انتاج انزيم L-asparaginase من البكتيريا واستخدامه في تثبيط الخلايا السرطانية. ٣.تنقية وتوصيف أنزيم L-asparaginase من البكتيريا *Erwinia carotovora* MM3 .

محمد عمر محيي الدين[١] ، خالد فاروق عبد الغفور[٢] ، محمد قيس العاني [٢] ، ناهي يوسف ياسين[٣]

[١] *قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية كلية الزراعة ، جامعة بغداد*

[٢] *قسم علوم الحياة، كلية العلوم ، جامعة الانبار*

[٣] *المركز العراقي لابحاث السرطان والوراثة الطبية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.*

(تاريخ الاستلام: ١٤ / ٦ / ٢٠٠٩ ، تاريخ القبول: ٢٧ / ٤ / ٢٠١٠)

*مستل من اطروحة الدكتوراه للباحث الثالث

الملخص:

تم تنقية أنزيم L-asparaginase المنتج من العزلة المحلية *Erwinia carotovora* MM3 والمستخلص بطريقة المعاملة بالقاعدة NaOH بتركيز ١ عياري باستخدام عدة خطوات شملت التركيز بكبريتات الامونيوم فبلغت الحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية للانزيم ٤٤,٠٠% و ١,٤٦ مرة على التوالي ، ثم اجريت عملية الفصل بالتبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني السالب DEAE-Sephacyl فكانت الحصيلة الأنزيمية وعدد مرات التنقية ٤٢,٥٧% و ٣,٠٥ مرة على التوالي ، ثم اخضع الانزيم للفصل بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام هلام Sephacryl-S300 فتبين وجود قمتين لفعالية الانزيم رمز للقمة الأولى بـERI و كانت الحصيلة الأنزيمية وعدد مرات التنقية لهذا الجزء ٢١,٦% و ٣,٣٦ مرة على التوالي ، ورمز للقمة الثانية ERII وكانت الحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية لهذا الجزء ٣٢,١٧% و ٥,٠٣ مرة على التوالي ، بعدها اخضع كل جزء على حدة لعملية الفصل بالترشيح الهلامي باستخدام نفس الهلام فكانت الحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية للجزء الاول ERI ١٨,٣٠% و ٧,٩٢ مرة على التوالي ، بينما كانت الحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية للجزء الثاني ERII ٢٩,١٩% و ١٢,٥٠ مرة على التوالي. تم اختبار نقاوة الانزيمين ERI و ERII باستخدام الترحيل الكهربائي على هلام متعدد اكريلامايد (٧,٥%) PAGE بغياب المادة الماسخة للبروتينات SDS فتبين ان الانزيم على درجة جيدة من النقاوة اذ تبين احتواء الانزيم ERI على حزمة واحدة بينما احتوى الانزيم ERII على ثلاث حزم . اظهرت نتائج توصيف الانزيمين ان الوزن الجزيئي للانزيمين والمقدر بطريقتي الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي على هلام متعدد اكريلامايد بوجود المادة الماسخة للبروتين SDS ان هنالك فرق في الوزن الجزيئي للانزيمين وحسب الطريقة المستخدمة ، فبلغ الوزن الجزيئي للانزيمين ERI و ERII قيمة قدرها ٣٩٨٠٠ و ١٠٢٠٠ دالتون على التوالي عند تقديره بطريقة الترشيح الهلامي ، بينما بلغ الوزن الجزيئي للانزيمين ERI و ERII قيمة قدرها ٤٥٧٠٠ و ١٦٦٠٠ دالتون على التوالي عند تقديره بطريقة الترحيل الكهربائي على هلام متعدد اكريلامايد PAGE-SDS . تم تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيمين ERI و ERII فبلغت ٣٠° م لكلا الانزيمين ، كما قدرت طاقة التنشيط لكلا الانزيمين فبلغت قيمتها ١٣,٥ X ١٠ ^{٣} و 10.9 X ١٠ ^{٣} سعرة /مول على التوالي ، كما تم تحديد طاقة التنشيط لمسخ الانزيمين ERI و ERII فبلغت قيمتها ٤,٦ X ١٠ ^{٣} و ٩,٤ X ١٠ ^{٣} سعرة /مول على التوالي ، كما تم تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية والثبات لكلا الانزيمين ERI و ERII فكان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية كلا الانزيمين هو ٧,٠ ، وتبين ان الانزيم ERI يحتفظ بكامل فعاليته عند معاملته بالرقم الهيدروجيني ٧,٠ مدة ٦٠ دقيقة بينما لوحظ ان الانزيم ERII لم يحتفظ بكامل فعاليته الا مدة ٣٠ دقيقة عند حضنه عند نفس الرقم الهيدروجيني . اظهرت نتائج تحديد الثوابت الحركية للانزيمين ان قيمة ثابت ميكائيلس Km المقدرة بطريقة Michaelis-Menten plot للانزيم ERI بلغت ٦ X ١٠$^{-٣}$ مولاري ، وللانزيم ERII فبلغت ٣ X ١٠$^{-٣}$ مولاري ، اما قيم السرعة القصوى Vmax للانزيمين فبلغت للانزيم ERI ٣,٢ مولاري/دقيقة وللانزيم ERII فبلغت ٦,١ مولاري/دقيقة. درس تأثير بعض المواد والكواشف في فعالية الانزيمين فتبين ان كلا الانزيمين يقاومان التراكيز الملحية للأملاح NaCl و KCl ولحد التركيز ٠,٢% اذ احتفظا بكامل فعاليتهما عند هذا التركيز ثم انخفضت الفعالية قليلا عند التركيز ٠,٥% ، كما تبين ان فعالية الانزيمين تتناسب عكسيا مع تركيز كل من 2.mercaptoethanol و EDTA اذ لوحظ ان فعالية الانزيمين تنخفض بزيادة تركيز هاتين المادتين ولم يظهر أي تاثير في فعالية الانزيمين عند استخدام هاتين المادتين بتركيز ٠,٠١%.

المقدمة:

قبل الشروع بدراسة الانزيمات وخواصها الحركية لا بد من تنقيتها حد التجانس ولا تتحقق التنقية الا عبر مجموعة من خطوات متدرجة ومدروسة يفترض ان تزداد خلالها فعالية الانزيم النوعية في كل خطوة .[1] اثبتت دراسة [2] امكانية تنقية انزيم L-asparaginase جزئيا من بكتيريا *Erwinia chrysanthemi* باستخدام التبادل الايوني الموجب بعمود Sepharose FF ، كما ان [3] قد اجروا تنقية الانزيم نفسه من العزلة الطافرة *Erwinia carotovora* –EC113 باربع خطوات اشتملت على التبادل الايوني السالب بهلام DEAE-cellulose و الترشيح الهلامي بعمود Sephadex –G200 والتبادل الايوني بهلام Sepharose CL-6B وكروماتوغرافيا الالفة باستخدام Hydroxy apitite .

