إلى أخرى والاسم الشائع لهذه الإنزيمات Group transferase.
3. إنزيمات الحلمة Hydrolases: تحفز هذه الإنزيمات حلمة أو تفكيك روابط مختلفة مثل C-C، C-N، C-O وبعض الروابط الأخرى. يتم من خلال هذه الإنزيمات إضافة ماء. ويتبع إنزيم الأسبارجيناز إلى هذه المجموعة.
4. إنزيمات التفكيك Lyases: تحفز هذه الإنزيمات فك روابط مختلفة مثل C-N، C-O، C-C وروابط أخرى بطرق أخرى غير الحلمة والأكسدة. يتم من خلال هذه الإنزيمات تفكيك أو تشكل روابط C=C.

5. إنزيمات التماكب Isomerases: تحفز هذه الإنزيمات تغيير بنية المادة ضمن الجزيئة الواحدة، وتسمى هذه الإنزيمات حسب نوع التماكب Isomerase، Racemase.
6. إنزيمات الربط ligases: تحفز إنزيمات الربط وصل جزيئتين مع بعضهما بروابط تساهمية (Covalent bonds).

تصنف الإنزيمات الميكروبية حسب طبيعة إنتاجها إلى نوعين أساسيين فهي إما أن تكون أنزيمات مستديمة (constitutive) تنتجها الخلية الميكروبية باستمرار وبكميات كبيرة خلال المراحل المختلفة للنمو بغض النظر عن تركيب الوسط الغذائي أو المادة التي تنمو عليها الخلايا كإنزيمات السلسلة التنفسية ودورة الحامض الثلاثي الكربوكسيل TCA وإنزيمات Glycolysis وإنزيمات التحلل السكري، أو أن تكون مستحثة (induced) وهذه لا تفرز إلا بوجود ركيزة تعمل عليها في وسط النمو أو بعض المواد القريبة منها كيميائياً، والتي تسمى بالمادة الحاث Inducer إذ تؤدي تلك المادة دوراً هاماً في تحفيز الخلية الميكروبية على إنتاج الأنزيم، والاعتقاد الحديث أن الإنزيمات المستحثة موجودة أصلاً في الخلية ولكن بكميات قليلة جداً، وإن وجود الركيزة المناسبة لها تعمل على تعجيل تخليقه ومن الأمثلة على ذلك إنتاج إنزيم الأسبارجينااز عند وجود المادة الأساس في الوسط الزراعي وهي الحمض الأميني الأسبارجين، إذ تشير العديد من المراجع إلى أن إنزيم الأسبارجينااز من الإنزيمات المستحثة إذ يتحفز إنتاجه عند وجود الأسبارجين في وسط النمو (Verma et al., 2007,45; Cachumba et al., 2016,77; Feng et al., 2017,1509).

تختلف مرحلة إنتاج الإنزيمات في جميع الكائنات الدقيقة فهي إما أن تفرز في المراحل الأولى من مراحل نمو الكائن المجهرى أو في المراحل المتأخرة. كما أنها قد تفرز إلى خارج الخلية وتسمى عندئذ بالإنزيمات خارج الخلوية Extracellular enzyme، وهذه لا تحتاج إلى خطوات استخلاص، أو أنها تبقى داخل الخلية وتسمى في هذه الحالة بالإنزيمات داخل الخلوية Intracellular enzyme، وهي تحتاج إلى خطوات استخلاص معينة قبل تنقيتها واستخدامها (الخفاجي، 1990، 702). يعد إنزيم الأسبارجينااز من الإنزيمات الخارجية Extracellular enzyme، فهو لا يحتاج إلى خطوات لتحطيم جدران الخلايا البكتيرية (Moorthy et al., 2010,1862; Ebrahiminezhad et al., 2011,307; Thakur et al., 2014,12; Feng et al., 2017,1509).

ثالثاً- لمحة تاريخية عن إنزيم الأسبارجينااز:

يعود تاريخ استكشاف إنزيم الأسبارجينااز لأول مرة إلى عام 1953، حيث أجريت أبحاث ودراسات حول معالجة الفئران والجرذان المصابة بسرطان الدم بمصل من دم خنازير غينيا، فأثبتت التجارب أن السرطان بدأ بالتراجع بشكل تدريجي، وبعد التحري عن السبب اكتشف الباحثون أن مصل دم هذه الخنازير يحتوي على إنزيم الأسبارجينااز الذي عمل على تراجع المرض، وكانت هذه نقطة الانطلاق لاستثمار هذا الإنزيم في المجال الدوائي (Broom.,1963,99)، بينما استخدم هذا الإنزيم في المجال الغذائي من قبل الباحث Zyzak وآخرون عام (4782,2003) ليثبت علمياً أن الأسبارجين هو المسبب الرئيسي لتشكيل الأكريلاميد، حيث قام باستخدام الأسبارجينااز التجاري (A2925) المنتج من بكتريا *Erwinia chrysanthemi* على عجينة البطاطا المسلوقة المقلية بكمية 50 وحدة لكل 60 غ من البطاطا، فتوصل إلى أن هذا الإنزيم عمل على تخفيض 88% من الأسبارجين الموجود في البطاطا والذي أدى إلى تقليل 99% من كمية الأكريلاميد في البطاطا المقلية. أجريت دراسة في عام 2004 للحد من الأكريلاميد المتشكل في الأغذية المقلية باستخدام إنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتريا *E.coli* حيث تمت إضافته إلى خبز الزنجبيل بكمية 4 وحدة/كغ، فوجد أن هذا الإنزيم عمل على تخفيض 75% من كمية الأسبارجين والذي أدى إلى تقليل 55% من كمية الأكريلاميد في المنتج النهائي (Amrein et al., 2004,4282). بينت النتائج في دراسة عام 2006 أجريت على تطبيق الإنزيم على بودرة البطاطا المجففة حيث أدى إلى تخفيض 90% من الأكريلاميد في المنتج النهائي (Ciesarová et al., 2006,141). أجري عام 2008 دراسة عن تطبيق الإنزيم على أصابع البطاطا المقلية بزيت عباد الشمس فأدى ذلك إلى تخفيض 67% من الأكريلاميد في المنتج النهائي (Pedreschi et al.,2008,386). أظهرت دراسة عام 2013 أجريت حول تطبيق الإنزيم على مختلف أنواع الحبوب ومنتجاتها بما فيها حبوب القهوة الخضراء بكمية 2000-6000 وحدة، فعمل الإنزيم على تخفيض الأكريلاميد بنسبة 55-74% في حبوب القهوة المحمصة (Hendriksen et al., 2009,4168). تعاقبت دراسات الباحثين لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من المصادر الميكروبية المختلفة والبكتيرية على وجه الخصوص لكون الأجناس البكتيرية بأنواعها العديدة هي المصدر الرئيسي لإنتاج هذا الإنزيم (Peterson and Ciegler,1969,929). تعد بكتريا *Bacillus* مصدراً هاماً لهذا الإنزيم فعلى سبيل الذكر بين كلاً من Moorthy وآخرون (1862,2010) و Pradhan وآخرون (36,2013) و Mahajan وآخرون (125,2012) قدرة أنواع مختلفة من الجنس البكتيري *Bacillus* على إنتاج إنزيم

الأسبارجينااز، ودراسة خواصه وظروف إنتاجه، في حين شهدت العقود الثلاث الأخيرة من القرن الماضي تطوراً كبيراً في إنتاج إنزيم الأسبارجينااز وتعدد مصادر إنتاج هذا الإنزيم وخاصة الأحياء الدقيقة (Ebeed and Abu-Taleb.2014,476; Narayana et al.,2008,331; Khamna et al.,) (2009,22). تمكن Sudhir وآخرون (2504,2014) من إنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus licheniformis* المعدلة وراثياً بفعالية إنزيمية بلغت 407.7 وحدة/مل. كما تمكن Feng وآخرون (1509,2017) من تحفيز إنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus subtilis* بفعالية مقدارها 407.62 وحدة/مل، بينما أنتج Cachumba وآخرون (77,2016) الإنزيم من بكتريا *Bacillus aryabhattai* بفعالية مقدارها 680.5 وحدة/مل.

رابعاً - مصادر إنزيم الأسبارجينااز:

تنتج الإنزيمات من مصادر مختلفة، وعلى الرغم من وجود أكثر من 2000 إنزيماً معروفاً حتى يومنا هذا إلا أن حوالي 50 إنزيماً فقط يتم إنتاجها تجارياً (Srivastava et al.,2010,1). تمت دراسة إنتاج الإنزيم من قبل الأحياء الدقيقة المختلفة وقد حظي الإنزيم المنتج من هذه المصادر بدراسات واسعة من حيث الإنتاج والتنقية والتوصيف وإمكانية استعماله في مجالات متعددة في الصناعات الغذائية والصناعية والدوائية، وذلك لأسباب عديدة منها سهولة التعامل مع الأحياء الدقيقة، ووفرة إنتاجها من الأنزيم، وقصر المدة اللازمة للإنتاج، ورخص أوساط النمو وبساطة عملية الغرلة والعزل وسهولة استخلاص وتركيز وتنقية الإنزيم ودراسة صفاته وإمكانية إنتاجه على نطاق تجاري (Amena et al., 2010,173).

تشير العديد من المراجع العلمية إلى وجود إنزيم الأسبارجينااز في أنسجة الحيوانات كالأسمك، الجرذان، خنازير غينا، البنكرياس، الكبد، الدماغ، المبيض، الطحال، الرئة، الخصية والكلى للعديد من الثدييات والطيور (Aghaiypour et al., 2001,55)، كما سجل وجوده في النباتات كالبازيلاء *Pisum sativum* (Allison et al.,1972,66) وفي الفاصولياء *Phaseolus vulgaris* (Mohamed et al., 2015,6)، ويبين الجدول (1) بعض الأحياء الدقيقة المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز.

الجدول (1) يبين بعض الأحياء الدقيقة المنتجة لإنزيم الأسبارجيناز.

المرجع	الكائن الحي		الأحياء الدقيقة
	النوع	الجنس	
Pradhan et al.,2013,36	<i>Bacillus spp</i>	<i>Bacillus</i>	البكتريا
Mahajan et al.,2014,11	<i>B. licheniformis</i>		
Feng et al.,2017,1509	<i>B. subtilis</i>		
Prakasham et al.,2010,72	<i>B. circulans</i>		
Roth.2013,30	<i>E. carotovora</i>	<i>Erwinia</i>	
Pieters et al.,2011,238	<i>E. chrysanthemi</i>		
Broome.1963,99	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia</i>	
Kavitha and Vjayalakshmi, 2010,528	<i>S. tendae TK-VL-333</i>	<i>Streptomyces</i>	
Amena et al.,2010,173	<i>S. gulbargensis</i>		
Narayana et al.,2008,331	<i>S. albidoflavus</i>		
El-Bessoumyet al.,2004,387	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i>	
Manna et al.,1995,291	<i>P. stutzeri</i>		
Nawaz et al.,1998,568	<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter</i>	
Mukherjee et al.,2000,180	<i>E. aerogenes</i>		
Stern et al.,1976,719	<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia</i>	
Stern et al.,1976,719	<i>Alkaliens eutrophus</i>	<i>Alkaliens</i>	
Stern et al.,1976,719	<i>Acinetobacter glutaminasificans</i>	<i>Acinetobacter</i>	
Stern et al.,1976,719	<i>Proteus vulgaricus</i>	<i>Proteus</i>	
Pattnaik et al.,2000,1143	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Aeromonas</i>	
Bansal et al.,2010,375	<i>Th. thermophilus</i>	<i>Thermus</i>	
Dias et al.,2016,785	<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus</i>	الفطريات
Bascomb et al.,1975,1	<i>A. terreus</i>		
Basha et al.,2009,53	<i>A. nidulans</i>		
Dhevagi and Poorani,2006,514	<i>Marine actinomycetes</i>		actinomycetes
Bansal et al.,2010,375	<i>C. utilis</i>	<i>Candida</i>	الخمائر
Dunlop and Roon.,1975,1017	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces</i>	

خامساً - مجموعة بكتريا *Bacillus*:

إن جنس البكتريا العصوية مجموعة كبيرة تتبع إلى مملكة *Eubacteria*، شعبة *Firmicutes*، صف *Bacili*، رتبة *Bacillales*، عائلة *Bacillaceae* و جنس *Bacillus* (De vos et al., 2009,420). يضم جنس العصويات حوالي 148 نوعاً، كما يضم أنواعاً ذات أثر هام في مجال زيادة خصوبة التربة نظراً لأهميتها في دورة النيتروجين (Belma et al., 2002,41)، ويمكن الاستفادة من بعض أنواعها في إنتاج الصادات الحيوية البكتيرية والفطرية وبعض الإنزيمات

الصناعية وفي إنتاج المبيدات الحيوية للحشرات. يوجد عدد كبير من العصيات بخصائص فيزيولوجية وبعوائل مختلفة جداً (التربة، الغبار...)، كما تتواجد أنواع معينة في الماء العذب وأخرى في مياه البحار، وأنواع محبة للحرارة، وأنواع محبة للحموضة، محبة للبرودة، محبة للقلوية (Esbelin, 2009,23). تتصف بكتريا العصيات بأنها متبوعة، تشكل أبواغاً ذات أشكال مختلفة مقاومة لمختلف الظروف البيئية. ويمكن تقسيم أنواع *Bacillus sp.* بشكل واسع اعتماداً على الخصائص الشكلية للأبواغ كحجمها وشكلها ومكان وضعها في الخلية إلى 3 مجموعات رئيسية وهي (Health Protection Agency. 2007):

1. المجموعة الأولى: تنتج أبواغاً بيضوية أو دائرية (كروية) الشكل ذات توضع مركزي أو طرفي، وتكون غير منتفخة.

B. cereus - B. anthracis - B. mycoides - B. megaterium - B. thuringiensis - B. licheniformis

2. المجموعة الثانية: تملك أبواغاً إهليلجية مركزية أو تحت طرفية، وتكون منتفخة.

B. alvei - B. circulans - B. subtilis - B. macerans - B. pumilus - B. coagulans - B. brevis.

3. المجموعة الثالثة: تملك أبواغاً كروية طرفية أو تحت طرفية، وتكون منتفخة.

B. sphaericus.

ومن أهم أنواع جنس *Bacillus* نوع *Bacillus licheniformis*:

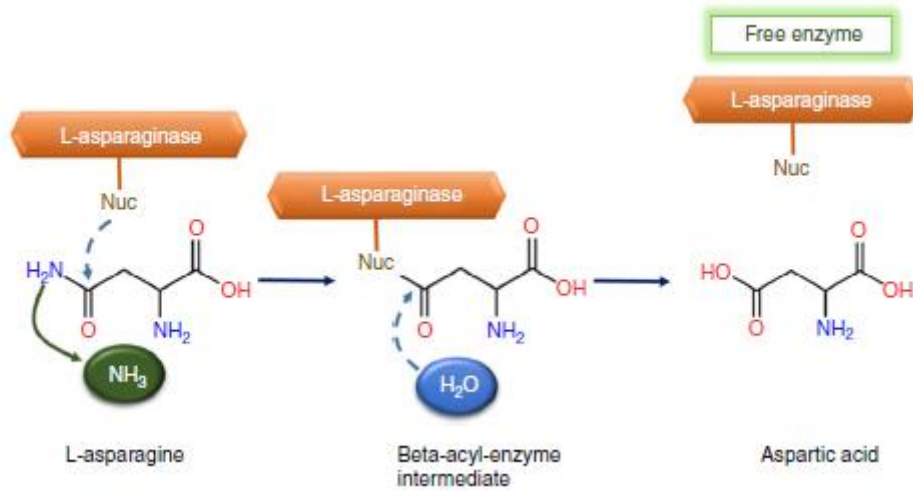
تعتبر التربة والمياه وريش الطيور الموطن الأصلي لها، وهي بكتيريا موجبة الغرام. المستعمرات الناتجة عن نموها بيضاء أو كريمية اللون، مستديرة وغير منتظمة الشكل، سطحها خشن تتراوح أبعادها بين (2.5 × 10 ميكرون)، لخلاياها القدرة على الحركة، لاهوائية اختياريًا وهذا مايفسر قدرتها على النمو في مجالات وبيئات مختلفة. محبة للملحة، متبوعة قادرة على تشكيل أبواغ بيضوية مركزية أو تحت طرفية، تساعد هذه الأبواغ على مقاومة الظروف البيئية غير الملائمة لنموها. قادرة على تخمير السكريات مثل سكر اللاكتوز، الغلوكوز والمانيتول، وإفراز إنزيمات خارج خلوية. وتعد هذه البكتريا من أفضل الأنواع البكتيرية في إنتاج العديد من الإنزيمات الصناعية كالأسبارجينااز والسيلولاز والبروتياز... إلخ. (Bergy et al., 2012, 537).

سادساً- آلية عمل إنزيم الأسبارجينااز وخواصه:

يتبع إنزيم الاسبارجينااز إلى إنزيمات الحلمهة، فهو يعمل على حلمهة الحمض الأميني الأسبارجين إلى حمض الإسبارتك والأمونيا (Narayana et al., 2008, 331) وفق التفاعل:



حيث تحدث عملية التحلل المائي للأسبارجين بشكل عام في خطوتين بوجود وسيط هو إنزيم بيتا أسيل كما هو موضح في الشكل (1). في الخطوة الأولى يتم تنشيط ثمالة موقع مركز الجزيئة (nucleophilic) التي لها ميل في وهب الالكترونات من قبل قاعدة قوية (قلوي) وتهاجم جزء الأميد لذرة الكربون في الأسبارجين (الركيزة) مولدة بذلك منتج وسيط وهو أنزيم بيتا أسيل، بينما تتم الخطوة الثانية من خلال مهاجمة الكربون المؤستر الذي شُكل بواسطة النوكليوفيل المنشط من قبل جزيئة ماء حيث ينتج الأسبارتك أسيد .



الشكل (1) يوضح آلية عمل إنزيم الأسبارجينااز (Cachumba et al., 2016).

سجل Swain وآخرون (1993,1474) أن البنية البلورية لإنزيم الأسبارجينااز بنية مكونة من أربعة وحدات متجانسة تابعة لصنف β/α ، حيث يوجد تحت وحدتين ذات سمات بنيوية فريدة على كل مجال، واقترحوا أن الموقع الفعال بين مجالات N و C الطرفية ينتمي إلى تحت وحدات مختلفة. اقترحت Ramya وآخرون (2012) أن معظم إنزيمات L-asparaginase المنتجة من البكتريا تتشابه بالتركيب الثالثي والرابعي وكذلك بالخصائص البيوكيميائية الشائعة. وفقاً لـ Yun وآخرون (2007,794) يمكن اعتبار أن كامل جزيئة الإنزيم كمثلي لثنائيات مرتبة بشكل غير متناظر في اثنتين من الرباعيات وتمتلك 8 وحدات (monomers) تتموضع في الموقع الفعال حيث يحتوي الموقع الفعال لإنزيم الأسبارجينااز على أحماض أمينية متنوعة وهي التيرونين Threonine، التيروسين Tyrosine، السيرين Serine، الغلوتامات Glutamate، الاسباراتات Aspartate، الألانين Alanine، الليسين Lysine، وثمانية سيرين لموقع فعال واحد من المونومير المجاور Adjacent monomer.

يختلف تركيب الإنزيم ومحتواه من الأحماض الأمينية تبعاً لاختلاف مصدره، حيث أثبت Moorthy وآخرون (1862,2010) و Qeshmi وآخرون (12,2015) أن الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجينااز من جنس *Bacillus* يتراوح بين 37-140 كيلودالتون مقدرة بطريقة الترحيل الكهربائي SDS PAGE. أكد Sudhir وآخرون (2504,2014) أن الوزن الجزيئي لهذا الإنزيم من بكتريا *Bacillus licheniformis* 37 كيلودالتون. أكد Praksham وآخرون (72,2010) أن الوزن الجزيئي لهذا الإنزيم من بكتريا *Bacillus circulans* 140 كيلودالتون. ويبين الجدول (2) الأوزان الجزيئية لإنزيم الأسبارجينااز المنتج من أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة.

الجدول (2) يبين الأوزان الجزيئية لإنزيم الأسبارجينااز المنتج من بعض أنواع الأحياء الدقيقة.

المرجع	الوزن الجزيئي (kDa)	مصدر إنزيم الأسبارجينااز
Moorthy et al.,2010,1862	45	<i>Bacillus spp</i>
Qeshmi et al.,2015,12	38	<i>Bacillus sp PG02</i>
Sudhir et al.,2014,2504	37	<i>Bacillus licheniformis</i>
Praksham et al.,2010,72	140	<i>Bacillus circulans</i>
Dhevagi and Poorani,2006,514	140	<i>Marine actinomycetes</i>
Amena et al.,2010,173	85	<i>Streptomyces gulbargensis</i>
Kavitha and Vijayalakshmi, 2010,528	97.4	<i>Streptomyces tendae TK-VL-333</i>
Roth.2013,245	34.5	<i>Erwinia carotovora</i>
Pieters et al.,2011,238	35	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
Broome JD.1963,99	140	<i>Escherichia coli</i>
Dias et al.,2016,785	115	<i>Aspergillus oryzae</i>
Stern et al.,1976,719	171-180	<i>Serratia marcescens</i>
El-Bessoumy et al.,2004,387	122	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Stern et al.,1976,719	150	<i>Alkaliens eutrophus</i>
Lubkowski et al.,1994,826	120	<i>Acinetobacter glutaminasificans</i>
Davidson et al.,1977,282	140	<i>Citrobacter freundii</i>
Distasio et al.,1982,343	146	<i>Vibrio succinogenes</i>

سابعاً- عزل وتنقية البكتريا المنتجة للأسبارجينااز:

لغرض تشجيع أي كائن دقيق على إنتاج إنزيم ما ينبغي في البداية عزل هذا الكائن بصورة نقية، بحيث يصبح في بيئته المخبرية الجديدة معزولاً عن غيره من الكائنات الحية بشكل مفرد ونقي، وتسمى هذه العملية بعملية العزل في مزارع نقية (Isolation in pure cultures) وهي خطوة لها أهميتها الاستثنائية لتجنب أخطاء التشخيص أو الدراسات الفيزيولوجية والحيوية المصاحبة لاستخدام هذا

الكائن الدقيق (Maheshwari et al., 2000,461)، وتسمى المزرعة النقية هذه بالعزلة (Isolate) لحين تشخيصها على مستوى الجنس والنوع من خلال دراسة خواصها المظهرية والمزرعية والفيزيولوجية وغيرها، وإذا ما أبدت عزلتان نقيتان أو أكثر تنتمي إلى جنس ونوع واحد تبايناً في صفة معينة يتوجب تسمية هذه العزلات بالسلالات (Strains). (Ruangpan and Tendencia, 2004,3). يتطلب العزل معرفة صفة مسبقة تتخذ كعامل انتخاب عند عزل الأحياء الدقيقة عن بيئتها الطبيعية كالتربة والماء والهواء (العاني، 1992، 37)، هناك العديد من التقنيات لعزل الأحياء الدقيقة الصناعية، وتعد تقنية المزرعة المدعمة Enrichment culture من أكثر تلك التقنيات شيوعاً لعزل الأحياء الدقيقة المنتجة للإنزيمات وفيها تضاف مركبات معينة إلى الوسط أو مصدر العزل لتحفيز الأحياء الدقيقة المنتجة للإنزيمات المحللة لتلك المركبات وتشجيعها على النمو والتضاعف بمعدلات عالية تشكل أعدادها مع تقدم زمن التحضين النسبة العظمى من الكائنات الموجودة في ذلك الوسط (محي الدين، 1998، 39)، وعندما تصبح للكائنات المدعمة صفة السيادة يصار إلى عزلها على صورة مزارع نقية بنشر لقاح Inoculum منها على أوساط غذائية صلبة انتقائية أو تفرقية كما يمكن ممارسة ضغوط انتخائية أخرى عند عزل الأحياء الدقيقة وحسب الغاية من عملية العزل كدرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني ودرجة الملوحة أو إضافة مضادات حيوية أو مثبطات أو منشطات معينة إلى الوسط (Joo and Rhee, 1997,75).

ثامناً - غربلة العزلات:

يقصد بعملية الغربلة المقارنة بين عدد كبير من العزلات في صفة محددة كصفة إنتاج إنزيم الأسبارجينااز لتحديد أي منها أكثر فاعلية أو مقدرة في التعبير عن تلك الصفة من خلال إجراء اختبارات معينة لانتقاء العزلة الأغزر إنتاجاً لإكمال الدراسة عليها أو ربما استخدامها على نطاق تجاري (محي الدين، 1998، 39) (عمر، 2006، 28)، وغالباً ما تجرى عملية الغربلة للبكتريا المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز على مرحلتين (Prakasham et al., 2010) هما:

1- الغربلة الأولية:

تسمى بالغربلة شبه الكمية Semi-quantitative تعتمد على إجراء اختبار يتسم بالدقة، حيث تزرع العزلات على وسط صلب يدعى M9 (pH 7) حاوي على مادة حاثّة لإنتاج الإنزيم مثل مادة الأسبارجين وتحضن مدة 24-48 ساعة عند حرارة 37°م. إذ تتناسب قابلية العزلات على إنتاج الإنزيم مع تغير لون الكاشف من الأصفر إلى الوردي نتيجة لتغير درجة pH الوسط من الحامضي إلى القلوي بوجود

كاشف الفينول الأحمر (2.5%)، ويقاس قطر المستعمرات والهالات المتشكلة وتحسب على أساسه كفاءة التحليل من القانون التالي (Pradhan *et al.*, 2013, 36 ; Feng *et al.*, 2017, 1509):

$$\text{كفاءة التحليل} = \text{قطر الهالة} / \text{قطر المستعمرة}$$

2-الغربة الثانوية:

تسمى بالغربة الكمية Quantitative كونها تعطي تصوراً متكاملاً عن قابلية العزلات على إفراز الإنزيم كماً ونوعاً. وهنا تجري المقارنة بين العزلات على أساس تقدير الفعالية الإنزيمية للمستخلصات الخام للإنزيم المنتج على أوساط غذائية طبيعية سائلة تماثل تلك التي تستعمل على نطاق تجاري وبأسلوب المزارع المغمورة Submerged culture (Lobanok *et al.*, 1998, 259).

تاسعاً- تشخيص العزلات المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز:

يعتمد تشخيص بكتريا *Bacillus* المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز على عدد من الاختبارات المورفولوجية والفيزيولوجية (Moorthy *et al.*, 2010, 1862)، حيث الصفات المزرعية في الأوساط الصلبة كشكل المستعمرة الناتجة و قطرها ولون هذه المستعمرة وقوامها، وعلى الخواص المجهرية كشكل الخلية وتشكيل الأبواغ. كما يتضمن التشخيص أيضاً بعض الاختبارات البيوكيميائية كاختبار حلمة النشاء، اختبار الكاتالاز، اختبار إنتاج الأندول، كما يتضمن التشخيص تحري قدرة العزلات البكتيرية على تمثيل واستخدام بعض السكريات (Bergey *et al.*, 2012, 537).

عاشراً- استخلاص الأنزيم:

يعد إنزيم الأسبارجينااز من الإنزيمات الخارجية، فهو ليس بحاجة إلى إجراء عمليات تحطيم لجدران الخلايا البكتيرية للحصول عليه

(Moorthy *et al.*, 2010, 1862; Ebrahimezhad *et al.*, 2011, 307; Feng *et al.*, 2017, 1509).

حادي عشر- تقدير الفعالية الإنزيمية:

يتم تحديد الفعالية الإنزيمية لإنزيم الأسبارجينااز من خلال تقدير كمية الأمونيا الناتجة (Feng *et al.*, 2017, 1509). ويستند إجراء الاختبار على اتباع طريقة نسلر في تقدير الأمونيا من خلال تحضير تراكيز مختلفة من محلول سلفات الأمونيوم ومعاملتها ب Tris-HCL (pH 8.6, 0.05M) والأسبارجين (0.04M) بوجود كاشف نسلر ثم تقاس الامتصاصية للمحاليل بجهاز المطياف الضوئي

عند طول موجة 450 نانومتر. ويتم عمل منحني قياسي تسجل فيه التراكيز المختلفة لسلفات الأمونيوم (ميلي مول /مل) على محور X وتسجل الامتصاصية على محور Y (Feng et al., 2017,1509).

ثاني عشر - العوامل المؤثرة على إنزيم الأسبارجينااز:

يحتاج كل إنزيم إلى ظروف محددة ليعمل بالصورة الأمثل وهذه الظروف تشمل:

1-تأثير درجة الحرارة:

أ- درجة حرارة إنتاج الإنزيم:

أشارت العديد من الدراسات إلى أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز لمعظم الأحياء الدقيقة وخصوصاً تلك التابعة للجنس *Bacillus sp.* كانت بين 30-45°م حيث وجد Jia وآخرون (9428,2013) عند دراسته لإنتاج الإنزيم من بكتريا *Bacillus B11-06.ACS* باستخدام درجات الحرارة بين 25-40°م أن درجة الحرارة المثلى لإنتاجية إنزيمية أعلى كانت 30°م. وأكد كلاً من Praksham وآخرون (72,2010) و Sudhir وآخرون (2504,2014) و Feng وآخرون (1509,2017) أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم من بكتريا *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* هي 37°م بلغت الفعالية الإنزيمية عندها على التوالي 407.62 وحدة /مل، 85 وحدة/مل، 407.7 وحدة/مل. أكد Cachumba وآخرون (77,2016) أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم من بكتريا *Bacillus aryabhattai* هي 40°م، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 680.5 وحدة/مل.

ب- درجة الحرارة المثلى لنشاط الإنزيم:

تؤثر درجة الحرارة في مختلف الفعاليات الحيوية للخلية، إذ يعتمد تشكل منتجات الاستقلاب في الأحياء الدقيقة بشكل كبير على درجة الحرارة، وكما هو الحال في معظم التفاعلات الكيميائية فإن سرعة التفاعلات الإنزيمية تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة ضمن المجال الحراري الذي يكون فيه الإنزيم ثابتاً ومحفوظاً بكامل فعاليته، وقد تبين أن لكل إنزيم درجة حرارة مثلى يكون عندها نشاط الإنزيم في أقصاه ويقل النشاط تدريجياً كلما ابتعدنا عن درجة حرارته المثلى نزولاً أو صعوداً وغالباً ما ترتبط درجة الحرارة المثلى للنمو وإنتاج الإنزيم بنوع الأحياء الدقيقة المستعملة في الإنتاج (الخياط ومحمد، 2000،123).

ت - درجة حرارة حفظ الإنزيم:

يمكن حفظ الإنزيم مبرداً عند درجة حرارة عشرين تحت درجة الصفر المئوي وعندما يراد استخدامه مرة أخرى يستعيد نشاطه عند رفع درجة حرارته إلى درجة الحرارة المناسبة للتفاعل الإنزيمي، كما أنه ليس من الضروري أن تكون درجة الحرارة المثلى لنمو الأحياء الدقيقة هي ذاتها المثلى لتحويلات الاستقلاب لتلك الأحياء، وتختلف درجة الحرارة الملائمة لثبات الإنزيم ونشاطه من إنزيم إلى آخر (السواح، 2002، 35).

2-تأثير الرقم الهيدروجيني:

يلعب الرقم الهيدروجيني الابتدائي للأوساط الزرعية دوراً بالغ الأهمية في نمو الكائن الحي الدقيق إذ يؤثر تأثيراً مباشراً في فيزيولوجيا الكائن الحي الدقيق عن طريق تأثيره في انحلالية المغذيات في الوسط وجاهزيتها، الأمر الذي ينعكس على نمو وفعالية الأحياء الدقيقة وسير عمليات التمثيل والتخليق وإنتاج الإنزيمات، فضلاً على تأثيره في فعالية الإنزيمات وثباتيتها، كما أن لكل إنزيم رقم هيدروجيني معين يكون عنده أكثر نشاطاً يسمى الرقم الهيدروجيني الأمثل إذ ينخفض النشاط الإنزيمي ويمكن أن يتوقف عند وصول هذا الرقم إلى الحد الأقصى أو الأدنى حيث يتغير التركيب الطبيعي للإنزيم في هذه الحالة (السواح، 2002، 75).

تتباين الأحياء الدقيقة المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز في قابليتها على النمو وإنتاج الإنزيم في أوساط ذات أرقام هيدروجينية مختلفة، فقد بينت العديد من الدراسات أن الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لإنتاج الإنزيم من بكتريا *Bacillus sp.* يتراوح بين 5.5-9 (Silpa et al., 2017, 561).

أشار Sudhir وآخرون (2504,2014) و Cachumba وآخرون (77,2016) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus licheniformis* و *Bacillus aryabhattai* هو 8. توصلت Qeshmi وآخرون (12,2015) إلى أن أعلى إنتاجية لإنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus spp GP02* كانت عند الرقم الهيدروجيني 7.5. وفي دراسة أجراها Moorthy وآخرون (1862,2010) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus sp.* هو 7 كما وجد Feng وآخرون (1509,2017) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لأعلى إنتاجية من إنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* هو 7.

3- تأثير زمن التخمر (مدة التحضين):

تعد مدة التحضين من العوامل الهامة التي تؤثر في عملية التخمر، ولاسيما في النمو والتخليق الحيوي للإنزيمات الميكروبية، وتختلف الفترة المثلى اللازمة للوصول إلى الإنتاجية العظمى للإنزيمات المستخلصة من الأحياء الدقيقة، حيث أن هناك عدد من العوامل التي تتداخل مع مدة الحضانة المثلى لإنتاج الإنزيم منها نوع الكائن المنتج وظروف التنمية ومكونات الوسط. تؤكد معظم الدراسات أن مدة الحضانة المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus sp.* تتراوح بين 24-48 ساعة ويعود ذلك إلى مدى نشاط العزلة البكتيرية ونوعها (Mahajan et al., 2017,32; Patil and Jadhav, 2014,11).

