تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم سايتوسين دي امينيز من البكتريا *Esherichia coli*

*** صفاء عبد لطيف المعيني ، عائشة مهنا محمد ، اسماعيل ياسين ،انوار حسني**
*** معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية**
قسم الكيمياء ،كلية التربية ابن الهيثم جامعة بغداد

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتوصيف بكتريا *Esherichia coli* من المرضى المصابين بالاسهال لغرض تحديد قابلية هذه العزلات على انتاج انزيم السايتوسين دي امينيز .

اظهرت ثماني عزلات من بكتريا *E. coli* تبايناً في قابليتها على انتاج انزيم السايتوسين دي امينيز وكانت العزلة *E. coli* E33 الاكفأ في انتاجها للانزيم اذ بلغت قيمة الفعالية النوعية للانزيم ،(4.920 وحدة/ ملغرام بروتين) عند تنميتها على الوسط الحاوي على 1% كليسرول و 3% ببتون مصدر كاربوني ونايتروجيني على التوالي وعند رقم هيدروجيني الامثل 8 .

درست الظروف المزرعية المثلى لانتاج انزيم السايتوسين دي امينيز من العزلة E. coli E33 . اظهرت النتائج بأن العزلة اعطت أعلى انتاج للانزيم ،اذ بلغت قيمة الفعالية النوعية (5.28 وحدة/ملغرام بروتين) عند تنميتها في الوسط الحاوي على الكلوكوز 1% ،وببتون 3% ،وخلاصة الخميرة بتركيز 0.2 % ، وبرقم هيدروجيني 8 وعند حضنها بدرجة حرارة 37 م مدة 24 ساعة .

المقدمة

استعملت المشتقات او المشابهات المصنعة للقواعد النتروجينية او النيوكليوسيدات أو النيوكليوتيدات بصورة واسعة في العلوم الطبية .ففي الماضي اعتمدت معظم هذهِ الاستعمالات على حقيقة دور النيوكليوتيدات لأنها أحد مكونات الاحماض النووية ، وبذلك تحتاج الى المصادر الأولية من نيوكليوتيد البيورين والبريمدين التي يجب توافرها بصورة مستمرة (1) . ثم استعملت مشتقات او مشابهات حدث فيها تحوير او تبديل في الحلقة غير المتجانسة للقاعدة النتروجينية او للسكر لغرض الحصول على تثبيط لنمو الخلايا ، بحيث تعمل على حث تأثيرات سمية عند أندماج هذهِ المشابهات في المكونات الخلوية المختلفة . وان العديد من هذهِ التاثيرات هي نتيجة لتثبيط من هذهِ المشابهات أو الأدوية على فعاليات أنزيمية ضرورية لبناء الحامض النووي أو نتيجة لأندماج المركبات الوسطية للدواء في الاحماض النووية بحيث تؤدي الى اختلاف في تسلسل وأزدواج النيوكليوتيدات الضرورية لنقل المعلومات الوراثية بصورة صحيحة.

اشتركت جميع انواع الخلايا بعملية مركزية هي التكوين والبناء الحيوي (Biosynthesis) للنيوكليوتيدات الرايبوزية والنيوكلوكسي رايبوزية ، وذلك لأن هذه الجزيئات هي المصدر المباشر للأحماض النووية ، وتعد من الأمور المهمة أيضاً في عملية تكوين قواعدها البيورينية والبريمدينية .ومن هذه الانزيمات انزيم السايتوسين دي أمينيز ، الذي يحفز أزالة مجموعة الأمين من السايتوسين محولاً إياه الى اليوراسيل والأمونيا ، ويوجد هذا الانزيم في البكتريا

والفطريات الذي له دور رئيس في مسار تعويض البريميدين ولكنها غير موجودة في خلايا الثديات (2)، وتكمن اهمية انزيم السايتوسين دي أمينيز في العلاج الجيني لبعض انواع الأورام السرطانية ، وذلك من خلال ازالة مجموعة الأمين من 5- فلورو سايتوسين (5-Fluorocytosine) وتحويلها الى 5- فلورو يوراسيل (5-Fluorouracil) التي هي المادة الفعالة المضادة للسرطان (4;3)، اختيرت البكتريا *E.coli* في انتاج هذا الانزيم لأنها من الاحياء المجهرية المنتشرة بشكل واسع مما يسهل عملية الحصول عليها ، ولانحتاج الى اوساط غذائية معقدة مما يسهل عملية تنميتها ، كما ان لها القابلية على ان تنمو بشكل كثيف ، علماً ان هناك العديد من الدراسات حول هذا الانزيم في مختلف الكائنات الحية نظراً لاهمية الانزيم في معالجة الاورام السرطانية .