اوضحت دراسة [4] ان انتاج انزيم L-asparaginase من *E.coli* وتنقيته باستخدام طريقتين تضمنت الاولى ترسيب الاحماض النووية باستخدام $MnCl_2$ ومن ثم الترسيب بكبريتات الامونيوم واجراء الترشيح الهلامي باستخدام Sephacryl –S200 وتركيزه اخيرا باستخدام الديلزة ضد PEG بينما تضمنت الطريقة الثانية المعاملة بدرجة الحرارة ٥٠ °م مدة خمس دقائق ومن ثم اجراء الترشيح الهلامي باستخدام Sephacryl –S200 ولمرتين متتاليتين ، وجد من هذه الدراسة ان طريقة التنقية الثانية كانت هي الافضل مقارنة بالطريقة الاولى بدلالة الفعالية النوعية والحصيلة الانزيمية وذلك لاي من المناظرات الانزيمية التي فصلها وبالطريقتين المذكورتين.

ذكر[5] ان الرقم الهيدروجيني الامثل لانزيم L-asparaginase المنتج من بكتيريا *Staphylococcus aureus* يقع بين ٨,٦–٨,٨ ، بينما ذكر[6] ان الرقم الهيدروجيني الامثل للانزيم المنتج من *Enterobacter cloacae* يبلغ ٨,٥.

بينت دراسة[7] ان درجة الحرارة المثلى للانزيم من *Erwinia carotovora* بلغت ٤٥ °م ، علما ان [3] قد لاحظوا ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم نفسه من عزلة اخرى من البكتيريا نفسها *Erwinia carotovora* EC113 تبلغ ٥٥°م.

وجد[8] ان فعالية انزيم L-asparaginase المنتج من *Erwinia sp.* تتوقف كاملة عند معاملته بمادة EDTA بتركيز ١٠ ملي مولاري ، بينما لم تتاثر بالايونات المعدنية (Na^{+} , K^{+} , Mg^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} , Co^{++} , Ni^{++}, Zn^{++}) وبتركيز ١٠ ملي مولاري لكل ايون . استهدفت هذه الدراسة تنقية الأنزيم ودراسة حركياته والعوامل المؤثرة في فعاليته.

المواد وطرائق العمل:

تم انتاج انزيم L-asparaginase باستعمال العزلة المحلية *Erwinia carotovora* MM3 وتم تقدير الفعالية الانزيمية تبعا لما ذكره [9] ومن ثم اجريت عملية التركيز بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٢٥–٨٥ % بعدها تم اجراء كروماتوغرافيا التبادل الايوني بالمبادل الايوني DEAE-Sephacyl السالب المجهز من شركة Pharmacia ومن ثم اجريت عملية الترشيح الهلامي باستعمال هلام Sephacryl –S300 ، تبين وجود نظيرين لانزيم L-asparaginase عند انتهاء عملية الفصل رمز للنظير الاول ERI وللنظير الثاني ERII وعومل كل منهما بصورة انزيم مستقل عند اكمال الخطوات اللاحقة من التنقية ودراسة خواص الانزيم.

بعدها تم اجراء الترحيل الكهربائي للانزيمين[10] . لغرض تحديد نقاوة الانزيمين وتقدير الوزن الجزيئ بطريقة الترحيل الكهربائي فضلا عن طريقة الترشيح الهلامي وبعدها تم تحديد درجة الحرارة المثلى للفعالية وتقدير طاقة التنشيط و دراسة الثبات الحراري ، ودراسة الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية ، ودراسة الرقم الهيدروجيني للثبات ، وتمت دراسة الثوابت الحركية ، وشملت V.max و Km [11] ، بعدها تم دراسة تأثير بعض الأملاح والكواشف في الفعالية الانزيمية لانزيمي L-asparaginase.

النتائج والمناقشة:

اظهرت النتائج (جدول ١) ارتفاع فعالية الانزيم الى ١٣,٥٧ وحدة/مل والفعالية النوعية ١,٢٩ وحدة/ملغم وكان عدد مرات التنقية وحصيلة الانزيم ١,٤٦ مرة و ٤٤% على التوالي باستعمال التركيز بكبريتات الامونيوم ، وقد استعان عدد غير قليل من الباحثين في تركيز انزيم L-asparaginase من احياء مجهرية مختلفة بكبريتات الامونيوم وبنسب اشباع مختلفة وامكن في هذه الدراسات الحصول على الانزيم بحصيلة متباينة ، فقد لاحظ [4] حصول انخفاض كبير في فعالية انزيم L-asparaginase المنتج من العزلة المحلية *E.coli* حدث بعد خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع ٥٠ – ١٠٠ % اذ بلغت الحصيلة الانزيمية ٣,١٦% وعدد مرات التنقية ٠,٢٨٢ مرة ، كما اثبت ذلك من قبل [12] من ان فعالية الانزيم نفسه انخفضت بعد خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم وكانت الحصيلة الانزيمية ٥٥% وبفعالية نوعية بلغت ٦٠ وحدة/ملغم.

كروماتوغرافيا التبادل الايوني :

لوحظ ظهور خمس قمم بروتينية في هذه المرحلة (شكل ١) وكانت القمة الثانية والثالثة والرابعة تمتلك فعالية انزيمية وعلى نحو متداخل جمعت اجزاء هذه القمم فكانت فعاليتها الانزيمية وفعاليتها النوعية ٨,٥٦ وحدة/مل و ٢,٦٨ وحدة/ملغم على التوالي (الجدول ١). ولوحظ خلال هذه المرحلة من التنقية ان حصيلة الانزيم قد بلغت ٤٢,٥٧% وبفارق ضئيل عن المرحلة السابقة المتمثلة بالتركيز بكبريتات الامونيوم مع زيادة عدد مرات التنقية الى ضعفي المرحلة السابقة وثلاثة اضعاف المستخلص الخام (الجدول ١) مما يشير الى ان خطوة التنقية هذه قد ادت الى التخلص من نسبة كبيرة من البروتينات غير الانزيمية دونما خسارة تذكر في البروتينات الانزيمية.

فقد استخدم[13] مبادلات ايونية من نوع DEAE-Cellulose لفصل انزيم L-asparaginase المنتج من بكتيريا *E.coli* بينما استخدم [14] مبادل CM-Sephadex لفصل انزيم L-asparaginase المنتج من *E.coli* HAP ، كما استخدم [15]مبادل ايوني من نوع DEAE-Cellulose لتنقية نفس الانزيم من بكتيريا *Erwinia aroideae* NRRL-B-138 .