أكد Praksham وآخرون (2010,72) أن مدة التحضين اللازمة لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus circulans* هي 24 ساعة. بين Pradhan وآخرون (2013,36) أن المدة اللازمة للتحضين لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus subtilis* hswx88 هي 36 ساعة. وأكد Mahajan وآخرون (2012,125) و Sudhir وآخرون (2014,2504) أن مدة التحضين اللازمة للحصول على الإنزيم من بكتريا *Bacillus licheniformis* هي 48 ساعة.

4- تأثير المصدر الكربوني:

يمثل عنصر الكربون خلال التخمرات الميكروبية مصدراً هاماً للطاقة وعنصراً رئيسياً في بناء الخلية. ولمصادر الكربون المختلفة ولاسيما العضوية منها أثراً مزدوجاً في الخلية، إذ يستعمل في عمليات البناء والتكوين الحيوي، إضافة إلى إنتاج مستقلبات أولية وثانوية، لذلك يعتبر وجوده في الوسط أمراً بالغ الأهمية (Stanbury et al., 1997,93).

تشير أغلب الدراسات إلى أن معظم الأحياء الدقيقة المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز تحتاج إلى الغلوكوز كمصدر للكربون. أثبت Moorthy وآخرون (2010,1862) عند دراسته لمصادر كربون مختلفة أن أفضل مصدر للكربون لإعطاء أعلى إنتاجية للإنزيم باستخدام أنواع مختلفة من بكتريا *Bacillus* هو سكر الغلوكوز (1.5%)، بينما استخدام المالتوز يعطي أدنى إنتاجية لهذا الأنزيم. أكد Cachumba وآخرون (2016,77) و Feng وآخرون (2017,1509) أن مصدر الكربون المثالي لإنتاجية إنزيمية أعلى من بكتريا *Bacillus subtilis* هو سكر الغلوكوز (2%). استخدم Jia وآخرون (2013,9428) أنواع مختلفة من السكريات كمصدر للكربون بتركيز (1%) كالغلوكوز، الديكستروز، والمالتوز وأكد أن الإنتاجية الإنزيمية كانت أعلى ما يكون عند استخدام سكري الغلوكوز والمالتوز. في

حين استخدمت إحدى الدراسات السكروز (2%) ومستخلص الخميرة (2%) كمصدر للكربون فكانت إنتاجية الإنزيم منخفضة. وسجلت إحدى الدراسات أن استخدام سكر الأرابينوز (2%) أعطى أعلى إنتاجية للإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* بينما استخدام اللاكتوز (1%) والرافنوز (1%) أعطت إنتاجية منخفضة (Silpa et al., 2017, 561). وسجلت دراسة لـ Hymavathi وآخرون (8,2008) أن أعلى إنتاجية للإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus circulans* كانت عند استخدام سكر المانيتول (1%).

5- تأثير مصدر النيتروجين:

يمثل عنصر النيتروجين خلال التخمرات الميكروبية مصدراً أساسياً وعنصراً رئيسياً في بناء الخلية كي تستطيع البكتريا القيام بعملها. أثبت من خلال دراسات مختلفة ضرورة وجود عنصر النيتروجين من أجل زيادة إنتاجية الإنزيم فوجد Hymavathi وآخرون (12,2008) أن استخدام مستخلص الخميرة بتركيز (1.5%) أدى إلى زيادة الإنتاجية للإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus firmus*، وأن استخدام الكازئين بتركيز (1.5%) أدى إلى زيادة الإنتاجية للإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus circulans* بينما أعطى أدنى إنتاجية للإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus firmus*. وأثبت أن التركيز المثالي للأسبارجين من أجل زيادة إنتاجية الإنزيم هو (1%) بينما التركيز المثالي لمستخلص الخميرة (1.5%) والبيتون (1.5%). أثبت Jia وآخرون (9428,2013) أن أفضل تركيز من مستخلص الخميرة للحصول على فعالية إنزيمية أعلى من بكتريا *Bacillus B11-06.ACS* هو 2.5% وأثبت أيضاً أن استخدام الترتوفان بتركيز (0.3%) مع الأسبارجين (0.5%) أدى إلى زيادة إنتاجية الإنزيم بالمقارنة مع الإنتاجية عند استخدام الترتوفان بتركيز (0.3%) لوحده. أكد Silpa وآخرون (561,2017) أن استخدام البيتون بتركيز (1%) أدى إلى زيادة إنتاجية الإنزيم من بكتريا *Bacillus sp.* وأكد أن استخدام مستخلص الخميرة بتركيز (2%) كمصدر للنيتروجين أدى إلى زيادة إنتاجية الإنزيم بمقدار 6 مرات بالمقارنة مع استخدامها بتركيز (0.5%).

6- تأثير التهوية (سرعة الدوران):

تلعب سرعة الدوران أو التهوية أهمية كبيرة لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز، إذ تعمل على تأمين الأوكسجين الذي تحتاجه الخلايا البكتيرية بالإضافة إلى توصيل كافة المواد المغذية بشكل متجانس للخلايا البكتيرية النامية. تختلف سرعات الدوران المطلوبة لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز حسب نوع بكتريا *Bacillus* ومصدرها فبعضها يحتاج إلى تهوية والبعض الآخر لا يحتاج إلى تهوية. أثبت

Hymavathi وآخرون (8,2008) أنه من دون تهوية أعطت بكتريا *Bacillus circulans* أعلى فعالية إنزيمية. بينما أثبت Silpa وآخرون (561,2017) أن مختلف أنواع بكتريا *Bacillus spp* أظهرت أعلى فعالية عند سرعة دوران (150 دورة/دقيقة) أما بالسرعات الكبيرة (200-250 دورة/دقيقة) وبالسرعات المنخفضة (60-90 دورة/دقيقة) أعطت إنتاجية إنزيمية منخفضة.

ثالث عشر - فصل وتنقية الأنزيم:

لدراسة الإنزيمات وخواصها الحركية لا بد من تنقيتها إلى حد التجانس أي التخلص من المواد والبروتينات الأخرى الموجودة مع الإنزيم تحاشياً للوقوع في استنتاجات خاطئة ولا تتحقق التنقية إلا عبر مجموعة من الخطوات المتدرجة يفترض أن تزداد خلالها فعالية الإنزيم النوعية في كل خطوة (Kornberg, 1990,1). وتعرف الفعالية النوعية للإنزيم على أنها قدرة الإنزيم على تحفيز تفاعل ما، وتحسب الفعالية النوعية كما في المعادلة التالية:

$$A_s = \frac{A}{m_{protein}}$$

حيث تمثل A فعالية الإنزيم، A_s الفعالية النوعية للإنزيم، $m_{protein}$ تركيز البروتين الناتج، كما تعرف عدد مرات التنقية n لكل مرحلة من مراحل التنقية كما يلي:

$$n = \frac{A_s}{A_s (crude)}$$

وتمثل $A_s (crude)$ الفعالية النوعية للإنزيم الخام (Morton, 1950,1092; Feng et al., 2017,1509).

يتم فصل وتنقية الإنزيم تبعاً للحجم والكتلة وفق الطرق التالية:

بالتثقيب فائق السرعة (Ultracentrifugation) ($300000 \times g$): حيث تكون كتلة الإنزيم العامل الرئيسي للفصل، وتستخدم هذه الطريقة لفصل الإنزيم عن الشوائب ولا تكون فعالة لتمييز الإنزيمات عن بعضها البعض.

أو بالترشيح الهلامي (Gel filtration): ويستخدم في مرحلة متقدمة من التنقية، ويعتمد الفصل على مبدأ الوزن الجزيئي، ومن أهم الهلامات المستخدمة Sephadex, Sephacryl و Sepharose. أو بالديليزة (Dialysis): وتستخدم عادة لإزالة الأملاح، ويعتمد ذلك على مبدأ حجم الملح وإذابته بالمحلول الموقي.

أو بالترشيح الفائق (Ultrafiltration): وتستخدم هذه الطريقة لتركيز البروتين. (Pabby *et al.*, 2007, 105)

كما يمكن أن يتم الفصل أيضاً تبعاً للقطبية (Polarity) باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (Ion-exchange chromatography)، أو أن تفصل تبعاً لقدرة البروتينات على الانحلال في المذيبات العضوية، أو تبعاً للخصائص البنيوية باستخدام كروماتوغرافيا الألفة (Affinity chromatography) أو الامتزاز المناعي (Immunoabsorption) (Morton, 1950, 1092; Berg *et al.*, 2006, 303).

الجدير بالذكر أنه لا يوجد ترتيباً ثابتاً لخطوات تنقية الأنزيمات، ولكن مع ذلك فإن المعاملة الحرارية -إذا كان بالإمكان استعمالها- والترسيب بكبريتات الأمونيوم أو المذيبات العضوية أو التركيز بالتجفيد أو الترشيح الفائق تمثل المراحل المبكرة في عمليات التنقية لغرض تركيز الإنزيم وتخليصه من أكبر قدر ممكن من الماء الموجود في مستخلصه ومن ثم تقليل حجمه ورفع كفاءة التنقية (Volesky and Laong, 1985, 119) (دلالي، 1983، 349).

يمكن فصل وتنقية الإنزيمات بخطوات متعددة، تبدأ في معظم الأحيان بالترسيب بالأملاح أو المذيبات العضوية، وتستخدم لهذا الغرض كبريتات الأمونيوم أو الأسيتون بدرجات إشباع متباينة تتراوح بين 20% إلى 100% (Bajaj *et al.*, 2009, 382; Basha *et al.*, 2009, 53; Kumar and Sobha., 2012, 137)، ولجميع الراسب يتبع ذلك عملية تثقيل بسرعة تتراوح بين 5000 دورة/ دقيقة إلى 8000 دورة/ دقيقة لمدة تتراوح بين 15 و 20 دقيقة. تختلف المراجع العلمية في ترتيب خطوات التنقية اللاحقة، حيث نجد أن مجموعة من الباحثين قد أجرت عملية الديليزة Dialysis باستخدام محلول Tris HCl 0.05M لمدة 12 ساعة، وألحقوها بعملية الكروماتوغرافيا المبادلة للأيونات (Ion-exchange chromatography) باستخدام عمود DEAE-Cellulose (Bajaj *et al.*, 2009, 382; Mahajan *et al.*, 2012, 125)، وفي بعض الأحيان تجرى بعد ذلك عملية كروماتوغرافيا الفصل تبعاً للحجم (الترشيح الهلامي)، ثم تجرى عملية الرحلان الكهربائي لكل العينات التي تم الحصول عليها خلال مراحل التنقية، ويستخدم لهذا الغرض هلام التمايز (هلام polyacrylamide) (Resolving gel) بتركيز 15% وهلام التراص (Stacking gel) بتركيز 5% (Gaffney, 1996, 431; Moorthy *et al.*, 2010, 1862). قام Tiul وآخرون (1972، 423) بتنقية إنزيم الأسبارجينااز المنتج من *Bacillus mesentericus* 43A بطريقة مشابهة لطريقة التنقية التي

ذكرت في الأبحاث الأخرى التي عملت على تنقية إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus sp.* حيث قام بعدة خطوات شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 80% ثم الدليزة وإمرار المحلول الإنزيمي على عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose (4×60 سم). وقام Moorthy وآخرون (1862,2010) بتنقية إنزيم الأسبارجينااز المنتج من *Bacillus sp.* بدرجة حرارة 4°م بعدة خطوات شملت تركيز مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 80% وتم جمع الراسب بإجراء عملية طرد مركزي بسرعة 9000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة، وبعدها أذيب الراسب باستخدام المحلول الموقى بورات الصوديوم (0.1M; pH7) ثم أجريت الدليزة وتمير المحلول الإنزيمي على عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose باستخدام المحلول الموقى نفسه، بعد أن تمت معادلته بالمحلول Tris-HCl (0.5M, pH= 8.6)، وجمع الإنزيم بمعدل جريان (1 مل /دقيقة) مع وجود متدرج من NaCl بتركيز (0.1-0.5 M) ومحلول بورات الصوديوم 0.1M (pH 7.4) وبلغت عدد مرات التنقية 11.2 مرة وبحصيلة 43.1% عند استخدام سكر الغلوكوز في وسط الزرع وبعدد مرات تنقية 10.5 مرة وبحصيلة 20% عند استخدام سكر المالتوز في وسط الزرع. تمكن Mahajan وآخرون (11,2014) من تنقية إنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* بعدة خطوات شملت الترشيح الفائق لمستخلص الإنزيم الخام باستخدام مصيدة 30KDa للتخلص من البروتينات منخفضة الوزن الجزيئي ثم الترسيب بالمذيب العضوي الأسيتون بنسبة إشباع 80% ثم الدليزة وإمرار المحلول الإنزيمي على عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose (4×60 سم) بمعدل جريان (1 مل/دقيقة) ثم الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-100 (4×60 سم) وجمع الإنزيم بمعدل جريان (0.5 مل/دقيقة) مع وجود متدرج من NaCl بتركيز (0-0.5 M) ومحلول الفوسفات الموقى 0.1M (pH 7.4) وأمكن استرداد 32.95% من الإنزيم بعدد مرات تنقية بلغت 30.17 مرة. تمكن Qeshmi وآخرون (12,2015) من تنقية إنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتريا *Bacillus sp. GP02* بعدة خطوات شملت تركيز مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 70-80% ثم الدليزة وإمرار المحلول الأنزيمي على عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose (4×60 سم) وبلغت عدد مرات التنقية 9.4 مرة وبحصيلة 45%.

ذكر Silpa وآخرون (561,2017) أن بعض الدراسات قامت بتنقية الإنزيم من بكتريا *Bacillus pumilus* بعدة خطوات شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسب

إشباع 70-100% وإمرار المحلول الأنزيمي على عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose وأمكن استرداد 11.2% من الإنزيم بعدد مرات تنقية بلغت 9 مرات. كما تم تنقية الإنزيم المنتج من أنواع مختلفة من البكتريا إذ ذكر أن عملية تنقية إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Erwinia carotovora* شملت تركيز مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 70% ثم الدليزة و الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-200. أما تنقية الإنزيم من بكتريا *Enterobacter aerogenes* فبدأت بفصل الإنزيم بالترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S-200 ثم تبعته عملية الترشيح الفائق. تمكن Amena وآخرون (173,2010) من تنقية الإنزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces gulbargensis* إذ شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع 40-60% تبعته عملية الدليزة والفصل على عمود Sephacryl S-200 (1×50سم) ثم تمرير العينة الناتجة على عمود التبادل الأيوني CM Sephadex C-50 وأمكن استرداد 32% من الإنزيم بعدد مرات تنقية بلغت 82.12 مرة.

1- تقدير البروتين :

يقدّر البروتين باستخدام عدة طرائق مثل برادفورد، البايوريت، طريقة لوري ولكن أفضل الطرق لتقدير كمية بروتين إنزيم الأسبارجينااز هي استخدام طريقة لوري لأنها حساسة أكثر لتراكيز قليلة من البروتين (Lowery et al.,1951,265) من خلال تحضير تراكيز مختلفة من البروتين القياسي (Bovine Serum Albumin)BSA تتراوح بين (0-100 ميكروغرام/مل) ثم معاملتها بمحلول العمل القلوي وكاشف Folin Ciocalteau ثم تقاس الامتصاصية للمحلول الناتج على طول موجة 750 نانومتر بجهاز المطياف الضوئي ثم يتم عمل منحنى قياسي تسجل فيه التراكيز المختلفة للـ BSA على محور X وتسجل الامتصاصية لكل تركيز على محور Y ويتم تقدير كمية البروتين الموجودة في العينة من المنحنى القياسي. أوصى الإتحاد العالمي للأنزيمات بالتعبير عن تركيز الإنزيم بوحدة قياسية تدعى وحدة الأنزيم (U) Unit، وإن الوحدة الإنزيمية لإنزيم الأسبارجينااز هي كمية الإنزيم التي تحرر ميكرومول واحد من الأمونيا تحت شروط محددة (37°م- pH 7) خلال دقيقة واحدة (Feng et al., 2017,1509).

رابع عشر - الصفات الحركية لعمل إنزيم الأسبارجيناز:

1- تأثير درجة الحرارة في فعالية الإنزيم:

تزداد سرعة معظم التفاعلات الكيميائية مع ارتفاع درجة الحرارة إذ إن الزيادة في درجة الحرارة تمنح الجزيئات المتفاعلة طاقة حركية أكبر مما ينتج عنها زيادة تصادم جزيئات الإنزيم مع الركيزة. تستمر التفاعلات الإنزيمية بالتسارع حتى بلوغها درجة حرارية معينة تتأثر الإنزيمات بعدها سلباً بسبب حدوث تغيير في تركيب الإنزيم. وتعرف درجة الحرارة المثلى الحقيقية لفعالية الإنزيم بأنها درجة الحرارة التي يبقى عندها الإنزيم محتفظاً بفعاليته على مدى من الزمن (Robinson,2015,1).

2- تأثير درجة الحرارة في ثباتية الإنزيم وتخزينه:

يتأثر الثبات الحراري للإنزيمات بعدة عوامل ولا سيما الرقم الهيدروجيني، القوة الأيونية وطبيعة المحلول الموقى ووجود المنشطات أو المثبطات ومدة الحضانة وتركيز الإنزيم. فبارتفاع درجة الحرارة عن الدرجة المثلى للتفاعل تتخرب بنية الإنزيم مما يؤدي إلى خفض نشاطه بسرعة، أما عند بدء التفاعل في درجات الحرارة الأقل فإن الحرارة تضيف طاقة تزيد تصادم جزيئات الإنزيم مع الركيزة، لذا فهناك تأثيران للحرارة وهما زيادة السرعة الابتدائية للتفاعل إلى حد درجة حرارية معينة (الدرجة المثلى) ثم تخريب (تغيير الطبيعة البروتينية للإنزيم) في درجات الحرارة المرتفعة مما يؤدي إلى انخفاض فعالية الإنزيم. أكد Silpa وآخرون (561,2017) عند دراسته لثباتية الإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus polymexa* على درجات حرارة مختلفة (10-37-50-60°م) لمدة 60 دقيقة أن الحرارة 65°م كانت المثالية حيث أعطى عندها الإنزيم ثباتية عالية. أكدت Qeshmi وآخرون (12,2015) عند استخدام مجال حراري بين (30-50°م) أن درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus sp PG02* هي 39°م وأن الإنزيم يحتفظ عند هذه الدرجة من الحرارة بفعالية تقدر بـ 92% عند حضانة مدة 60 دقيقة وأنه يفقد كامل فعاليته عند حضانة بدرجة 50°م لمدة 60 دقيقة. أثبت Mahajan وآخرون (11,2014) عند دراسته لحفظ الإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* في درجات حرارة مختلفة (-20، 4، 10، 30، 60°م) لمدة 30 يوماً أنه أفضل درجة حرارة لتخزين الإنزيم خلال هذه المدة هي -20°م دون حدوث أي تغيرات في الفعالية كما أثبتوا أن الإنزيم بقي ثابتاً ضمن مجال حراري تراوح بين 30-60°م مدة 60 دقيقة وأن أفضل درجة حرارة لفعالية إنزيمية عالية كانت 60°م. وجد Moorthy وآخرون (1862,2010) أن درجة حرارة 40°م أعطت أعلى فعالية إنزيمية من بكتريا *Bacillus spp*.

أكد Stecher وآخرون (1,1999) أن درجة الحرارة المثلى لثبات الإنزيم المنتج من بكتريا *Esherchia coli* كانت 65°م وأن الإنزيم يحتفظ بكامل فعاليته عند حفظه بدرجة حرارة 65°م لمدة 60 دقيقة كما أثبت Kotzia و Labrou (567,2007) أن درجة الحرارة المثالية التي يعطي عندها الإنزيم المنتج من بكتريا *Erwinia* ثباتية عالية هي 65°م لمدة 60 دقيقة.

3- تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الإنزيم:

يؤثر الرقم الهيدروجيني بطريقتين مختلفتين إما أن يغير بنية الإنزيم أو يغير الشحنات الكهربائية للمجاميع الوظيفية للأحماض الأمينية بالموقع الفعال للإنزيم، وعلى تأين الركيزة وتأين معقد الإنزيم مما يؤثر على سرعة التفاعل الإنزيمي (Robinson,2015,9).

4- تأثير الرقم الهيدروجيني في ثباتية الإنزيم:

يعد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم من الصفات المهمة لأي إنزيم والتي يجب أن تدرس إذ يعتمد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم معين على عدة عوامل منها درجة الحرارة والقوة الأيونية وطبيعة المحلول الموقى وتركيز المنشطات ووجود المثبطات وتركيز الركيزة والإنزيم والمرافقات الإنزيمية (Robinson,2015,19).

تشير العديد من المراجع أن الإنزيم يحتفظ بثباتية عالية عند درجات مختلفة من الرقم الهيدروجيني تتراوح بين (6-9). وجد Mahajan وآخرون (11,2014) أن الإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* حافظ على ثباتية عالية عند الرقم الهيدروجيني 9 لمدة 24 ساعة. وجد أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus firmus* وبكتريا *Bacillus circulans* هو 6 حيث احتفظ الإنزيم بثباتية عالية بدرجة 65°م مدة 15 دقيقة (Silpa et al., 2017,561). أثبت Moorthy وآخرون (1862,2010) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيمية عالية للإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus sp.* هو 8. أكد Stecher وآخرون (1,1999) و Morten and Richard (1161,2000) و Kumar and Sobha (137,2012) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لأعلى فعالية إنزيمية للإنزيم المنتج من بكتريا *Esherchia coli* هو 8.6 ويعود الاختلاف في تحديد قيمة الثباتية الحمضية إلى اختلاف نوع البكتريا ومصدرها .

5- تأثير الأملاح والشوارد المعدنية:

تحتاج الخلايا الحية إلى الأملاح وبعض العناصر المعدنية لأغراض متعددة فهي إما أن تدخل في التراكيب الخلوية وهذه عادة تحتاجها بكميات كبيرة أو أن تدخل في تركيب بعض الإنزيمات بينما تحتاج قسماً منها للحصول على حالة التوازن الأيوني المهمة في التفاعلات الكيميائية للخلية (الخفاجي، 1990، 699).

تشير معظم الدراسات إلى ضرورة وجود بعض الشوارد المعدنية في مراحل الاستقلاب الخلوي لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز ويتوقف نوع الأملاح والشوارد المطلوبة على نوع الأحياء الدقيقة المنتجة للإنزيم إذ تختلف الحاجة لهذه الشوارد من كائن إلى آخر، وأن أبرز تلك الأملاح هي أملاح المغنيزيوم والحديد وفقاً لـ Abdelrazek وآخرون (1,2019) وFeng وآخرون (1509,2017) حيث أكدوا على زيادة الإنتاجية الإنزيمية للإنزيم المنتج من بكتيريا *Bacillus licheniformis* بوجود شوارد المغنيزيوم والصوديوم والحديد بتركيز (1mM) وانخفاضها بوجود شوارد الزئبق والكالسيوم. استخدم Jia وآخرون (9428,2013) أنواعاً مختلفة من الأملاح بتركيز (0.01%) كفسفات البوتاسيوم، كبريتات الحديد، كبريتات الزنك بالإضافة إلى كلوريد المنغنيز حيث أكد أن هذه المواد ضرورية لإعطاء أعلى فعالية للإنزيم. بين Moorthy وآخرون (1862,2010) تأثير الفعالية الإنزيمية بوجود شوارد المعادن ك (Mn^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} and Ni^{+2}) وخاصة كلوريد المغنيزيوم إذ تزداد الفعالية بوجوده، بينما يفقد الأنزيم فعاليته عند استخدام محلول EDTA و Ca^{+2} . كما أثبت Mahajan وآخرون (11,2014) أن الشوارد أحادية التكافؤ وشاردة Mg^{+2} من العوامل المنشطة للإنتاجية الإنزيمية للإنزيم المنتج من بكتيريا *Bacillus licheniformis* وأن هذه الفعالية تنخفض بوجود بعض الشوارد ثنائية التكافؤ مثل Ca^{+2} و Zn^{+2} و Hg^{+2} . كذلك بين كلاً من Abdelrazek وآخرون (1,2019) و Han وآخرون (1096,2014) أن فعالية الإنزيم المنتج من بكتيريا *Bacillus licheniformis* تزداد بوجود شاردة Mg^{+2} وتنخفض بوجود الشوارد من نوع Cu^{+2} و Ni^{+2} و Co^{+2} و Ca^{+2} على عكس Moorthy وآخرون (1862,2010) الذين أكدوا أن فعالية الإنزيم المنتج من بكتيريا *Bacillus sp* تزداد بوجود هذه الشوارد.

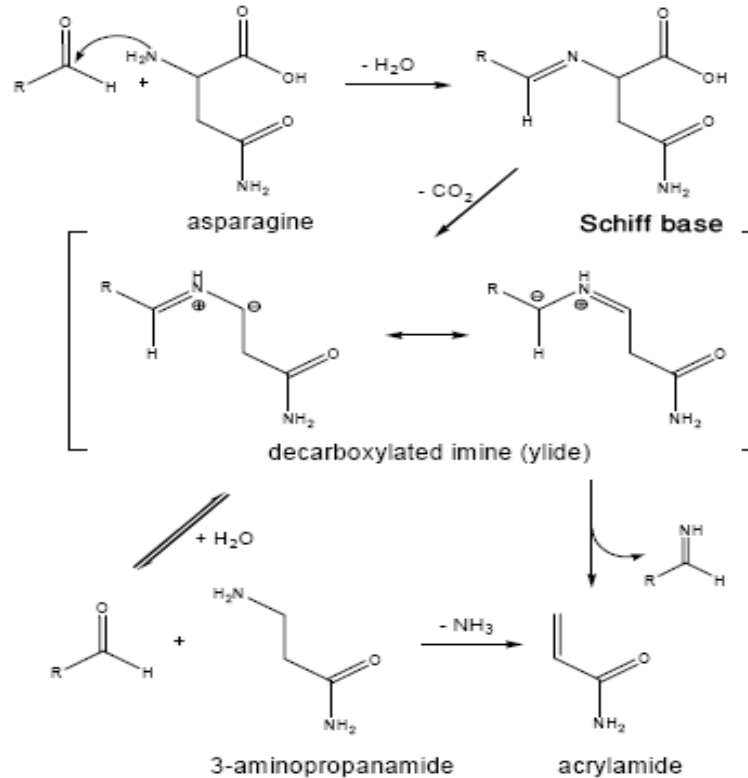
6- تأثير الركيزة:

وجدت الدراسات أن أفضل تركيز للأسبارجين في التفاعل الأنزيمي هو 1 مول (Mahajan *et al.*, 2014,11; Silpa *et al.*, 2017,561).

خامس عشر - الأهمية التطبيقية لإنزيم الأسبارجينااز:

1-أهمية الأسبارجينااز في التطبيقات الغذائية:

يسمى الإنزيم بـ Acrylaway في الصناعات الغذائية إذ يعتبر هذا الإنزيم عاملاً مساعداً في العمليات التصنيعية حيث يعمل على تقليل كمية الأكريلاميد المتشكلة خلال عملية قلي المواد الغذائية النشوية كالبطاطا والفلافل والخبز وأغذية الأطفال والمقرمشات وغيرها من الأغذية النشوية. يتشكل الأكريلاميد نتيجة تفاعل ميلارد الذي يعطي اللون البني عند تفاعل الحمض الأميني الأسبارجين مع السكريات المرجعة الموجودة في هذه الأغذية النشوية، بالإضافة الى تحسين لون المنتج وطعمه وقوامه (Cachumba *et al.*,2016,77). ويوضح الشكل (2) تفاعل الحمض الأميني الأسبارجين مع السكريات المرجعة بوجود الحرارة وتشكل الأكريلاميد.



الشكل (2) يوضح تفاعل الحمض الأميني الاسبارجين مع السكريات المرجعة بوجود الحرارة وتشكل الأكريلاميد (Amrein, 2005,1)

أثبت Zyzak وآخرون (4782,2003) أن إضافة إنزيم الأسبارجيناز قبل عملية القلي أو الخبز يقلل 99% من كمية الأكريلاميد المتشكلة بسبب قدرة هذا الإنزيم على تفكيك كمية كبيرة من الحمض الأميني الأسبارجين. يعرف الأكريلاميد على أنه مركب بلوري أبيض اللون يملك وزناً جزيئياً مقداره 71.08 ودرجة انصهار 84.5°م. يتمتع بخاصية قطبية تجعل درجة انحلاله في الماء عالية، صيغته الكيميائية $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ (Eriksson, 2005,11)، أثبتت الأبحاث تأثيراته السمية على أعصاب الإنسان وقدرته المحتملة على إحداث السرطان (JECFA, 2006,452) إذ يمتص الأكريلاميد ويتوزع في مختلف النسيج عند الحيوان والإنسان بسبب قطبيته العالية وحجمه الصغير. أظهر تتبع الأكريلاميد الموسوم بـ C^{14} و C^{13} عند الفئران أن فترة بقائه ومستقلبه الفعال الغلايسيداميد يبلغ 1.5-3.5 ساعة مما يدل على اختفائه السريع. كما أن امتصاص الأكريلاميد عند الإنسان يكون أكثر فعالية عندما يمر عن طريق الفم بالمقارنة مع امتصاصه عن طريق الجلد (Amrein, 2005,12; Bjellaas et al. 2007,1020; Zödl et al., 2007,99). صنفت الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC,1994,389) الأكريلاميد كمادة ذات قدرة محتملة على إحداث السرطان عند الإنسان وذلك بالاعتماد على التجارب الحيوية التي أظهرت تأثيرات مسرطنة لنسج عديدة عند الجرذان والفئران. لذلك حددت لجنة الخبراء المشتركة لمنظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية للمضافات الغذائية JECFA الجرعة الفموية للأكريلاميد المؤدية إلى سمية حادة (Acute toxicity) بأعلى من 100 ملغ/كغ لوزن الجسم كما حددت قيمة LD50 بأعلى من 150 ملغ/كغ وزن الجسم، كما حددت كمية الأكريلاميد في بعض المواد الغذائية المختلفة مقدرة بـ ppp مثل الشيبس فكانت (117-2762)، البطاطا المقلية (20-1325)، الوجبات السريعة (12-1168)، المخبوزات (10-364)، القهوة (175-351)، أغذية الأطفال (0-130)، المكملات البروتينية (0-116)، الخضراوات والفواكه المعلبة (0-83) وللخضراوات والفواكه المجمدة (10-20) (JECFA, 2006)، ومن أجل ذلك أجريت العديد من الدراسات من أجل تقليل كمية الأكريلاميد المتشكل في الأغذية.

يستقلب الأكريلاميد وفق عدة مسارات ، فمن الممكن أن يتحول الأكريلاميد إلى غلايسيداميد في الكبد (Glycidamide) عن طريق تشكيل الإيبوكسيد بواسطة الأكسدة من نوع Epoxidation بوجود الساييتوكروم P450 2E1 Oxidase (CYP2E1)، ثم تنزع مجموعة الـ Epoxide للغلايسيداميد بواسطة Epoxide Hydrolase (EH) مؤدية إلى أن يرتبط كل من الأكريلاميد والغلايسيداميد مع الغلوتاثيون (GSH) بوجود أو غياب Glutathione-transferase ليتشكل مركبات

Mercapturic acids بمساعدة Transpeptidase والغلوتاثيوناز (Glutathionase) وأسيتيل كوانزيم A والتي تطرح في البول ومن أهم هذه المركبات:

N-acetyl-S-(carbamoyl-2-hydroxyethyl) cysteine
N-acetyl-S-(3-amino-2-hydroxy-3-oxopropyl) cysteine
(Amrein, 2005; Huang *et al.*, 2007; Zödl *et al.*, 2007)

تم استخدام العديد من الطرائق من أجل تقليل كمية الأكريلاميد في الأغذية كعملية نقع المواد الغذائية بالماء (Cummins *et al.*, 2008,854)، استخدام الأحماض العضوية (Rosén, and Hellenäs., 2002,880)، استخدام الأملاح كملح الطعام (Cluas *et al.*, 2008,118)، استخدام مضادات الأكسدة (Mustafa,2008,1) أو المعاملة بالبروتين والأحماض الأمينية (Mestdagh *et al.*, 2008,26).

استخدمت الدراسات الحديثة إنزيم الأسبارجينااز لما له من تأثير كبير على الحمض الأميني الأسبارجين الذي يعد الأساس في حدوث تفاعل ميلارد وتشكل الأكريلاميد. أجريت العديد من الدراسات حول كيفية استخدام إنزيم الأسبارجينااز المنتج من الأحياء الدقيقة المختلفة بتركيز محددة وتحت ظروف معينة من درجة حرارة و pH، فتبين أنه يعمل على تخفيض كمية الأكريلاميد بنسب مختلفة حسب نوع الكائن الحي المنتج منه الإنزيم. أثبت Xu وآخرون (163,2016) أنه عند استخدام إنزيم الأسبارجينااز المنتج من جنس *Bacillus* قبل عملية الخبز لخبز الزنجبيل أدى إلى انخفاض كمية الأكريلاميد المتشكلة بنسبة 55%. كما أكد Pedreschi وآخرون (386,2008) أن إضافة الإنزيم إلى قطع البطاطا النيئة بدرجة حرارة 60°م لمدة 5 دقائق أدى إلى خفض كمية الأكريلاميد في المنتج النهائي بنسبة 67%. أجريت دراسة أخرى من قبل Pedreschi وآخرون (1473,2011) فعند نقع قطع البطاطا النيئة قبل إجراء عملية القلي لها بماء دافئ درجة حرارته 85°م لمدة 3.5 دقيقة ثم تعريضها للإنزيم المنتج من جنس *Bacillus* بكمية (10000 وحدة /لتر) بدرجة حرارة 50°م لمدة 20 دقيقة أدى إلى انخفاض كمية الأكريلاميد بنسبة 90%. أثبت Mahajan وآخرون (125-2012) أنه عند استخدام إنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* لتقليل كمية الأكريلاميد المتشكلة في قطع البطاطا المقلية استخدم الإنزيم بكمية (30 وحدة/مل) بدرجة حرارة 175°م ولمدة 15 دقيقة أدى إلى انخفاض كمية الأكريلاميد بنسبة 80% في المنتج النهائي. أكد Onishi وآخرون (783,2015) أن إضافة الإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* إلى البطاطا الشيبس بكمية (40 وحدة/لتر) بدرجة حرارة 170°م لمدة 90 ثانية أدى إلى خفض كمية الأكريلاميد بنسبة 80%. أكد Hendriksen (4168,2009) أن إضافة الإنزيم

المنتج من *Aspergillus oryzae* إلى البسكوييت قبل عملية الخبز بجرعات مختلفة أدى إلى خفض كمية الأكريلاميد بنسبة (65-92%) بينما أثبت Huang وآخرون (2014,1561) أن إضافة الإنزيم المنتج من *Rhizomucor miehei* إلى البسكوييت قبل الخبز بكمية 0.5-10 وحدة/مل بحرارة 200°م لمدة 15 دقيقة أدى إلى خفض الأكريلاميد بنسبة 81.6-94.2%. وتعتبر وحدة/ليتر عن كمية الأسبارجينااز التي تحرر واحد ميكرومول من الأمونيا تحت ظروف (37°م-7 pH) في الدقيقة الواحدة.