طرائق العمل

اولاً : عزل بكتريا *E.coli* وتشخيصها

عزلت وشخصت بكتريا *E.coli* من المرضى المصابين بالاسهال بعمر 2 – 4 سنة وشخصت على وفق المراجع المعتمدة بالطرائق التي استعملت من قبل (5 ، 6)

ثانياً: اختبار قابلية عزلات *E.coli* على انتاج أنزيم سايتوسين دي أمينيز

اعتمدت الطرائق التي وصفت من (7 ، 8 ، 9)

1. التنشيط وانتاج اللقاح

استعمل وسط التنشيط وانتاج اللقاح اذابة (من 3% ببتون ، 1% كليسرول ، 1% فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ، 0.6%مستخلص الخميرة ، 0.3% كلوريد الصوديوم ، 0.01% كلوريد المغنسيوم) ، في 25 مليلتر من الماء المقطر في دورق سعة 250 مليلتر ، عدل الرقم الهيدروجيني الى 8 بوساطة محلول NaOH (0.1 عياري) ، ثم عقم في المؤصدة بدرجة 121 مْ مدة 15 دقيقة. لقح الوسط بعزلات بكتريا *E.coli* بوساطة ناقل العروة (Loop) التي يراد اختبار كل عزلة على حده وحضن بحاضنة هزازة بسرعة 200 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة .

2. انتاج الكتلة الحيوية

لقح 100 مليلتر من وسط التنشيط وانتاج اللقاح المحضر بنسبة 10% من اللقاح المحضر في الفقرة(اعلاه) لكل عزلة من بكتريا *E.coli* التي يراد اختبارها لانتاج انزيم سايتوسين دي امينيز وعدل الرقم الهيدروجيني الى 8 بوساطة محلول NaOH (0.1 عياري) ، وحضن بحاضنة هزازة بسرعة 200 دورة/دقيقة ودرجة 37مْ مدة 24 ساعة . نبذُت الخلايا البكتيرية النامية بالمنبذة بسرعة 9000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة بدرجة 4مْ اهمل الراشح وغسلت الخلايا المترسبة مرتين بالمحلول الفسيولوجي (0.15 M NaCl , pH=8) .

3. تكسير الخلايا بالامواج فوق الصوتية

أخذ راسب الخلايا البكتيرية بعد عملية الغسل وعلق الراسب بمحلول دارىء الفوسفت 0.05 مولاري ذي رقم هيدروجيني 8 بنسبة (0.3 مليلتر من المحلول لكل 1 غرام خلايا رطبة) ، استعمل المازج (Vortex) لتعليق الخلايا وتهيئتها لعملية التكسير.

اذ استخدم جهاز الموجات فوق الصوتية (Ultra Sonic disintegrater) للكسر وشغل الجهاز بطاقته القصوى بتسليط 19.5 ذبذبة /ثانية مدة 30 ثانية في حمام ثلجي بدرجة 4 مْ ، لتكسير الخلايا، إذ نقل عالق الخلايا الى قنينة صغيرة وضعت في وعاء حاو على قطع ثلج وغمر بمجس الامواج فوق الصوتية بعد غسله وتعقيمه بالكحول و ترك

مدة ليجف و غمر هذا المجس الى عمق مناسب داخل الوعاء الحاوي على عالق الخلايا المهيئة كررت هذه العملية ثماني مرات مع اوقات توقف مدة دقيقة الى دقيقتين لتلافي ارتفا ع درجة حرارة المزيج على 4مْ وكذلك ارتفا ع درجة حرارة المجس المستخدم للتكسير (9 ، 7) ، ثم اخذت قطرة من عالق الخلايا وفحصت مجهرياً للتثبت من التكسير الكلي للخلايا البكتيرية . نُبذ بالمنبذة بسرعة (9000 دورة/دقيقة) مدة 15 دقيقة بدرجة 4مْ لغرض الحصول على المستخلص الخام ،اجريت عليه اختبارات قياس فعالية انزيم السايتوسين دي أمينيز .

4. قياس فعالية انزيم السايتوسين دي أمينيز

قدرت فعالية انزيم سايتوسين دي أمينيز بالنظام نفسه الذي تم فيه قياس الفعالية من قبل (8 ، 27) ، وعلى وفق المعادلة الاتية :-

$$\text{الفعالية الانزيمية(وحدة/مليلتر)} = \frac{\text{الحجم الكلي لوسط التفاعل}}{0.4 \times 1 \times 8.223} \times \text{ميل}$$

اذ ان :

1 : مسار الضوء (سم) .

8.223 : معامل الحيود المولاري للسايتوسين mM-1.CM-1.

0.4 : حجم محلول الانزيم المضاف (مليلتر) .

وحدة الفعالية : هي كمية السايتوسين المزال منه الامين بالمايكرومول خلال دقيقة ولكل ملغرام بروتين (8) .

ثانياً: تحديد الظروف المثلى للبكتريا *E.coli* لأنتاج انزيم السايتوسين دي أمينيز

بعد تحديد العزلة الاكفأ في انتاج انزيم السايتوسين دي أمينيز تم تحديد الظروف التغذوية والفيزيائية المثلى في انتاج هذا الانزيم .