الترشيح الهلامي :

اظهر قياس الامتصاصية للاجزاء المفصولة على الطول الموجي ٢٨٠ نانوميتر ظهور قمتين بروتينيتين منفصلتين عن بعضهما البعض ووجد ان هاتين القمتين تمتلكان فعالية انزيمية رمز للقمة الاولى ERI و القمة الثانية ERII (الشكل ٢) . جمعت اجزاء القمتين كلا على حدة وقيست فعاليتيهما الانزيمية وتركيز البروتين فيهما ، فكانت فعاليتيهما الانزيمية ٨,٠٠ و ٩,٣٠ وحدة/مل وفعاليتيهما النوعية ٢,٩٦ و ٤,٤٢ وحدة/ملغم على التوالي (جدول ١).

مررت اجزاء القمتين على عمود الترشيح الهلامي نفسه تحت الظروف نفسها وجمعت الاجزاء المستردة في الحالتين (الشكل ٣ و الشكل ٤) وكانت الفعالية الانزيمية للجزء الاول ERI ١١,٣ وحدة/مل وفعاليته النوعية ٦,٩٨ وحدة/ملغم اما الفعالية الانزيمية للجزء الثاني ERII فكانت ١٠,٨٠ وحدة/مل وفعاليته النوعية ١١,٠٢ وحدة/ملغم. كما يبين ذلك الجدول (١) الذي يوضح من جانب اخر ان عدد مرات التنقية التي امكن تحقيقها لبروتينات ERI و ERII كانت ٧,٩٢ و ١٢,٥٠ مرة اما حصيلتيهما فكانتا ١٨,٣٠ % و ٢٩,١٩% على التوالي في نهاية مرحلة التنقية وهي حصيلة عالية مقارنة مع عدد من الدراسات التي اتبعت الخطوات نفسها في تنقية انزيم L-asparaginase من الاحياء المجهرية [16] [17].

ان ظهور قمتين مفصولتين وبفعالية انزيمية دليل على ان المستخلص الانزيمي لبكتيريا *Erwinia carotovora* MM3 ينتج نوعين من انزيمات L-asparaginase مختلفين في وزنيهما الجزيئي ويمتلكان الفعالية الانزيمية نفسها.ويذكر ان العديد من الباحثين قد اشاروا الى قدرة بعض انواع الاحياء المجهرية على انتاج اكثر من نوع واحد من انزيمات

L-asparaginase او اكثر من نظير واحد لهذا ، فقد بين [18] وجود متناظرين لانزيم L-asparaginase في بكتيريا *E.coli* B رمز لهما بـECI و ECII يختلفان في الرقم الهيدروجيني الامثل لعملهما وفي ذائبيتهما وان الاول يتميز بفعاليته تجاه الاورام السرطانية اما الثاني فيخلو من هذه الفعالية ، وفي دراسة اخرى وجد [19]ان بكتيريا *E.coli* K12 تنتج متناظرين من انزيم L-asparaginase رمز لهما بـ Ans-I و Ans-II ولوحظ لاحقا ان انتاجية البكتيريا من النظير الثاني يقتصر على الظروف اللاهوائية. ونظرا لظهور انزيمين من مستخلص البكتيريا قيد الدراسة لذلك تم توصيف هذين الانزيمين في هذه الدراسة جنبا الى جنب.

اختبار نقاوة انزيم L-asparaginase :

اظهر مصور الترحيل الكهربائي وجود عدد من حزم البروتينات في عينة الانزيمين وعلى طول خط هلام متعدد اكريلامايد وبلغ عدد حزم ERI حزمة واحدة وعدد حزم ERII ثلاث حزم احدها واضحة يعتقد انها تعود للانزيم نفسه اما الحزمتين الاخريين فتعدان الى بروتينات ملوثة مما يعني عدم تنقية الانزيم ERII على نحو كامل بخلاف الانزيم الاول (مصور ١).

تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما وجده (٤) من ان انزيم-L asparaginase المنقى من العزلة المحلية *E.coli* امتلك ثلاث حزم متباينة الوزن الجزيئي وفسر ذلك بوجود بروتينات اخرى ملوثة للانزيم المنقى ، كما ذكر [20] ان فعالية انزيمL-asparaginase المنقى جزئيا من بكتيريا *Erwinia aroideae* قد وجدت في حزمة واحدة من بين سبع حزم ظهرت على هلام متعدد اكريلامايد بغياب المادة SDS الماسخة للبروتين .

توصيف الأنزيم بنوعيه ERI و ERII:

الوزن الجزيئي :

تبين ان الوزن الجزيئي للانزيم الاول ERI يبلغ ٣٩٨٠٠ دالتون وللانزيم الثاني ERII يبلغ ١٠٢٠٠ دالتون.

اما الطريقة الثانية التي اعتمدت لقياس الون الجزيئي فهي طريقة الترحيل الكهربائي بوجود المادة الماسخة للبروتينات SDS وفق العلاقة بين لوغاريتم الاوزان الجزيئية لعدد من البروتينات القياسية والحركة النسبية لهذه البروتينات في هلام اكريلامايد (الشكل ٣-٦) فتبين ان الوزن الجزيئي للانزيم الاول ERI يبلغ ٤٥٧٠٠ دالتون وللانزيم الثاني ERII يبلغ ١٦٦٠٠ دالتون ، وهي اعلى من قيم الاوزان الجزيئية المقدرة بطريقة الترشيح الهلامي لنفس الانزيمين في هذه الدراسة.

ان التباين في الاوزان الجزيئية للبروتينات والانزيمات عند تقديرها بالطرق المختلفة يكاد يكون امرا طبيعيا لا سيما وان الاساس العلمي لهذه الطرائق تختلف الواحدة عن الاخرى [11] وعموما فان الوزن الجزيئي لانزيمي L-asparaginase بنوعيه ERI و ERII المنتجين في هذه الدراسة اقل مقارنة مع معظم الدراسات التي اجريت في هذا المجال اذ ان معظم المراجع العلمية تشير الى ان الوزن الجزيئي لانزيمL-asparaginase من الاحياء المجهرية ولا سيما البكتيريا اكثر من ١٠٠٠٠٠ دالتون وان هذا الانزيم يتألف في الغالب من اكثر من وحدة واحدة [21] .