2- أهمية الأسبارجينااز في التطبيقات العلاجية:

يعتبر أنزيم الأسبارجينااز أحد الأنزيمات الهامة ذات التطبيقات الواسعة في المجالات الصيدلانية والغذائية. إذ بلغت قيمة المبيعات السنوية لهذا الأنزيم 380 مليون دولار عام 2017، ويتوقع أن تصل هذه القيمة إلى 420 مليون دولار عام 2025 (Alam et al., 2019,56). يسمى الإنزيم في الصناعات الدوائية بـ *Erwinasae* لأن مصدره الأساسي بكتريا *Erwinia*، إذ يستخدم كمادة معالجة لمرضى السرطان وبخاصة سرطان ابيضاض الدم الحاد (Husain et al., 2016,2)، وتتلخص آلية تأثير إنزيم الأسبارجينااز في خلايا سرطان الدم من خلال تحطيم الحمض الأميني الأسبارجين الذي يعد الأساس لنشاط الخلايا السرطانية والتي لا تستطيع تصنيعه ذاتياً بسبب افتقارها لإنزيم *Asparagine synthetase* وبالتالي عند معالجة المريض بإنزيم الأسبارجينااز تفقد الخلايا قدرة الحصول على الحمض الأميني الأسبارجين فيؤدي إلى تثبيط تصنيع البروتين ويؤدي ذلك إلى تماوت الخلية السرطانية (Kumar and Sobha, 2012,137)، حيث أثبتت الدراسات أن إنزيم الأسبارجينااز المنتج من قبل بكتريا *E.coli* و *Erwinia cartrovora* يستخدم في المجالات الطبية لمعالجة السرطان، تنتج بكتريا *Ecoli* نوعين من الإنزيم *L-asparaginase I* (EC1) والإنزيم *L-asparaginase II* (EC2)، وإن الأنزيم (EC2) هو المستخدم فقط في علاج السرطان (Hatamzadeh et al., 2020,8309; Whitecar et al., 1970,732)، كما أكدت بأنه من الإنزيمات المستحثة إذ يتحفز إنتاجه عند نقص النيتروجين في وسط النمو (Verma et al., 2007,45) له وزن جزيئي يساوي 141 كيلودالتون، وإن درجة الحرارة ودرجة الحموضة المثالية له هي 37°م و 7-8 على التوالي. كما أن إنزيم الأسبارجينااز المنتج من قبل بكتريا *E.chrysanthemi* يستخدم في معالجة مرضى السرطان أيضاً ووزنه الجزيئي 140-150 كيلودالتون، وإن درجة الحرارة ودرجة الحموضة المثالية له هي 50°م و 8 (Kumar and Sobha., 2012,137). وخلال الدراسات المختلفة التي أجريت لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز وجد أن هنالك

العديد من الأوساط الزرعية التي يمكن استخدامها، ويعد الأسبارجين والبرولين من أهم المركبات التي استخدمت كركيزة للوصول الى أعلى إنتاجية للإنزيم، كما استخدم الغلوكوز كأهم مصدر وحيد للكربون (Farag *et al.*, 2015,1509; Berg *et al.*, 2011,168).

الفصل الثاني: مواد البحث وطرائقه:

أولاً- مواد البحث والأجهزة المستخدمة:

1-الأجهزة المستخدمة في البحث:

نفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية- مخبر التقانات الصناعية والغذائية -ما بين العام 2017-2021 ويبين الجدول (3) أهم الأجهزة المستخدمة عند إجراء البحث.

الجدول (3) الأجهزة المستخدمة في البحث

الشركة المصنعة	اسم الجهاز
Hanna – Romania	مقياس الرقم الهيدروجيني (pH-meter)
Mettler Toledo – Taiwan	ميزان حساس Sensitive balance
Heraeus – Germany	جهاز تنقيط مبرد Cooling centrifuge
Lab Tech – Koria	حاضنة Incubator
New Brunswick Scientific – U.S.A	حاضنة هزازة Rotary shaker
Memmert- Germany	حمام مائي Water bath
Shenan LDZX -50 FB- China	جهاز الموصدة (المعقم) Autoclave
Stuart- China	مازج أنابيب Vortex
Grad- Russian	فرن كهربائي Oven
G F L – Germany	جهاز تقطير الماء Water Distillater
Olympus – Philippines	مجهر ضوئي Microscope
Boeco – Germany	مسخن مع محرك مغناطيسي Heater Magnetic stirrer
Rocker- India	مضخة تفريغ Vacuum pump
Optizen- Korea	مطياف ضوئي Spectrophotometer UV/visible
Bio Air - Italy	غرفة عزل مزودة بالأشعة فوق البنفسجية Laminar hood
Young in chromass -China	جهاز كروماتوغرافيا السائلة YL9100 Plus ⁺ HPLC System

2-الأوساط الزرعية:

حضرت جميع الأوساط الزرعية مخبرياً أو حسب تعليمات الشركة وعقمت هذه الأوساط بالموعدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121°م وتحت ضغط 1.02 ضغط جوي، مدة 20 دقيقة وكانت الأوساط المستخدمة كما يلي:

❖ الوسط الصلب لعزل البكتريا المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز:

يدعى بوسط M9، حضر هذا الوسط بإذابة المكونات الآتية في لتر من الماء المقطر (Feng et al., 2017,1509 ; Mahajan et al., 2014,11).

1. Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	6غ
2. K ₂ HPO ₄	3غ
3. L-asparagine	5غ
4. NaCl	0.5غ
5. MgSO ₄ .7H ₂ O (1M)	0.5غ
6. CaCl ₂ .2H ₂ O(0.1M)v	0.015غ
7. Agar	18غ
8.phenol Red(2.5%)	0.30-0.04 مل
9.Glucose(20%)	10مل

عدل الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 7 ثم عقم بالموعدة .

❖ الوسط السائل لعزل البكتريا المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز(M9):

حضر من مكونات وسط العزل الصلب السابق مع استبعاد الآغار

(Feng et al., 2017,1509 ; Mahajan et al.,2014,11).

❖ وسط الأساس السائل لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز:

حضر هذا الوسط بإذابة المكونات الآتية في لتر من الماء المقطر .

1. Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	6غ
2. K ₂ HPO ₄	3غ
3. L-asparagine	3غ
4. NaCl	0.5غ
5. MgSO ₄ .7H ₂ O (1M)	0.5غ
6. CaCl ₂ .2H ₂ O(0.1M)	0.015غ
7. Yeast extract	1غ
8. Pepton	1غ
9.Glucose	2غ

عدل الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 7 ثم عقم بالموعدة . استعمل هذا الوسط للغلبة الثانوية

وإنتاج إنزيم الأسبارجينااز (Pradhan et al., 2013,36).

3-طرائق العمل:

❖ عزلات بكتريا *Bacillus*:

حصلنا على 23 عزلة من بكتريا *Bacillus* من مخبر التقانات الحيوية الصناعية والغذائية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية مصنفة إلى مستوى الجنس من قبل الدكتورة ناريمان النعمة ومعزولة من ترب محلية مختلفة. نُشِطت هذه العزلات بطريقة التخطيط على وسط الآغار المغذي (Nutrient agar) وحضنت بحرارة 30°م لمدة 48 ساعة ثم نقلت مستعمرة من المستعمرات المتشكلة إلى 10مل من وسط المرق المغذي (Nutrient broth) وحضنت بحرارة 30°م لمدة 48 ساعة، بعد التأكد من أنها بكتريا عسوية حيث أجري عليها اختبار التبوغ بتعريض المعلق البكتيري لحرارة 80°م لمدة 15 دقيقة (Bergy et al.,2012,561)

❖ تصنيف بكتريا *Bacillus*:

☒ دراسة بعض الخواص المزرعية والمجهريّة والبيوكيميائية للمستعمرات الناتجة:

✓ الخواص المزرعية:

درست بعض الخواص المزرعية مثل شكل المستعمرة وقطرها، اللون، السطح.

✓ الخواص المجهريّة:

درست بعض الخواص المجهريّة مثل شكل الخلية، شكل الأبواغ ومكان توزيعها وصبغها بصبغ الملاكيث، صبغة غرام.

✓ الاختبارات البيوكيميائية:

أجريت الاختبارات البيوكيميائية التالية:

-اختبار حلمة النشاء: يحضر 100 مل من الوسط المغذي المتكون من: 1 غ من الببتون، 0.5 غ من KH_2PO_4 ، 0.2 غ من النشاء، 1.5 غ من الآغار، pH 7 يعقم الوسط في الموصدة عند 121°م لمدة 20 دقيقة، ويوزع في أطباق بتري، ثم تزرع البكتريا التابعة لجنس *Bacillus* بطريقة التخطيط، تحضن الأطباق المزروعة عند درجة الحرارة 30°م لمدة 24 ساعة، وللكشف عن قدرة البكتريا المدروسة على حلمة النشاء يستخدم محلول اليود اليودي (2غ يود البوتاسيوم، 1غ يود) تذاب في الماء المقطر، ويكمل الحجم إلى 300 مل) الذي يصب حتى يغمر سطح الطبق المزروع، فإذا تلون سطح الطبق بلون أزرق (باستثناء المنطقة التي جرى فيها حلمة النشاء بفعل البكتريا المنتجة لإنزيم الأميلاز التي تبقى

غير ملونة)، يكون الاختبار إيجابياً، أما إذا تلون كامل سطح الطبق باللون الأزرق يكون الاختبار سلبياً (Atlas, 1998,80).

-اختبار الكاتالاز: للكشف عن قدرة البكتريا المدروسة على إنتاج إنزيم الكاتالاز الذي يحلل الماء الأكسجيني إلى ماء وأكسجين يتم نشر البكتريا بواسطة الإبرة اللاقحة على سطح شريحة زجاجية ثم يتم إضافة قطرة من محلول H_2O_2 بتركيز 10%، فإذا تشكلت فقاعات غازية، يدل هذا على إنتاج الكاتالاز (Atlas, 1998,80).

-اختبار إنتاج الأندول: للتأكد من قدرة البكتريا المدروسة على تحويل التربتوفان إلى أندول يحضر وسط المرق المغذي ويضاف إليه 0.01 % تربتوفان، يوزع الوسط في أنابيب اختبار، ويعقم في الموصدة، ثم تلقح الأنابيب بالبكتريا المدروسة، (يترك أنبوب بدون زرع كشاهد) وتحضن عند درجة الحرارة 30°م لمدة 24 ساعة. يجرى اختبار تشكل الأندول بواسطة كاشف كوفاك الذي يتكون من 1 غ من باراداي ميتيل أمين بنز ألدهيد و 15 مل من الكحول الإيثيلي و 10 مل من حمض كلور الماء المركز، حيث يوضع 1-2 مل من الكاشف على سطح الأنابيب المزروعة، وفي حال ظهور لون أحمر يكون ذلك دليل على وجود الأندول، وتقارن النتائج مع الأنبوب الشاهد (Atlas, 1998,80).

-اختبار أحمر الميثيل (MR) وفوكس بروسكاور (VP): يتم هذا الاختبار بتلقيح البكتريا المراد اختبارها في وسط مرق الغلوكوز تركيز 1% وبعد انتهاء فترة الحضانة، يقسم الوسط الزرع الحاوي على البكتريا إلى قسمين في أنابيب اختبار معقمة. يضاف إلى الأنبوب الأول قطرات من كاشف أحمر الميثيل، يضاف إلى الأنبوب الثاني قطرات من كاشف بروسكاور الذي يتكون من الفانافثول 5% ومحلول هيدروكسيد البوتاسيوم 40%. ثم تقرأ النتيجة بعد مرور 10 دقائق فإذا تغير اللون من البرتقالي إلى الأحمر دل ذلك على إيجابية الاختبار (Atlas, 1998,80).

-اختبار استهلاك السترات: تستهلك البكتريا السترات للحصول على مصدر وحيد للكربون، يتم إجراء هذا الاختبار وذلك بتلقيح الوسط الزرع سيمون ستريت آغار Simmon's citrate agar الحاوي على دليل بروموثايمول الأزرق Bromothymol blue بالبكتريا المراد اختبارها، وبعد انتهاء فترة الحضانة 24-48 ساعة تقرأ النتيجة. فإذا تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دل ذلك على إيجابية الاختبار (Atlas, 1998,80).

-اختبار تخمير السكريات: تم التحري عن قدرة العزلة الأكفأ على تخمير السكريات التالية: (غلوكوز، سكروز، إينوسيتول، فركتوز، رافينوز، أرابينوز، زيلوز، مانيتول، رامنوز، الغالاكتوز)، واختبار تخمير السكريات حضر وسط M9 السائل المكون من:

6 غ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، 3 غ K_2HPO_4 ، 5 غ L-asparagine ، 0.5 غ NaCl ، 0.5 غ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 0.015 غ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، 0.28 مل صبغة الفينول الأحمر (0.007%) في لتر من الماء المقطر ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7، وعقم بالموصدة بدرجة حرارة 121°م لمدة 20 دقيقة. عقت السكريات باستخدام مرشح ميكروبيولوجي بقطر ثقب 0.22 ميكرو ميلي، وأضيفت إلى الوسط الأساسي بتركيز 1% بعد تبريده إلى درجة حرارة الغرفة، بالإضافة إلى وجود شاهدين الأول يحتوي على مكونات الوسط كافة بوجود سكر الغلوكوز (Positive control) والثاني يحتوي على جميع مكونات الوسط فقط بدون وجود سكر (Negative control) (Patil and Jadhav, 2017,32)، وعدّ تغير لون وسط M9 من اللون الأصفر إلى اللون الوردي دليلاً على قدرة العزلة البكتيرية على تخمير السكر.

❖ انتخاب السلالات المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز:

☒ الغلبة الأولية:

أجري الاختبار بوضع 15 ميكرو لتر من عزلات بكتريا *Bacillus* المنتقة على وسط العزل الصلب M9 المضاف له صبغة الفينول الأحمر بتركيز مختلفة تراوحت بين (0.001-0.002-0.0025-0.0037-0.005-0.007-0.0075%) مع وجود عینتي شاهد، الشاهد الأول لا يحتوي على صبغة الفينول الأحمر، والشاهد الثاني لا يحتوي على مادة الأسبارجين وإنما يحتوي على مادة NaNO_3 كمصدر للنيتروجين. وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 30°م لمدة 24-48-72 ساعة مع مراقبة تغير لون الوسط، وبعد تشكل مستعمرات وردية اللون نتيجة إيجابية بسبب تغير لون الوسط نتيجة لتغير pH كاشف الفينول الأحمر من الأصفر في الوسط الحمضي إلى الوردي في الوسط القلوي مما يدل على استهلاك مادة الأسبارجين وقدرة العزلات البكتيرية على إنتاج الإنزيم. قيس قطر المستعمرات والهالات المتشكلة وقدرت كفاءة التحليل من خلال القانون التالي: كفاءة التحليل = قطر الهالة / قطر المستعمرة (Feng et al.,2017,1509).

تم التأكد من قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج الإنزيم من خلال تنمية البكتريا في وسط العزل السائل الحاوي على صبغة الفينول الأحمر بتركيز مختلفة (0.001-0.002-0.0025-0.0037-

0.005-0.007-0.0075%) مع وجود عينتي شاهد، الأول غير حاوي على صبغة الفينول الأحمر، والشاهد الثاني غير حاوي على مادة الأسبارجين وإنما حاوي على مادة NaNO_3 كمصدر للنيتروجين (Feng et al.,2017,1509 ; Pradhan et al.,2013,36).

☒ الغلبة الثانوية:

استعملت طريقة المزارع المغمورة (Submerged culture) المذكورة من قبل Moorthy وآخرون (1862,2010) باستعمال حاضنة هزازة لإنتاج الإنزيم. إذ لقت دوارق زجاجية سعة 250 مل تحتوي على 50 مل من وسط الإنتاج السائل المعقم بمليتر واحد من البكتريا المنمأة بحيث يكون تركيز اللقاح في وسط الإنتاج حوالي 10^5 خلية/مل. حضنت الدوارق عند درجة حرارة 30°C مدة 48 ساعة بسرعة تحريك 150 دورة/دقيقة بعد ذلك فصلت الكتلة الحيوية من وسط النمو بالطرد المركزي المبرد وعلى سرعة 6000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 4°C . تم التخلص من الراسب، وجمع الرائق الذي عد المستخلص الخام للإنزيم وتم ترشيحه باستخدام ورق ترشيح (Whatman paper No1)، ثم قدرت الفعالية الأنزيمية وفقاً لـ Patil و Jadhav (32,2017).

❖ تقدير الفعالية الأنزيمية لإنزيم الأسبارجيناز:

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل Patil و Jadhav (32,2017) إذ أضيف 0.5 مل من مستخلص الإنزيم الخام إلى محلول التفاعل المتكون من 0.5 مل من المحلول الموقى Tris-HCl (0.05M، pH 8.6) و 0.5 مل من محلول المادة الأساس الأسبارجين (0.04M) وحضن مزيج التفاعل في حمام مائي على درجة حرارة 37°C واستمر التفاعل الإنزيمي مدة 30 دقيقة. أوقف التفاعل بإضافة 0.5 مل من محلول ثلاثي كلور حمض الخل TCA (0.1N)، وأجريت عملية طرد مركزي بسرعة 9000 دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق. أخذ 0.1 مل من الرائق وأضيف له 3.7 مل من الماء المقطر. تم الكشف عن الأمونيا الناتجة بفعل الإنزيم بإضافة 0.2 مل من محلول نسلر (كاشف نسلر يحوي على مكونات HgCl_2 و KI تشكل في الوسط القلوي بوجود الأمونيا معقداً يدعى يوديد زئبقيك البوتاسيوم وكلما ازداد تركيز الأمونيا زادت شدة اللون الأصفر وبالتالي تزداد الامتصاصية) إلى محلول التفاعل ومزج الخليط جيداً باستعمال مازجة الأنابيب Vortex وحفظ المزيج بدرجة حرارة 20°C لمدة 20 دقيقة ثم قيست الامتصاصية عند طول موجة 450 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) مقابل محلول الشاهد (Blank) الحاوي على جميع المواد ما عدا محلول

الإنزيم. تعرف وحدة فعالية الإنزيم (Unit) بأنها كمية الإنزيم التي تحرر ميكرومولاً واحداً من الأمونيا في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة، لكن لتقدير فعالية إنزيم الأسبارجينااز الناتج يجب أولاً التوصل إلى معادلة المنحني القياسي للأمونيوم،

ومنها يستخرج تركيز الأمونيا المتحرر بفعل الإنزيم على المادة الأساس الأسبارجين بالاستعانة بذلك المنحني القياسي لمحلول الأمونيا.

$$\frac{\text{كمية } NH_3 \text{ المتحررة } (\mu mol) \times 2}{0.1 \times 30} = \text{الأنزيم (وحدة/مل)}$$

حيث:

2 يُمثل حجم المزيج الابتدائي المتواجد فيه المستخلص الأنزيمي (مل).

30 يُمثل زمن التفاعل (دقيقة).

0.1 يُمثل الكمية المأخوذة من الرائق (مل) (Uzma et al.,2016,37).

☒ المنحني القياسي لمحلول سلفات الأمونيوم: (Moorthy et al.,2010,1862)

حضرت تراكيز متدرجة من سلفات الأمونيوم تراوحت من (0-5) ميلي مول بإجراء التخفيفات

اللازمة لمحلول سلفات الأمونيوم (10ميلي مول) بالماء المقطر كما موضح في الجدول (4).

الجدول (4) تراكيز محلول سلفات الأمونيوم القياسي

رقم الأنبوب	محلول سلفات الأمونيوم بتركيز 10 (ميلي مول/ مل)	ماء المقطر (مل)	التركيز النهائي للأمونيا (ميلي مول/ مل)
1	0	100	0
2	2.5	97.5	0.25
3	5	95	0.50
4	7.5	92.5	0.75
5	10	90	1
6	15	85	1.5
7	20	80	2
8	30	70	3
9	40	60	4
10	50	50	5

نُقل 1مل من المحاليل المحضرة أعلاه إلى أنابيب اختبار وأضيف إلى كل منها 0.2 مل من محلول نسلر ومزج الخليط جيداً باستعمال مازجة الأنابيب Vortex وحفظ المزيج بدرجة حرارة 20°م لمدة 20 دقيقة ثم قيست الامتصاصية عند طول موجة 450 نانومتر في جهاز المطياف الضوئي

(Spectrophotometer) الذي تم تصفيره باستعمال الشاهد المؤلف من المحاليل المستعملة لتقدير الأمونيا واستخدام الماء بدلاً من محلول الأمونيوم نفسه الأنبوب (1) جدول (4).

❖ أمثلة ظروف إنتاج إنزيم الأسبارجينااز:

☒ قدرة العزلة البكتيرية *B.licheniformis* على استهلاك السكريات كمصدر وحيد للكربون:

تم اختبار العديد من السكريات (غلوكوز، سكروز، فركتوز، رافينوز، مانيتول، غالاكتوز، زيلوز) لمعرفة تأثير هذه السكريات على إنتاجية الإنزيم نسبة إلى قدرة البكتريا على استهلاكها كمصدر وحيد للكربون. ولاختبار تخمير السكريات حضر وسط M9 الصلب المكون من: 6 غ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، 3 غ K_2HPO_4 ، 5 غ L-asparagine ، 0.5 غ NaCl ، 0.5 غ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 0.015 غ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، 0.28 مل صبغة الفينول الأحمر (0.007%) في لتر من الماء المقطر ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7 وأضيف له 18 غ آغار، ثم عقم بالموصدة بدرجة حرارة 121°م لمدة 20 دقيقة. عقت السكريات باستخدام مرشح ميكروبيولوجي بقطر ثقب 0.22 ميكروميلي، وأضيف 10 مل من تركيز 20% من كل سكر إلى لتر من الوسط بعد تعقيمه وتبريده إلى حرارة 50°م (Patil and Jadhav, 2017,32)، وعدّ تشكل هالات وردية اللون على وسط M9 دليلاً على قدرة العزلة البكتيرية على تمثيل السكر واستخدامه كمصدر وحيد للكربون.

☒ تأثير المتغيرات المدروسة في إنتاجية إنزيم الأسبارجينااز:

درست ظروف إنتاج إنزيم الأسبارجينااز لتحديد الطريقة المثلى لإنتاجه من بكتريا *Bacillus spp*، تم إنتاج الإنزيم باستخدام طريقة التخمير المغمورة في وسط الإنتاج السائل المذكور سابقاً، ثم درس تأثير خمسة متغيرات وهي:

1. درجة حرارة التحضين (25-30-35-40-45°م).
 2. رقم الحموضة (6-7-8-9-10).
 3. سرعة الدوران (0-50-100-150-200).
 4. تركيز مصدر الكربون (1-1.5-2-2.5-3%).
 5. تركيز مصدر النيتروجين (1-1.5-2-2.5-3%) في نمو السلالة المستخدمة.
- مع تثبيت زمن مدة التحضين 48 ساعة والذي يثبت أنه يعطي أعلى إنتاجية، درس تأثير كل متغير عند خمسة مستويات موضحة في الجدول (5) حيث استخدم البرنامج الإحصائي Minitab

والتصميم الإحصائي (Response Surface Methodology (RSM) Muthuvelayudham) and Viruthagiri, 2010,97)، الذي وضع ليس فقط لاختصار عدد التجارب المستخدمة في عملية الأمثلة، بل لإعطاء نتائج أكثر منطقية ووضوح من البرامج الإحصائية الأخرى، من خلال دراسة تأثير كل متغير على حدا وتأثير تداخل المتغيرات مع بعضها البعض حيث تعبر X_1 عن درجة الحرارة، X_2 عن درجة الحموضة، X_3 سرعة الدوران، X_4 تركيز الغلوكوز، X_5 تركيز مستخلص الخميرة. ويعبر تحليل نتائج الأمثلة عن العلاقة بين الفعالية الإنزيمية (Y) Response والمتغيرات الخمسة المدروسة (X) Independent variables بمعادلة من الدرجة الثانية (Thenmozhi et al., 2011,486) كما يلي:

$$Y=a+bX_1+cX_2+dX_3+eX_4+fX_5+gX_1X_2+hX_1X_3+iX_1X_4+jX_1X_5+kX_2X_3+lX_2X_4+mX_2X_5+nX_3X_4+oX_3X_5+pX_4X_5+qX_1X_2X_3+rX_1X_2X_4+sX_1X_2X_5+tX_1X_3X_4+uX_1X_3X_5$$

حيث:

Y: العامل المدروس Response.

a: الثابت Constant.

b, c, d, e, f: العامل المتغير Linear coefficient.

g, h, i, j, k: العامل المتغير مربع Square coefficient.

l, m, n, o, p, q, r, s, t, u: العوامل المترابطة مع بعضها Interaction coefficient.

الجدول (5) يبين المتغيرات المدروسة ومستوياتها باستخدام البرنامج الإحصائي Minitab

المتغيرات					مستويات المتغيرات بصورة رمز
سرعة الدوران (دورة/دقيقة)	رقم الحموضة	درجة حرارة التحسين °م	تركيز مستخلص الخميرة %	تركيز سكر الغلوكوز %	
0	6	25	1	1	$-\alpha = -2$
50	7	30	1.5	1.5	-1
100	8	35	2	2	0
150	9	40	2.5	2.5	+1
200	10	45	3	3	$+\alpha = +2$

تم وضع التصميم الإحصائي المشار إليه في الجدول (6) باستخدام البرنامج الإحصائي Minitab، والذي يعبر عن المتغيرات المدروسة ومستوياتها، ويبين التجارب التي أجريت وعددها 32 تجربة.

الجدول (6) يبين التصميم الإحصائي للتجارب

المتغيرات	درجة الحرارة	رقم الحموضة	سرعة الدوران	تركيز الغلوكوز	تركيز مستخلص الخميرة %
رقم التجربة	°م		(دورة/دقيقة)	%	
1	30	7	50	1.5	2.5
2	40	7	50	1.5	1.5
3	30	9	50	1.5	1.5
4	40	9	50	1.5	2.5
5	30	7	150	1.5	1.5
6	40	7	150	1.5	2.5
7	30	9	150	1.5	2.5
8	40	9	150	1.5	1.5
9	30	7	50	2.5	1.5
10	40	7	50	2.5	2.5
11	30	9	50	2.5	2.5
12	40	9	50	2.5	1.5
13	30	7	150	2.5	2.5
14	40	7	150	2.5	1.5
15	30	9	150	2.5	1.5
16	40	9	150	2.5	2.5
17	25	8	100	2	2
18	45	8	100	2	2
19	35	6	100	2	2
20	35	10	100	2	2
21	35	8	0	2	2
22	35	8	200	2	2
23	35	8	100	1	2
24	35	8	100	3	2
25	35	8	100	2	1
26	35	8	100	2	3
27	35	8	100	2	2
28	35	8	100	2	2
29	35	8	100	2	2
30	35	8	100	2	2
31	35	8	100	2	2
32	35	8	100	2	2

❖ تنقية إنزيم الأسبارجينااز:

☒ الحصول على المستخلص الخام للإنزيم:

أنتج إنزيم الأسبارجينااز بطريقة التخمير المغمر وباستخدام وسط الأساس السائل. وزع الوسط في دوارق سعة 250 مل بحجم 50 مل في كل دورق بعد أن أضيف الغلوكوز بنسبة 1.5% ومستخلص الخميرة بنسبة 2.5% وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 9 ثم عقم بالموصدة. لقحت الدوارق بـ 1% من

البكتريا المنمأة (10^5 خلية/مل) ثم حضنت الدوايق في الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/د عند درجة حرارة 30°م، ومدة الحضان 48 ساعة وبعد انتهاء مدة التخمير أجريت عملية طرد مركزي للمزرعة الناتجة بسرعة 6000 دورة/د لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4°م بعدها جمع الرائق وأهمل الراسب، عن طريق الترشيح باستخدام ورق الترشيح (Whatman paper No1) والذي اعتبر مستخلصاً خاماً للإنزيم (Mahajan et al., 2012,125).

❖ مراحل تنقية الأسبارجينااز:

☒ المعاملة بالأسيتون: (Mahajan et al., 2014,11)

أضيف في المرحلة الأولى من التنقية الأسيتون المركز بنسبة 80% إلى المستخلص الخام، وترك بدرجة حرارة 4°م لمدة 16 ساعة مع التحريك على محرك مغناطيسي بسرعة متوسطة لإتاحة ترسيب بروتين الإنزيم، ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4°م، فصل الرائق وأخذ الراسب الناتج وحل في 10 مل من المحلول الموقي Tris-HCl pH 8.6 (M0.05)، واحتفظ بالرائق والراسب عند حرارة -20°م لحين الاستخدام (Mahajan et al., 2014,11). قدر حجم المستخلص الإنزيمي وتركيز البروتين والفعالية الإنزيمية والنوعية للرائق والراسب.

☒ التنقية باستخدام أعمدة الكروماتوغرافيا:

✓ عمود الـ Sephadex G-100: (Mahajan et al., 2014,11)

تتكون مادة الـ Sephadex من مصفوفة (متوالية) من الديكسترين (ناتج من ارتباط وحدات الغلوكوز بروابط أثيرية)، يفصل هذا العمود على مبدأ الوزن الجزيئي، يسمح بفصل البروتينات ذات الأوزان الجزيئية من 4-150 كيلو دالتون، وقد جرت هذه المرحلة من التنقية بعد مرحلة الترسيب بالأسيتون حيث أخذ الراسب الناتج بعد مرحلة التشبع بنسبة 80% وحل في 10 مل من محلول Tris-HCl pH 8.6 (0.05M). تم تحضير هلام الـ Sephadex G-100 كالتالي: حلت الهلامة بالمحلول الموقي Tris-HCl pH 8.6 (M0.05). بعدها علقت بـ 100 مل من نفس المحلول الموقي وأزيل منها الغاز (Degassing) بمضخة تفريغ الهواء ثم سكبت الهلامة بلطف في عمود زجاجي بأبعاد (30×2.6 سم) مع ملاحظة عدم تشكل فقاعات، ثم غسل عمود الهلامة بمحلول Tris-HCl pH 8.6 (0.05M) 3 مرات، وثبتت سرعة الجريان عند 30 مل/ساعة. أضيف لسطح عمود Sephadex G-100 3 مل من الأنزيم المعالج بالأسيتون، ومرر المحلول الموقي Tris-HCl pH 8.6 (0.05M) على العمود مع المحافظة على سرعة جريان 30 مل/ساعة. جُمعت أجزاء محلول الاسترداد

مع المحافظة على سرعة جريان 30 مل/ساعة وبواقع 0.5 مل للجزء الواحد في الدقيقة. وتمت متابعة امتصاصية كل جزء عند طول موجة 280 نانومتر للأجزاء المفصولة، ورسم المنحني البياني للعلاقة بين الامتصاصية وأرقام الأجزاء، ثم جمعت محتويات الأنابيب التي تقع ضمن تشكيل القمة، وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها.

✓ (DEAE –Sepharose) DiethyleAminoethyle –Sepharose :

تتكون مادة Sepharose من سلاسل متشابكة من الأغاروز مرتبطة بروابط هيدروجينية. هو مبادل أيوني ضعيف للشحنة السالبة، يفصل على مبدأ الشحنة الكهربائية ويستخدم لعملية التنقية السريعة في الدراسات البحثية والتطبيقات الصناعية (Jimat et al., 2017, 1). أجريت عملية التنقية لهذه المرحلة وفق الخطوات التالية: جمعت الأجزاء التي أظهرت أعلى فعالية أنزيمية في المرحلة السابقة، وأضيفت إلى سطح العمود الحاوي على هلامة DEAE -Sepharose.

تم تحضير هلامة DEAE- sepharose كالتالي: حلت الهلامة بالمحلول الموقى Tris – pH 8.6 HCl (0.05M). بعدها علقت بـ 100 مل من نفس المحلول الموقى وأزيل منها الغاز (Degassing) بمضخة تفريغ الهواء ثم سكبت الهلامة بلطف في عمود زجاجي بأبعاد (10×2.3سم) مع ملاحظة عدم تشكل فقاعات، غسل العمود بمحلول Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) 3 مرات، وثبتت سرعة الجريان عند 60 مل/ساعة. أضيف لسطح عمود DEAE- sepharose 3 مل من المحلول الإنزيمي الناتج من المرحلة السابقة، ومرر محلول الاسترداد Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) على العمود. جمعت الأجزاء المفصولة من العمود مع المحافظة على سرعة الجريان 60 مل/ساعة وبواقع 1 مل للجزء الواحد في الدقيقة. وتمت متابعة امتصاصية كل جزء عند طول موجة 280 نانومتر للأجزاء المفصولة، ورسم المنحني البياني للعلاقة بين الامتصاصية وأرقام الأجزاء، ثم جمعت محتويات الأنابيب التي تقع ضمن تشكيل القمة، وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها وفق طريقة Lowry (1951) باستخدام bovine serum albumin (BSA) كبروتين قياسي (Mahajin et al., 2014).