1. تحديد مصدر الكاربون الامثل لانتاج انزيم السايتوسين دي أمينيز

حضر 100 مليلتر من وسط انتاج الكتلة الحيوية ، واستبدل المصدر الكاربوني الكليسرول بمصادر كاربونيه وكلاً على حدة (كلوكوز 0.98% ، سكروز 0.93% ، نشأ0.88% ، سترات الصوديوم 34% ، سكسنات الصوديوم 1.6% ،فورمات الصوديوم 1.12% ،ترترات الصوديوم 1.88% ،اوكزالات الصوديوم 2.18%) ، (ومعاملة السيطرة بدون أي مصدر كاربوني) وعدل الرقم الهيدروجيني الى (8) تم التعقيم في المؤصدة بدرجة 121مْ مدة 15 دقيقة اما السكريات فتم تعقيمها باستعمال المرشحات . لقحت الاوساط باللقاح المحضر بنسبة 10% وحضن بدرجة 37مْ في حاضنة هزازة 200 دورة/دقيقة مدة 24 ساعة بعد انتهاء مدة الحضن ، نُبذت الاوساط كلاًعلى حدة بسرعة 9000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة بدرجة 4مْ بعد ذلك اجريت بقية الخطوات المذكورة في طرائق العمل .

2.تحديد مصدر النايتروجين الامثل لانتاج انزيم السايتوسين دي أمينيز

حضر 100 مليلتر من وسط انتاج الكتلة الحيوية، مع اعتماد الكلوكوز 1% أفضل مصددر كاربوني واستبدل المصدر النايتروجيني بمصادر نايتروجينية اخرى كلاً على حدة هي الببتون 3% و 1% ، مستخلص اللحم 3% و1% ، مستخلص الخميرة 1% ، يوريا 1% ، ومصادر اخرى غير عضوية هي حامض الاسبارتك 1% ، سترات الامونيوم $(NH_4)_3$-Citrate 1% ،كبريتات الامونيوم $(NH_4)_3SO_4$ 1% وكلوريد الامونيوم NH_4Cl 1% ، معاملة سيطرة من دون أي مصدر نايتروجيني وكانت نسبة مستخلص الخميرة المضافة في الوسط هي 0.2% بدل من 0.6% في الوسط المحضر في الفقرة(ثانيا 2). وعدل الرقم الهيدروجيني الى 8 وعقم بالمؤصدة بدرجة 121مْ مدة 15 دقيقة . لقحت الاوساط باللقاح المحضر بنسبة 10% وحضن بدرجة 37مْ في حاضنة هزازة 200 دورة/دقيقة مدة 24 ساعة بعد

انتهاء مدة الحضن ، نبذت الاوساط على حدة بسرعة 9000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة بدرجة 4مْ بعد ذلك تم اجراء الخطوات المذكورة في الفقرات (تكسير الخلايا بالامواج فوق الصوتية) ، و(قياس الفعالية الانزيمية) ،(تقدير البروتين الكلي).

3.تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج انزيم السايتوسين دي أمينيز

حُضر 100 مليلتر من وسط انتاج الكتلة الحيوية ، اذ اعتمد الكلوكوز 1% أفضل مصدر كاربوني والببتون 3% ومستخلص الخميرة 0.2% أفضل مصدر نايتروجيني وبأرقام هايدروجينية تراوحت بين(5.5 – 9.5) بفارق نصف درجة من وسط الى أخر لتحديد الرقم الهيدروجيني الافضل لأنتاج الانزيم ،عقمت الاوساط بالمؤصدة بدرجة 121 مْ مدة 15 دقيقة ، لقحت الاوساط باللقاح المحضر بنسبة 10% وحضن بدرجة 37مْ في حاضنة هزازة 200 دورة/دقيقة مدة 24 ساعة بعد انتهاء مدة الحضن ، نبذت الاوساط كلاً على حدة بسرعة 9000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة بدرجة 4مْ بعد ذلك اجريت بقية الخطوات المذكورة في طرائق العمل .

4.تحديد الحرارة المثلى لانتاج انزيم السايتوسين دي أمينيز

حضر 100 مليلتر من وسط انتاج الكتلة الحيوية ، مع اعتماد الكلوكوز 1% وببتون 3% مصدر كاربوني، ومستخلص الخميرة 0.2% مصدر نايتروجيني ،وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 1% كلوريد الصوديوم 0.3% وكلوريد المغنسيوم 0.01% واعتمدا الرقم الهيدروجيني الافضل وهو (8) (اعتماداً على النتائج التي ظهرت خلال التجارب السابقة) وعُقمت الاوساط بالمؤصدة بدرجة 121 مْ وضغط 15 باوند لكل انج مربع مدة 15 دقيقة لقحت الاوساط باللقاح المحضر بنسبة 10% وحضن في حاضنة هزازة 200 دورة/دقيقة مدة 24 ساعة بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين(30–50)مْ بفارق 5 درجات حرارية مئوية من وسط لاخر بعد انتهاء مدة الحضن نُبذت الاوساط كلاً على حدة بسرعة 9000 دورة/دقيقة بدرجة 4مْ مدة 15 دقيقة ، و اجريت بقية الخطوات المذكورة في طرائق العمل .

ثالثاً: تقدير كمية البروتين الكلي Estimation of Total Protein

استعملت الطريقة الموصوفة من لاوري وجماعته (Lowry et al.,1951) لتقدير كمية البروتين في محلول الانزيم المستخلص من بكتريا *E.coli* .