اوضحت دراسة محلية ان الوزن الجزيئي لانزيم L-asparaginase من عزلة محلية لبكتيريا *E.coli* بطريقة الترشيح الهلامي يبلغ ١٥١٣٥٦ دالتون و ٣٧١٥٠ دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي باستخدام عوامل ماسخة SDS ومعاملة الانزيم بعامل مختزل هو 2-mercaptoethanol مما قاد الى الاستنتاج بان انزيم L-asparaginase يتألف من اربعة وحدات ثانوية.[13]

علما ان دراسة محلية اخرى على الانزيم نفسه من البكتيريا نفسها قد اشارت الى ظهور ثلاث حزم بروتينية عند تقدير الوزن الجزيئي بطريقة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام متعدد اكريلامايد بوجود SDS لانزيم L-asparaginase وبأوزان جزيئية ١٣٦٢٣ و ٥٣٩٧٧ و ٨٩٣٣٨ دالتون وتم ارجاع ظهور ثلاث حزم بروتينية في مسار الانزيم في الهلام الى تجزؤه الى قطع بروتينية مختلفة الاوزان الجزيئية.[4]

درجة الحرارة المثلى للفعالية والثبات:

لوحظ زيادة فعالية الانزيمين على نحو واضح برفع درجة حرارة التفاعل وبلوغها حدها الاقصى عند درجة حرارة ٣٠ °م (شكل ٧) ، ولوحظ ايضا ان التدهور الحاصل في فعالية الانزيمين في درجات الحرارة اعلى من درجة الحرارة المثلى مختلفا بالنسبة للانزيمين اذ شهد انزيم ERI انحدارا شديدا في فعاليته عند درجتي الحرارة ٤٠ و ٥٠ °م مقارنة مع الانخفاض الحاصل في فعالية الانزيم ERII ، مما يشير اشارة اولية الى ان الانزيم الاخير (ERII) اكثر ثباتا تجاه درجات الحرارة العالية . وتعزى زيادة سرعة التفاعلات الانزيمية بفعل ارتفاع درجات الحرارة الى زيادة الطاقة الحركية للجزيئات الموجودة في وسط التفاعل وبالتالي زيادة التصادمات بينها وبين المادة الاساس ، بيد ان انخفاض الفعالية بزيادة درجة حرارة التفاعل عن درجة الحرارة المثلى للفعالية فيعود الى تاثر التركيب الفراغي للانزيم واحتمال مسخه وفقدان فعاليته جزءا او كلا اعتمادا على درجة الحرارة[11].

يعزى كون درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم L-asparaginase المنتج من بكتيريا *Erwinia carotovora* MM3 بحدود ٣٠ °م الى طبيعة الكائن المجهري المنتج للانزيم فهذه البكتيريا تميل الى درجة الحرارة المعتدلة اذ تنمو بشكل مثالي في درجة الحرارة ٣٠ °م وبالتالي تكيفت الانظمة الحيوية ومن ضمنها الانزيمات الموجودة داخل الخلية بصورة عامة للعمل ضمن هذه الدرجة الحرارية.[13]

من جانب اخر درس الثبات الحراري للانزيمين في ٤٠ °م وعلى مدى من الزمن تراوح من ١٠ الى ١٢٠ دقيقة (الشكل ٨) وقد اختيرت درجة الحرارة هذه كونها اعلى من درجة الحرارة المثلى بعشر درجات حرارية ، فوجد ان انزيم ERI يحتفظ بكامل فعاليته عند درجة الحرارة المذكورة مدة ٦٠ دقيقة بينما يفقد حوالي ٧٦,٥ % من فعاليته عند الاستمرار بمعاملته مدة ١٢٠ دقيقة ، بينما الانزيم ERII يبدأ بفقد فعاليته وعلى نحو تدريجي بدءا من الدقيقة ٤٠ من معاملته اذ لوحظ انه لا يحتفظ الا بحوالي ٢٥,٧ % و ١٤,٣% من فعاليته الاصلية عند معاملته في ٤٠ °م مدة ٦٠ و ١٢٠ دقيقة مما يعني انه اكثر حساسية للحرارة مقارنة مع الانزيم ERI .

وتختلف المصادر التي تتناول انزيمات L-asparaginase من الاحياء المجهرية في تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية هذه الانزيمات وثباتها تجاه

درجات الحرارة ، فقد اشار [17]الى ان انزيم L-asparaginase المنقى من البكتيريا *Pseudomonas boreopolis* يفقد كامل فعاليته عند حضنه بدرجة حرارة ٤٠ °م مدة ٢٤ ساعة ، بينما ذكر [22] ان انزيم L-asparaginase المنتج من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* يفقد فعاليته بعد ١٠ دقائق من حضنه بدرجة الحرارة ٥٠ °م .

تقدير طاقة التنشيط :

وجد ان طاقة التنشيط للانزيم ERI تبلغ ١٣,٥ X ١٠ ^{٣} سعرة/مول اما طاقة التنشيط للأنزيم ERII فقد بلغت ١٠,٩ X ١٠ ^{٣} سعرة/مول.وتعد هاتان القيمتان ضمن مدى طاقة التنشيط لمعظم التفاعلات الانزيمية التي ذكرها[23] التي تتراوح بين ٦٠٠٠–١٥٠٠٠ سعرة/مول علما بان طاقة التنشيط قد تم حسابها من منحني ارينيوس Arrhenius (الشكل ٩).

وتعد هذه القيمة منخفضة للانزيمين مما يشير الى كفاءتهما العالية في تحويل المادة الاساس الاسباراجين الى النواتج وذلك لان العلاقة بين طاقة التنشيط الواطئة تدلل على الكفاءة الحفزية للانزيمات .

كما قدرت طاقة التنشيط لمسخ انزيم L-asparaginase وبنوعيه ERI و ERII فكانت للانزيم ERI ٤,٦ X ١٠ ^{٣} سعرة/مول والأنزيم ERII ٩,٤ X ١٠ ^{٣} سعرة/مول، مما يؤكد ان الانزيم ERI اكثر مقاومة تجاه درجات الحرارة العالية مقارنة مع الانزيم الثاني ذلك لان طاقة التنشيط لمسخ الانزيم تتناسب طرديا مع مقاومة الانزيمات للحرارة.

وتتوافق هذه النتيجة مع ما تم ملاحظته في الفقرة السابقة من ان انزيم ERI ذو ثبات حراري عال بخلاف انزيم ERII ، ويذكر ان كلا الانزيمين يعدان من الانزيمات الحساسة للحرارة ذلك لان طاقة تنشيط مسخ الانزيمات تتراوح بين ٤٠٠٠٠–١٥٠٠٠٠ سعرة/مول .(١٦٨–٦٣٠ كيلو جول /مول) و تعطي قيمة طاقة التنشيط لمسخ الانزيم فكرة عن مدى ثبات الانزيم بدرجات الحرارة العالية فكلما كانت عالية كان ثبات الانزيم اكثر [23]

قدرت طاقة التنشيط لانزيم L-asparaginase المنتج من بكتيريا *Erwinia aroideae* NRRL B-138 من قبل [15] فبلغت ١١٠٠٠ سعرة/مول كما وجد [22] ان طاقة التنشيط لانزيمي L-asparaginase المعزولين من خلايا الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* X2180- بلغت ٦٠٠٠ و ١١٠٠٠ سعرة/مول لكلا الانزيمين.

الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية والثبات:

قدر الرقم الهيدروجيني لفعالية انزيم انزيم L-asparaginase بنوعيه ERI و ERII المنتج من البكتيريا *Erwinia carotovora* MM3 بمدى من الارقام الهيدروجينية تراوح بين ٥,٥ – ٨,٥ باستعمال دارئ ترس بتركيز ٠,١% ، وبينت النتائج الموضحة في الشكل(١٠) ان فعالية الانزيمين تزداد زيادة تدريجية بزيادة الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل وتصل حدها الاقصى في الرقم الهيدروجيني ٧,٠ ثم تعود وتنخفض بزيادة الرقم الهيدروجيني اذ بلغت فعالية الانزيمين ERI و ERII قيمة قدرها ٢١,٣% و ١٦% على التوالي في الرقم الهيدروجيني ٨,٥ من فعاليتهما عن الرقم الهيدروجيني الامثل ٧,٠.

وعند دراسة ثبات الانزيمين تجاه الارقام الهيدروجينية قيد الدراسة لوحظ ان الانزيمين يحتفظان بفعاليتهما عند معاملتهما بالرقم الهيدروجيني ٧,٠ بدرجات متفاوتة (الشكل ١١) ، اذ تبين ان انزيمERI اكثر ثباتا تجاه الرقم الهيدروجيني ٧,٠ واحتفظ بكامل فعاليته عند معاملته بهذا الرقم الهيدروجيني مدة ٦٠ دقيقة وانه يفقد ٢٧,٣% من الفعالية بعد مرور ١٢٠ دقيقة من المعاملة بخلاف الانزيم الثاني ERII الذي لم يحتفظ بكامل فعاليته الا مدة ٣٠ دقيقة عند حضنه بالرقم الهيدروجيني ٧,٠ شهد بعد ذلك تدهورا ففقد ١١,٢% و ٢٥,٩% من فعاليته بعد مرور ٦٠ دقيقة و ١٢٠ دقيقة من الحضن وعلى التوالي.

ان سبب دراسة ثبات هذين الانزيمين تجاه الرقم الهيدروجيني ٧,٠ ولمدد زمنية مختلفة هوالتعرف على مدى امكانية احتفاظهما بفعاليتهما في الدم في حالة ثبوت صلاحية استخدامهما في معالجة الاورام.

لقد درس انزيم L-asparaginase وثباته تجاه الارقام الهيدروجينية المختلفة ، فقد درس [24] و [4] تاثير الارقام الهيدروجينية في فعالية انزيم L-asparaginase المنتج من اجناس بكتيرية مختلفة فوجدوا ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم تساوي ٨,٤ ، بينما ذكر [15]ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم L-asparaginase المنتج من بكتيريا *Erwinia aroideae* يقع ضمن المدى ٩,٠–٩,٥ .

ان الرقم الهيدروجيني الامثل للانزيمين المنتجين في هذه الدراسة والبالغ ٧,٠ يعد مؤشرا جيدا على امكانية استخدامهما في معالجة الاورام ذلك لانه رقم قريب من الرقم الهيدروجيني للدم البالغ ٧,٤ وامكانية استخدامه عن طريق الحقن المباشر في الدورة الدموية.[25] [26]

الثوابت الحركية للأنزيم :

قدرت الثوابت الحركية لانزيم L-asparaginase بنوعيه ERI و ERII اللذين تم تنقيتهما في هذه الدراسة والمنتج من العزلة المحلية من بكتيريا *Erwinia carotovora* MM3 ، باستخدام الاسباراجين مادة اساس وعبر عن العلاقة بين سرعة التفاعل (v) وتركيز المادة الاساس [S] لاستخراج قيم Vmax و Km بطريقة Michaelis – Menten Plot فوجد ان قيمة ثابت ميكائيلس للانزيم الاول ERI يبلغ ٠,٠٩% ويعادل ٦ X١٠ $^{-٣}$ مولاري وللانزيم الثاني ERIIيبلغ ٠,٠٥% ويعادل ٣ X١٠$^{-٣}$ مولاري. (الشكل ٣–١٢). اما قيم السرعة القصوى V.max للانزيمين ERI و ERII فبلغت ٣,٢ و ٦,١ مولاري/دقيقة على التوالي.

ان اهمية تقدير قيمة ثابت ميكاليس لانزيم L-asparaginase تتجلى في تحديد الفة الانزيم للتفاعل مع المادة الاساس الاسباراجين ، وكلما كانت قيمة ثابت ميكائيلس واطئة كلما كان الانزيم مرشحا للاستخدام في تثبيط خلايا السرطان لان العلاقة بين قيمة ثابت ميكائيلس للانزيم والفة الانزيم تجاه المادة الاساس المستخدمة علاقة عكسية وكلما كانت قيمة ثابت ميكائيلس قليلة ادى ذلك الى زيادة سرعة ازالة الحامض الاميني اسباراجين من بلازما الدم وبالتالي موت خلايا السرطان التي تجهز بهذا الحامض من الدم لانها لا تستطيع تصنيعه داخل الخلية.[27]

وتأتي قيمة ثابت ميكاليس المقدرة لانزيم L-asparaginase بنوعيه ERI و ERII مقاربة لما وجده [20] للانزيم نفسة من البكتيريا *Erwinia aroideae* والبالغة ٣ X ١٠$^{-٣}$ مولاري باستخدام الاسباراجين مادة اساس ويذكر [28] ان انزيمات الاسباراجينيز من احياء مجهرية مختلفة تمتلك

درجات ميل متباينة تجاه مواد التفاعل المختلفة مبررا ذلك بالدور الفسلجي المهم الذي يلعبه الانزيم خلال الادوار المختلفة من حياة هذه الكائنات.

ان دراسة الثوابت الحركية لانزيم L-asparaginase المنتج من العزلة المحلية *Erwinia carotovora* MM3 يعتبر مؤشرا واضحا على تراكيز المركبات الايضية في الخلية الحية من مواد تفاعل ونواتج ، كما ان تحديد هذه الثوابت يساعد على تحديد السلوك الفسلجي للتفاعل بما في ذلك الالية التي يتم بواسطتها تنظيم الفعالية الانزيمية داخل الكائن المجهري. [11]

تأثير الأملاح في فعالية الأنزيم :

يتضح من الجدول (٢) ان كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم كان تاثيرهما قليلا في فعالية الانزيمين ، اذ احتفظ كلا الانزيمين بكامل فعاليتهما لحد تركيز ٠,٢% ثم انخفضت الفعالية قليلا عند تركيز ٠,٥% من كلوريد الصوديوم ليحتفظ الانزيم بفعالية قدرها ٩٥,٢% للانزيم ERI و ٩٨,١% للانزيم ERII بينما احتفظ كلا الانزيمين بفعالية قدرها ٨٠% عند استخدام ملح كلوريد البوتاسيوم بتركيز ٠,٥%.