❖ تقدير البروتين:

اتبعت طريقة Lowry وآخرون (1951, 265) و Mahajan وآخرون (2014, 11) لتقدير تركيز البروتين كما يلي:

☒ المواد والمحاليل المستخدمة:

محلول (A) كربونات الصوديوم 2%: حضر بإذابة 2 غ من Na_2CO_3 في 25 مل من من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH (N 0.1) ثم يكمل الحجم بنفس المحلول إلى 100 مل.

محلول (B) كبريتات النحاس 1%: حضر بإذابة 1 غ من كبريتات النحاس $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ بكمية من الماء المقطر ثم يكمل الحجم إلى 100 مل.

محلول (C) طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم 2%: حضر بإذابة 2 غ من طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم بكمية من الماء المقطر ثم يكمل الحجم إلى 100 مل.

محلول العمل المكون من مزيج من المحاليل A و B و C محضرة آنياً بنسبة (1:1:98).

كاشف فولن Folin-Ciocalteu phenol المخفف بنسبة (1 كاشف: 1 ماء مقطر).

محلول ألبومين المصل البقري الخزين (BSA) المحضر بتركيز 200 مغ/مل ماء مقطر (محلول الخزين).

☒ تحضير المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين:

حضرت تراكيز متدرجة من محلول BSA تراوحت من (0-100 ميكروغرام/مل) بإجراء التخفيف اللازمة لمحلول BSA الخزين (200 ميكروغرام/مل) بالماء المقطر وكما موضح في الجدول (7).

الجدول (7) يوضح تراكيز محلول BSA القياسي.

رقم الأنبوب	محلول BSA الخزين بتركيز 200 ميكروغرام/مل (مل)	الماء المقطر (مل)	تركيز محلول BSA (ميكروغرام/مل)
1	0.0	5	0.0
2	0.25	4.75	10
3	0.50	4.5	20
4	0.75	4.25	30
5	1	4	40
6	1.25	3.75	50
7	1.50	3.50	60
8	1.75	3.25	70
9	2	3	80
10	2.25	2.75	90
11	2.50	2.50	100
12	5	0	200

أضيف لكل 1 مل من هذه التراكيز 5 مل من محلول العمل المحضر آنياً مع المزج الجيد. تركت النماذج مدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ثم أضيف 0.3 مل من محلول كاشف فولن بالتدريج مع التحريك السريع ليتجانس المحلول ويظهر اللون الأرجواني الناتج عن تفاعل الكاشف مع معقد النحاس ونتروجين البروتين عند ترك الخليط بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة. تجرى تجربة شاهد بأخذ 1 مل من الماء المقطر بدلاً من محلول البروتين القياسي. تقاس الامتصاصية عند طول موجة 750 نانومتر ومنها رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين تركيز BSA (ميكروغرام/مل) والامتصاصية (Moorthy et al., 2010,1862).

☒ تقدير تركيز البروتين في المستخلص الإنزيمي وبعد كل مرحلة من مراحل التنقية:

قُدر البروتين في محلول العينة قبل التنقية و بعد كل مرحلة من مراحل التنقية بنفس خطوات الطريقة المذكورة أعلاه (تحضير المنحنى القياسي للبروتين)، ولكن بأخذ 1 مل من العينة الحاوية على بروتين الإنزيم بدلاً من 1 مل من تركيز محلول البروتين القياسي، ثم قيست الامتصاصية عند طول الموجة 750 نانومتر، وبالتعويض بمعادلة المنحنى القياسي للبروتين تم الحصول على تركيز البروتين في العينة مقدراً بالميكروغرام/مل (Mahajan et al.,2014,11; Hatamzadeh et al., 2020,8309).

❖ طريقة الرحلان الكهربائي للبروتين باستخدام طريقة

:SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكريلاميد تبعاً لطريقة (Laemmli 1970) والموصوفة من قبل Garfin (1990,425) و Rath وآخرون (2009,1760) في اختبار نقاوة الإنزيم، حيث تعتبر هذه الطريقة من أهم طرائق الفصل للاستدلال على نقاوة البروتين ووزنه الجزيئي وبما أن جزيئات البروتين مختلفة في الشكل والوزن الجزيئي والشحنة يتم في البداية تغيير طبيعتها، حيث تقوم مادة الـ SDS بتوحيد شحنة البروتينات فتصبح ذات شحنة سالبة، وعند تحميل خليط البروتينات على هلام الـ Polyacrylamide تتعرض للتيار الكهربائي فتهاجر البروتينات باتجاه القطب الموجب أثناء ذلك تُفصل بواسطة الغربلة الجزيئية (molecular sieving) تبعاً للوزن الجزيئي من ثم يتم تظهير حزم البروتين باستخدام صبغة خاصة، ويمكن معرفة وزن البروتين الناتج بمقارنة المسافة التي يقطعها جزيء البروتين على هلام الفصل مع حزم من الجزيئات البروتينية معلومة الوزن الجزيئي.

☒ **المواد والمحاليل المستخدمة:** (Garfin,1990,425)

المحلول الموقى لهلام الفصل Separation gel buffer (pH 8.8): حضر بتركيز (1.5N) وذلك بإذابة 18.2 غ من Tris في 80 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 8.8 باستخدام (1 N) من حمض كلور الماء (0.1 N) وأكمل الحجم بعد ذلك إلى 100 مل بالماء المقطر.

المحلول الموقى لهلام الرص Stacking gel buffer (pH 6.8): حضر بتركيز (0.5 N) وذلك بإذابة 6 غ من Tris في 40 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6.8 باستخدام حمض كلور الماء (1 N) وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

محلول الترحيل Electrode buffer (pH 8.3): ويتكون من 3.03 غ من Tris، 14.4 غ غلايسين، و1 غ SDS تحل جميعها بالماء المقطر ويعدل الرقم الهيدروجيني إلى 8.3 باستخدام حمض كلور الماء (1 N) وأكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر.

محلول أكريلاميد Acrylamide stock solution: حضر بإذابة 30 غ من أكريلاميد مع 0.8 غ من Bis-أكريلاميد Bis-acryl amide في 60 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر، وحفظ في الثلاجة.

محلول SDS 10%: أذيب 10 غ من (SDS) في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

محلول بيرسلفات الامونيوم (APS) Ammonium Per Sulphate: حضر أنياً بتركيز (1.5%) وذلك بإذابة 0.15 غ من (APS) في 10 مل من الماء المقطر.

تيميد TEMED (N,N,N,N-tetra mmethyl ethylene diamine) وهو جاهز للاستعمال.
محلول التثبيت Fixing solution: حضر بمزج 50 مل كحول الميثيل مع 10 مل حمض الخل و40 مل ماء مقطر.

محلول التصبغ Staining Solution: حضر بإذابة 0.25 غ من صبغة كوماسي الزرقاء (G) في 250 مل من خليط مكون من حمض الخل: كحول الميثيل: الماء المقطر بنسبة 5:4:1 على التوالي.
محلول إزالة الصبغة Destaining solution: يتكون من خليط من حمض الخل الثلجي: كحول الميثيل: ماء مقطر بنسبة 5:4:1 على التوالي.

محلول صبغة بروموفينول الأزرق Bromo phenol blue %0.25 وحضر بإذابة 0.25 غ من صبغة بروموفينول الأزرق في 100 مل من محلول (50%) من الغليسرول.

☒ طريقة الرحلان الكهربائي لإنزيم الأسبارجيناز باستخدام SDS-PAGE:

تجمع الأجزاء الخاصة بالرحلان الكهربائي، وتثبت الشرائح داخل إطار الصب باستخدام الملاقط الجانبية، يتم تحضير الهلام بنوعيه: هلام الفصل بتركيز 12% بولي أكريلاميد، وهلام الرص بتركيز 4.5% بولي أكريلاميد حسب الجدول (13) وبدون إضافة المادتين (APS) و (TEMED) لحين صب الهلام في القالب بين الشريحتين مباشرة

(Rath *et al.*, 2009,1760; Laemmli,1970,680; Moorthy *et al.*,2010,1862)

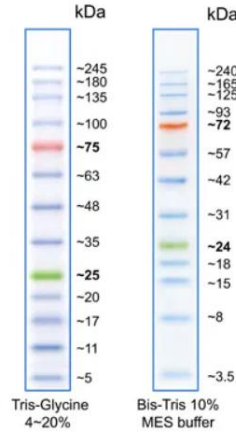
الجدول (8) يبين مكونات هلامة الفصل وهلامة الرص والأحجام المستخدمة.

المادة	الحجم المستخدم لتحضير هلامة الفصل	الحجم المستخدم لتحضير هلامة الرص
هلام الأكريلاميد	16.25 مل	3.25 مل
ماء مقطر	11.125 مل	8.5 مل
Tris	9.375 مل (pH 8.8 ، N 1.5)	1.5625 مل (pH 6.8 ، N 1)
SDS 10%	0.375 مل	0.125 مل
APS 10%	0.375 مل	0.125 مل
TEMED	20 ميكروليتر	15 ميكروليتر

يتم صب محلول هلام الفصل حتى الخط الظاهر على الطبقة الزجاجي (يحدد بوضع المشط قبل الصب ثم يرسم خط أسفله بمسافة 1 سم) ويكون بوضع عمودي. يتم التخلص من الفقاعات الهوائية بعد الانتهاء من الصب بإضافة كمية من الماء المقطر على سطح الهلام، ثم يترك الهلام ليتصلب. حضر هلام الرص وأضيف إلى القالب بعد أن جفف الماء المقطر باستخدام ورق الترشيح ويوضع المشط داخل الفراغ بين الشريحتين إذ يترك لمدة 20 دقيقة، من ثم يتم سحب المشط من الهلام بحرص حتى لا تتكسر الآبار المتشكلة. يفصل الإطار من قالب الصب وتثبت الشريحتان داخل جهاز الرحلان عن طريق حامل يوضع في خزان الفصل (Bio-Rad tank- California). يغمر الحامل بمحلول الترحيل ويجري تحميل العينات بمقدار 20 ميكروليتر ممزوجة بالصبغة الدالة على الرحلان في الآبار أعلى الهلامة، يتم توصيل مزود الطاقة بعد إغلاق الخزان وتوصيل الأقطاب الموجبة والسالبة في أماكنها الصحيحة، ويضبط التيار على 160 فولت وتستمر عملية الرحلان لمدة 3 ساعات، وبعد وصول الصبغة إلى نهاية الهلامة يتم رفع الحامل من خزان الفصل وإخراج الهلام من بين الشرائح. يوضع الهلام في حوض التلوين ويضاف محلول التثبيت. يغسل الهلام عدة مرات بالماء المقطر لإزالة آثار محلول

التثبيت، ثم يوضع الهلام في محلول التصبغ لمدة 60 دقيقة حتى ظهور الحزم بشكل واضح. يقدر الوزن الجزيئي للبروتينات المفصولة بالمقارنة مع بروتينات قياسية معروفة الوزن الجزيئي تتراوح أوزانها بين 5-245 كيلو دالتون، والشكل (3) يبين البروتينات القياسية المستخدمة (BlueElf prestained protien) من شركة Jena Bioscience.

BLUelf Prestained Protein Ladder



الشكل (3) يوضح البروتينات القياسية المستخدمة في الرحلان الكهربائي (BlueElf prestained protien). ولتحديد الوزن الجزيئي للبروتينات يتم رسم المنحني القياسي، حيث تجرى عملية الرحلان الكهربائي للبروتينات القياسية معروفة الوزن، ويتم فصلها وقياس مسافة الرحلان. يعتمد رسم المنحني القياسي على حركية البروتينات في الهلام، والتي تكون متناسبة طردياً مع لوغاريتم وزنها الجزيئي، ويمثل المنحني القياسي قيم لوغاريتم الوزن الجزيئي (المعروف) مقابل الحركة النسبية RF لتلك البروتينات.

حسبت الحركة النسبية (Rf) Relative mobility لحزم البروتينات القياسية وللإنزيم من

$$R_f = \frac{D_{protein}}{D_{dye}} \quad \text{المعادلة الآتية:}$$

حيث تمثل $D_{Protein}$ مسافة رحلان البروتين، وتمثل D_{dye} مسافة رحلان الصبغة (Boguth et al., 2000, 1037).

❖ دراسة بعض الصفات الحركية لإنزيم الأسبارجينااز المنقى المفرز من بكتريا *Bacillus licheniformis*

☒ تأثير درجة الحرارة في فعالية الإنزيم المنقى:

قدرت فعالية الإنزيم النقي عند مدى من درجات الحرارة تراوحت بين 10-100°م لمدة 30 دقيقة ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة مقابل الفعالية الإنزيمية لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم. (Kotzia and Labrou. 2007,567; Qeshmi *et al.*, 2015,12; Moorthy *et al.*, 2010,1862)

☒ الاستقرار الحراري:

حضن 0.5 مل من المحلول الإنزيمي الخام بدرجات حرارة مختلفة (10-100°م) مدة 60 دقيقة وفق الطريقة التي ذكرها Stecher وآخرون (1,1999)، Kotzia و Labrou (567,2007)، Moorthy وآخرون (1862,2010)، Feng وآخرون (1509,2017)، ثم بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي و قدرت الفعالية الإنزيمية لتحديد درجة الحرارة المثلى لثباتية الإنزيم.

☒ تخزين الإنزيم الخام:

حضن 0.5 مل من المحلول الإنزيمي بدرجات حرارة مختلفة (-20، 4، 10، 30، 60°م) مدة 4320 ساعة (6 أشهر) وقيست الفعالية الإنزيمية خلال أزمنة مختلفة وهي 24، 48، 120، 288، 480، 720، 1512، 4320 ساعة وفق الطريقة التي ذكرها Mahajan وآخرون (11,2014) لتحديد درجة الحرارة المثلى لتخزين الإنزيم.

☒ تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الإنزيم المنقى:

قدرت الفعالية الإنزيمية مع استخدام المحاليل الموقية التالية بدلاً من محلول Tris-HCL الموقى (0.05 M) بدرجة 37°م لمدة 30 دقيقة (Moorthy *et al.*, 2010,1862)

- موقى الخللات برقم هيدروجيني 3 و 4 و 5 و بتركيز 0.05 M.
 - موقى فوسفات الصوديوم برقم هيدروجيني 6 و 7 و 8 و بتركيز 0.05 M.
 - موقى الغلايسين هيدروكسيد الصوديوم برقم هيدروجيني 9 و 10 و 11 بتركيز 0.05 M.
- من أجل الحصول على أرقام الحموضة 3-4 حضر محلول حمض الخل (A) بتركيز 0.1 M ومحلول خللات الصوديوم (B) 0.1 M ثم مزج كما في الجدول (9) للحصول على أرقام الحموضة المطلوبة وأكمل الحجم إلى 200 مل بالماء المقطر.

الجدول (9) يبين المكونات اللازمة لتحضير موكي الخللات في درجات الحموضة pH من 3-5 ونسب المحاليل المستخدمة

رقم الحموضة	المحلول (A) / مل	المحلول (B) / مل
pH 3.0	98.23	1.77
pH 4.0	84.70	15.30
pH 5.0	35.70	64.30

(Zhang et al., 2009,213)

ومن أجل الحصول على أرقام الحموضة 6-7-8 استخدم محلول الفوسفات الموكي المحضر من محلول فوسفات ثنائية الصوديوم (A) بتركيز 0.4 M ومحلول فوسفات أحادية الصوديوم الحامضية بتركيز 0.4 M (B) ثم مزج كما في الجدول (10) للحصول على أرقام الحموضة المطلوبة وأكمل الحجم إلى 200 مل بالماء المقطر.

الجدول (10) يبين المكونات اللازمة لتحضير موكي فوسفات الصوديوم في درجات الحموضة pH من 6-8 ونسب المحاليل المستخدمة

رقم الحموضة	المحلول (A) / مل	المحلول (B) / مل
pH 6.0	12.3	87.7
pH 7.0	61.0	39.0
pH 8.0	94.7	5.3

(Zhang et al., 2009,213)

أما من أجل الحصول على أرقام حموضة 9-10-11 استخدم المحلول الموكي الغلايسين هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.05M المحضر من محلول الغلايسين (A) 0.2 M ومحلول هيدروكسيد الصوديوم (B) 0.2 M ثم مزج كما هو مبين في الجدول (11) وأكمل الحجم بالماء المقطر حتى الوصول إلى حجم 100 مل.

الجدول (11) يبين المكونات اللازمة لتحضير موكي الغلايسين في درجات الحموضة pH من 9-11 ونسب

المحاليل المستخدمة

رقم الحموضة	المحلول (A) / مل	المحلول (B) / مل
pH 9.0	25	4.4
pH 10	25	15.2
pH 11	25	32.4

(Salehi et al., 2004,2455)

✖ الاستقرار الحمضية:

حُضِن 0.5 مل من محلول الإنزيم مع 0.5 مل من كل من المحاليل الموقية المختلفة ضمن المجال (pH 3-11) بدرجة حرارة 37°م مدة 60 دقيقة، ثم بردت وجرى قياس الفعالية الإنزيمية المتبقية

وفقاً لـ (Stecher *et al.*, 1999,1; Moorthy *et al.*, 2010,1862; Mahajan *et al.*, 2014,11;)
(Feng *et al.*, 2017,1509)

☒ تأثير تركيز الركيزة في فعالية الإنزيم المنقى:

أضيفت تراكيز مختلفة من مادة الأسبارجين (M 1.4-1.2 -1.0 -0.8 -0.6 -0.4 -0.2) بحجم 0.5 مل إلى وسط التفاعل بدرجة 37°م مدة 30 دقيقة ثم قيسَت الفعالية الإنزيمية لتحديد التركيز الأمثل من الركيزة لإعطاء أعلى فعالية إنزيمية (Moorthy *et al.*, 2010,1862).

☒ تأثير بعض الشوارد المعدنية ومادتي EDTA و $MgCl_2$ في فعالية الإنزيم المنقى:

حضرت الشوارد المعدنية (Na^+ , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ag^+ , Ca^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2}) بتركيز 1 mM/مل وأضيفت بحجم 150 ميكروليتر كل شاردة على حدا إلى 1 مل من محلول Cu^{+2} ، التفاعل فأصبح التركيز النهائي 130 ميكرومول/مل (Moorthy *et al.*, 2010). كما استخدمت تراكيز مختلفة (0.2-0.4-0.6-0.8-1-1.2 mM/مل) من مركبي EDTA و $MgCl_2$ بدرجة 37°م لمدة 30 دقيقة لمعرفة تأثيرها على فعالية الإنزيم (Moorthy *et al.*, 2010,1862).

❖ التطبيقات العملية للأسبارجيناز:

أُستخدم الإنزيم المنقى في هذه الدراسة وطُبق على الأغذية المقلية بزيت عباد الشمس (البطاطا المقلية، الشيبس، الدونات) وقُدرت كمية الأكريلاميد في العينات المدروسة وتم مقارنتها مع عينة الشاهد غير المعاملة بالإنزيم باستخدام جهاز HPLC (Maloney., 2014,6).

☒ المواد والأجهزة المستخدمة في تقدير الأكريلاميد:

مادة الأكريلاميد بنقاوة 99 % (Fluka).

ميتانول عالي النقاوة (GR for HPLC)، Merck .

جهاز HPLC : Young in Chromass مزود بكاشف UV – Vis.

☒ تحضير العينات ومعاملتها بالإنزيم:

حصل على الطحين الأبيض لعمل العجينة، والبطاطا الطازجة (صنف Spunta)، وزيت القلي النباتي المستخلص من بذور دوار الشمس من السوق المحلية في مدينة دمشق، وحضرت العينات مخبرياً.

البطاطا المقلية: نقعت بالإنزيم بتركيز (30 وحدة/مل) لمدة 15 دقيقة بعد غسلها وتقسيرها وتقطيعها على شكل أصابع (1×1×5سم) ثم قليت بحرارة 175°م مدة 20 دقيقة وفقاً لـ (Mahajan et al., 2012,125).

أما بالنسبة للبطاطا المقرمشة (الشيبس) نقعت بالإنزيم بتركيز (10000 وحدة/ليتر) لمدة 20 دقيقة بعد غسل البطاطا وتقسيرها وتقطيعها على شكل شرائح رقيقة بسماكة تقريباً 0.5-1 ملم، ثم قليت بحرارة 150°م مدة 15 دقيقة وفقاً لـ (Pedreschi et al.,2008,386).

أما بالنسبة للدونات أضيف الإنزيم إليها بكمية (500 وحدة/ليتر) لمدة 12 دقيقة عند تشكيل العجينة ثم قليت بحرارة 200°م مدة 15 دقيقة وفقاً لـ (Xu et al.,2016,210).

☒ الكشف عن الأكريلاميد:

تم تحديد محتوى العينات المدروسة من الأكريلاميد وفق طريقة (Peng et al.,2003,10) كما يلي:

☒ استخلاص الأكريلاميد من العينة المدروسة (Acrylamide extraction):

طحنت العينة المعدة لعملية تقدير الأكريلاميد (بطاطا مقلية أو شيبس أو دونات) وجنست باستخدام خلاط مولينكس، ثم أخذ منها 10 غ وأضيف إليها 50 مل من الماء المقطر منزوع الشوارد، حرك المزيج باستخدام محرك مغناطيسي لمدة 20 دقيقة، ثم ثقل بسرعة 10000 دورة /دقيقة لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 4°م. فصل المستخلص المائي المتوضع بين الطور الدهني المتجمد والطافي في الأعلى والجزء الراسب المستقر في الأسفل باستخدام محقن 1 مل من أجل تحميله على الطور الصلب (Sorbent).

☒ التحليل الكروماتوغرافي للأكريلاميد:

كشف عن الأكريلاميد باستخدام جهاز HPLC باستخدام عمود نوع 150mm×4.6×5 µm C18، وطور متحرك مؤلف من 5% من الميثانول (CH₃OH)، و95% ماء، بمعدل تدفق 0.9 مل/دقيقة، وكاشف UV- detector بطول موجة 210 نانومتر، وحجم الحقنة 25 ميكرو لتر.

☒ المنحني المعياري للأكريلاميد (Calibration curve):

حضرت سلسلة عيارية من المحاليل القياسية للأكريلاميد وفق التراكيز 0.5، 1، 1.5، 2 ppm.

✖ حد الكشف في جهاز HPLC (Limit of detection):

حدد التركيز الأدنى للأكريلاميد الذي يمكن الكشف عنه بواسطة جهاز HPLC من خلال أخذ 7 قراءات للتركيز 0.5 ppm وحسب الحد الأدنى للكشف من خلال المعادلة:

$$\text{الحد الأدنى للكشف} = \text{الانحراف المعياري} \times 3$$

✖ تحديد المسترجع (Recovery):

أجريت تجربة الاسترداد لتحديد كفاءة استخلاص الأكريلاميد من العينات وحساب النسبة الحقيقية للأكريلاميد في العينات المختبرة. طحنت عينة من كل نوع من المواد الغذائية (البطاطا المقلية، الشيبس، الدونات) ووزن 10 غ منها في دورقين مخروطيين. الأول أضيف له 50 مل من الماء المقطر (شاهد Blank) والثاني أضيف له 50 مل من محلول الأكريلاميد المحضر بتركيز 500 ميكروغرام/كغ (Spike) أجريت عملية الاستخلاص والتحليل وفق الطريقة المذكورة سابقاً وحسبت نسبة الاسترداد (R) وفق المعادلة :

$$R = (\text{Spike} - \text{Blank}) \times 100$$

❖ التحليل الإحصائي:

✖ لغرض الغرلة حسبت المتوسطات الحسابية وانحرافاتها المعيارية بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة مع حساب فروقها المعنوية وذلك على مستوى ثقة 1% باستخدام تحليل التباين ANOVA باستخدام أقل فرق معنوي ضمن البرنامج الإحصائي SPSS الإصدار 17 (SPSS Statistics for Windows, Version 17.0).

✖ لغرض أمثلة ظروف إنتاج إنزيم الأسبارجيناز استخدم البرنامج الإحصائي Minitab والتصميم الاحصائي RSM في أمثلة ظروف إنتاج إنزيم الأسبارجيناز (Muthuvelayudham and Viruthagiri, 2010).

✖ ولتحليل نتائج الصفات الحركية للإنزيم تم استخدام البرنامج الإحصائي XLSTAT 2008 (Zoia et al., 2008).

الفصل الثالث: النتائج والمناقشة:

أولاً- غربلة عزلات محلية من *Bacillus* لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز:

1- الغربلة الأولية:

❖ الغربلة الأولية على وسط M9 الصلب:

نميت 23 عزلة من البكتيريا على وسط الغربلة الأولية M9 الصلب الحاوي على الأسبارجين وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 30°م لمدة 24-48-72 ساعة، مع مراقبة تغير لون الوسط، فعندما تتلون الهالات والمستعمرات باللون الوردي نتيجة لتغير pH الوسط (لوجود كاشف الفينول الأحمر الذي يتغير لونه من الأصفر في الوسط الحمضي إلى الوردي في الوسط القلوي) فإن ذلك دليلاً على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز.

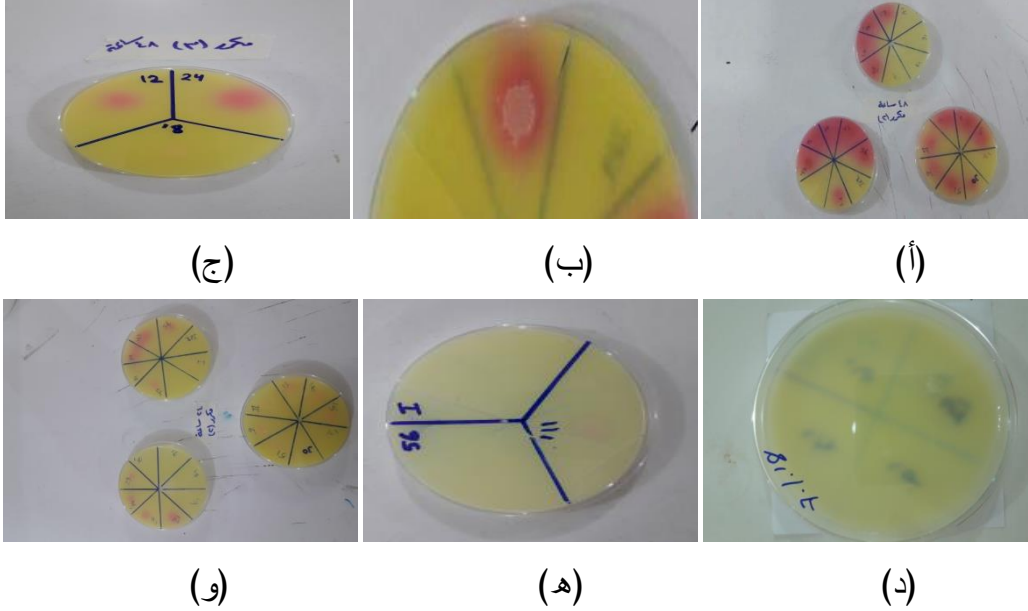
أظهرت نتائج الغربلة الأولية أن 17 عزلة من 23 عزلة بكتيرية أعطت مستعمرات ذات لون وردي واضح خلال 48 ساعة ضمن وسط M9 للغربلة الأولية وعند إضافة تراكيز مختلفة من صبغة الفينول الأحمر (0.001-0.002-0.0025-0.0037-0.005-0.007-0.0075%) تبين أن إضافة التركيز 0.007% من صبغة الفينول الأحمر أعطت أفضل نتيجة، حيث توافقت هذه النتيجة مع التركيز الذي ذكره Moorthy وآخرون (1862,2010) بأنه التركيز الأنسب للحصول على أفضل هالات وردية اللون للمستعمرات البكتيرية المنتجة للإنزيم عند إجراء الغربلة الأولية، وبالتالي فهي تمتلك القدرة على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز أما العزلات الست المتبقية فلم تظهر تشكل للهالات الوردية اللون وبالتالي فهي غير قادرة على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز لذلك تم استبعادها. قيس قطر المستعمرات وقطر الهالات المتشكلة وقدرت كفاءة التحليل كما هو موضح في الجدول (12).

الجدول (12) يبين كفاءة تحليل العزلات البكتيرية على وسط M9 الصلب الحاوي على صبغة الفينول الأحمر بتركيز 0.007%.

العزلات البكتيرية	كفاءة التحليل خلال 24 ساعة			كفاءة التحليل خلال 48 ساعة			كفاءة التحليل خلال 72 ساعة		
	متوسط قطر الهالة (مم)	متوسط قطر المستعمرة (مم)	كفاءة التحليل	متوسط قطر الهالة (مم)	متوسط قطر المستعمرة (مم)	كفاءة التحليل	متوسط قطر الهالة (مم)	متوسط قطر المستعمرة (مم)	كفاءة التحليل
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0.9	0.8	1.1	1.5	1	1.5	1.5	1	1.5
3	0.8	0.6	1.3	1.1	0.7	1.6	1.1	0.7	1.6
4	1	0.9	1.1	1.5	1	1.5	1.5	1	1.5
5	0.8	0.7	1.1	1.5	1	1.5	1.5	1	1.5
6	1.1	0.9	1.2	1.6	1.1	1.5	1.6	1.1	1.5
7	0.7	0.7	1	1.3	0.9	1.4	1.3	0.9	1.4
8	0.9	0.9	1	1.7	1.2	1.4	1.7	1.2	1.4
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1.4	1.3	1.1	1.5	1.3	1.2	1.5	1.3	1.2
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0.8	0.8	1	1	0.8	1.2	1	0.8	1.2
14	0.8	0.7	1.1	1	0.8	1.3	1	0.8	1.3
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0.4	0.4	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1.2	1	1.2	1.2	1	1.2
18	1	0.9	1.1	1.3	1.1	1.2	1.3	1.1	1.2
19	0.7	0.6	1.2	1.2	1	1.2	1.2	1	1.2
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	0.9	0.8	1.1	1.1	1	1.1	1.1	1	1.1
22	0.8	0.6	0.9	1	0.8	1.2	1	0.8	1.2
23	0.8	0.7	1.1	1.1	1	1.1	1.1	1	1.1

يبين الجدول (12) أن العزلات اتسمت باختلاف كفاءتها التحليلية أي اختلاف قدرتها على إنتاج الإنزيم بدرجات متفاوتة على وسط الغريلة الأولية خلال أزمنة التحضين المختلفة وهي صفة هامة اتخذت معياراً للتمييز في مرحلة الانتخاب الأولي، وعند حساب كفاءة التحليل تبين تماثل في قطر الهالات والمستعمرات المتشكلة خلال 48 ساعة و72 ساعة وكانت الكفاءة التحليلية في الزمن 48 ساعة أفضل من الكفاءة التحليلية في الزمن 24 ساعة وهذا يتوافق مع Ebeed و Abu-Taleb (2014, 476) اللذين أثبتوا أن كفاءة التحليل تتم خلال مدة تحضين 48 ساعة. بلغت كفاءة التحليل كما هو موضح في

الجدول (12) للعديد من العزلات البكتيرية بين (1.4 - 1.6) بينما كانت أدنى قيمة 0.7. ويبين الشكل (4) بعض الحالات المتشكلة بفعل إنتاج العزلات لإنزيم الأسبارجينااز عند تنميتها على وسط M9 الصلب للغربة الأولية الحاوي على صبغة الفينول الأحمر بالتراكيز المختلفة خلال 24 و 48 ساعة.



الشكل (4) يوضح قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز على وسط M9 الصلب .
أ: التلون الوردي المتشكل من العزلات البكتيرية المنتجة لإنزيم الأسبارجينااز خلال مدة 48 ساعة.
ب ، ج: شكل المستعمرة والهالات اللونية المتشكلة بزم 48 ساعة خلال التنمية على وسط M9 الحاوي على صبغة الفينول الأحمر بتركيز 0.007%

د: الوسط الشاهد الغير حاوي على أسبارجين وغير الحاوي على صبغة الفينول الأحمر.
هـ: نمو البكتريا على وسط M9 الحاوي على صبغة الفينول الأحمر بتركيز 0.001% خلال 48 ساعة.
و: نمو البكتريا على وسط M9 الحاوي على صبغة الفينول الأحمر بتركيز 0.007% خلال 24 ساعة.

❖ الغربة الأولية على وسط M9 السائل:

عند تنمية العزلات البكتيرية في أنابيب تحتوي على وسط M9 السائل الحاوي على الأسبارجين، وحضنها بدرجة حرارة 30°م لمدة 48 ساعة، مع مراقبة تغير لون الوسط تم التأكد أن العزلات المدروسة وعددها 17 عذلة قد أعطت لوناً وردياً متدرجاً كما هو موضح بالجدول (13) وبالتالي فهي قادرة على إنتاج الإنزيم بنسب متفاوتة، أما العزلات الست المتبقية فقد تم استبعادها في الغربة الثانوية لعدم قدرتها على إنتاج الإنزيم.

الجدول (13) يبين شدة التلون الوردي الناتج عن العزلات البكتيرية لمعرفة قدرتها على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز.

رقم العزلة	شدة التلون	رقم العزلة	شدة التلون	رقم العزلة	شدة التلون	رقم العزلة	شدة التلون
1	-	7	++	13	++++	19	+
2	+	8	++	14	++++	20	-
3	++++	9	-	15	-	21	++++
4	++	10	-	16	+	22	+++
5	++++	11	+	17	++	23	+++
6	++++	12	-	18	++		

(-) بدون تلوّن وردي، (+) لون وردي ضعيف، (++) لون وردي متوسط (+++ لون وردي جيد، (++++ لون وردي غامق.

لم تظهر العزلات البكتيرية خلال 24 ساعة من مدة التحضين أي تغيير في لون الوسط بينما أظهرت بعد 48 ساعة من فترة التحضين لوناً وردياً واضحاً على وسط M9 الحاوي على صبغة الفينول الأحمر بتركيز 0.007%، أما خلال نموها على وسط M9 الحاوي على تراكيز مختلفة من صبغة الفينول الأحمر فلم تظهر أي تلوّن خلال 24 ساعة أما بعد 48 ساعة ظهر اللون الوردي فاتحاً مقارنة بشدة اللون الوردي المتشكل عند استخدام التركيز 0.007% على وسط M9، كما تدرج اللون الوردي المتشكل على وسط M9 الحاوي على الصبغة بتركيز 0.007% في شدته كما هو موضح في الجدول (13) بسبب تباين قدرة العزلات على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز.