النتائج والمناقشة

اولاً: عزل *E. coli* وتشخيصها

شخصت عشر عزلات من بكتريا E.coli من مجموع 25 عينة مجموعة من الاطفال المصابين بمرض الاسهال . باعتماد الصفات المزرعية والمظهرية والبايوكيميائية اذ كانت جميع العزلات سالبة لملون كرام وعصوية الشكل ومستعمراتها وردية على وسط ماكونكي وقدرتها على تخمير سكراللاكتوز وذي بريق معدني لماع (Metallic Sheen) على وسط اكار أيوسين مثيل الازرق (EMB) .

ثانياً: تعيين الظروف المثلى لانتاج السايتوسين دي أمينيز

1. تحديد المصدر الكاربوني الامثل لانتاج السايتوسين دي أمينيز

يبين شكل (1) ان افضل مصدر كاربوني استعمل لتنمية عزلة E.coli E 33 وانتاج انزيم سايتوسين دي امينيز هو الكلوكوز، اذ بلغت الفعالية النوعية للكلوكوز (8.247)وحدة/ ملغرام بروتين، يليه في ذلك السكروز(7.335)وحدة/ ملغرام بروتين ، ثم النشأ(7.179) وحدة/ ملغرام بروتين، ثم الكليسرول(6.417) وحدة/ ملغرام

بروتين، تبين بان ، ، سكسنات الصوديوم اعطت اقل فعالية نوعية (1.561) وحدة/ ملغرام بروتين ومقارنة بالسيطرة (0.311)وحدة/ ملغرام بروتين .

لوحظ ان معاملة السيطرة باستعمال الوسط الانتاجي الخالي من المصدر الكاربوني لم تساعد االعزلة البكتيرية E 33 *E.coli* على انتاج الانزيم بالكمية الكافية اذ لم تتجاوز الفعالية النوعية لهذه المعاملة عن 0.3 وحدة/ ملغرام بروتين ، وذلك بسبب غياب مصادر الطاقة ذي الجاهزية العالية ولجوء الخلية الى استعمال المصدر النايتروجيني مصدر كاربوني وهذا يتفق مع ماذكره (8) . الذي عزى التباين الملاحظ في تركيز البروتين لعينات التجربة المختلفة الى مدى جاهزية المصدر الكاربوني المستعمل. إذ تميل الخلية الى استعمال المصادر الكاربونية ذي الجاهزية العالية مثل الكلوكوز ، بوصفها الافضل والاسرع في تجهيز الخلية بالطاقة الضرورية لسير مختلف العمليات الأيضية .

اما باقي المصادر الكاربونية الحاوية على عنصر الصوديوم Na فقد اظهرت الدراسات ان لهذا المصدر تأثيراً تحفيزياً قليلاً على فعالية الانزيم ، فقد اشار (10) الى ان الصوديوم له تاثير تحفيزي قليل في فعالية انزيم السايتوسين المستخلص من بكتريا *Pseudomonas aureofaciens* ، اما (9) فقد اشارالى ان للصوديوم تاثيراً تثبيطياً في فعالية الانزيم المستخلص من *E.coli* وبنسبة 10% .

2. تحديد المصدرالنايتروجيني الامثل لانتاج السايتوسين دي أمينيز

بين شكل (2) ان افضل مصدر نايتروجيني استعمل لتنمية عزلة E.coli E 33 وانتاج انزيم سايتوسين دي امينيز هو الببتون 3%، اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم 9.995) وحدة/ ملغرام بروتين وعند استعمال 1% ببتون فكانت الفعالية النوعية (8.111) وحدة/ ملغرام بروتين تلتها في ذلك المصادر الاخرى مثل ، مستخلص الخميرة 1% (7.91) وحدة/ ملغرام بروتين، ومستخلص اللحم 3% (7.734) وحدة/ ملغرام بروتين، ومستخلص اللحم 1% (6.588) وحدة/ ملغرام بروتين، وحامض الاسبارتيك (4.938) وحدة/ ملغرام بروتين ويوريا (1.145) وحدة/ ملغرام بروتين ،وسترات الامونيوم (6.298) وحدة/ ملغرام بروتين، وكبريتات الامونيوم(1.358) وحدة/ ملغرام بروتين ،وكلوريد الامونيوم (1.061) وحدة/ ملغرام بروتين والسيطرة (0.515) وحدة/ ملغرام بروتين.

تبين النتائج ان الانزيم المنتج من العزلة المحلية E33 *E.coli* يستحث بوجود الجزيئات البروتينية ذي الوزن الجزيئي الصغير مثل الببتون كمادة اساس في الاوساط الزرعية المستعملة ، اذ يزيد من انتاجية هذا الانزيم مقارنة مع الجزيئات البروتينية ذي الوزن الجزيئي الكبير (8) ، وكما اكدت الدراسات ان اضافة مستخلص الخميرة الى الوسط الانتاجي ضرورية لتحفيز انتاج هذا الانزيم .

لوحظ ان التنوع بالمصدر النايتروجيني ضروري لانتاج السايتوسين لذلك استعمل الببتون 3% ومستخلص الخميرة 0.2% مصدر نايتروجيني في وسط انتاج الكتلة الحيوية لأن الدراسات اشارت الى ان الخلية لاتحتاج سوى 131 مايكرومول من أي حامض اميني لتصنيع 0.5 غرام من البروتين الخلوي (11) .