من جهة اخرى لوحظ ان كلوريد الكالسيوم بالتراكيز المستخدمة يكون تاثيره مثبطا لفعالية الانزيمين ERI و ERII اذ لوحظ ان الانزيم ERI فقد ٧٠% من فعاليته عند تركيز ٠,٥% بينما احتفظ الانزيم ERII بفعالية قدرها ٤٦,٨% عند استخدام نفس التركيز ، كما تبين ان ملح كبريتات الخارصين بتركيز ٠,٥% يؤدي الى فقدان ٧٠% من فعالية الانزيم ERI و ٥٤,٢% من فعالية الانزيم ERII، كما ان ملح كبريتات المغنيسيوم يؤدي الى تثبيط فعالية الانزيم ERI وفقدان ٣٥,٧% من فعاليته عند استخدام تركيز ٠,٥% بينما احتفظ الانزيم ERII بفعالية قدرها ٥٩,٢% عند نفس التركيز.

ويتضح من النتائج ان تاثيرا مختلفا للاملاح يظهر تجاه فعالية الانزيمين قيد الدراسة ، ويبدو ان الانزيمين يقاومان التراكيز المرتفعة من ملحي كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم الامر الذي يعد نتيجة ايجابية كون دم الانسان يحتوي على تراكيز عالية من الصوديوم (١٣٦– ١٤٥ ملي مول/لتر) والبوتاسيوم (٣,٥–٥,٠ ملي مول/لتر) لان الانزيم المستخدم في العلاج قد يحقن في الدم مباشرة.

تلعب هذه الايونات دورا كبيرا في المحافظة على البنية الفراغية للانزيم وبالتالي المحافظة على فعاليته ، وتؤثر الايونات الموجبة احادية التكافؤ كالصوديوم والبوتاسيوم تاثيرا ايجابيا في فعالية الانزيم في حين تكون الايونات الموجبة ثنائيةالتكافؤ كالمغنيسيوم غير ضرورية لفعالية الانزيم. [29]

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده [30] الذي اشار الى ان فعالية انزيمL-asparaginase المنتج من مصل دم خنازير غينيا قد تم تثبيطه بتركيز ٥,٠ ملي مولاري من كبريتات المغنسيوم والكالسيوم ، كما تتفق مع ما وجده [31] الذي اشار الى ان فعالية انزيم L-asparaginase المنتج من *Thermus aquaticus* تم تثبيطها بتراكيز عالية من الكالسيوم والمغنيسيوم ؛ كما اشار [28] الى ان فعالية انزيم L-asparaginase المنتج من بكتيريا *Corynebacterium glutamicum* لا يتثبط بواسطة ايونات البوتاسيوم والمغنيسيوم والعديد من العناصر احادية او ثنائية التكافؤ بتراكيز اكثر من ١٥٠ ملي مولاري.

تاثير العوامل المختزلة و الكلابية في فعالة الأنزيم: :

اختبر تاثير كاشفين في فعالية أنزيم L- Asparaginase وبنوعيه ERI و ERII من العزلة المحلية لبكتيريا *Erwinia carotovora* MM3 هما ٢.مركبتوايثانول وهو من العوامل المختزلة واثيلين ثنائي امين رباعي حامض الخليك (EDTA) وهو من العوامل الكلابية وبتراكيز تراوحت بين ٠,٠١ % و ٠,٥% ، وحسبت درجة التاثير كنسبة مئوية من فعالية الانزيم المتبقية بعد المعاملة بالمادتين المذكورتين (جدول ٣).

وتبين من النتائج ان كلتا المادتين يزداد تاثيرهما في الانزيمين ERI و ERII بزيادة تركيزهما اذ لوحظ ان الانزيمين يفقدان ٩,٦% و ١١,٨% من فعاليتهما الاصلية عند معاملتهما بمركب ٢.مركبتوايثانول بتركيز ٠,١% بينما يفقدان ٥٤,٦% و ٣٩,٨% من فعاليتهما بزيادة التركيز الى ٠,٥% مما يعني ان الانزيمين يحتويان في تركيبيهما على اواصر ثنائية الكبريت وان هذه الاواصر تبدأ بالاختزال بشكل محدود ، في التراكيز الواطئة وبشكل واسع في التراكيز العالية.

وقد اشار عدد من الباحثين الى وجود اواصر ثنائي الكبريت (disulphide) في انزيمات الاسبارجينيز من الاحياء المجهرية ، فقد وجد كل من [32] و [33] ان انزيم L-asparaginase يحتوي على اواصر ثنائية الكبريت ولكن لا يكون تاثيرها مباشرا في تحديد التركيب الفراغي للمواقع الفعالة كونها تربط بين الوحدات الاربعة لجزيئة الانزيم لذلك يبقى الانزيم فعالا جزئيا بعد معاملته بمادة مختزلة.

ويوضح الجدول(٣) من جانب اخر ان نمط تاثر الانزيمين ERI و ERII بمادة EDTA الكلابية لا تختلف عن نمط تاثرهما بالمركب ٢. مركبتوايثانول ، اذ يلاحظ زيادة تاثرهما بـEDTA بزيادة تركيز هذه المادة ، فقد بلغت فعاليتهما ٨٥,١% و ٨٠,٠ % من فعاليتهما الاصلية عند معاملتهما بالتركيز ٠,١% وانخفضت هذه الفعالية الى ٣٠,٧% و٤٠,٢% لكلا الانزيمين وعلى التوالي عند معاملتهما بالتركيز ٠,٥% مما يثبت ان الانزيمين قيد الدراسة هما من الانزيمات المعدنية (Metalloenzymes) وعند معاملتها بالعوامل الكلابية مثل EDTA فانها تنتزع ايونات المعادن من جزيئات الانزيم من خلال تكوين معقدات معها وبالتالي تؤدي الى تثبيط فعالية الانزيم.[34]

جدول (١): جدول التنقية لأنزيم L- Asparaginase من العزلة *Erwinia carotovora* MM3.

مراحل التنقية		الحجم الكلي مل	فعالية الأنزيم وحدة/مل	الفعالية الكلية وحدة	تركيز البروتين ملغم/مل	الفعالية النوعية وحدة/ملغم بروتين	عدد مرات التنقية	استرداد فعالية الأنزيم %
المستخلص الأنزيمي الخام		١٢٥	٧,٤٠	٩٢٥	٨,٤١	٠,٨٨	١	١٠٠
التركيز بكبريتات الأمونيوم (٢٥-٨٥%) .		٣٠	١٣,٥٧	٤٠٧,١٠	١٠,٥٠	١,٢٩	١,٤٦	٤٤,٠٠
التبادل الايوني بعمود DEAE- Sephacyl .		٤٦	٨,٥٦	٣٩٣,٧٦	3.20	2.68	3.05	42.57
الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl S300	ERI	٢٥	٨,٠٠	٢٠٠,٠٠	٢,٧٠	٢,٩٦	٣,٣٦	٢١,٦
	ERII	٣٢	٩,٣٠	٢٩٧,٦٠	٢,١	٤,٤٢	٥,٠٣	٣٢,١٧
الترشيح الهلامي للجزء ERIبعمود Sephacryl S300		١٥	١١,٣٠	١٦٩,٥٠	1.62	6.98	7.92	18.30
الترشيح الهلامي للجزء ERII بعمود Sephacryl S300		25	10.80	270.00	0.98	11.02	12.50	29.19