تبين نتائج عملية الغرلة الأولية على وسط M9 الصلب والسائل التطابق مع دراسة العديد من الباحثين، إذ توافقت النتائج مع دراسة Pradhan وآخرون (36,2013) ومع دراسة Moorthy وآخرون (1862,2010) من خلال نمو العزلات البكتيرية التابعة لجنس *Bacillus* على وسط M9 الحاوي على الصبغة بتركيز 0.007% بعد فترة تحضين 48 ساعة.

2- الغرلة الثانوية:

قدرت الفعالية الإنزيمية للعزلات التي أعطت نتيجة إيجابية عند الغرلة الأولية في إنتاج إنزيم الأسبارجينااز وتم تقدير تركيز الأمونيا الناتج عن تفاعل الإنزيم مع الركيزة وفق طريقة Patil و Jadhav (32,2017) من خلال الاستعانة بالمنحنى القياسي لتركيز سلفات الأمونيا.

❖ تقدير تركيز الأمونيا من المنحنى القياسي لسلفات الأمونيوم:

حضرت تراكيز متدرجة من سلفات الأمونيوم وفقاً لـ Moorthy وآخرون (1862,2010) بتراكيز من (0-5 ميلي مول) كما هو موضح في الجدول (14)، نقل 1 مل من المحاليل المحضرة إلى أنابيب اختبار، وأضيف إلى كل منها 0.2 مل من محلول نسلر ومزج الخليط جيداً باستعمال مازجة

الأنابيب Vortex وحفظ المزيج بدرجة حرارة 20°م لمدة 20 دقيقة. قيست الامتصاصية عند طول موجة 450 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) الذي تم تصفيره باستعمال الشاهد المكون من نفس المحاليل المستخدمة عدا سلفات الأمونيا.

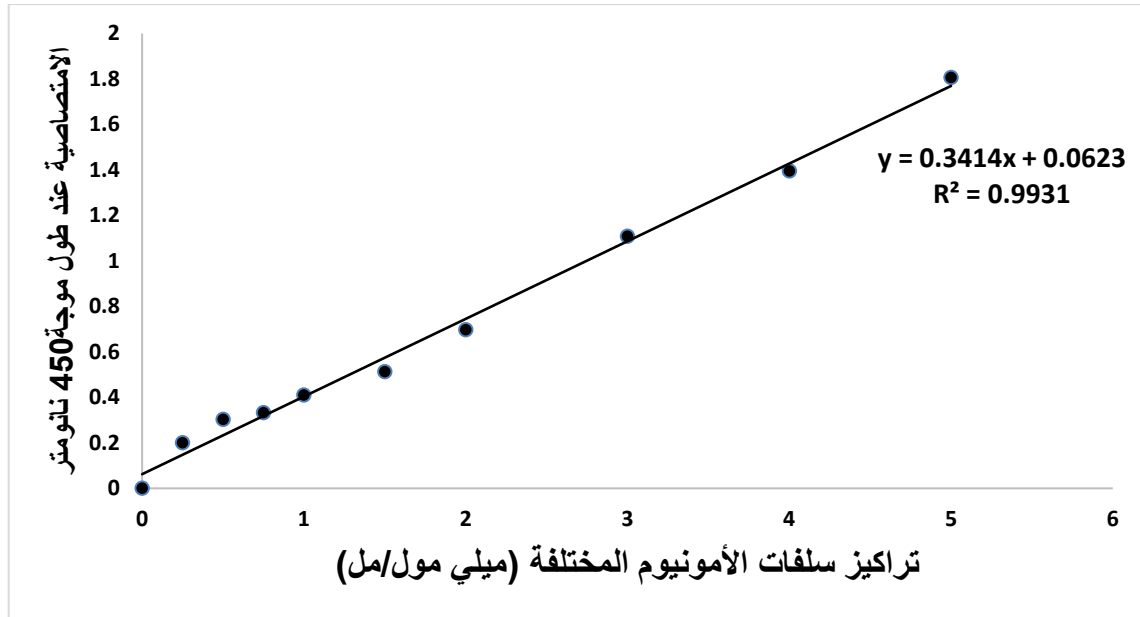
الجدول (14) يحدد قيم الامتصاصية لتراكيز سلفات الأمونيوم المستخدمة في رسم المنحنى القياسي.

تراكيز سلفات الأمونيوم (ميلي مول /مل)	المتوسط الحسابي للامتصاصية ± الانحراف المعياري
0	0
0.25	0.00120±0.201
0.5	0.00023±0.303
0.75	0.00247±0.333
1	0.00061±0.410
1.5	0.00034±0.513
2	0.00257±0.698
3	0.00030±1.108
4	0.00042±1.396
5	0.00402±1.806

رُسم المنحنى القياسي لقيم الامتصاصية مقابل تركيز سلفات الأمونيوم بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز حيث وُجدت فروق معنوية بين تراكيز سلفات الأمونيوم على مستوى ثقة 1% بعد استخدام تحليل التباين ANOVA وباستخدام أقل فرق معنوي، حيث بلغت أدنى قيمة للامتصاصية 0.201 للتركيز 0.25 ميلي مول، بينما بلغت أعلى قيمة للامتصاصية 1.806 لتركيز 5 ميلي مول من سلفات الأمونيوم كما موضح بالشكل رقم (5)، إذ تبين النقط قيم الامتصاصية المقاسة تبعاً لتركيز الأمونيا، ويبين الخط المستقيم الملائمة الخطية وفقاً للعلاقة:

$$Y = 0.341X + 0.062$$

حيث Y قيمة الامتصاصية الضوئية على طول موجة 450 نانومتر، و X تركيز الأمونيا.



الشكل (5) يظهر المنحني القياسي لسلفات الأمونيوم باستخدام طريقة نسلر.

Y: قيمة الامتصاصية الضوئية على طول موجة 450 نانومتر، X: تركيز سلفات الأمونيوم.

❖ قياس فعالية إنزيم الأسبارجينااز:

قيست كمية الأمونيا الناتجة عن تحول الأسبارجين بوجود إنزيم الأسبارجينااز بالطريقة اللونية

باستخدام المطياف الضوئي وعلى طول موجة 450 نانومتر بالمعادلة التالية:

$$Y = 0.341X + 0.062$$

بمعنوية ($P > 0.001$)، كما كان معامل الانحدار معنوياً ($P > 0.001$) ومعامل التحديد $R^2 = 0.993$

أي أن تركيز سلفات الأمونيوم مسؤول عن 99% من الامتصاصية الناتجة. يبين الجدول (15) الفعالية

الإنزيمية للعزلات السبع عشرة المتفوقة مقدرة بالوحدة/مل، حيث بينت الدراسة الإحصائية وجود فروق

معنوية في الفعالية الإنزيمية للعزلات على مستوى ثقة 1% باستخدام تحليل التباين ANOVA،

وباستخدام أقل فرق معنوي، تراوحت الفعالية الإنزيمية للعزلات البكتيرية بين 698.92-1064.51

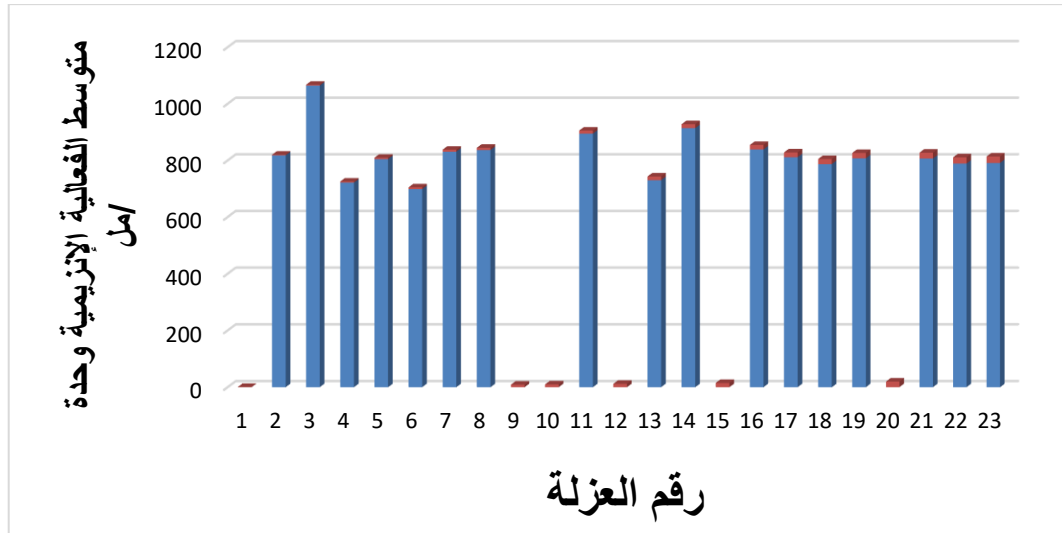
وحدة/مل، إذ بلغت أعلى قيمة للفعالية 4.84 ± 1064.51 وحدة/مل للعزلة (3)، بينما كانت أدنى قيمة

0.70 ± 698.92 وحدة/مل للعزلة (6).

الجدول (15) يظهر فعالية الأسبارجينااز لعزلات بكتيريا *Bacillus* مقدرة بالوحدة/مل.

العزلة	متوسط الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل) $\pm$ الانحراف المعياري
2	2.07 $\pm$ 818.19 ^d
3	4.84 $\pm$ 1064.51 ^a
4	2.76 $\pm$ 721.41 ^f
5	3.46 $\pm$ 804.50 ^d
6	0.70 $\pm$ 698.92 ^f
7	1.38 $\pm$ 830.89 ^c
8	1.38 $\pm$ 836.75 ^c
11	0.69 $\pm$ 894.43 ^b
13	0.69 $\pm$ 730.21 ^f
14	0.69 $\pm$ 913.98 ^b
16	1.38 $\pm$ 838.71 ^c
17	2.76 $\pm$ 811.34 ^d
18	6.22 $\pm$ 786.90 ^e
19	2.76 $\pm$ 807.43 ^d
21	3.46 $\pm$ 806.45 ^d
22	3.46 $\pm$ 788.86 ^e
23	4.84 $\pm$ 790.81 ^e

يبين الجدول (15) أن العزلات السبع عشرة كانت فعاليتها الإنزيمية ممتازة تراوحت بين 698.92-1064.51 وحدة/مل. تفوقت نتائج هذه الدراسة على دراسات أخرى تخص جنس *Bacillus*، إذ بينت دراسة Sudhir وآخرون (2504,2014) أن بكتريا *Bacillus licheniformis* أنتجت الإنزيم بفعالية 407.7 وحدة/مل، كما تفوقت على ما توصل إليه Feng وآخرون (1509,2017) حيث وجدوا أن العزلة *Bacillus subtilis* تنتج الإنزيم بفعالية مقدارها 407.62 وحدة/مل وأيضاً تفوقت على نتائج دراسة أخرى لـ Cachumba وآخرين (77,2016) حيث بلغت الفعالية الإنزيمية للعزلة *Bacillus aryabhattai* 680.5 وحدة/مل. وبالنتيجة تميزت العزلة (3) بأعلى قدرة على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز مقارنة مع بقية العزلات كما هو موضح في الشكل (6)، لذلك اعتمدت في هذه التقنية لقياس مقدار إنزيم الأسبارجينااز.



الشكل (6) يظهر فعالية الأسبارجينااز لعزلات بكتريا *Bacillus* مقدرة بالوحدة/مل.

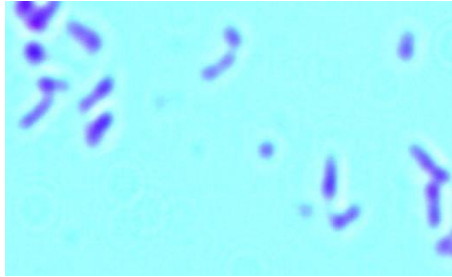
ثانياً - تصنيف العزلة الأكفأ من جنس *Bacillus*:

❖ الخواص الشكلية للبكتريا:

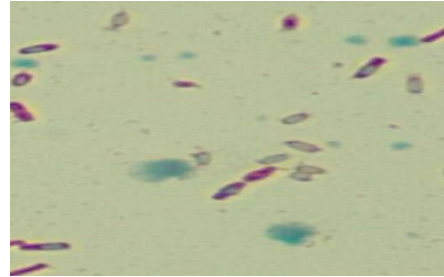
تبين تحت المجهر الضوئي أن العزلة (3) من بكتريا *Bacillus* موجبة الغرام، عصوية الشكل متبوعة، ذات أبواغ بيضوية تحت طرفية بعد تلوينها بأخضر المالكيت .

ظهرت المستعمرات على سطح الوسط الإنمائي بلون أبيض حليبي و سطح أملس، ويوضح

الشكل (7) أشكال الخلايا التي أخذت من المستعمرات النامية باستخدام المجهر الضوئي .



خلايا بكتيرية مصبوعة باللون البنفسجي



أبواغ مصبوعة بصبغة المالكيت

الشكل (7) يبين أشكال خلايا البكتريا بعد التلوين وكما ظهرت باستخدام المجهر الضوئي .

❖ الخواص البيوكيميائية للبكتريا:

تبين من الاختبارات الكيمياءحيوية أن العزلة (3) موجبة النتيجة لاختبار الكاتالاز، أحمر الميثيل، فوكس بروسكاور، السترات، تحليل النشاء، وسالبة لاختبار الأندول كما هو موضح في الجدول (16). توافقت هذه النتائج مع ما ذكره (Bergey et al., 2012,537) بالنسبة لبكتريا *Bacillus*.

الجدول (16) : يبين نتائج بعض الاختبارات البيوكيميائية للعزلة (3)

الاختبار	النتيجة
اختبار إنتاج الإندول	-
اختبار الكتالاز	+
حلمهة النشاء	+
اختبار أحمر الميثيل	+
فوكس بروسكاور	+
اختبار السترات	+

❖ قابلية تخمر السكريات من قبل العزلة الأكفأ:

يبين جدول (17) قابلية العزلة (3) على تخمير السكريات المضافة إلى وسط (M9) السائل.

الجدول (17) يبين قابلية العزلة رقم (3) على استخدام وتمثيل السكريات

السكر	العزلة 3	Positive control (Glucose)	Negative control (without suger)	D- Xylose	L- Arabinose	D- Rhamnose	D- Fructose	D- Galactose	D- Raffinose	D- Mannitol	D- Inositol	D- Sucrose
		+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
السكر	العزلة 3	Starch	D- Melibiose	D- Mannose	D- Trehalose	D- Melezitose	D- Cellobiose	D- Ribose	D- Sorbitol			
		+	+	+	+	-	+	+	+			

وبالأخذ في الاعتبار بين الاختبارات السابقة والنتائج المذكورة في الجدولين (16) و(17) مع تصنيف Bergey (Bergey et al., 2012,537) يمكن القول بأن العزلة (3) تابعة لجنس *Bacillus* ، وبإدخال البيانات إلى برنامج API of Microorganism Identification مع الاعتماد على شكل

البوغ ومكان توضعها ضمن الخلية البكتيرية تبين أن العزلة تعود إلى *B. licheniformis* بنسبة 99.3%.

ثالثاً- تعيين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز باستخدام التصميم الاحصائي RSM:

❖ قدرة العزلة البكتيرية *B.licheniformis* على استهلاك السكريات كمصدر وحيد للكربون:

تم اختبار العديد من السكريات (غلوكوز، سكروز، فركتوز، رافينوز، مانيتول، غالاكتوز، زيلوز) لمعرفة تأثير هذه السكريات في إنتاجية الإنزيم نسبة إلى قدرة البكتريا على استهلاكها كمصدر وحيد للكربون. بينت النتائج أن أعلى إنتاجية لإنزيم الأسبارجينااز ظهرت عند إضافة سكر الغلوكوز إلى وسط الإنتاج، بينما الأنواع الأخرى من السكريات مثل السكروز، الفركتوز، المانيتول والرافينوز أعطت إنتاجية أقل أما السكريات غالاكتوز والزيلوز فلم ينتج عن إضافتها أي إنتاجية إنزيمية.

❖ تأثير المتغيرات المدروسة على إنتاجية إنزيم الأسبارجينااز:

أجريت أمثلة ظروف إنتاج إنزيم الأسبارجينااز باستخدام طريقة التخمير المغمر بدراسة تأثير خمسة متغيرات (درجة حرارة التحضين، رقم الحموضة، سرعة الدوران، تركيز سكر الغلوكوز، تركيز مستخلص الخميرة) على نمو السلالة المستخدمة، مع تثبيت زمن التحضين مدة 48 ساعة (والتي تم تثبيتها خلال تجارب سابقة)، وبالاعتماد على التصميم الإحصائي المشار إليه في الجدول (6) تم إجراء 32 تجربة، وحسبت فعالية إنزيم الأسبارجينااز كما هو موضح في الجدول (18) الذي يبين نتائج الفعالية الإنزيمية الناتجة من عزلة *Bacillus licheniformis*.

الجدول (18) يظهر فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنتج من عزلة *Bacillus licheniformis* بعد تعريضه لعدة متغيرات.

الفعالية الإنزيمية وحدة/ مل	تركيز مستخلص الخميرة %	تركيز الغلوكوز %	سرعة الدوران (دورة/دقيقة)	رقم الحموضة	درجة الحرارة °م	رقم التجربة
504.40	2.5	1.5	50	7	30	1
722.39	1.5	1.5	50	7	40	2
611.93	1.5	1.5	50	9	30	3
565.98	2.5	1.5	50	9	40	4
564.03	1.5	1.5	150	7	30	5
456.50	2.5	1.5	150	7	40	6
1481.92	2.5	1.5	150	9	30	7
646.14	1.5	1.5	150	9	40	8
982.40	1.5	2.5	50	7	30	9
877.81	2.5	2.5	50	7	40	10
1197.46	2.5	2.5	50	9	30	11
1255.13	1.5	2.5	50	9	40	12
728.25	2.5	2.5	150	7	30	13
849.46	1.5	2.5	150	7	40	14
988.27	1.5	2.5	150	9	30	15
916.91	2.5	2.5	150	9	40	16
677.42	2	2	100	8	25	17
881.72	2	2	100	8	45	18
326.49	2	2	100	6	35	19
1112.41	2	2	100	10	35	20
902.25	2	2	0	8	35	21
723.36	2	2	200	8	35	22
1458.46	2	1	100	8	35	23
832.84	2	3	100	8	35	24
701.86	1	2	100	8	35	25
608.99	3	2	100	8	35	26
667.64	2	2	100	8	35	27
672.53	2	2	100	8	35	28
647.12	2	2	100	8	35	29
608.02	2	2	100	8	35	30
659.82	2	2	100	8	35	31
622.68	2	2	100	8	35	32

❖ تحليل التجربة:

يبين الجدول (19) تأثير العوامل المدروسة في الفعالية الإنزيمية للأسبارجينااز كما يلي:

- تأثير كل عامل لوحده في إنتاج الأنزيم - التأثير الخطي (Linear effect):

نلاحظ من الجدول (19) أن قيمة P لكل من الرقم الهيدروجيني pH وتركيز الجلوكوز أقل من 0.05 ($P < 0.05$) وبالتالي هناك تأثير خطي معنوي لكل من هذين المتغيرين في إنتاج إنزيم الأسبارجينااز، بينما نلاحظ أن قيمة P لكل من درجة حرارة التحضين، سرعة الدوران وتركيز مستخلص الخميرة كانت أكبر من 0.05 ($P > 0.05$) وهذا يعني أنه ليس لهذه المتغيرات أي تأثير معنوي على إنتاج إنزيم الأسبارجينااز.

- تأثير تربيع العوامل Squares effect في إنتاج إنزيم الأسبارجينااز:

نلاحظ من الجدول (19) أن قيمة P لكل من مربع الرقم الهيدروجيني ومربع تركيز الجلوكوز كانت أقل من 0.05 ($P < 0.05$) وذلك يعني أن هنالك تأثير معنوي لهذين العاملين في الفعالية الإنزيمية ولذلك تأخذ العلاقة بين مربع هذه المتغيرات وفعالية الإنزيم شكل قطع مكافئ.

- تأثير العوامل المتداخلة Interaction effect في الفعالية الإنزيمية للأسبارجينااز:

كما هو مبين في الجدول (19) فقد كانت علاقة درجة الحرارة معنوية مع الرقم الهيدروجيني، وكانت علاقة الرقم الهيدروجيني معنوية مع تركيز الجلوكوز حيث كان ($P < 0.05$) بينما كانت العلاقات الأخرى غير معنوية.

ويدل معامل الانحدار $R^2 = 75.1\%$ على أن معادلة الانحدار للعوامل المتغيرة تؤثر

بنسبة 75.1% على مقدار التغير في فعالية الإنزيم.

واعتماداً على الجدول (19) يمكن كتابة المعادلة كما يلي:

$$Y = 652.181 + 147.931 X_2 + 41.298 X_4 + 12.407 X_2 X_2 + 118.957 X_4 X_4 - 63.906 X_1 X_2 - 8.675 X_2 X_4.$$

الجدول (19) يبين نتائج التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات المدروسة في فعالية إنزيم الأسبارجينااز.

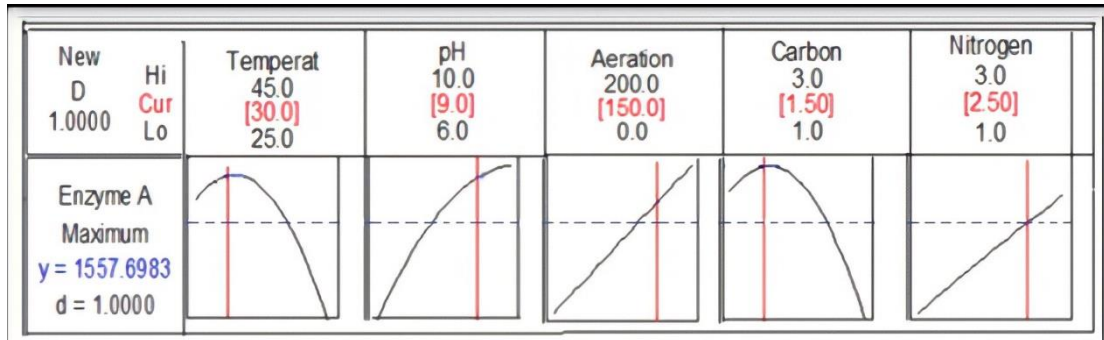
المتغير	معامل التغير	الخطأ المعياري للمعامل (T)	الاحتمالية (P)
الثابت	652.181	7.179	0.001
درجة الحرارة	-14.989	-0.322	0.753
رقم الحموضة	147.931	3.182	0.009
سرعة الدوران	-18.492	-0.398	0.698
تركيز الغلوكوز	41.298	0.888	0.039
تركيز مستخلص الخميرة	-3.178	-0.068	0.947
(درجة الحرارة) ²	27.437	0.652	0.528
(رقم الحموضة) ²	12.407	0.295	0.037
(سرعة الدوران) ²	35.746	0.850	0.413
(تركيز الغلوكوز) ²	118.957	2.829	0.016
(تركيز مستخلص الخميرة) ²	-3.599	-0.086	0.933
حرارة×حموضة	-63.906	-1.122	0.028
حرارة×سرعة دوران	-63.661	-1.218	0.287
حرارة× تركيز الغلوكوز	48.388	0.850	0.414
حرارة× تركيز مستخلص الخميرة	-88.832	-1.560	0.147
حموضة×سرعة دوران	55.719	0.978	0.349
حموضة× تركيز الغلوكوز	-8.675	-0.152	0.048
حموضة× تركيز مستخلص الخميرة	75.758	1.330	0.210
سرعة الدوران× تركيز الغلوكوز	-98.363	-1.727	0.112
سرعة الدوران× تركيز مستخلص الخميرة	60.117	1.056	0.314
تركيز الغلوكوز× تركيز مستخلص الخميرة	-51.196	-0.899	0.388

كما ويبين الجدول (20) التحليل الإحصائي لتباين المتغيرات المدروسة التي تؤثر في إنتاج الإنزيم وجود متغير خطي (Linear) واحد على الأقل من المتغيرات المفردة الخمسة له تأثير معنوي لأن ($P < 0.05$)، كما يوجد مربع متغير (Square) واحد على الأقل من مربعات المتغيرات الخمسة ذي تأثير معنوي ($P < 0.05$)، ويوجد علاقة ترابط واحدة (Interaction) على الأقل من علاقات الترابط العشرة معنوية حيث ($P < 0.05$).

الجدول (20) يبين نتائج التحليل الإحصائي لتباين المتغيرات المدروسة التي تؤثر في فعالية إنزيم الأسبارجينااز.

المصدر	درجة الحرية	المجموع التسلسلي للمربعات	المجموع المعدل للمربعات	معدل متوسط المربعات	F	P
الانحدار	20	1721382	1721382	86069	1.660	0.045
خطي	5	579979	579979	115996	2.240	0.024
تربيعي	5	450224	450224	90045	1.740	0.017
التداخل	10	691179	691179	69118	1.330	0.021
الخطأ المتبقي	11	570687	570687	51881		
الخطأ في الملاءمة	6	567336	567336	94556	141.12	0.21
الخطأ الكلي	5	3350	3350	670		
المجموع	31	2292069				

يبين الشكل (8) الشروط المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus licheniformis* وفق النتائج الإحصائية: درجة حرارة تحضين 30°م، ورقم هيدروجيني 9، وسرعة دوران 150 دورة/دقيقة، وتركيز سكر غلوكوز 1.5%، وتركيز مستخلص خميرة 2.5%. تم تطبيق هذه الشروط وقيست الفعالية الإنزيمية للإنزيم فبلغت 1481.92 وحدة/مل، وهي قريبة من فعالية الإنزيم النظرية ($y=1557.6983$) المبينة في الشكل (8).



الشكل (8) يوضح الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus licheniformis* بواسطة البرنامج الإحصائي RSM

❖ الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم:

☒ تأثير درجة الحرارة في إنتاج الأسبارجينااز:

تشير النتائج المبينة في الشكل (8) إلى أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز كانت 30°م، ويعود السبب في ذلك لأن درجة الحرارة تؤثر بشكل مباشر في معدلات كل من النمو الميكروبي والتخليق الحيوي للمستقلبات إذ أن الانخفاض عن الحد الأمثل لدرجة حرارة الإنتاج يؤدي إلى تباطؤ

النمو وتأخير تخليق المستقلبات المطلوبة وأن ارتفاعها عن حدّها قد يؤثر سلباً في نمو الكائن الحي الدقيق وبالتالي في الإنتاج (السواح، 2002، 75). أشارت العديد من الدراسات إلى أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز لمعظم الأحياء الدقيقة وخصوصاً تلك التابعة للجنس *Bacillus sp.* كانت بين 30-45°م. توافقت النتائج مع ماتوصل إليه Jia وآخرون (9428,2013) عند دراسته لإنتاج الإنزيم من بكتريا *Bacillus sp.* باستخدام مدى من درجات الحرارة بين 25-40°م تبين أن درجة الحرارة المثلى لأعلى إنتاج للإنزيم كانت 30°م، بينما لم تتوافق النتائج مع ما وجده كل من Prakasham وآخرون (72,2010) و Feng وآخرون (1509,2017) و Cachumba وآخرون (77,2016) أن درجة الحرارة المثلى للإنزيم عند إنتاجه من بكتريا *Bacillus subtilis* و *Bacillus aryabhattai* على التوالي هي 37°م حيث بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 407.62 وحدة /مل، 85 وحدة/مل، 680.5 وحدة/مل على التوالي وكذلك لم تتوافق مع Sudhir وآخرون (2504,2014) حيث بلغت الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *B. licheniformis* 37°م وحيث كانت الفعالية الإنزيمية عندها 407.7 وحدة/مل.

☒ تأثير الرقم الهيدروجيني pH في إنتاج الأسبارجينااز:

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (8) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز هو 9. ويذكر أن الرقم الهيدروجيني أحد العوامل البيئية التي ينبغي التحكم بها لتحقيق إنتاج مستويات عالية من الإنزيمات الميكروبية وليس بالضرورة أن يتوافق الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج إنزيم معين من الأحياء الدقيقة مع الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو تلك الأحياء توافقاً تاماً لأسباب تتعلق بالجوانب الفيزيولوجية لنمو الكائن وإنتاج الإنزيم والتي تتأثر باختلاف الظروف البيئية والأحياء الدقيقة المستخدمة في الإنتاج (محي الدين، 1998، 39). توافقت النتائج مع نتائج Silpa وآخرون (561,2017) حيث وجد أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من مختلف أنواع بكتريا *Bacillus* كان عند درجة pH 8.9. بينت نتائج الدراسات المختلفة وجود تباين في تأثير درجات الحموضة باختلاف أنواع بكتريا *Bacillus* فقد توصل Cachumba وآخرون (77,2016) و Feng وآخرون (1509,2017) و Qeshmi وآخرون (12,2015) إلى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus aryabhattai* هو 8 ومن بكتريا *Bacillus subtilis* هو 7 ويعود هذا الاختلاف إلى اختلاف مصدر البكتيريا المنتجة للإنزيم.

☒ تأثير سرعة الدوران (التهوية) في إنتاج الأسبارجينااز:

يلاحظ من الشكل (8) أن سرعة الدوران المثلى لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز هي 150 دورة بالدقيقة. والجدير بالذكر أن لسرعة الدوران أهمية كبيرة بتأمين الأوكسجين وتجانس توزيع المواد الغذائية لخلايا البكتريا. توافقت النتائج مع ما توصل إليه Silpa وآخرون (561,2017) من أن بكتريا *B. licheniformis* والأنواع الأخرى من *Bacillus* جميعها *Bacillus* أظهرت أعلى فعالية للإنزيم عند سرعة دوران (150 دورة/دقيقة) أما بالسرعات الكبيرة (200-250 دورة/دقيقة) وبالسرعات المنخفضة (60-90 دورة/دقيقة) انخفضت الفعالية الإنزيمية .

☒ تأثير مصدر الكربون (الغلوكوز) في إنتاج الأسبارجينااز:

استخدمت تراكيز مختلفة من سكر الغلوكوز (1-1.5-2-2.5-3%) في الوسط المستخدم لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus licheniformis*. قيست الفعالية الإنزيمية من أجل تحديد تركيز سكر الغلوكوز المثالي، فكان التركيز المثالي هو 1.5% كما هو موضح في (الشكل 8). تم استخدام الغلوكوز لاحقاً في وسط إنتاج الإنزيم في المراحل اللاحقة من الدراسة لكونه يحفز إنتاج الإنزيم بمعدلات عالية مقارنة مع مصادر الكربون الأخرى (Stanbury et al., 1997,93).

لقد توافقت هذه النتائج مع ماتوصل إليه كلاً من Jia وآخرون (9428,2013) و Moorthy وآخرون (1862,2010) عند دراستهم تأثير مصادر كربون مختلفة إذ وجدوا أن أفضل مصدر للكربون لإعطاء أعلى إنتاجية للإنزيم باستخدام أنواع مختلفة من جنس *Bacillus sp.* هو سكر الغلوكوز (1.5%)، توصل Feng وآخرون (1509,2017) و Cachumba وآخرون (77,2016) عند استخدام أنواع أخرى من *Bacillus* أن مصدر الكربون المثالي لإنتاجية إنزيمية أعلى للإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* هو الغلوكوز بنسبة (2%)، كما توصل Hymavathi وآخرون (8,2008) إلى أن أفضل مصدر للكربون للوصول إلى أعلى إنتاج للإنزيم من بكتريا *Bacillus circulans* هو سكر المانيتول (1%)، وقد يعزى الاختلاف بالنتائج إلى اختلاف أنواع *Bacillus* وتغذيتها.

☒ تأثير مصدر النيتروجين (مستخلص الخميرة) في إنتاج الأسبارجينااز:

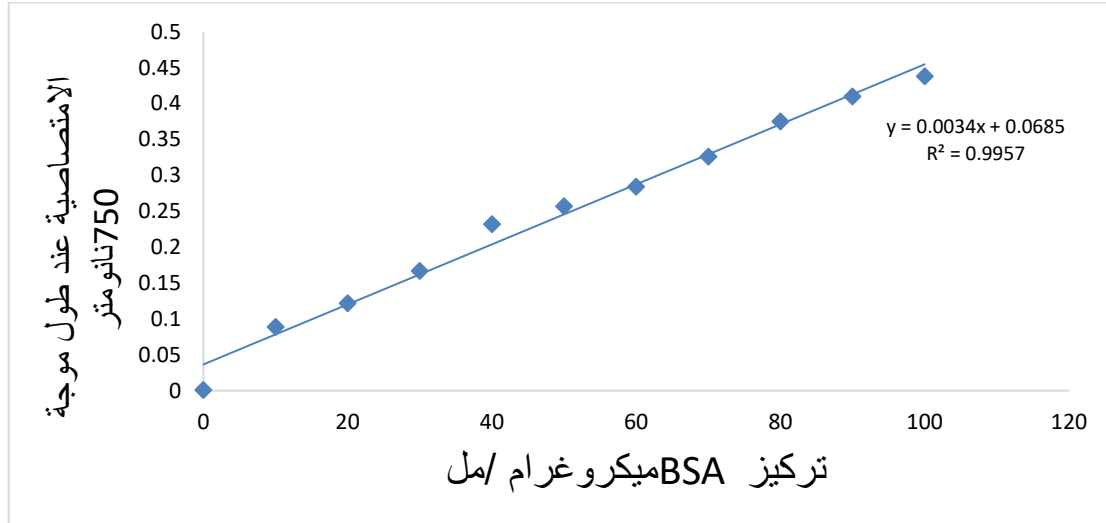
استخدمت تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة (1-1.5-2-2.5-3%) في الوسط المستخدم لإنتاج إنزيم الأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus licheniformis*. قيست الفعالية الإنزيمية من أجل تحديد تركيز مستخلص الخميرة المثالي، فكان التركيز المثالي هو 2.5% كما هو موضح في (الشكل 8). توافقت النتائج مع ماتوصل إليه Jia وآخرون (9428,2013) إلى أن أفضل تركيز من مستخلص

الخميرة للحصول على أعلى فعالية إنزيمية من جنس *Bacillus sp.* هو 2.5%. بينما أظهرت نتائج Hymavathi وآخرون (8,2008) إلى أن استخدام مستخلص الخميرة بتركيز 1.5% أدى إلى زيادة الفعالية الإنزيمية للإنزيم المنتج من بكتيريا *Bacillus circulans*، وقد يعزى ذلك إلى كون هذا النوع يحتاج إلى تغذية خاصة.