اما بشأن تأثير ايونات الامونيوم (المصادر النايروجينية ذو الجاهزية العالية)، فأن وجودها بتراكيز قليلة في وسط الانتاج تختزل مدى انتاج الانزيم ، وهذا ما يفسر انخفاض الفعالية الانزيمية في وسط الانتاج المحتوي على المصادر النايتروجينية غير العضوية ولاسيما كلوريد الامونيوم وكبريتات الامونيوم (12) .

3. تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني في انتاج إنزيم السايتوسين دي أمينيز من خلايا العزلة المحلية E 33 *E.coli*

تشيرالنتائج الموضحة في شكل (3) ، الى ان الرقم الهيدروجيني 8 اعطى اعلى فعالية نوعية ،اذ بلغت قيمتها (9.837) وحدة/ ملغرام بروتين يليها في ذلك كل من ، الرقم الهيدروجيني 8.5 كانت قيمة الفعالية النوعية (9.765) وحدة/ ملغرام بروتين ،الرقم الهيدروجيني 7.5 (8.699) وحدة/ ملغرام بروتين ، والارقام الهيدروجينية 7 و9 و 9.5 وكانت قيمة الفعالية النوعية 8.325 ، 7.665 ، 6.006 وحدة/ ملغرام بروتين على التوالي ، اما الارقام الهيدروجينية

(5 – 6.5) فقد اعطت فعالية نوعية منخفضة جداً ولاسيما في الرقم 5 و 5.5 ،اذ انخفضت الى اقل من 25% كما في شكل (3).

نلاحظ من هذه النتائج ان الفعالية النوعية تنخفض كلما قل او زاد الرقم الهيدروجيني عن (7 – 8.8) ، ان هذه النتائج تؤكد ما أشارت اليه بعض الدراسات المبنية على تغيير الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط ودراسة تاثير ذلك في انتاج عدد من الانزيمات في خلايا E.coli ان بعض إنزيمات إزالة مجموعة الأمين (Deaminases) تتحفز عند الرقم الهيدروجيني (8–9) بينما تنتج إنزيمات إزالة مجموعة الكاربوكسيل (Decarboxylases) بصورة أفضل في الظروف الحامضية (13) .

اشارت بعض الدراسات البحثية الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل الذي يعمل به انزيم السايتوسين دي أمينيز مختلف حسب مصدر الانزيم ، اذ اشار (14) الى ان هذا الانزيم المستخلص من خميرة الخبز (Baker's Yeast) يعمل عند الرقم الهيدروجيني المقارب 7 في حين اشار (8) الى ان انزيم السايتوسين دي أمينيز من المصدر نفسه كان الرقم الهيدروجيني الامثل له 7.5 . اما (15) فقد اشار الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل الذي يعمل عنده انزيم السايتوسين دي أمينيز المستخلص من بكتريا *S. marcescens* كان 8 ، كما اشار (16) الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل كان (7.3 – 7.5) للأنزيم المستخلص من بكتريا *S. typhimurium* اذ بلغت الفعالية النوعية 2.100 وحدة/ملغم بروتين وان الرقم الهيدروجيني الامثل للانزيم المنتج من بكتريا *B. subtilis* كان 8.8، اذ بلغت الفعالية النوعية 1.830 وحدة /ملغرام بروتين (17) ، واشار (18) الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل للأنزيم نفسه المستخلص من بكتريا *P. aureofaciens* كان (9.1) ، وان الرقم الهيدروجيني الامثل للانزيم المعزول من طفيلي اللشمانيا هو 7.6، اذ بلغت الفعالية النوعية 11.59 وحدة / ملغرام بروتين (19) ، ومن هذه النتائج تبين ان الرقم الهيدروجيني يختلف باختلاف نوع العزلة البكتيرية وطبيعة الانزيم قيد الدراسة ، كما ان لمكونات وسط النمو ومدة الحضن تأثيراً في الأنتاج ، إذ يتغير الرقم الهيدروجيني للوسط بمرور زمن الحضن نتيجة لتغير تركيب الوسط بسب العمليات الأيضية التي تحدث داخل الخلية وما ينجم عنها من تبادل للمتأيضات مع الوسط الخارجي (20) .

4. تأثير درجة حرارة الحضن في انتاج إنزيم السايتوسين دي أمينيز من خلايا العزلة المحلية *E.coli* E 33

تبين النتائج الموضحة في الشكل (4) ان اعلى فعالية نوعية للعزلة *E.coli* E 33 عند درجة 37م (9.860) وحدة/ ملغرام بروتين وكانت قيمة الفعالية النوعية عند درجة حرارة 30م(9.344) وحدة/ ملغرام بروتين ، ثم انخفضت الفعالية النوعية عند درجة حرارة 40م اذ كانت (7.410) وحدة/ ملغرام بروتين وعند درجة 45 م و كانت الفعالية النوعية (5.066) وحدة/ ملغرام بروتين وعند درجة 50م كانت الفعالية النوعية (1.950) وحدة/ ملغرام بروتين ،مما يشير الى ان درجة الحرارة 37م هي الدرجة المثلى لانتاج السايتوسين دي أمينيز ..