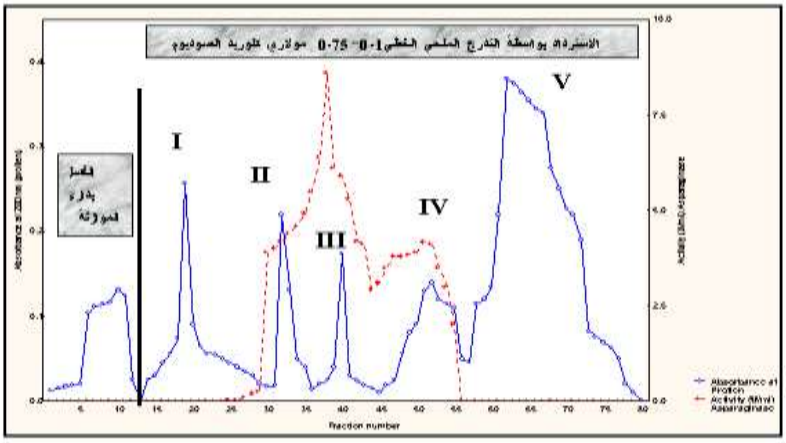
جدول (٢): تاثير بعض الاملاح في فعالية أنزيم L- Asparaginase وبنوعيه ERI و ERII من العزلة المحلية لبكتيريا *Erwinia carotovora* MM3.

الأملاح	التركيز %	الفعالية المتبقية%	
		ERI	ERII
NaCl	0.01	١٠٠	١٠٠
	٠,١	١٠٠	١٠٠
	٠,٢	١٠٠	١٠٠
	٠,٥	٩٥,٢	٩٨,١
KCl	0.01	100	١٠٠
	٠,١	١٠٠	١٠٠
	٠,٢	١٠٠	١٠٠
	٠,٥	٨٠,٠	٨٠,٠
$CaCl_2$	0.01	١٠٠	١٠٠
	٠,١	٦٠,٥	٨٩,٠
	٠,٢	٤٥,٠	٦٠,٠
	٠,٥	٣٠,٠	٤٦,٨
$MgSO_4$	0.01	١٠٠	١٠٠
	٠,١	٩٠,٤	٩١,٢
	٠,٢	٧٠,٠	٦٥,٣
	٠,٥	٦٤,٣	٥٩,٢

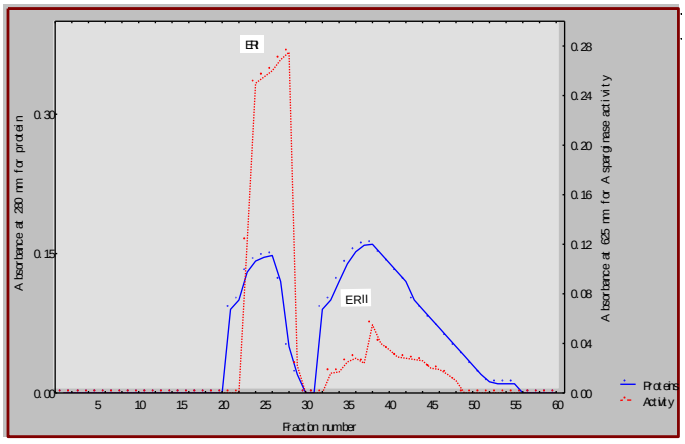
١٠٠	١٠٠	0.01	$ZnSO_4$
٧٤,٦	٦٠,٥	٠,١	
٦٥,٣	٤٥,٠	٠,٢	
٤٥,٨	٣٠,٠	٠,٥	

جدول (٣): تاثير الكاشفين (2.-mercaptoethanol) و(EDTA)في فعالية الأنزيم

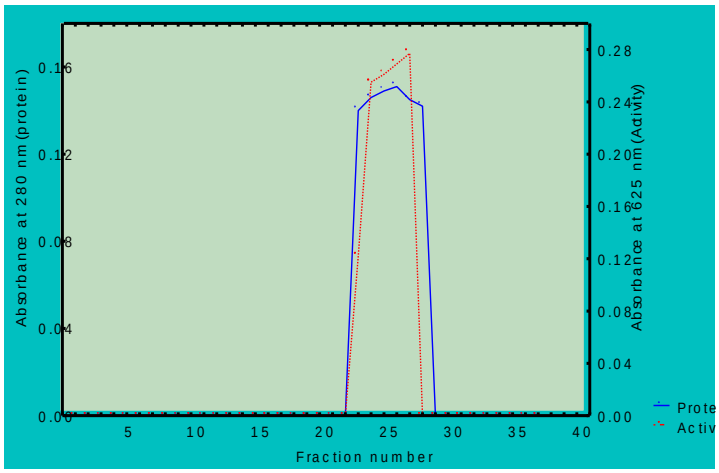
الفعالية المتبقية%		التركيز %	المادة
ERII	ERI		
١٠٠	١٠٠	0.01	2.mercaptoetanol
٨٨,٢	٩٠,٤	٠,١	
٧١,٤	٦٠,١	٠,٢	
٦٠,٢	٥٥,٤	٠,٥	
١٠٠	١٠٠	0.01	EDTA
٨٠,٠	٨٥,١	٠,١	
٧٥,٠	٦٠,٠	٠,٢	
٤٠,٢	٣٠,٧	٠,٥	



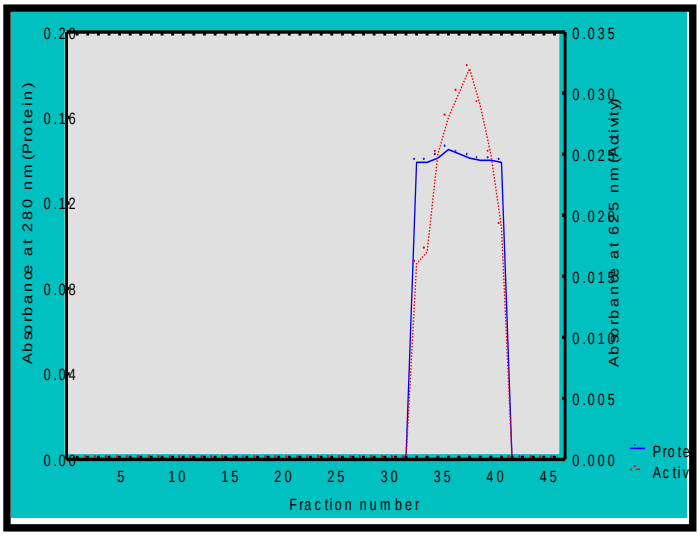
شكل ١ : كروماتوكرام التبادل الايوني لتنقية انزيم L–asparaginase المنتج من العزلة MM3 *Erwinia carotovora* على عمود DEAE–Sephacyl . تمت الموازنة باستخدام محلول ٠,٠١ مولاري ترس ذي الرقم الهيدروجيني ٨ الحاوي على ٠,١ % ترايتون اكس ١٠٠ وتم الاسترداد باستخدام التدرج الملحي بين ٠,١٠ – ٠,٧٥ مولاري كلوريد الصوديوم في ٠,٠١ مولاري ترس ذي الرقم الهيدروجيني ٨,٥ و ٠,١ % ترايتون اكس ١٠٠ في عمود بأبعاد (١,٥ X ٤٠) سم وبسرعة جريان ٠,٦ مل /الدقيقة وبواقع ٢ مل/جزء.