رابعاً - تنقية إنزيم الأسبارجينااز:

1. المنحنى القياسي لتقدير البروتين:

من أجل تقدير كمية البروتين قبل وبعد كل مرحلة من مراحل التنقية، تم رسم المنحنى القياسي للبروتين، إذ جرى استخدام تراكيز متدرجة من محلول ألبومين المصل البقري (BSA) تراوحت من (0-100 ميكروغرام/مل) وقيست الامتصاصية لشدة اللون الأرجواني باستخدام كاشف Folin عند طول الموجة 750 نانومتر ومنها رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين تركيز BSA (ميكروغرام/مل) والامتصاصية (Lowry.,1951,265)، حيث يوضح الشكل (9) العلاقة الخطية بين تراكيز المحلول القياسي (BSA) والامتصاصية وبتعويض قيمة الامتصاصية المقاسة قبل وبعد كل مرحلة من مراحل التنقية في معادلة المنحنى القياسي يمكننا حساب تركيز البروتين الناتج.



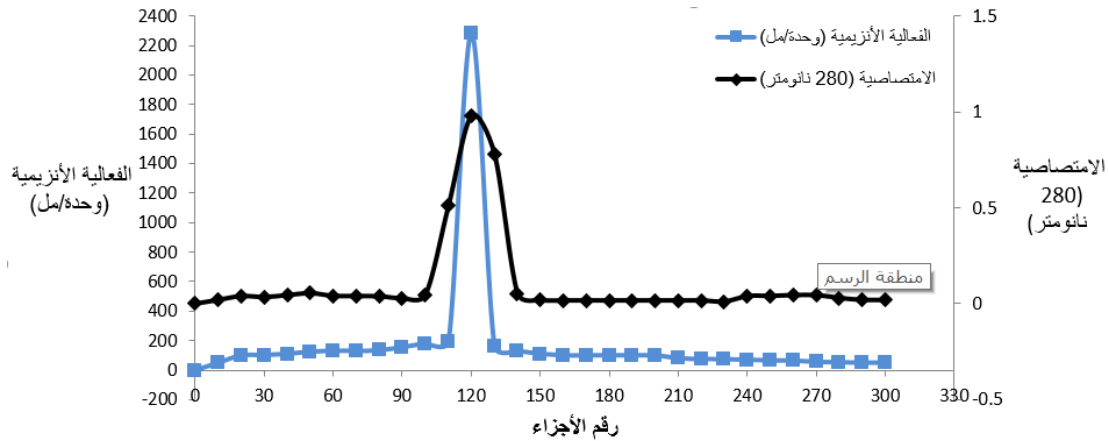
الشكل (9) يظهر المنحنى القياسي للبروتين باستخدام ألبومين المصل البقري (BSA)

2. ترسيب بروتين الإنزيم بالأسيتون:

أُخضع المستخلص الإنزيمي الخام لسلسلة من خطوات التنقية تمثلت الخطوة الأولى منها بفصل بروتين الإنزيم عن طريق ترسيبه بالمذيب العضوي الأسيتون بنسبة إشباع 80% وأذيب الراسب الناتج بـ 10 مل من المحلول الموقى Tris – HCl بتركيز 0.05M ورقم هيدروجيني 8.6، وتتلخص عملية ترسيب بروتينات الإنزيمات بالأسيتون بمعادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين وإحداث الخل (disruption) بطبقة الماء المحيطة بالبروتين وخفض درجة تميئها (degree of hydration) ومن ثم انخفاض ذائبية البروتين وترسيبه (Lide. 2006,226; Jimat *et al.*, 2017,5).

3. الفصل على عمود Sephadex G-100:

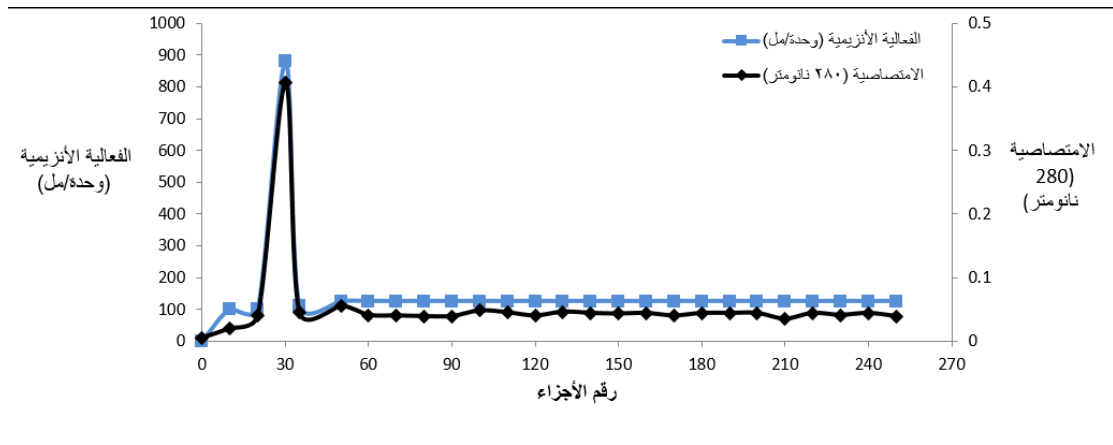
أضيف مقدار 3 مل من راسب البروتين الناتج من عملية الترسيب بالأسيتون على سطح عمود Sephadex G-100، وجمعت أجزاء البروتين في أنابيب بمعدل 0.5 مل للجزء الواحد في كل أنبوب، وقيست الامتصاصية لأجزاء بروتين محلول الاسترداد التي جمعت عند طول موجة 280 نانومتر وحسبت فعالية الإنزيم عند القمة المتشكلة، ويتضح من الشكل (10) أن الأجزاء التي تم جمعها في الأنابيب ذات الأرقام بين 115-135 (10 مل) أظهرت أعلى امتصاصية عند طول موجة 280 نانومتر، لذلك تم جمعها حيث أظهرت فعالية عالية لإنزيم الأسبارجينااز.



الشكل (10) يوضح عملية فصل الأسبارجينااز باستخدام هلامة Sephadex G-100 ، قيس الامتصاصية لأجزاء البروتين التي فصلت بمعدل جريان 30مل/ساعة باستخدام محلول Tris – HCl بتركيز 0.05M و pH 8.6 ، وتم قياس الامتصاصية عند طول موجة 280 نانومتر لأجزاء البروتين. قيس فعالية الإنزيم عند القمة المتشكلة.

4. الفصل على عمود DEAE-Sepharose:

بعد ذلك أُخذ 3 مل من محلول الاسترداد الناتج من هلامة Sephadex G-100 وتم إمرارها على هلامة DEAE-Sepharose بمعدل جريان 60 مل/ساعة باستخدام محلول Tris-HCL بتركيز 0.05 M و pH 8.6 ثم قيست الامتصاصية لأجزاء محلول الاسترداد التي فصلت بمعدل 1 مل للجزء الواحد في كل أنبوب وقيست الامتصاصية عند طول موجة 280 نانومتر ثم قيست فعالية الإنزيم عند القمة المتشكلة، ويبين الشكل (11) أن الأجزاء التي جمعت في الأنابيب بين 20-32 أظهرت أعلى فعالية لإنزيم الأسبارجينااز.



الشكل (11) يوضح عملية فصل الأسبارجينااز باستخدام هلامة DEAE-Sepharose قيست الامتصاصية لأجزاء البروتين التي فصلت بمعدل جريان 60 مل/ساعة باستخدام محلول Tris-HCL بتركيز 0.05M و pH 8.6 ، وتم قياس الامتصاصية عند طول موجة 280 نانومتر. قيست فعالية الإنزيم عند القمة المتشكلة.

يبين الجدول (21) ملخصاً لخطوات تنقية إنزيم الأسبارجينااز المنتج من البكتريا *Bacillus licheniformis*، حيث أظهرت النتائج ارتفاع الفعالية الإنزيمية والتي بلغت 880.54 وحدة/مل، كما بلغت الفعالية النوعية 667.08 وحدة/مغ بعدد مرات تنقية بلغت 283.86 ، وبحصيلة إنزيمية مقدارها 3.83%.

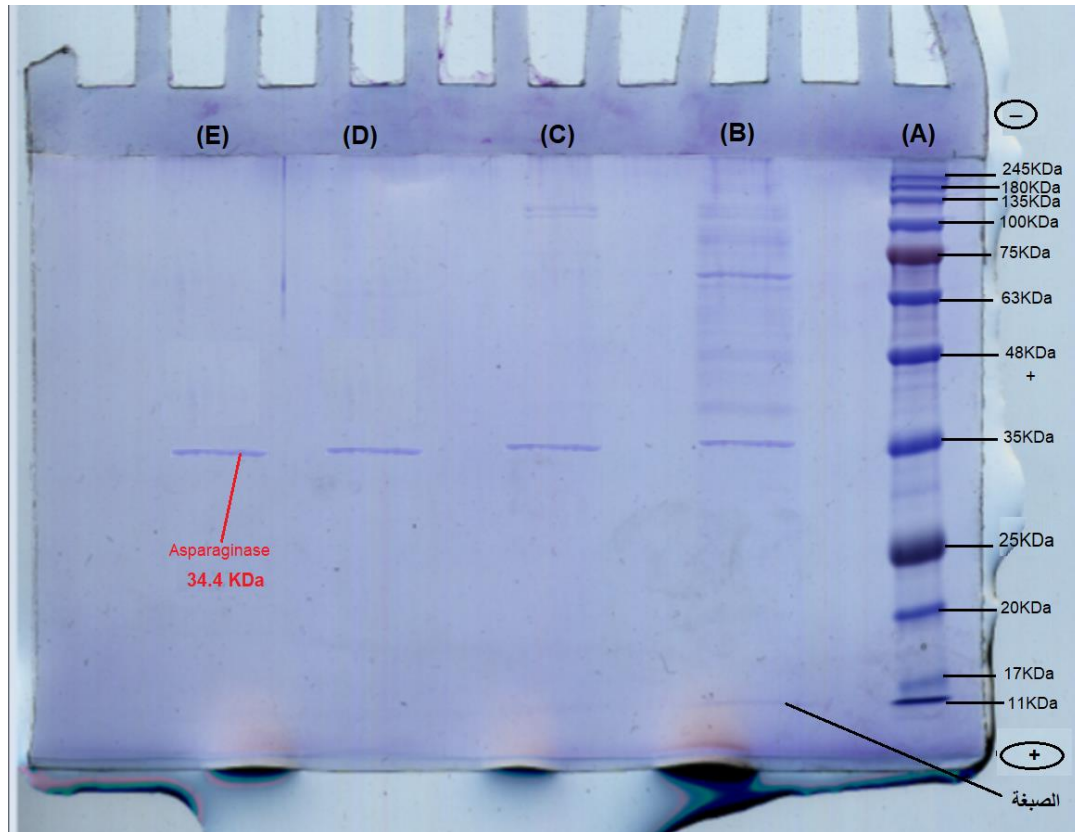
الجدول (21) يبين مراحل التنقية لإنزيم الأسبارجينااز المنتج من *Bacillus licheniformis*.

خطوات التنقية	الحجم الناتج (مل)	الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل)	الفعالية الكلية (وحدة)	تركيز البروتين (ميكروغرام/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغ)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية %
المستخلص الخام	50	1379.23	68961.5	586.76	2.35	1	100
الترسيب بالأسيتون 80%	10	2468.92	24689.2	13.120	188.18	80.08	35.80
عمود Sephadex G-100	3	2281.49	6844.47	3.8	600.39	255.49	9.92
عمود DEAE-Sephrose	3	880.54	2641.62	1.32	667.08	283.86	3.83

يبين الجدول (21) تفوق نتائج كافة مراحل التنقية بالمقارنة مع النتائج التي وجدها Mahajan وآخرون (11,2014) حيث أثبت أن الترسيب بالأسيتون بنسبة إشباع 80% للمستخلص الإنزيمي الخام لبكتريا *Bacillus licheniformis* أدى إلى زيادة الفعالية النوعية من 23.10 إلى 697.09 وحدة/مغ ورفع عدد مرات التنقية إلى 30.17 مرة. كما تفوقت أيضاً على نتائج Moorthy وآخرون (1862,2010) الذي وجد أن إضافة كبريتات الأمونيوم بتركيز 80% إلى مستخلص الإنزيم الخام المنتج من *Bacillus sp.* أدى إلى زيادة الفعالية النوعية من 0.10 إلى 1.12 وحدة/مغ، حيث بلغت عدد مرات التنقية 11.2 مرة. كما تفوقت على نتائج Jimat وآخرون (5,2017) الذي تمكن من تنقية أنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتريا *Bacillus sp.* بمرحلتين عن طريق ترسيب بروتين الإنزيم باستخدام كبريتات الأمونيوم 90% ثم استخدام عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني-DEAE Sepharose حيث توصل إلى عدد مرات تنقية بلغ 2.21. وذكر Silpa وآخرون (561,2017) عملية التنقية لأنواع مختلفة من جنس *Bacillus* منها نوع *B.pumilus* حيث جرت عملية التنقية بعدة خطوات شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسب إشباع 70-100% وإمرار المحلول الأنزيمي على عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose وأمكن الحصول على عدد مرات تنقية بلغت 9 مرات.

خامساً- تعيين الوزن الجزيئي لبروتين الأسبارجيناز باستخدام SDS-PAGE:

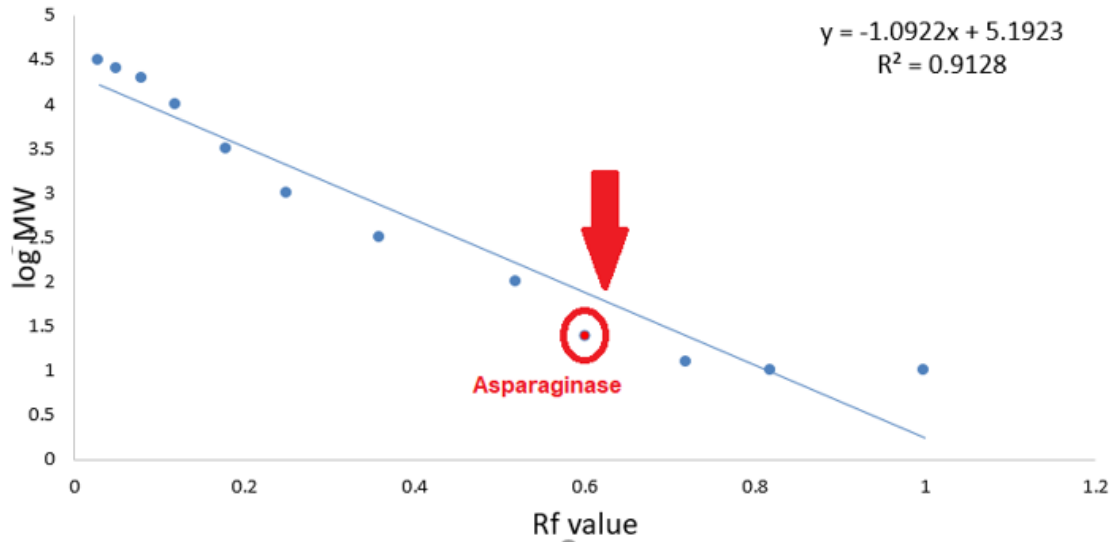
بعد إجراء عملية التنقية لإنزيم الأسبارجيناز، تم الاحتفاظ بحجم 50 ميكروليتر من الأجزاء الناتجة عن كل مرحلة من مراحل التنقية في المجمدة عند درجة حرارة -20°م، بعدها أجريت عملية الرحلان الكهربائي لهذه الأجزاء (الشكل 12) حيث يبين المسار (A) نتائج الرحلان الكهربائي لبروتينات معروفة الوزن الجزيئي، يبين المسار (B) نتيجة الرحلان الكهربائي لعينة الإنزيم الخام، يبين المسار (C) نتيجة الرحلان الكهربائي لعينة الإنزيم المرسب بالأسيتون بينما يبين المسار (D) نتيجة الرحلان الكهربائي لعينة البروتين بعد التنقية باستخدام هلامة Sephadex G-100 حيث ظهرت حزمة واحدة فقط، أما المسار (E) فيبين نتيجة الرحلان الكهربائي لعينة البروتين بعد تنقيتها باستخدام هلام DEAE-Sephrose وقد ظهرت حزمة واحدة أيضاً .



الشكل (12) يوضح الرحلان الكهربائي لعينات البروتين الناتجة عن مراحل التنقية باستخدام SDS-PAGE. المسار (A) مؤشر لبروتينات معروفة الوزن الجزيئي، المسار (B) عينة الإنزيم الخام، المسار (C) عينة الإنزيم المرسب بالأسيتون، المسار (D) عينة البروتين بعد التنقية باستخدام هلامة Sephadex G-100 ، أما المسار (E) عينة البروتين بعد تنقيتها باستخدام هلام DEAE-Sephrose .

وتظهر في هذا الشكل في المسار A الأوزان الجزيئية للبروتينات الناتجة التي حسبت كما يلي: في البداية رسم المنحني القياسي لبروتينات معروفة الوزن الجزيئي (مؤشرات الوزن الجزيئي للبروتينات

ذات الوزن الجزيئي المنخفض (Low molecular weight protein markers) وتم الربط بين قيمة الحركة النسبية RF وقيمة $\log(MW)$ ، حيث RF يمثل نسبة المسافة التي قطعها البروتين إلى المسافة التي قطعتها الصبغة الدالة، بينما $\log(MW)$ هو لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات معروفة الوزن الجزيئي 5-245 كيلو دالتون. يبين الشكل (13) المنحني القياسي الناتج. أجريت المواءمة الخطية وفقاً للمعادلة المبينة في هذا الشكل.



الشكل (13) يبين المنحني القياسي الناتج عن الرحلان الكهربائي للبروتينات المعروفة الوزن الجزيئي على

هلامة SDS-PAGE

ثم تم حساب الوزن الجزيئي لكل حزمة في الشكل (الهلام) من خلال قياس نسبة المسافة التي قطعتها الحزمة لكل بروتين معروف الوزن الجزيئي إلى المسافة التي قطعتها الصبغة وتعويضها في معادلة المستقيم المبين في الشكل (13) وبالنتيجة أمكن حساب الوزن الجزيئي للإنزيم المدروس والذي بلغ 34.4 كيلو دالتون.

تباينت الدراسات في تقدير الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجينااز وذلك تبعاً لاختلاف المصدر الميكروبي للإنزيم، فقد تراوح الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجينااز المنتج من جنس *Bacillus sp.* بين 33-48 كيلو دالتون (Silpa et al., 2017,561). كانت النتائج متوافقة مع ما توصل إليه Mahajan وآخرون (11,2014) حيث وجد أن الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجينااز المنتج من *Bacillus licheniformis* هو 33.7 كيلو دالتون، تقاربت النتائج مع ماوجده Qeshmi وآخرون (12,2015) أن الوزن الجزيئي له بلغ 38 كيلو دالتون عند إنتاجه من بكتيريا *Bacillus sp* PG02

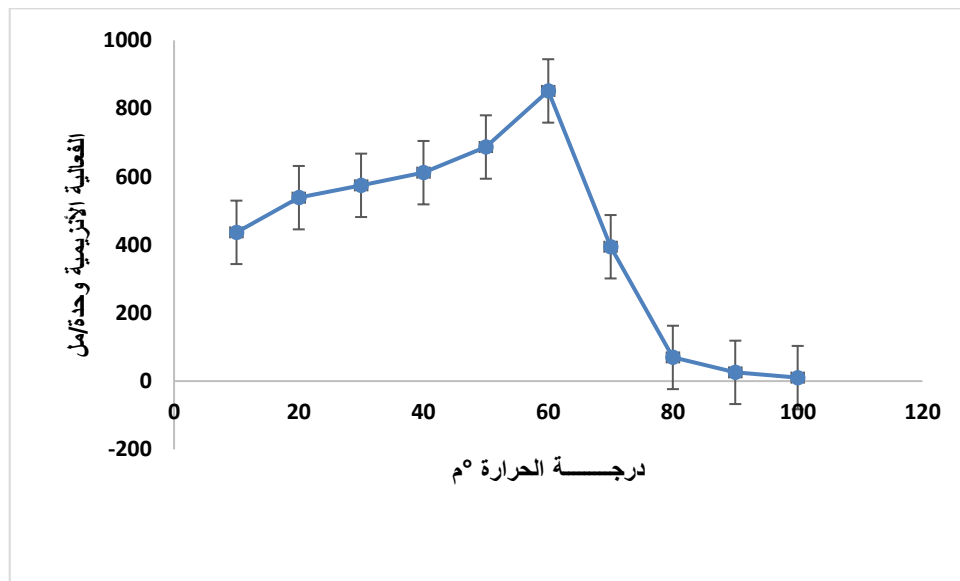
، بينما اختلف النتائج مع ماتوصل إليه Moorthy وآخرون (1862,2010) إلى أن الوزن الجزيئي لبروتين إنزيم الأسبارجينااز هو 45 كيلو دالتون عند إنتاجه من جنس *Bacillus*.

سادساً- دراسة بعض الصفات الحركية لإنزيم الأسبارجينااز المنقى المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis*

حُللت كافة نتائج هذا الجزء من التجارب باستخدام البرنامج الإحصائي XLSTAT (Zoia) *et al.*, 2008,101 وبواقع ثلاثة مكررات لكل تجربة.

1. درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم المنقى:

أجري التفاعل الإنزيمي بدرجات حرارة تراوحت بين 10-100°م، فأظهرت النتائج كما هو موضح في الشكل (14) تزايد فعالية الإنزيم مع زيادة درجة الحرارة حتى بلغت أقصاها عند درجة الحرارة 60°م إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 851.64 وحدة/مل ثم انخفضت بزيادة درجة الحرارة لتصل إلى 10.25 وحدة/مل عند درجة الحرارة 100°م.



الشكل (14): يبين تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى.

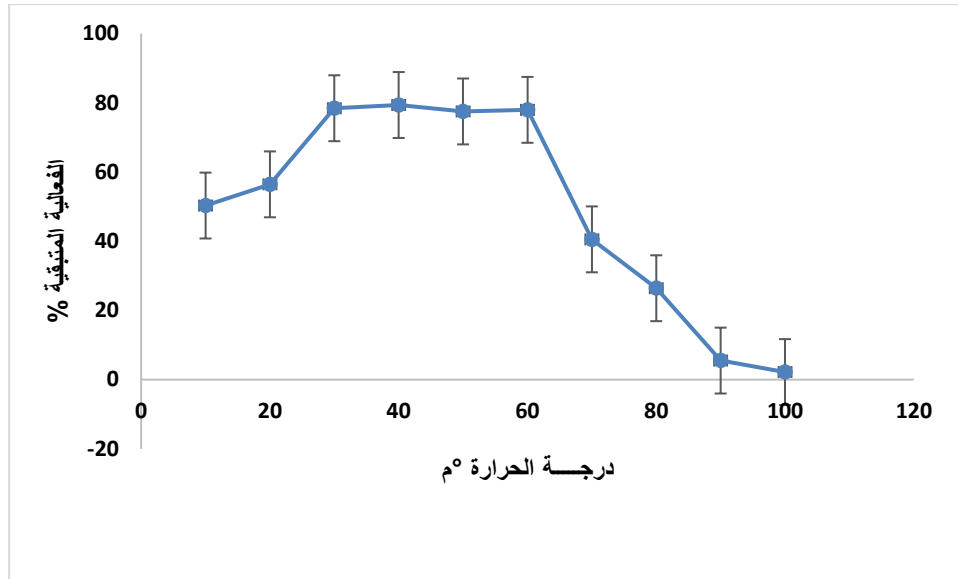
أكدت نتائج التحليل الإحصائي أن قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 10-20°م تختلف اختلافاً ظاهرياً عن قيمة الفعالية عند درجات الحرارة 30-40-50°م، كذلك تختلف قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 70-80°م اختلافاً ظاهرياً عن قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 90-100°م. بينما تختلف قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 60°م اختلافاً معنوياً عن جميع القيم التي تم الحصول عليها عند مستوى ثقة 0.05. ويعزى ذلك إلى زيادة سرعة التفاعلات الإنزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات ومن ثم زيادة التصادمات بين جزيئات الإنزيم وجزيئات المادة الأساس أما انخفاض

الفعالية الإنزيمية الشديد عند درجات الحرارة العالية فإنه يعود إلى امتصاص الجزيئات المتفاعلة لحرارة عالية مما يؤدي إلى تغيير تركيب الإنزيم ومن ثم مسخه وفقدانه للفعالية تدريجياً (Robinson,2015,28).

توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما وجدته Mahajan وآخرون (11,2014) أن إنزيم الأسبارجينااز النقي المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* أظهر أقصى فعالية إنزيمية عند درجة الحرارة 60°م أثناء حضن الإنزيم بدرجات حرارة مختلفة بوجود رقم هيدروجيني 9 ، بينما اختلفت النتائج مع ما وجدته Moorthy وآخرون (1862,2010) الذي وجد أن أقصى فعالية إنزيمية للإنزيم النقي المنتج من بكتريا *Bacillus sp.* كانت عند درجة الحرارة 40°م أثناء حضن الإنزيم بدرجات حرارة مختلفة وبرقم هيدروجيني 8، وهذه الاختلافات قد تعتمد على طبيعة بروتين الإنزيم الذي قد يختلف باختلاف أنواع البكتريا المنتجة له.

2. تحديد مجال الثبات الحراري لفعالية الإنزيم المنقى:

أظهرت نتائج حضن إنزيم الأسبارجينااز المنقى والمنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* بدرجات حرارة تراوحت بين 10-100°م مدة 60 دقيقة أن الإنزيم احتفظ بنسبة 77-79% من فعاليته بدرجة حرارة تراوحت بين 30-60°م (الشكل 15). انخفضت الفعالية الإنزيمية تدريجياً عند 10-20°م وعند 70-100°م حيث فقد الإنزيم 49.70% من فعاليته عند حرارة 10°م و43.58% من فعاليته عند حرارة 20°م، كما فقد الإنزيم 59.47% من فعاليته عند درجة الحرارة 70°م وفقد 73.58% من فعاليته عند حرارة 80°م وفقد 94.92% منها عند حرارة 90°م، بينما فقد 97.81% من هذه الفعالية عند حرارة 100°م. ويعزى سبب انخفاض فعالية الإنزيم قيد الدراسة بارتفاع درجة الحرارة إلى تأثير الحرارة في تركيب جزيئة الإنزيم ومن ثم مسخه (Meng et al.,1993,8459).

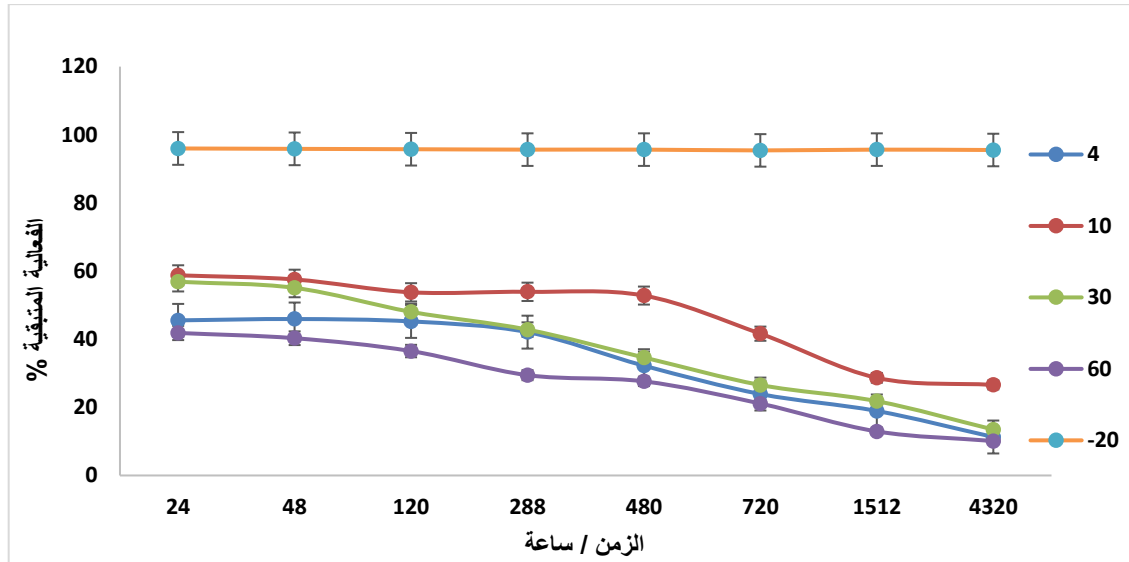


الشكل(15): يبين تأثير درجة الحرارة في ثبات فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى.

أكدت نتائج التحليل الإحصائي أن قيمة الفعالية الإنزيمية ضمن المجال الحراري 10-20°م تختلف اختلافاً ظاهرياً (غير معنوي) عن مثيلاتها عند درجات الحرارة 70-80-90 ، بينما قيمة الفعالية ضمن المجال الحراري 30-60°م تختلف اختلافاً معنوياً عن درجة الحرارة 100°م وعن درجات الحرارة الأخرى وهنا نستنتج أن الفعالية قد بقيت شبه ثابتة في المجال الحراري من 30-60°م. توافقت النتائج مع ما ذكره Mahajan وآخرون (11,2014) حيث توصل إلى أن درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم النقي هي 65°م ويحتفظ الإنزيم بكامل فعاليته عند حصنه بدرجة حرارة بين 30-60°م مدة 60 دقيقة.

3. درجة الحرارة المثلى لتخزين الإنزيم الخام:

تضعف الفعالية الإنزيمية مع إطالة مدة التخزين وارتفاع درجة الحرارة فقد أثبتت نتائج حصن إنزيم الأسبارجينااز الخام المنتج من بكتيريا *Bacillus licheniformis* بدرجات حرارة مختلفة -20، 4، 10، 30، 60°م مدة 4320 ساعة (6 أشهر) مع قياس الفعالية خلال الأزمنة التالية 24، 48، 120، 288، 480، 720، 1512، 4320 ساعة أن درجة الحرارة -20°م هي أفضل درجة حرارة لتخزينه حيث احتفظ الإنزيم بـ 95.5% من فعاليته بدرجة حرارة -20°م خلال هذه الأزمنة مدة 4320 ساعة (الشكل 16)، أما بالنسبة لبقية درجات الحرارة فبدأت الفعالية بالانخفاض بشكل تدريجي، إذ فقد الإنزيم في نهاية المدة المدروسة 88.71% من فعاليته عند درجة حرارة 4 مئوية، و 73.42% عند درجة حرارة 10 مئوية، و 86.51% عند درجة حرارة 30 مئوية، و 89.89% عند درجة حرارة 60 مئوية ويعزى ذلك إلى تغيير تركيب الإنزيم ومن ثم مسخه وفقدانه للفعالية تدريجياً (Robinson,2015,29)

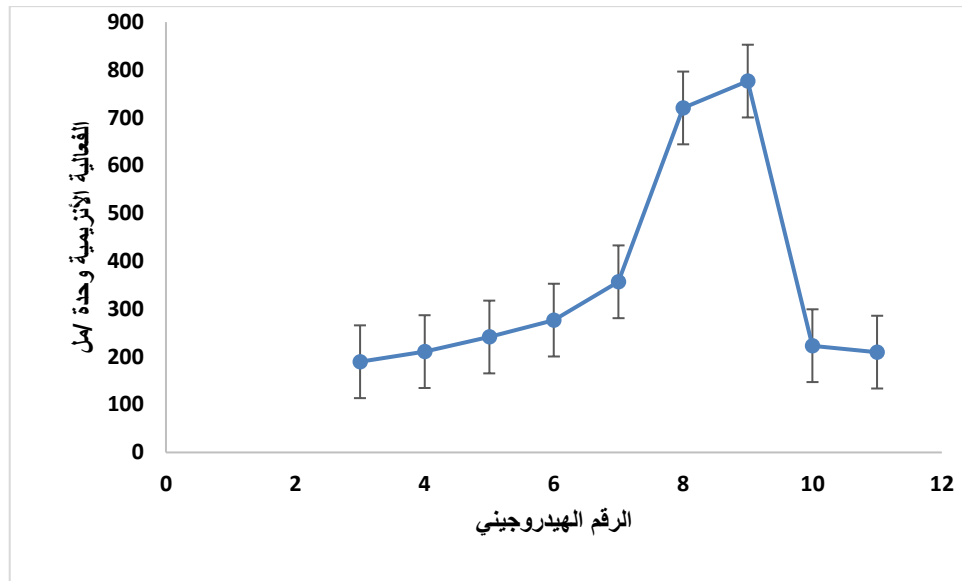


الشكل (16): يبين تأثير درجة حرارة التخزين في فعالية إنزيم الأسبارجينااز الخام.

أكدت نتائج التحليل الإحصائي أن قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 4°م تختلف اختلافاً ظاهرياً (غير معنوي) عن قيمة الفعالية عند درجات الحرارة 10°م، وأيضاً تختلف قيمة الفعالية عند الحرارة 10-30°م اختلافاً ظاهرياً عن قيمة الفعالية عند الحرارة 60°م. بينما تختلف قيمة الفعالية عند الحرارة -20°م اختلافاً معنوياً عن جميع القيم التي تم الحصول عليها عند مستوى ثقة 0.05 ($P < 0.05$). توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما وجدته Mahajan وآخرون (11,2014) أن إنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* أظهر أقصى فعالية إنزيمية عند حفظه مدة 30 يوم بدرجة -20°م.

4. الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم المنقى:

قدر الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوح بين (11-3) باستعمال محاليل موقية مختلفة. وبينت النتائج الموضحة في الشكل (17) أن الإنزيم أظهر أعلى فعالية عند الرقم الهيدروجيني 9، إذ أعطى الإنزيم أقصى فعالية إنزيمية مقدارها 776.72 وحدة/مل في حين انخفضت الفعالية الإنزيمية عند الأرقام الهيدروجينية الحامضية حيث كانت 241.46 وحدة/مل عند الرقم الهيدروجيني 5، كما وصلت الفعالية عند الرقم الهيدروجيني المتعادل 7 إلى 356.93 وحدة/مل، وأيضاً انخفضت الفعالية الإنزيمية عند الأرقام الهيدروجينية القاعدية لتصل إلى 209.82 وحدة/مل عند الرقم 11. وأكدت نتائج التحليل الإحصائي أن قيمة الفعالية الإنزيمية عند الرقم الهيدروجيني 9 تختلف اختلافاً معنوياً عن قيم الفعالية عند أرقام الحموضة الأخرى المستخدمة حيث تفوقت على باقي القيم.



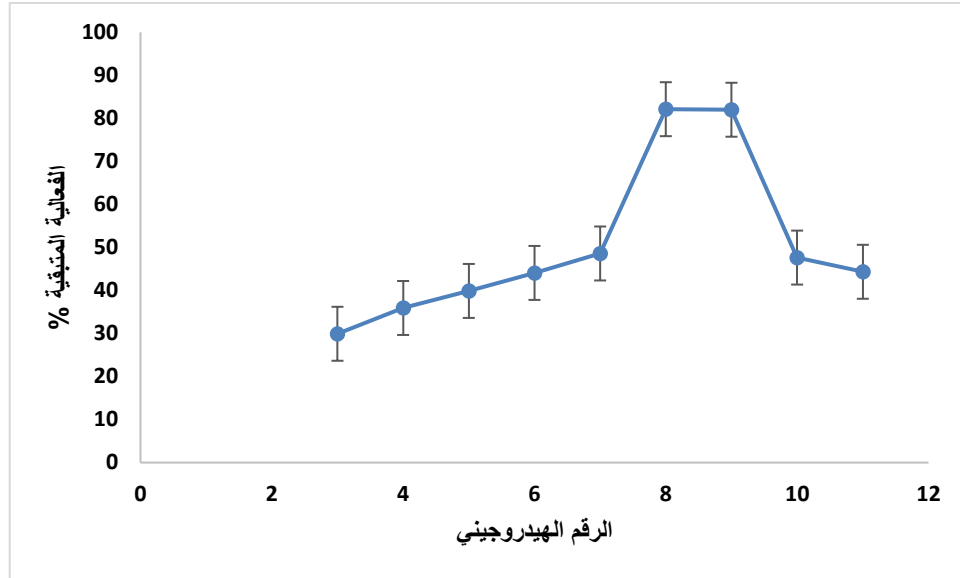
الشكل (17): يبين تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى

إن سبب الانخفاض في الفعالية يعود إلى تأثير واحدة أو أكثر من المجاميع الأيونية الموجودة في الموقع الفعال للإنزيم بسبب تغير الحالة الأيونية لهذه المجاميع وانعكس ذلك على قابلية الإنزيم للارتباط بالركيزة (Robinson, 2015,29) وجاءت النتائج متفقة مع ما تمت الإشارة إليه في دراسات سابقة أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الأسبارجينااز المنتج من معظم الأنواع التابعة لجنس *Bacillus sp.* يتراوح بين 8-10 حيث أكدت إحدى هذه الدراسات أن درجة pH المثالية لأعلى فعالية إنزيمية لإنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتيريا *Bacillus licheniformis* هو 9 (Mahajan et al., 2014,11). كما تقاربت النتائج مع ما توصل إليه Stecher وآخرون (1,1999) و Morten و Richard (1161,2000) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل هو 8.6. وأكد Kumar و Sobha (137,2012) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيمية أعلى هو 8.

5. تحديد مجال الثباتية الحمضية لفعالية الإنزيم المنقى:

عين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الأسبارجينااز بحضنه عند حرارة 37°م لمدة 60 دقيقة في محاليل موقية تراوحت أرقامها الهيدروجينية بين 3-11. أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (18) أن إنزيم الأسبارجينااز احتفظ بثباتية ضمن مجال من أرقام الحموضة فكان أعلى فعالية بين أرقام حموضة 8-9 ثم تناقصت تدريجياً كلما اختلفت حموضة الوسط، إذ احتفظ الإنزيم تقريباً بـ 82.12% عند حضنه في الرقم الهيدروجيني 8 و احتفظ بـ 81.94% عند حفظه ضمن الرقم 9 بينما فقد الإنزيم نسبة مرتفعة من فعاليته عند الأرقام الهيدروجينية الحامضية 3-6 والقاعدية 10-11، حيث فقد 70.06% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 3، كذلك فقد 64.06% من هذه الفعالية عند الرقم

الهيدروجيني 4، كما فقد 60.11% عند الرقم الهيدروجيني 5، وفقد 55.92% عند الرقم الهيدروجيني 6 كما فقد فعاليته بنسبة 51.40% عند الرقم الهيدروجيني المتعادل 7 وكذلك فقد الإنزيم نسبة مرتفعة من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني القاعدي 10 تقدر ب 52.36% وعند الرقم 11 فقد 55.61% من فعاليته.



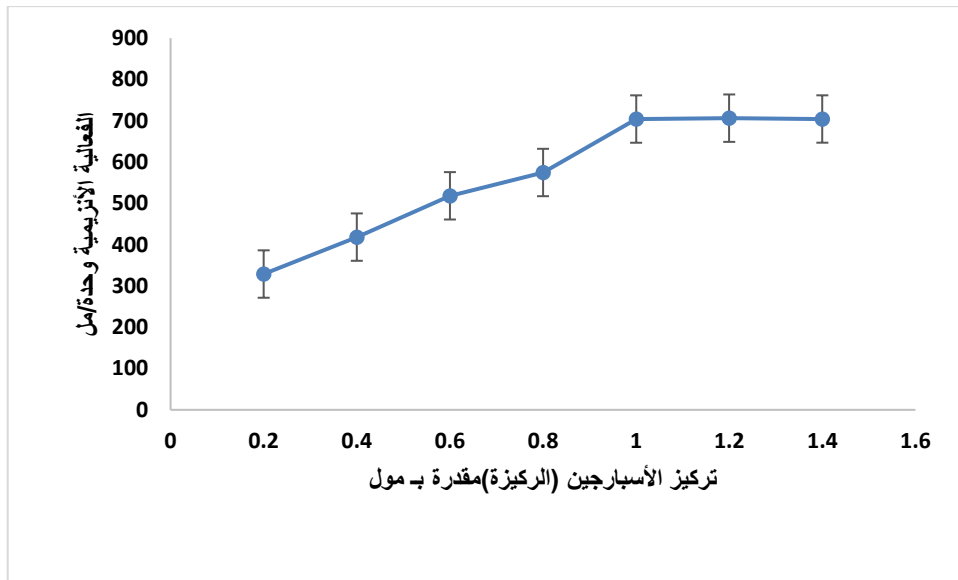
الشكل (18): يبين تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن قيمة الفعالية الإنزيمية المتبقية عند الرقم الهيدروجيني 8-9 تختلف اختلافاً معنوياً عن باقي قيم الأرقام الهيدروجينية، وهنا نستنتج أن النسبة المئوية للفعالية المتبقية بقيت شبه ثابتة في هذا المجال. وقد أكد التحليل الإحصائي أن قيم الفعالية الأخرى ذات دلالة معنوية، أي أن هناك اختلاف حقيقي في القيم المحددة.

وقد يعود سبب الانخفاض في الفعالية عند القيم الهيدروجينية الحامضية أو القاعدية إلى حدوث تغيرات في شحنة جزيئة الإنزيم علاوة على تغير الحالة الأيونية للموقع الفعال للإنزيم عند الحدود القصوى من الحموضة والقاعدية، حيث يعتبر المصدر الميكروبي للإنزيم والطبيعة الكيميائية للمحلول الموقى من العوامل المهمة التي تؤثر في تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم (Silpa et al., 2017)، توافقت هذه النتائج مع ما توصل إليه Mahajan وآخرون (2014, 11) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* تراوح بين 8-9 وتوافقت أيضاً مع ما أثبتته Silpa وآخرون (2017) أن الإنزيم يبقى ثابتاً ضمن الأرقام الهيدروجينية القلوية التي تتراوح بين 8-9.

6. تأثير تركيز الركيزة في فعالية الإنزيم المنقى:

يبين الشكل (19) فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى تبعاً لتركيز الركيزة (الأسبارجين)، ويتضح من هذا الشكل زيادة النشاط الإنزيمي بشكل تدريجي مع زيادة تركيز الركيزة، وأن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند استخدام 1 مول من الأسبارجين وبعد هذا التركيز لم تلاحظ أي زيادة ملموسة في الفعالية، وقد توصل Mahajan وآخرون (11,2014) و Silpa وآخرون (561,2017) إلى أن أفضل تركيز للأسبارجين هو (1 مول). تشير نتائج التحليل الإحصائي إلى أن هناك فروق معنوية في قيم الفعالية لدى استخدام الأسبارجين بتركيزات 0.2-0.4-0.6-0.8 مول، بينما كانت الفروق ظاهرية بين قيم الفعالية عند التراكيز 1-1.2-1.4 مول عند مستوى ثقة 0.05 والسبب هو عدم بقاء جزيئات إنزيمية حرة للارتباط مع الركيزة و تشبع جزيئات الإنزيم بالركيزة .



الشكل (19): يبين تأثير تركيز الركيزة (الأسبارجين) في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى.

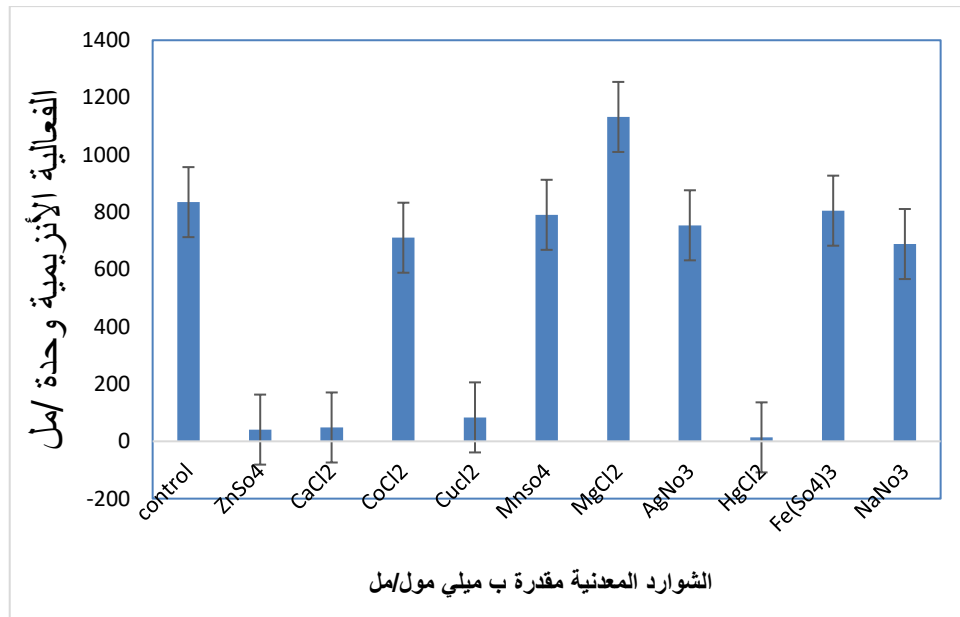
7. تأثير بعض الشوارد المعدنية في فعالية الإنزيم المنقى:

يلاحظ من الشكل (20) أن الشوارد (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ag^{+} , Na^{+} , Fe^{+3} , Co^{+2}) أدت إلى زيادة الفعالية الإنزيمية وقد ازدادت فعالية الإنزيم بشكل ملحوظ بنسبة 135.61% عند استخدام شاردة Mg^{+2} ، وبقي الإنزيم محافظاً على 85.12% من فعاليته عند استخدام شاردة Co^{+2} ، و 94.70% عند استخدام شاردة Mn^{+2} ، و 90.31% عند استخدام شاردة Ag^{+1} ، و 96.42% عند استخدام شاردة Fe^{+3} ، و 82.48% عند استخدام شاردة Na^{+} . وأن الشوارد المعدنية (Ca^{+} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2}) أدت إلى خفض الإنتاجية الإنزيمية، إذ فقد الإنزيم 95.10% من فعاليته عند استخدام شاردة Zn^{+2} ، و 94.22% عند استخدام شاردة Ca^{+2} ، و 90% عند استخدام شاردة Cu^{+2} و 98.35% عند استخدام

شاردة Hg^{+2} . بينت الدراسة الإحصائية عدم وجود فروق معنوية بين الفعالية الإنزيمية لقيمة الشاهد والفعالية الإنزيمية عند استخدام الشوارد (Co^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ag^{+} , Na^{+} , Fe^{+3}) بينما لوحظ وجود فرق معنوي بين قيمة الشاهد والقيم الناتجة عن الشوارد المعدنية (Hg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2}) عند مستوى ثقة 0.01.

توافقت النتائج مع ماتوصل إليه Abdelrazek وآخرون (8,2019) بازدياد الفعالية الإنزيمية بوجود شاردة (Mg^{+2}) وانخفاضها بوجود الشاردة Ca^{+2} .

توافقت النتائج أيضاً مع دراسة Mahajan وآخرون (11,2014) بازدياد الفعالية الإنزيمية عند وجود شاردة (Mg^{+2}) وانخفاض الفعالية الإنزيمية بوجود شوارد Hg^{+2} و Ca^{+2} و Cu^{+2} و Zn^{+2} . كما توافقت النتائج مع نتائج Moorthy وآخرون (1862,2010) على إعطاء الإنزيم المنتج من جنس *Bacillus sp.* إنتاجية إنزيمية عالية بوجود مركب كلوريد المغنيزيوم .

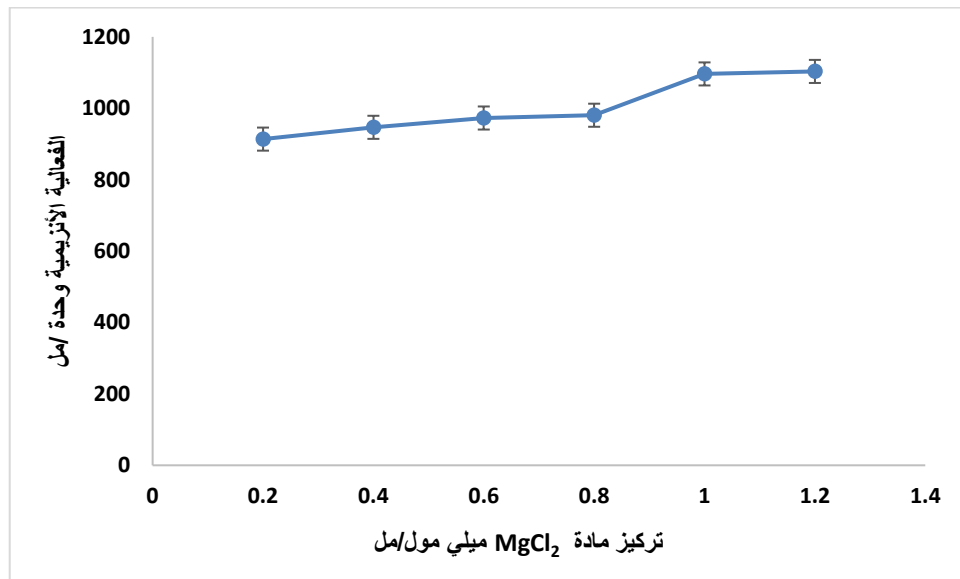


الشكل (20): يبين تأثير بعض الشوارد في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى.

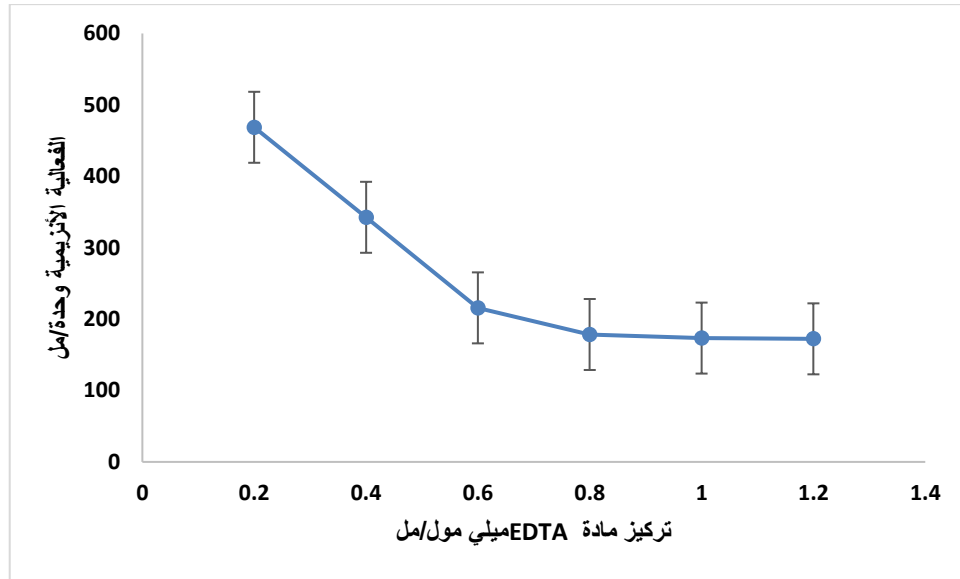
8. تأثير مادتي EDTA و $MgCl_2$ في فعالية الإنزيم المنقى:

يتضح من الشكل (21) أن استخدام مادة $MgCl_2$ بتركيزات مختلفة (0.2-0.4-0.6-0.8-1.2-1.2 ميلي مول/مل) أثرت على الفعالية الإنزيمية حيث ازدادت بشكل تدريجي مع زيادة تركيز المادة فبلغت أقصى قيمة لها عند استخدام تركيز 1 mM/مل حيث كانت 1096.21 وحدة /مل ولم يلاحظ أي زيادة ملموسة في الفعالية بعد هذا التركيز. بينما يتضح من الشكل (22) أن استخدام مادة EDTA بتركيزات مختلفة (0.2-0.4-0.6-0.8-1.2-1.2 ميلي مول/مل) أدى إلى انخفاض تدريجي في النشاط

الإنزيمي مع زيادة تركيز المادة حيث كان أقصى انخفاض للفعالية عند استخدام التركيز 0.8 ميلي مول/مل وانخفضت الفعالية إلى 178.43 وحدة/مل ولم يلاحظ أي انخفاض في الفعالية بعد هذا التركيز. تشير نتائج التحليل الإحصائي إلى وجود فروق معنوية في قيم الفعالية لدى استخدام مادة $MgCl_2$ بتركيزات 0.2-0.4-0.6-0.8 ميلي مول/مل، بينما كانت الفروق ظاهرية بين قيم الفعالية عند التراكيز 1-1.2 ميلي مول/مل عند مستوى ثقة $P < 0.05$ والسبب هو عدم بقاء جزيئات إنزيمية حرة للارتباط مع المادة وتشيع جزيئات الإنزيم بها. كما وضح التحليل الإحصائي إلى أن هناك فروق معنوية في قيم الفعالية لدى استخدام مادة EDTA بتركيزات 0.2-0.4-0.6 ميلي مول/مل، بينما كانت الفروق ظاهرية بين قيم الفعالية عند التراكيز 0.8-1-1.2 ميلي مول/مل عند مستوى ثقة $P < 0.05$. توافقت النتائج مع ماتوصل إليه Moorthy وآخرون (1862,2010) بازدياد الفعالية الإنزيمية بشكل تدريجي كلما ازداد تركيز مادة $MgCl_2$ حيث بلغت أقصى فعالية عند التركيز 1 ميلي مول/مل وأكد أيضاً على انخفاض الفعالية الإنزيمية بشكل تدريجي كلما ازداد تركيز مادة EDTA حتى الوصول إلى تركيز 0.8 ميلي مول/مل وعلى عدم ملاحظة أي انخفاض ملموس بعد هذا التركيز .



الشكل (21): يبين تأثير مادة $MgCl_2$ في فعالية إنزيم الأسبارجينااز المنقى.



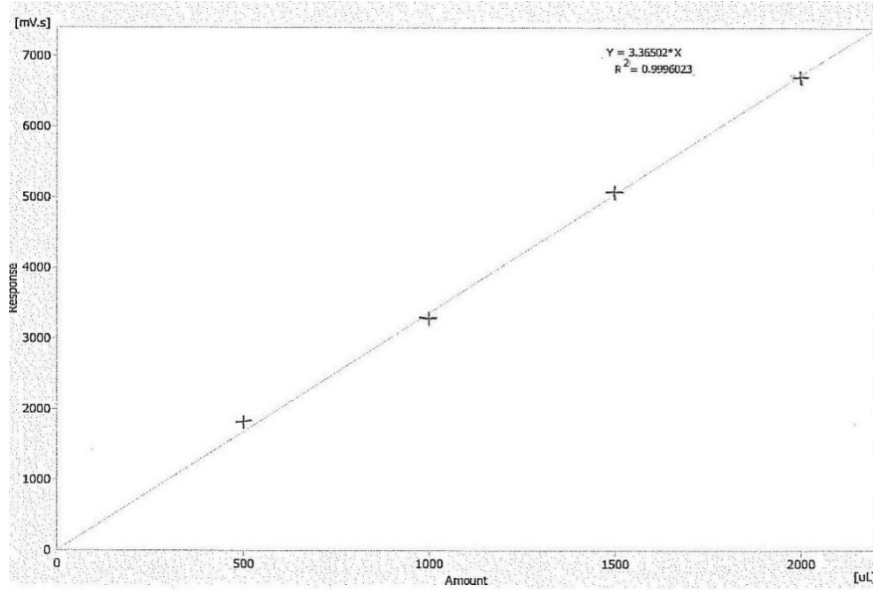
الشكل (22): يبين تأثير مادة EDTA في فعالية إنزيم الأسبارجيناز المنقى.

سابعاً- التطبيقات العملية للإنزيم:

درست كفاءة إنزيم الأسبارجيناز المنقى والمنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* في تقليل كمية الأكريلاميد المتشكلة في الأغذية المقلية الحاوية على النشاء باستخدام جهاز HPLC حيث أجري الكشف عن مستوى الأكريلاميد في عينات البطاطا المقلية والشيبس والدونات. حُصل على الطحين الأبيض لعمل العجينة، والبطاطا الطازجة (صنف Spunta)، وزيت القلي النباتي المستخلص من بذور دوار الشمس من السوق المحلية في مدينة دمشق، وحُضرت العينات مخبرياً. حددت القيم باستخدام قيمة ميول منحنى المعايرة، وقيمة الاسترداد المتحصل عليها في الطريقة المتبعة.

5. قيم ميول منحنى المعايرة:

كانت قيم الارتباط بين تراكيز المحاليل القياسية ومساحة القمم الخاصة بمادة الأكريلاميد في جهاز HPLC مساوية 0.9996023 كما كانت المعادلة كالتالي $Y=3.36502X$ ويوضح ذلك في الشكل (23).



الشكل (23): يظهر معادلة المنحني المعياري للأكريلاميد.

6. حد الكشف في جهاز HPLC:

حدد التركيز الأدنى للأكريلاميد الذي يمكن الكشف عنه بواسطة جهاز HPLC وكان 4.4

ميكروغرام /كغ.

7. محتوى الأكريلاميد في العينات الغذائية:

❖ محتوى الأكريلاميد في البطاطا المقلية:

يظهر الجدول (22) نتائج تحليل الأكريلاميد في عينات البطاطا المقلية غير المعاملة والمعاملة

بالإنزيم المنقى.

الجدول (22) يوضح نتائج تحليل الأكريلاميد في عينات البطاطا المقلية.

متوسط محتوى العينة من الأكريلاميد (ميكروغرام /كغ)± الانحراف المعياري	محتوى العينة من الأكريلاميد		العينة
	مكرر 2	مكرر 1	
16.27 ±1458.68	1447.171	1470.180	عينة الشاهد غير المعاملة بالإنزيم
29.20± 731.77	752.411	711.129	العينة المعاملة بالإنزيم المنقى

نلاحظ من الجدول (22) أن محتوى الأكريلاميد في عينات البطاطا المقلية كانت ضمن المجال

الذي أشار إليه Muthaiah وآخرون (45,2019) حيث أكدوا أن كمية الأكريلاميد في البطاطا المقلية

تراوحت بين 371.56-6391.73 ميكروغرام/كغ، كما تقاربت النتائج مع كمية الأكريلاميد المصرح بها

من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية FDA (312,2002) والتي بينت أن متوسط كمية الأكريلاميد لعينات مختلفة من البطاطا المقلية بلغ بين 20-1325 ميكروغرام/كغ. كان محتوى العينات من الأكريلاميد مرتفع عن ما أشار إليه Ariseto وآخرون (207,2009) في عينات البطاطا المقلية والتي كان متوسط محتواها من الأكريلاميد 264 ميكروغرام/كغ، ومرتفع أيضاً عن ما أشار إليه Olmez وآخرون (564,2008) حيث كان محتوى عينات البطاطا المقلية من الأكريلاميد 63 ميكروغرام /كغ واختلف أيضاً عن ما أشار إليه Tateo وآخرون (232,2007) والذي أكد أن متوسط محتوى عينات البطاطا المقلية من الأكريلاميد 50 ميكروغرام /كغ. ويمكن أن يعود الاختلاف في قيم مستوى الأكريلاميد بين عينات البطاطا المقلية المدروسة من قبل الباحثين إلى عوامل عديدة كطريقة الزراعة وموعدها والفترة التخزينية للبطاطا ونوعها ونوع زيت القلي المستخدم وطريقة القلي (Xu et al., 2016,163).

بينت نتائج تحليل محتوى الأكريلاميد في عينة البطاطا المقلية والمضاف لها الإنزيم المنقى بكمية (30 وحدة/مل) لمدة 15 دقيقة إلى انخفاض نسبته إلى 50.17%، حيث كانت كمية الأكريلاميد في العينة غير المعاملة بالإنزيم 1458.68 ميكروغرام/كغ لتتخفض إلى 731.77 ميكروغرام/كغ في العينة المعاملة بالإنزيم. توافقت النتائج مع نتائج Pedreschi وآخرون (386,2008) حيث أكد على انخفاض نسبة الأكريلاميد في المنتج النهائي بين 45-67% وأيضاً توافقت مع نتائج Maloney (9,2014) حيث انخفضت نسبة الأكريلاميد في المنتج النهائي إلى 50-65%. اختلفت النتائج مع نتائج Mahajan وآخرون (125,2012) الذي أكد انخفاض محتوى البطاطا المقلية من الأكريلاميد بنسبة 80% عند استخدام إنزيم الأسبارجينااز المنقى المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* بكمية (30وحدة/مل) لمدة 15 دقيقة.

❖ محتوى الأكريلاميد في البطاطا المقرمشة (الشيبس):

يظهر الجدول (23) نتائج تحليل الأكريلاميد في عينات البطاطا المقرمشة (الشيبس) غير المعاملة والمعاملة بالإنزيم المنقى.

الجدول (23) يوضح نتائج تحليل الأكريلاميد في عينات البطاطا المقرمشة (الشيبس).

متوسط محتوى العينة من الأكريلاميد (ميكروغرام /كغ)±الانحراف المعياري	محتوى العينة من الأكريلاميد		العينة
	مكرر 1	مكرر 2	
28.55 ±381.08	401.271	360.897	عينة الشاهد غير المعاملة بالإنزيم
13.72±178.20	187.898	168.496	العينة المعاملة بالإنزيم المنقى

نلاحظ من الجدول (23) أن محتوى الأكريلاميد في عينات البطاطا المقرمشة ضمن المجال الذي أشارت إليه إدارة الغذاء والدواء الأمريكية FDA (326,2002) حيث بينت أن محتوى عينات البطاطا المقرمشة من الأكريلاميد تراوح بين 117 إلى 2762 ميكروغرام /كغ، كما كانت النتائج ضمن المجال الذي أشار إليه Olmez وآخرون (564,2008) الذي أكد أن محتوى الأكريلاميد في عينات البطاطا المقرمشة تراوح بين 59-2336 ميكروغرام/كغ. اختلفت كمية الأكريلاميد في النتائج عن كمية الأكريلاميد التي أشار إليها Muthaiah وآخرون (45,2019) الذي أكد أن محتوى الأكريلاميد في عينات البطاطا المقرمشة كان 2593.35 ميكروغرام/كغ. انخفضت قيمة الأكريلاميد في النتائج عن القيمة التي أشارت إليه JECFA في دراستها على عينات من البطاطا المقلية عام 2006 والتي بينت أن متوسط محتوى تلك العينات من الأكريلاميد بلغ 752 ميكروغرام /كغ، وانخفضت النتائج أيضاً عن النتائج الذي وجدها Ariseto وآخرون (207,2009) في عينات البطاطا المقرمشة والتي كان متوسط محتواها من الأكريلاميد 591 ميكروغرام/كغ. يمكن أن يعود الاختلاف في قيم مستوى الأكريلاميد بين عينات البطاطا المقرمشة المدروسة من قبل الباحثين لنفس السبب الذي يعود له الاختلاف في محتوى عينات البطاطا المقلية إلى عامل أو أكثر كطريقة الزراعة أو موعدها والفترة التخزينية للبطاطا ونوعها ونوع زيت القلي المستخدم وطريقة القلي (Xu et al.,2016,163).

بينت نتائج تحليل محتوى الأكريلاميد إلى انخفاض نسبته بنسبة 46.76% في عينة البطاطا المقرمشة المضاف لها الإنزيم المنقى بكمية (10000وحدة/ليتر) لمدة 20 دقيقة، حيث كان متوسط كمية

الأكريلاميد في العينة غير المعاملة بالإنزيم 381.08 ميكروغرام/كغ لتتخفض إلى 178.20 ميكروغرام/كغ في العينة المعاملة بالإنزيم المنقى. توافقت النتائج مع نتائج Pedreschi وآخرون (386,2008) حيث أكد على انخفاض نسبة الأكريلاميد في المنتج النهائي إلى 45%، بينما اختلفت النتائج عن النتائج التي توصل إليها Onishi وآخرون (783,2015) عند إضافة إنزيم الأسبارجينااز المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* بكمية (40 وحدة/ليتر) حيث انخفضت نسبة الأكريلاميد في منتج البطاطا المقرمشة إلى 80% بينما اختلفت النتائج عن نتائج Maloney (10,2014) حيث انخفضت كمية الأكريلاميد في المنتج النهائي بنسبة 90%.

❖ محتوى الأكريلاميد في الدونات:

يظهر الجدول (24) نتائج تحليل الأكريلاميد في عينات الدونات غير المعاملة والمعاملة بالإنزيم المنقى.

الجدول (24) يوضح نتائج تحليل الأكريلاميد في عينات الدونات.

متوسط محتوى العينة من الأكريلاميد (ميكروغرام /كغ)±الانحراف المعياري	محتوى العينة من الأكريلاميد		العينة
	مكرر 1	مكرر 2	
13.21 ±375.15	384.492	365.805	عينة الشاهد غير المعاملة بالإنزيم
4.86±152.94	149.502	155.374	العينة المعاملة بالإنزيم المنقى

نلاحظ من الجدول (24) أن محتوى الأكريلاميد في عينات الدونات كانت ضمن المجال الذي أشارت إليه JECFA في دراستها على عينات من الدونات عام 2006 والتي بينت أن متوسط محتوى تلك العينات من الأكريلاميد بلغ 10-364 ميكروغرام/كغ. انخفضت كمية الأكريلاميد في العينات عن كمية الأكريلاميد الذي أشار إليها Muthaiah وآخرون (45,2019) في عينات الدونات المقلية حيث كانت 803.79 ميكروغرام/كغ. توافقت نتائج هذه الدراسة ضمن المجال الذي أشار إليه Taeymans وآخرون (323,2004) الذي أكد أن محتوى العينات من الأكريلاميد في عينات الدونات تراوح بين 11-448 ميكروغرام /كغ.

بينت نتائج تحليل محتوى الأكريلاميد إلى انخفاض نسبته بنسبة 40.63% في عينة الدونات المضاف لها الإنزيم المنقى بكمية (500 وحدة/ ليتر) إلى العجينة لمدة 12 دقيقة، حيث كانت متوسط

كمية الأكريلاميد في العينة غير المعاملة بالإنزيم 375.15 ميكروغرام/كغ لتتخفض إلى 152.94 ميكروغرام/كغ في العينة المعاملة بالإنزيم المنقى. اتفقت النتائج مع ماتوصل إليه Kukurová وآخرون (1,2013) عند إضافة إنزيم الأسبارجينااز المنتج من *Aspergillus oryzae* بكمية (500 وحدة/ليتر) حيث انخفضت كمية الأكريلاميد في منتج الدونات والحلويات المقلية بنسبة تراوحت بين 15-75%، كما تقاربت النتائج مع نتائج Ciesarová وآخرون (141,2006) الذي أكد انخفاض الأكريلاميد بنسبة 46% عند إضافة الإنزيم إلى عجينة الدونات بكمية (500 وحدة /ليتر).