أشارت البحوث الى وجود نوعين من انزيم السايتوسين دي أمينيز ، احدهما ثابت تجاه الحرارة والاخر متغير تجاه الحرارة ، اذ ذكر (21 ، 15) ، ان الانزيم المستخلص من بكتريا *S. marcescens* ثابت تجاه الحرارة وان 75% من الفعالية بقيت عند درجة حرارة 75م ، اما الانزيم الممستخلص من بكتريا *P. aureofaciens* فقد اشارت الدراسات البحثية الى ان الانزيم غير ثابت بالحرارة ، إذ بدأت فعالية الأنزيم بالانخفاض التدريجي عند رفع درجة الحرارة اكثر من 40م (18) ، ووجد (10) ان درجة الحرارة المثلى التي تم اعتمادها لانتاج انزيم السايتوسين دي أمينيز في بكتريا *S. marcescens* هي 45م ، اما في بكتريا *B. subtilis* فقد وجد ان التفاعل يستمر حتى درجة حرارة 60م ،اذ بلغت الفعالية النوعية 1.60 وحدة /ملغرام بروتين ، وبعدها ينخفض بشكل ملحوظ ، اما الدرجة الحرارية المثلى لفعالية الأنزيم فقد كانت 37م (21) .

ثم اشار (22) الى ان الفعالية الانزيمية في الخمائر كانت عند درجة 37 م وهي درجة الحرارة المثلى ثم تبدأ الفعالية الأنزيمية بالانخفاض التدريجي عند رفع درجة الحرارة مابين (50 – 60) م ، يتضح من تلك البحوث ان

الانزيم الثابت تجاه الحرارة اكثر انتشاراً في البكتريا من الانزيم (18) ، ويعد الانزيم المستخلص من بكتريا*E.coli* ثابتاً تجاه الحراره مما يعطيه ميزة ثباتيه في اثناء التنقية واستعماله في المعالجة الكيميائية (23) ، ان لدرجة الحرارة تاثيراً مهماً في انتاج الانزيم من الاحياء المجهرية عن طريق تاثيره في الذائبية والطاقة الحركية للجزيئات وسرعة التفاعلات الانزيمية في الخلية وينعكس سلباً او ايجاباً في انتاج الانزيم (24) ، وتعد درجة الحرارة عاملاً مهماً في التفاعل الانزيمي من حيث نشاطه ويتناسب طردياً مع درجة الحرارة وان هذه الظاهرة تنطبق على عدد كبير من الانزيمات التي تعمل في درجات حرارة (0 – 50) م اذ تؤدي درجة الحرارة القصوى الى تفكيك الاواصر الضعيفة المسؤولة عن المحافظة على الشكل الثلاثي للبروتين ومن ثم يترتب على ذلك تشويه طبيعة الانزيم وفقدان فعاليته (25 و 26) .

المصادر

1. Mathews,C. K. and Van Hold, K. E.(1990).Biochemistry the Benjamine Cummings Publishing Company,Inc.California.
2. Nishiyama, T. ;Kawamura, Y. ; Kawamoto, K. ; Matsumura, H. ; Yamamoto, N. and Ito T. (1985). Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. Cancer Res.,45:17531761.
3. Blackburn, R.V. (1998). Adenoviral-mediated transfer of a heatinduible double suicide gene into prostate carcinoma cell .Cell Cancer Res.,58(7):1358-1362.
4. Katsuragi, T.:Sonoda, T. ; Matsumoto,K. :Sakai, T. and Tonomura, K.(1989,a). Purification and some properties of cytosine deaminase from Baker's Yeast. Agric. Biol. Chem.,53 (5):1313-1319.
5. Cruick Shank, R. (1965). Medical microbiology guid to the laboratory diagnosis and control of infection .11thed. E and S. Lmingatone Limited Edinburgh and London.
6. Sneath,P.A.;Mair,N.S.;Sharp,M.E. and Cutfield,J.F.(1997). Analysis of secreted aspartic proteinases from Candida albicans ;purification and characterization of individual sap 1,sap 2 and sap 3 isoenzymes, 143 :349-365.
7. Rasoloson,D.;Tomkova,E.;Cammack,R.;Kulda,J. and Tachezy, J. (2001). Metronidazole – resistant strains of Trichomonas vaginalis display increased susceptibility to oxygen. Parasitol.,123:45-56.
8. Katsuragi,T.;Sakai,T.;Matsumoto,K. and Tonomura,K.(1986). Cytosine deaminase from *E.coli* production, purification and some characteristics.Agric. Biol. Chem.,50(7):1721-1730.
9. Mertens,E. and Muller,M.(1990).Glucokinase and fructokinase of Trichomonas vaginalis and Trichomonas foetus.J. Protozool., 37(5):384-388.
10. Yu,T.S. ;Sakai,T. and Omata,S.(1976,b).Kinetic properties of cytosine deaminase from Pseudomonas aursfciens.Agric. Biol. Chem., 40(3):551-557.
11. Willis,R.C. and Woolfolk,C.A.(1974).Asparagine utilization in Escherichia coli . J. Bact. 118(1):231-241.
12. Ireton,G.C.;McDermott,G.;Black,M.E. and Stoddard,B.L. (2002). The structure of Escherichia coli cytosine deaminase.J. Mol. Biol., 315:687-697.
13. Cedar,H. and Schwartz,J.H.(1968). Production of L-asparaginase II by Escherichia coli . J. Bact. 96(6):2043-2048.
14. Ipata,P.L.;Marmocchi,F.;Magni,G.;Felicioi,R. and Polidoro, G. (1971).Baker's Yeast cytosine deaminase. some enzymic properties and all osteric inhibition by nucleosides and nucleotides. Biochem.,10:4270-4276.
15. Sakai,T.;Yu,T.S.; Tabe,H. and Omata,S.(1975,a).Purification of cytosine deaminase from Serratia marcescens..Agric. Biol. Chem., 39(8):1623-1629.
16. West, T.P.;Shanley,M.S. and O'Donovan,G.A.(1982). Purification and some properties

cytosine deaminase from Salmonella typhimurium . Biochim. Biophys. Acta.,719:251-258.

17 . يونس ، دعاء عبد المنعم .(1995). تواجد وخواص انزيم السايتوسين دي امينيز في بكتريا الباسلس سبتلس Bacillus subtillis . رسالة ماجستير . قسم علوم الحياة . كلية العلوم . جامعة الموصل .

18. Sakai,T. ; Yu,T.S. ; Taniguchi,K. and Omata,S.(1975,b). Purification of cytosine deaminase from Pseudomonas aureofaciens..Agric. Biol. Chem., 39(10):2015-2020.

19. المشهداني ، ثائر محمد حسن .(2000). تواجد وخواص انزيمات مسار السايتدين في طفيليات الليشمانيا . رسالة ماجستير . قسم علوم الحياة . كلية العلوم . جامعة الموصل .

20. Kievit,E.;Nyati,M.K.;Ng,E.;Stegman,L.D.;Parsels,J.;Ross,B.D.; Rehemtulla,A. and Lawrence,T.S.(2000).Yeast cytosine deaminase improves radiosensitization and bystander effect by 5-fluorocytosine of human colorectal cancer xenografts.Cancer Research,60:6649-6655.

21. Dabrowska,A.;Szary,J.;Kowalczuk,M.;Szala,S. and Ugorski, M. (2004). CEA-negative glioblaaaastoma and melanoma cells are sensitive to cytosine deaminase/5-fluorocytosine therapy directed by the carcinoembryonic antigen promoter.51(3):723-732.

22. Katsuragi, T.:Sibata, M. :Sakai, T. and Tonomura,K.(1989,b). Stabilization of cytosine deaminase from Baker's Yeast by Immobilization. Agric. Biol. Chem.,53 (6):1515-1523.

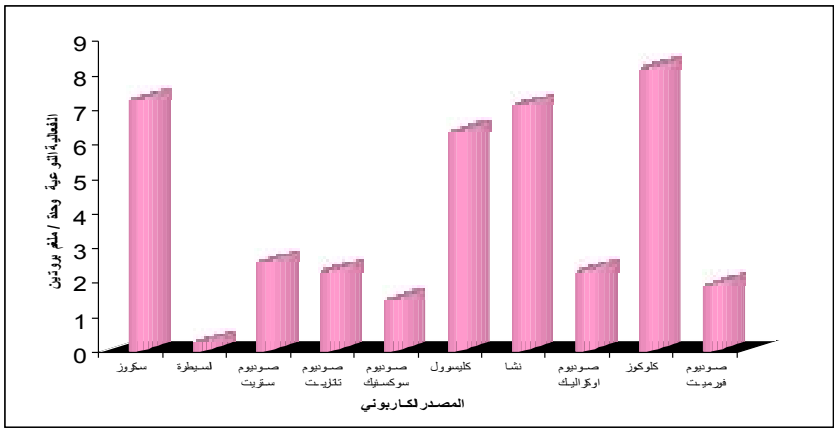
23. Wang,T.P.;Neuhrd,J. and Eriksson,S.(1955).An Escherichia coli system expressing human Deoxyribonucleoside salvage enzymes of or evaluation of potential antiproliferative nucleoside analogs. Antimicrobial Agents and Cheotherapy, 42(10):2620-2625.

24. Bull,A.T. and Bushnell,ME.(1976).Enviromental control of fungal growth .In:The filamentous fungi.(eds. J.E. Smith and D.R. Berry) 2:1-26.

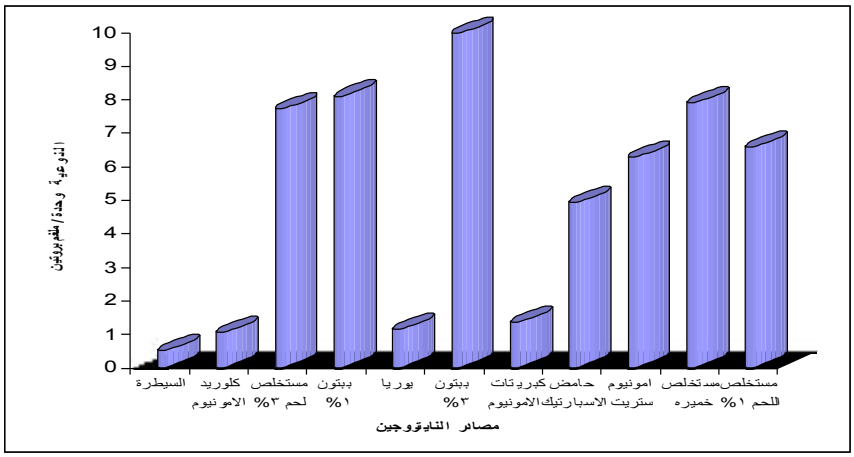
25. النجفي ، طلال سعيد.(1994).علم الخلية .دار الكتب للطباعة والنشر .مطبعة جامعة الموصل.الموصل.