يعود انخفاض كمية الأكريلاميد في العينات الغذائية بعد معاملتها بإنزيم الأسبارجينااز إلى قدرة هذا الإنزيم على تفكيك الأسبارجين الموجود فيها حيث أثبت Zyzak وآخرون (4782,2003) أن إضافة إنزيم الأسبارجينااز إلى المواد الغذائية قبل عملية القلي يقلل 90% من كمية الأكريلاميد المتشكلة فيها من خلال قدرة هذا الإنزيم على تفكيك الحمض الأميني الأسبارجين فيحول دون تفاعله مع السكريات المرجعة الموجودة في الغذاء. أكد Xu وآخرون (163,2016) انخفاض محتوى العينات الغذائية من الأكريلاميد بعد معاملتها بإنزيم الأسبارجينااز النقي بسبب قدرة هذا الإنزيم على تفكيك 75% من كمية الأسبارجين الحر .

8. قيمة المسترجع:

كان تركيز الأكريلاميد بالعينة الموسومة (Spike) 2256.640 و 1146.325 و 1072.446 ميكروغرام/كغ وفي الشاهد (blank) 1325.241 و 339.093 و 225.574 ميكروغرام/كغ لكل من البطاطا المقلية والشيبس والدونات على التوالي. طبقت المعادلة المذكورة سابقاً فكانت قيمة الاسترداد 93.139% للبطاطا المقلية و 80.723% للشيبس و 84.687% للدونات وهي نسب جيدة وأعلى من قيمة الاسترداد المتحصل عليها من قبل (Wang et al.,2008,90) والتي كانت 78% حيث اعتمد على استخدام مصيديتي استخلاص (Oasis HLB and Bond Elut-Accucat) وجهاز HPLC-UV للكشف عن الأكريلاميد في بعض الأغذية المقلية في الصين، كما تقاربت هذه النسب مع النسب المذكورة من قبل Muthaiah وآخرون (45,2019) حيث كانت الاسترجاعية بنسبة 101.33% لمختلف منتجات البطاطا المقلية والشيبس بنسبة 94% بالنسبة للدونات.

ثامناً - الاستنتاجات:

- (1) إنتاج الأسبارجينااز بكميات كبيرة من بكتريا (*Bacillus licheniformis*).
- (2) إمكانية الحصول على أعلى إنتاجية إنزيمية للأسبارجينااز من بكتريا *Bacillus licheniformis* عند تطبيق الظروف التالية: درجة حرارة تحضين 30°م، ورقم هيدروجيني 9، وسرعة دوران 150 دورة/دقيقة، وتركيز سكر غلوكوز 1.5%، وتركيز مستخلص خميرة 2.5%.
- (3) إنزيم الأسبارجينااز من الإنزيمات المتحملة للحرارة.
- (4) إنزيم الأسبارجينااز من الإنزيمات المتحملة للقلوية.
- (5) إنزيم الأسبارجينااز من الإنزيمات المتخصصة جداً لركيزة الأسبارجين.
- (6) إنزيم الأسبارجينااز من الإنزيمات المتحملة للتخزين لمدة 6 أشهر دون حدوث انخفاض في نشاطه.
- (7) ازدادت الفعالية الإنزيمية للأسبارجينااز بوجود مركب $MgCl_2$ وشاردة Mg^{+2} بينما انخفضت الفعالية الإنزيمية للأسبارجينااز بوجود مركب EDTA وشوارد (Cu^{+2} ، Hg^{+2} ، Ca^{+2} ، Zn^{+2}).
- (8) بلغ الوزن الجزيئي لبروتين إنزيم الأسبارجينااز باستخدام هلامة SDS-PAGE 34.4 كيلو دالتون بعد إجراء عملية التنقية باستخدام هلامة Sephadex G-100 و هلامة DEAE-sepharose.
- (9) نجاعة قدرة إنزيم الأسبارجينااز في تخفيض كمية الأكريلاميد في الأغذية النشوية المقلية.

تاسعاً - التوصيات:

- (1) الاستمرار بالعمل على بكتريا *Bacillus* للحصول على سلالات ذات إنتاجية أعلى من الإنزيم.
- (2) الاستمرار في تطبيق الإنزيم المنقى على منتجات غذائية ذات محتوى نشوي مرتفع لمعرفة قدرته على تخفيض كمية الأكريلاميد.
- (3) استخدام تقنيات وراثية كعملية التنسيل (Cloning) أو تطهير بكتيريا *Bacillus* للحصول على طفرات موجهة ومحددة وبالتالي تطوير الإنتاج.
- (4) محاولة العمل على إنتاج الإنزيم باستخدام مخلفات زراعية أو صناعية متاحة و رخيصة الثمن.

المراجع العلمية:

أولاً- المراجع العربية:

- الخفاجي، زهرة محمود. (1990). التقنية الحيوية - مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر. جامعة بغداد. ص-ص: 131-132، 699، 702.
- الخياط، غسان حمادة ومحمد، محمد (2000). كيمياء مكونات الأغذية. كلية الزراعة، جامعة دمشق. ص: 123.
- السواح، محمود محمد عوض الله (2002). الأنزيمات الميكروبية. دار النيل للطباعة - الطبعة الأولى - مصر. ص.ص: 35، 75، 78.
- العاني، فاروق ياس. (1992) وراثة الأحياء المجهرية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. دار الحكمة للطباعة والنشر. ص: 37.
- دلالي، باسل كامل. (1983). فهم الأنزيمات. مطابع جامعة الموصل. جامعة الموصل. ص: 349.
- عمر، عادل. (2006). إنتاج أنزيمات الأميلاز من الفطريات وتنقيتها واستعمالها في بعض المجالات التطبيقية. أطروحة دكتوراه في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سوريا. ص: 28.
- محي الدين، محمد عمر. (1998). تنقية وتوصيف إنزيم البروتيناز الحامضي - بديل المنفحة - المنتج من العفن Rhizomucor miehei MO-46 بطريقة تخمرات الحالة الصلبة. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة - جامعة بغداد. ص 37.

ثانياً – المراجع الأجنبية:

- Abdelrazek, N. A., Elkhatab, W. F., Raafat, M. M., and Aboulwafa, M. M. (2019). Experimental and bioinformatics study for production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis*: a promising enzyme for medical application. **AMB Express**, 9(1), 1-16.
- Aghaiypour, K., Wlodawer, A., and Lubkowski, J. (2001). Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, 40(19), 5655-5664.
- Alam, S., Pranaw K., Tiwari, R. (2019). Recent development in the uses of asparaginase as food enzyme. In Parameswaran B (ed.) **Green bio-processes, energy, environment, and sustainability**. Springer, Singapore. (p 56).
- Allison, J. P., Davidson, L., Gutierrez-Hartman, A., and Kitto, G. B. (1972). Insolubilization of L-asparaginase by covalent attachment to nylon tubing. **Biochemistry Biophysical Researches Community**, 47(1), 66-73.
- Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A., and Lingappa, K. (2010). Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. **Brazilian Journal of Microbiol**, 41(1), 173-178.
- Amrein, T. (2005). **Systematic studies on process optimization to minimize acrylamide contents in food**. Ph D thesis. Swiss Federal Institute of Technology. Switzerland. (pp 1, 12, 25).
- Amrein, T. M., Schönbächler, B., Escher, F., and Amadò, R. (2004). Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(13), 4282-4288.
- Arisseto, A. P., Toledo, M. C. F., Govaert, Y., van Loco, J., Fraselle, S., Degroodt, J. M., and Caroba, D. C. R. (2009). Contribution of selected foods to acrylamide intake by a population of Brazilian adolescents. **LWT - Food Science and Technology**, 42, 207–211.
- Ashie, I. N. (2003). Bioprocess Engineering of Enzymes. **Food Technology journal**, 57(1), 44-51.
- Atlas, P. (1998). Bile Esculin Test. In Pierce, B. E (ed.). **Exercises for the microbiology laboratory**. Morton Publishing Company. USA. (pp 80-82).
- Bajaj, B. K., Pangotra, H., Wani, M. A., Sharma, P., and Sharma, A. (2009). Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9. **Indian Journal of Chemical Technology**, 16, 382-387.
- Bansal, S., Gnaneswari, D., Mishra, P., and Kundu, B. (2010). Structural stability and functional analysis of L-Asparaginase from *Pyrococcus furiosus*. **Biochemistry**, 75(3), 375-81.

- Bascomb, S., Banks, G. T., Skarstedt, M. T., Fleming, A., and Bettelheim, K. A. (1975). The properties and large-scale production of L-asparaginase from *Citrobacter*. **J Gen Microbiol**, 91, 1-16.
- Basha, S. N., Rekha, R., Komala, M., and Ruby, S. (2009). Production of extracellular anti-leukemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid state and submerged fermentation, purification and characterization. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 8, 53-60.
- Belma, A., Necde, T., and Yavuz, B. (2002). Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. **Journal biology**, 126, 41-55.
- Berg, H. (2011). Asparaginase revisited. **Leukemia and lymphoma**, 52(2), 168-178.
- Berg, M. J., John, T., and Stryer, L. (2006). **Biochemistry**. (6th edition). W.H. Freeman and Company. New York. (P 303).
- Bergey, W., Aidan, P., Michael, G., Peter, K., Hans, J. B., Martha, E. T., Wolfgang, L., and Ken, S. (2012). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. (5 th edition). Springer. New York. pp 537-580.
- Bjellaas, T., Stølen, L. H., Haugen, M., Paulsen, J. E., Alexander, J., Lundanes, E., and Becher, G. (2007). Urinary acrylamide metabolites as biomarkers for short-term dietary exposure to acrylamide. **Food and Chemical Toxicology**, 45, 1020–1026.
- Boguth, G. N., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, 21, 1037-1053.
- Broome, J. D. (1963). Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **The Journal of Experimental Medicine**, 118 (1), 99–120.
- Bruice, T. C. and Benkovic, S. J. (2000). Chemical basis for enzyme catalysis. **Biochemistry**, 39, 6267-6274.
- Cachumba, J. J., Antunes, F. A., Peres, G. F., Brumano, L. P., Santos, J. C., and Silva, S. S. (2016). Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 47 (1), 77-85.
- Ciesarová, Z., Kiss, E., and Boegl, P. (2006). Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. **Journal of Food and Nutrition Research**, 45(4), 141-146.
- Cluas, A., Chare, R., and Schieber, A. (2008). Acrylamide in cereal products: A review. **Journal of Cereal Science**, 47, 118-133.
- Cummins, E., Butler, F., Gormley, R., and Brunton, N. (2008). A methodology for evaluating the formation and human exposure to acrylamide through fried potato crisps. **Food Science and Technology**, 41, 854–867.
- Davidson, L., Burkom, M., Ahn, S., Chang, L. C., and Kitto, B. (1977). L-Asparaginases from *Citrobacter freundii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 480(1), 282-94.
- De vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N.B., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K., and Whitman, W. B. (2009). **Bergey's manual of systemic bacteriology**. second edition. Volume 3. Firmicutes. Library of congress. (p 420).

- Dhevagi, P., and Poorani, E. (2006). Isolation and characterization of L-asparaginase from marine actinomycetes. **Indian journal of biotechnology**, (5), 514-520.
- Dias, F. F., Ruiz, A. L., Torre, A. D and., Sato, H. H. (2016). Purification, characterization and antiproliferative activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 6 (9), 785-794.
- Distasio, J. A., Salazar, A. M., Nadji, M., and Durden, D. L. (1982). Glutaminase-free asparaginase from *Vibrio succinogenes*: an antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. **International Journal of Cancer**, 30(3), 343-347.
- Dunaway-Mariano, D. (2008). Enzyme function discovery. **Structure**, 16(11), 1599-1600.
- Dunlop, P.C., and Roon, R. J. (1975). L-asparaginase of *Sacharomyces cerevisiae*: An extracellular enzyme. **Journal of Bacteriology**, 122, 1017-102.
- Ebeed, N. and Abou-Taleb, K. (2014). Production of L-asparaginase from some local bacterial strains using agro-industrial residues and evaluation of its anti-tumor activity. **Current Science International**, 3(4), 476-487.
- Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., and Ghasemi. Y. (2011). L-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. **Indian Journal of Microbiol.** 51(3), 307–311.
- El-Bessoumy, A. A., Sarhan, M., and Mansour, J. (2004). Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 37, 387 – 393.
- Eriksson, S. (2005). **Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology**. Ph D. thesis. Department of Environmental Chemistry, Stockholm University. Sweden. (p 11).
- Esbelin, J. (2009). **La protiene et les systems a deux composants ResDE, des regulateurs majeurs de la synthese des enterotoxins de**. PHD thesis .Universite` d`Avignon et des pays de vaushuce. (p 23).
- Farag, A. M., Hassan, S. W., Beltage, E.A., and El-Shenawy, M. A. (2015). Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **Egyptian journal Aquatic Research**, 41(4), 295-302.
- FDA. (2002) . **Survey data on acrylamide in food. Individual food products**. Food Drug Administration. USA.p:312-354.
- Feng, Y., Liu, S., Jiao ,Y., Gao, H., Wang, M., Du, G., and Chen, J. (2017). Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 101(4), 1509-1520.
- Gaffney, B. J. (1996). Lipoxygenase: Structural principles and spectroscopy. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, 25, 431-459.
- Garfin, D. E. (1990). Purification Procedures. electrophoretic methods. In Murray, E. D. and Deutscher, P (Eds.). **Methods in Enzymology**. Vol. 185. Academic Press, New York. (pp 425-441).

- Genton, L., Melzer, K., and Pichard, C. (2010). Energy and macronutrient requirements for physical fitness in exercising subjects. **Clinical Nutrition**, 29 (4), 413–423.
- Godfrey, T., and West. S. I. (1996). Introduction to industrial enzymology. In Godfrey, T., West. S. I. (Eds.). **Industrial enzymology**. Second edition. London, Macmillan Press, (pp 1-8).
- Han, S., Jung, J., and Park, W. (2014). Biochemical characterization of l-asparaginase in NaCl-tolerant *Staphylococcus* sp. OJ82 isolated from fermented seafood. **J Microbiology Biotechnology**, 24(8),1096–1104.
- Hatamzadeh, S., Rahnama, K., Nasrollahnejad, S., Fotouhifar, K. B., Hemmati, K. H., White, J. F and Taliei, F. (2020). Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from the Asteraceae family plant species of Iran. **Peer J**, 8(5), 8309-8321.
- Health Protection Agency. (2007). Identification of *Bacillus* species. **National Standard Method** BSOP ID9 Issue 2.1.
- Hendriksen, H. V., Kornbrust, B. A., Ostergaard, P. R., and Stringer, M. A. (2009). Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(10), 4168-4176.
- Huang, C. C. J., Li, C. M., Wu, C. F., Jao, S. P., and Wu, K. Y. (2007). Analysis of urinary N-acetyl-S-(propionamide)-cysteine as a biomarker for the assessment of acrylamide exposure in smokers. **Environmental research**, 104(3), 346-351.
- Huang, L., Liu, Y., Sun, Y., Yan, Q., and Jiang, Z. (2014). Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and Its application in food safety and leukemia treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, 80(5), 1561-1569.
- Husain, I., Sharma, A., Kumar, S., and Malik, F. (2016). Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparaginase from *Enterobacter cloacae*: In-Vitro Evaluation of Cytotoxic Potential against Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. **PLOS ONE**, 11(2).
- Hymavathi, M., Sathish, T., Subbah, C. H. R., and Prakasham, R. S.(2008). Enhancement of L-aspraginase production by isolated *Bacillus circulans* MTCC8574 using response surface methodology. **Application Biochemistry Biotechnology**, 159(1), 8-191.
- IARC. (1994). **Monographs on the evaluation of carcinogen risk to Humans: Some industrial chemicals**. International Agency for Research on Cancer. 60: 389–433.
- JECFA. (2006). Evaluation of certain food contaminants. **Sixtyfourth report of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Geneva.p:452-478.
- Jia, M., Xu, M., He, B., and Rao, Z . (2013). Cloning, expression , and characterization of L-asparaginase from newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. American Chemical Society Publication. 61(39), 9428-9434.
- Jimat, D. N., Jamal, P., Azmi, A. (2017). Purification and partial characterization of L-asparaginase enzyme produced by newly isolated *Bacillus* Sp. **International Islamic University Malaysia Engineering Journal**, 18(2), 1-10.

- Joo, G. J. and Rhee, I. K. (1997). Production of glucose isomerase from xy/b mutant *Streptomyces chibensis* J- 59. **Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, 25 (1), 75-81.
- Kavitha, and Vijayalakshmi. (2010). Optimization and purification of L-asparaginase produced by *Streptomyces tendae* TK-VL_333. **Naturforsch**, 65, 528 – 531.
- Khamna, S., Yokota, A., and Lumyong ,S. (2009). L-Asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. **International Journal of Integrative Biology**, 6(1), 22 – 26.
- Kornberg, A. (1990). Why purify enzymes. In Deutscher, M. P. (ed.). **Methods in Enzymology** Vol. 182. Academic press. New York. (pp 1-5).
- Kotzia, G. A., and Labrou, N. E. (2007). L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. **Journal of Biotechnology**, 127, 657-669.
- Kukurová, K., Morales, F. J., Bednářiková, A., and Ciesarová, Z. (2009). Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. **Molecular Nutrition and Food Research**, 53(12), 1532-1539.
- Kukurová, K., Ciesarová, Z., Mogol, B .A., Açar, O. C., and Gökmen, V. (2013). Raising agents strongly influence acrylamide and HMF formation in cookies and conditions for asparaginase activity in dough. **European Food Research and Technology**, 237(1), 1-8.
- Kumar, D., and Sobha, K. (2012). L-Asparaginase from microbes: a comprehensive review. **Advances in Bioresarch**, 3(4), 137–157.
- Kumar, N. S. M., Shimray, C. A., Indrani, D., and Manonmani, H. K. (2014). Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-asparaginase treatment. **Food and Bioprocess Technology**, 7(3),741-748.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685.
- Lide, D. R. (2006). **CRC Handbook of Chemistry and Physics** (87th ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. (p 226).
- Lobanok, A. G., Sapunova, L. I., Dikhtievski, Y. O., and Kazakevich, I. O. (1998). Screening of glucose isomerase-producing microor-ganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 14, 259-262.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 193, 265-275.
- Lubkowski, J., Wlodawer, A., Housset, D., Weber, I. T., Ammon, H. L., Murphy, K. C., and Swain, A. L. (1994). Refined crystal structure of *Acinetobacter glutaminasificans* glutaminase-asparaginase. **Acta Crystallogr Section D Biology Crystallogr**, 50(6), 826-32.
- Mahajan, R. V., Mihooliya, K., Saurabh, S. S., and Saxena, R. (2012). L-asparaginase from *Bacillus* SP. RKS-20: process optimization and application in the inhibition of acrylamide formation in fried foods . **Journal of proteins and proteomics**, 5(2), 125-132.
- Mahajan, R.V., Saran, S., Kameswaran, K., Kumar, V., and Saxena, R. K. (2014). Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase

- activity: optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresources Technology**, 125(1),11-16.
- Maheshwari, R., Bhardawaj, G., and Bhat, M. (2000). Thermophilic Fungi: Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64(3), 461-488.
- Maloney, k . (2014). **Use of asparaginase to mitigate acrylamide formation in food**. PhD thesis,6-14
- Manna, S., Sinha, A., Sadhukan, R., and Chakrabarty, S. L. (1995). Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. **Current Microbiology**, 30, 291-298.
- Meng, M., Bagdasarian, M., and Zeikus, J. G. (1993). The role of active-site aromatic and polar residues in catalysis and substrate discrimination by xylose isomerase. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, (90), 8459–8463.
- Mestdagh, F., Maertens, J., Cucu, T., Delporte, K., Van Peteghem, C., and De Meulenaer, B. (2008). Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. **Food Chemistry**, (107), 26–31.
- Mohamed, S., Elshal, M., Kumosani, T and Aldahlaw, A. (2015). Purification and characterization of asparaginase from *Phaseolus vulgaris* Seeds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. doi 309214.
- Moorthy, V., Aishwarya, R., Alagarsamy, S., and Rajesh, T. (2010). Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. **African Journal of Microbiology Research**, 4(18), 1862-1867.
- Morten, M., and Richard, P. D. (2000). Thermal stability and activities of soil enzymes as influenced by crop rotations. **Soil Biology and Biochemistry**, 27(9):1161-1166.
- Morton, R.(1950). Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles. *Nature*.(166): 1092-1095.
- Moss, G. P. (2006). Recommendations of the Nomenclature Committee. International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyze.,45-56.
- Mukherjee, J., Majumdar, S., and Scheper, T. (2000). Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, (53), 180-184.
- Mustafa, A. (2008). **Acrylamide in Bread Precursors, Formation and Reduction**. Ph D. thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. (pp 1-2).
- Muthaiah, P. M., Semwal, A. D., Sharma, G. K and Govindaswamy, A. (2019). HPLC-UV quantitative analysis of acrylamide in snack foods of India. **DRDO-Defence Food Research Laboratory**, 4(1), 45-54.
- Muthuvelayudham, R. and Viruthagiri, T. (2010). Application of central composite design based response surface methodology in parameter optimization and on cellulase production using agricultural waste. **International Journal of Chemical and Biological Engineering**, 3(1), 97-104.

- Narayana, K. J. P., Kumar, K. G., and Vijayalakshmi, M. (2008). L-Asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. **Indian Journal of Microbiology**, 48(3), 331 – 336.
- Nawaz, M. S., Zhang, D., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E. (1998). Isolation and characterization of *Enterobacter cloacae* capable of metabolizing asparagine. **Application of Microbiol of Biotechnology**, (50), 568-572.
- Nomenclature International Union of Biochemistry and Molecular Biology. IUBMB, (2017).86-94.
- Olmez, H ., Tuncay, F., .zcan, N., and Demirel, S. (2008). Asurvey of acrylamide levels in foods from the Turkish market. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 564– 568.
- Onishi, Y., Prihanto, A. A., Yano, S., Takagi, K., Umekawa, M., and Wakayama, M. (2015). Effective treatment for suppression of acrylamide formation in fried potato chips using L-asparaginase from *Bacillus subtilis*. **Biotechnology**, 5(5), 783-789.
- Pabby, A. K., Rizvi, S. S., and Sastre, A. M. (2007). **Handbook of membrane separations : chemical, pharmaceutical, and biotechnological applications**. Boca Raton. CRC Press. (pp 105, 132, 507).
- Pandey, A. (2004). Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, (47), 309–317.
- Patil, R. C., and Jadhav, B. L. (2017). Screening and Optimization of L-Asparaginase Production From *Bacillus* Species. **IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry**, (3) 3, 32-36.
- Pattnaik, S., Kabi, R., Janaki Ram, K., and Bhanot, K. K. (2000). L-asparaginase activity in *Aeromonas* sp. isolated from freshwater mussel. **Indian Journal Experimental Biology**, (38), 1143-1146.
- Pedreschi, F., Mariotti, S., Granby, K., and Risum, J. (2011). Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. **LWT-Food Science and Technology**, 44(6), 1473-1476.
- Pedreschi, F., Kaack, K., and Granby, K. (2008). The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. **Food Chemistry**, 109(2), 386-392.
- Peng, L., Farkas, T., Loo, L., Teuscher, J., and Kallury, K. (2003). Rapid and reproducible extraction of acrylamide in French Fries using a single solid-phase sorbent. **American laboratory (Fairfield)**, 35(21), 10-14.
- Peterson , R. E., and Ciegler, A. (1969). L-Asparaginase production by various bacteria. **Applied Microbiology**, 17(6), 929 – 930.
- Pieters, R., Hunger, S. P., Boos, J., Rizzari, C., Silverman, L., Baruchel, A., Goekbuget, N., Schrappe, M., and Pui, C. H. (2011). L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. **Cancer**, 117(2), 238-249.
- Pradhan, B., Sashi, K. D., and Sabuj, S. (2013). Screening and characterization of extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 3(12), 36-41.
- Prakasham, R. S., Hymavathi, M., Subba, R. C., Arepalli, S.K ., Venkateswara, R. J., Kavin, K. P., Nasaruddin, K., Vijayakumar, J. B., and Sarma, P. N. (2010). Evaluation of

- antineoplastic activity of extracellular asparaginase produced by isolated *Bacillus circulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 160(1), 72-80.
- Purves, W. K., Sadava, D.O., and Gordon, H. (2004). **life: The science of biology** (7th edn). Macmillan Publishers. New York. pp. 139–140.
- Qeshmi, F. I., Rahimzadeh, M., Javadpour, S., and Poodat, M. (2015). Intracellular L-Asparaginase from *Bacillus* sp. PG02: Purification, Biochemical Characterization and Evaluation of Optimum pH and Temperature. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 1(12), 12-19
- Ramya, L. N., Doble, M., Rekha, V. P. B., and Pulicherla, K. K. (2012). L-asparaginase as potent antileukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Applied Biochemistry Biotechnology**, (167), 2144-2159.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G., and Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106 (6), 1760–1765.
- Raymond, F.G.; Thomas, C.; and John, F.A. (2006). **The RNA World: The Nature of Modern RNA Suggests a Prebiotic RNA World**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. (p 273).
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, 59, 1-41.
- Rosén, J., and Hellenäs, K. E. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analyst**, 127(7), 880-882.
- Roth, G., Nunes, J. E. S., Rosado, L. A., Bizarro, C. V., Volpato, G., Nunes, C. P., Renard, G., Basso, L. A., Santos, D. S., and Chies, J. M. (2013). Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. **Brazilian Journal Chemistry Engineer**. 2(30), 245-256.
- Ruangpan, L., and Tendencia, E. A. (2004). Bacterial isolation, identification and storage. In Ruangpan, L., and Tendencia, E. A. (Eds.). **Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment**. (pp 3–11).
- Salehi, Z., Sohrabi, M., Kaghazchi, T., and Bonakdarpour, B. (2004). Application of down flow jet loop bioreactors in implementation and kinetic determination of solid-liquid enzyme reactions. **Process Biochemistry**, 40 (7), 2455-2460.
- Shieh, C. J., Phan, T. L. A.; and Shih, I. L. (2009). Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. **Biochemical Engineering Journal**, 43, 85-91.
- Silpa, S., Bhattacharya, S., and Venkatanagaraju, E. (2017). Overview on L-asparaginase. **World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, 6(5), 561-601.
- Srivastava, P., Shukla, S.; Choubey, S.K.; and Gomase, V.S. (2010). Isolation, purification, characterization of glucose isomerase enzyme form *Streptomyces* species isolated from Parbhani Region. **Journal of Enzymes Research**, 1(1),1-10.
- Stanbury, P., Whitaker, A., and Hall, S. (1997). **Principles of Fermentation Technology** (Second edition). Aditya books Private Limited, New Delhi, India . pp 93–105.

- Stecher, A. L., De Deus, P. M., Polikarpov, I., and Abrahao-Neto, J. (1999). Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. **Pharmaceutica acta helvetiae**, 74(1), 1-9.
- Stern, M. L., Phillips, A.W., and Gottlieb, A. J. (1976). Physical properties of L-asparaginase from *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, 125(2), 719-727.
- Sudhir, A. P., Dave, B. R., Prajapati, A. S., Panchal, K., Patel, D., and Subramanian, R. B. (2014). Characterization of a recombinant glutaminase-free L-asparaginase (ansA3) enzyme with high catalytic activity from *Bacillus licheniformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 174(7), 2504-2515.
- Swain, A. L., Jaskolski, M., Housset, D., Rao, J., and Wlodawer, A. (1993). Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90(4), 1474-1478.
- Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R. H., Gondé, P., Van Eijck, P., Lalljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Müller, D., Tallmange, D., brien, J., Thompson, S., Silvani, D., and Whitmore, T. (2004). A Review of Acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation, and Control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44, 323-347.
- Tateo, F., Bononi, M., and Andreoli, G. (2007). Acrylamide levels in cooked rice, tomato sauces and some fast food on the Italian market. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20, 232-235.
- Thakur, M., Lincoln, L., Niyonzima, F. N., and More, S. S. (2014). Isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from *Mucor hiemalis*. **J Biocatal Biotransform**, 2, 12-14.
- Thenmozhi, C., Sankar, R., Karuppiah, V., and Sampathkumar, P. (2011). L-asparaginase production by mangrove derived *Bacillus cereus* MAB5. optimization by response surface methodology. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 4(6), 486-491.
- Tiul, E. S., Ermenko, V. V., and Mardashev, S. R. (1972). Activity and Properties of L-asparaginase from *Bacillus mesentericus* 43A. **Microbiologia**, (41), 423-429.
- Tuncel, N. B., Yilmaz, N., and Şener, E. (2010). The effect of pea (*Pisum sativum* L.) originated asparaginase on acrylamide formation in certain bread types. **International Journal of Food Science and Technology**, 45(12), 2470-2476.
- Uzma, F., Narasimha, M.K., and Srinivas, C. (2016). Optimization of physiological conditions for L-asparaginase production by endophytic fungi (*Fusarium solani*) isolated from *Tinospora cordifolia* (Willd.). **European Journal of Experimental Biology**, 6(3), 37-45.
- Verma, N., Kumar, K., Kaur, G., and Anand, S. (2007) .L-asparaginase:a promising chemotherapeutic agent. **Journal of Critical Reviews in Biotechnology**, 27 (1), 45-62.
- Volesky, B., and Laong, I. (1985). Microbial enzymes production, purification and isolation. **Critical reviews in Biotechnology**, (2), 119-146.
- Wang, H., Lee, A.W. M., Shuang, S., and Choi, M. M. F. (2008).SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. **Microchemical Journal**, 89, 90-97.

- Whitecar, J. P., Bodey, G. P., Harris, J. E., and Freireich, E. J. (1970) L-asparaginase. **New England Journal of Medecine**, 282(13),732–734.
- Xu, F., Oruna-Concha, M. J., and Elmore, J. S. (2016). The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. **Food chemistry**, 210, 163-171.
- Yun, M. K., Nourse, A., White, SW., Rock, C. O., and Heath, R. J. (2007). Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic Escherichia coli L-asparaginase I. **Journal of Molecular Biology**, 369(3), 794-811.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., and Olsson, L., (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, (56), 17-34.
- Zhang, Y. P., Hong, J., and Ye, X. (2009). Cellulase assays. In Mielenz, J. R. (Ed.) **Biofuels Methods And Protocols**. Springer. New York. (pp 213-231).
- Zödl, B., Schmid, D., Wassler, G., Gundacker, C., Leibetseder, V., Thalhammer, T., and Ekmekcioglu, C. (2007). Intestinal transport and metabolism of acrylamide. **Toxicology**, 232(1-2), 99–108.
- Zoia, L., Orlandi, M., and Argyropoulos, D. S. (2008). Microwave-assisted lignin isolation using the enzymatic mild acidolysis (EMAL) protocol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56 (10),101-115-122.
- Zyzak, D.V., Sanders, R. A., and Stojanovic, M. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 51(16), 4782–4787.

ABSTRACT

Twenty three isolates of *Bacillus spp* were obtained from the National Commission for Biotechnology (NCBT), they were classified to the genus level, they were isolated from different local soils. Isolates were grown on M9 solid medium supplied with phenol red indicator, they were screened for their production of asparaginase. Liquid media were used to determine asparaginase activity. Enzymatic activity was measured by colorimetric method using Nessler's reagent spectrophotometrically at a wave length of 450 nm. The most efficient isolate number 3 was selected and its species was classified according to Bergey's manual of classification in terms of morphological and biological characteristics. The isolate (3) was found to be *Bacillus licheniformis*.

The conditions for producing asparaginase enzyme from *Bacillus licheniformis* were optimized using Asparagine as substrate in submerged fermentation by using the statistical program Minitab and the statistical design Response Surface Methodology (RSM) were applied. The highest enzyme activity was obtained at an incubation temperature of 30°C, pH value of 9, aeration 150 rpm per minute, carbon source concentration (glucose) of 1.5% and nitrogen source concentration (yeast extract) of 2.5%. Enzyme activity obtained under the above mentioned conditions was 1481.92 U/ml.

Purification steps of enzyme started by precipitation with 80% acetone, then separation by column chromatography using Sephadex G-100 and Sephacryl DEAE-sepharose. The molecular weight was 34.4 kDa determined using SDS PAGE.

The effects of temperature, pH, substrate concentration (asparagine), and some metallic ions (Cu^{+2} , Na^{+} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ag^{+} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2}) on purified asparaginase were determined. The enzyme was produced by submerged fermentation of *Bacillus licheniformis* isolated from local soils. Maximum enzyme activity was found at pH 9, temperature 60°C and 1 mole/ml of asparagine as a substrate. The enzyme remained stable at pH 8-9 and temperature at 30-60°C for 60 minutes. Asparaginase was activated by (Na^{+} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ag^{+} , Co^{+2} , Fe^{+3}) ions at a concentration of 1mM/ml while other ions such as (Zn^{+2} , Hg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2}) reduced asparaginase activity at a concentration of 1mM/ml. The highest enzyme activity was observed with MgCl_2 at a concentration of 1mM/ml, while EDTA at a concentration of 0.8mM/ml reduced the activity of the enzyme.

The efficacy of purified asparaginase produced by *Bacillus licheniformis* in reducing the amount of acrylamide formed by Maillard reaction was tested in the frying of some food products including potatoes, chips, and donuts. The amount of acrylamide formed after

frying was measured in the enzymatically treated samples and compared with those in the control (untreated samples). The results showed a reduction in the amount of acrylamide formed in the treated samples by 50.17%, 46.76%, and 40.63% in fried potatoes, chips and donuts, respectively, compared to the untreated control samples.

Key words: Identification- *Bacillus licheniformis*- asparagine –asparaginase -enzyme activity- optimum conditions -submerged fermentation- purification- molecular weight- enzyme stability-acrylamide- millard reaction.

Syrian Arab Republic
Damascus University
College of Agriculture
Department of Food Science



Asparaginase production by *Bacillus* spp and its application in reducing acrylamide formation in fried food

A THESIS

Submitted in partial fulfillment of the requirements for the
Ph. D. degree in Food Science Section

Prepared by

Vivian Ramzi Daifallah
(National Commission for Biotechnology)

Supervision

Supervisor
Dr. Sabah Yazajy
Prof. Of Food Science
Faculty of Agriculture
Damascus University

Co-Supervisor
Dr. Lina Al-Amir
Assistant prof. in
National Commission for
Biotechnology –Damascus

2021