26. ال فليح ، خولة احمد.(1986).مدخل الى الكيمياء الحياتية . دار الكتب للطباعة والنشر . مطبعة جامعة الموصل . الموصل .

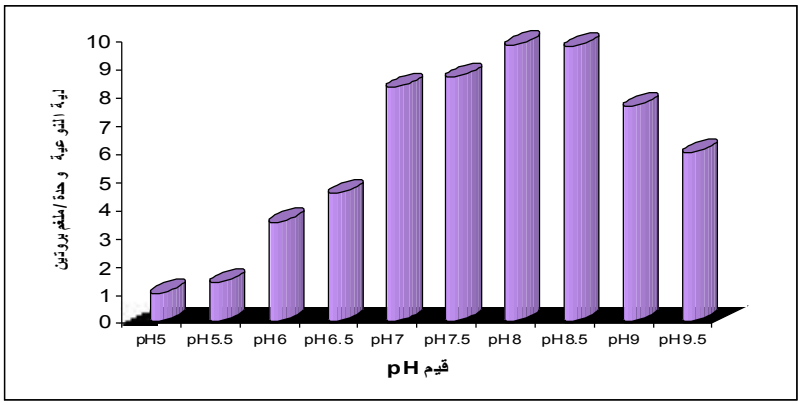
27. المعيني ، صفاء عبد لطيف .(2001). استخلاص وتوصيف اللكتينات من بعض المصادر المايكروبية . رسالة دكتوراه .قسم التقنيات الاحيائية . كلية العلوم . جامعة بغداد.



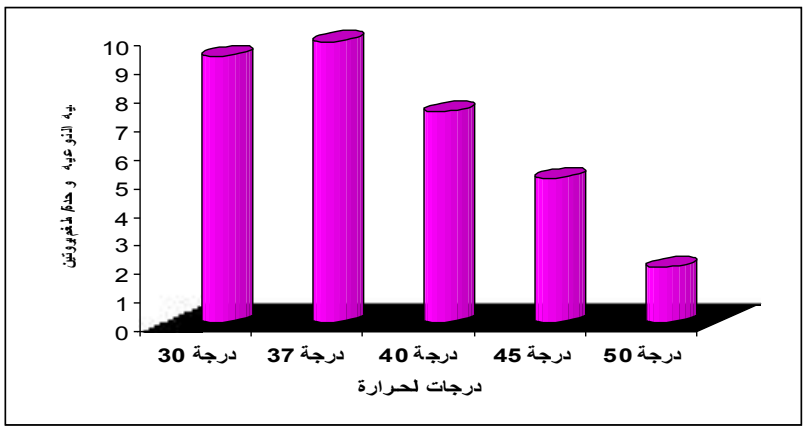
الشكل (1): تاثير المصادر الكاربونية المختلفة في انتاج السايتوسين دي أمينيز من العزلة المحلية لبكتريا E 33 *E.coli*



الشكل (2): تاثير المصادر النايتروجينية المختلفة في انتاج السايتوسين دي أمينيز من العزلة المحلية لبكتريا E 33 *E.coli*



الشكل (3) :تاثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني في انتاج السايتوسين دي أمينيز من العزلة المحلية لبكتريا E 33 *E.coli*



الشكل (4): تاثير درجات حرارية مختلفة(30–50) م في انتاج السايتوسين دي أمينيز من العزلة المحلية لبكتريا E 33 *E.coli*

Determination of Optimum Cultural Conditions for the Production of Cytosine Deaminase From Escherichia coli

***S. A. L. Al-Maeny , A. M. Mohmmad , I.y. Majeed ,A.H . Ali**

***Biotechnology Institute For Post Graduate Studies**

College Of Education / Ebn- Al-Haitham

Abstract

The study involved isolation and characterization of *E.coli* from patient's infected with diarrhea , in order to study the ability of the bacteria to produce cytosine deaminase (CD).

Result showed eight isolates of *E.coli* which showed adifference in the production of (CD) and the isolate of *E. coli* E33 was the beast of its production of CD than the other's and the value of the specific activity was 4.920 u/mg protein , when grown in the medium which contains 1% glycerol ,3% peptone as a source of Carbon and Nitrogen respectively with pH 8.

The optimum cultural condition's for the production of CD from E. coli E33 was studied the result's showed that the isolate gave the highest production of the enzyme(5.28 u/mg protein) which was grown in amedium containing 1% glucose as a carbon source while the best source of nitrogen was peptone in conc. 3% and Yeast extract in conc. 0.2%. The initial optimal pH in the production of this enzyme was 8 at 37 C° .