شكل (٢) :الترشيح الهلامي لتنقية أنزيم L-asparaginase باستخدام عمود Sephacryl S-300 بأبعاد (٤٢X١,٥) سم وتمت الموازنة والاسترداد باستخدام المحلول ٠,٠١ دارئ ترس ذي الرقم الهيدروجيني ٨,٥ – ٠,٢٥ مولاري كلوريد الصوديوم – ٠,١ % ترايتون اكس ١٠٠ وبواقع ٣ مل لكل جزء وبسرعة جريان ١٨ مل / الساعة .

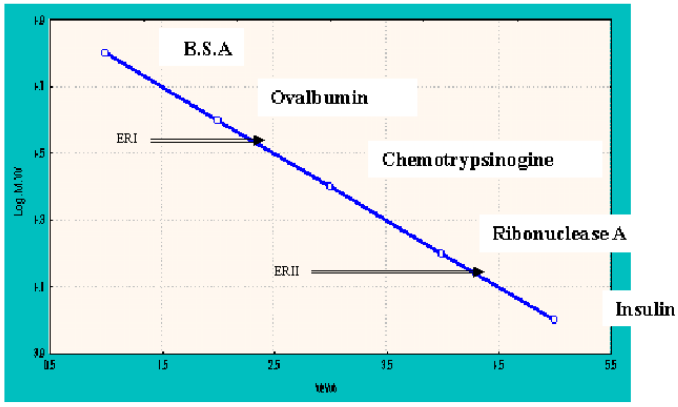


شكل (٣) :الترشيح الهلامي لتنقية الجزء الاول ERI من انزيم L-asparaginase باستخدام عمود Sephacryl S-300 بأبعاد (٤٢X١,٥) سم وتمت الموازنة والاسترداد باستخدام المحلول ٠,٠١ دارئ ترس ذي الرقم الهيدروجيني ٨,٥ – ٠,٢٥ مولاري كلوريد الصوديوم – ٠,١ % ترايتون اكس ١٠٠ وبواقع ٣ مل لكل جزء وبسرعة جريان ١٨ مل / الساعة وتم الاسترداد تحت ظروف استرداد الدكستران الازرق نفسها.

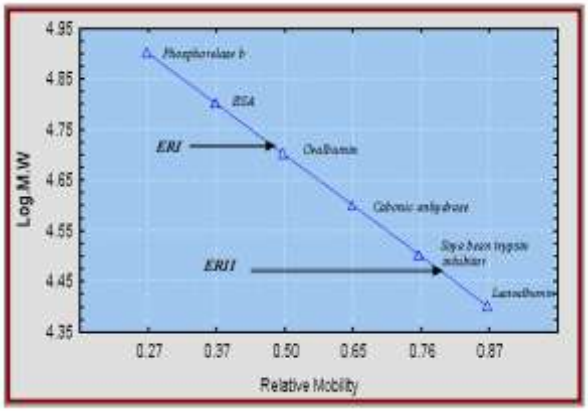


شكل (٤) :الترشيح الهلامي لتنقية الجزء الثاني ERII من انزيم L-asparaginase باستخدام عمود Sephacryl S-300 بأبعاد (٤٢X١,٥) سم وتمت الموازنة والاسترداد باستخدام المحلول ٠,٠١ دارئ ترس ذي الرقم الهيدروجيني ٨,٥ – ٠,٢٥ مولاري كلوريد الصوديوم – ٠,١ % ترايتون اكس ١٠٠ وبواقع ٣ مل لكل جزء وبسرعة جريان ١٨ مل / الساعة وتم الاسترداد تحت ظروف استرداد الدكستران الازرق نفسها.

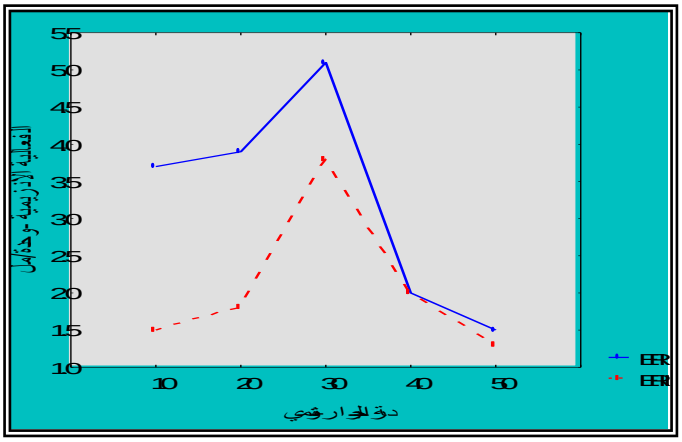
المصور (١) : الترحيل الكهربائي للانزيمين ERI و ERII بهلام متعدد الاكريلامايد بتركيز ٧,٥% ورقم هيدروجيني ٨,٥ بغياب المادة الماسخة للبروتينات SDS ، نفذ الترحيل بتيار ٣٠ ملي امبير وصبغ الهلام بصبغة Coomassae brilliant blue R-250.



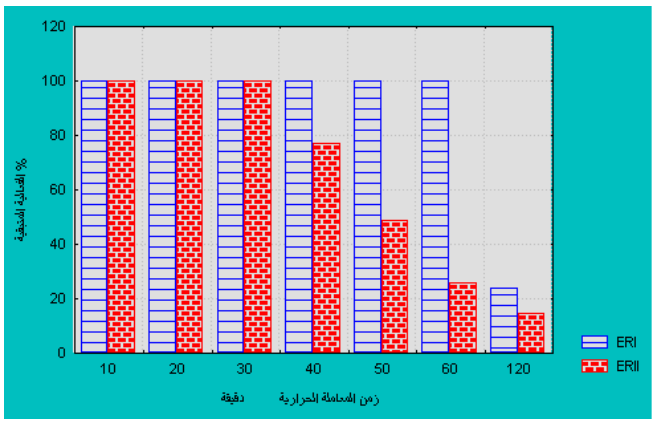
شكل (٥) : العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي ونسبة حجم الفراغ الى حجم الاسترداد (Vo/Ve) للبروتينات القياسية باستخدام عمود Sephacryl S-300 بأبعاد (٤٢X ١,٥) سم واستخدمت هذه العلاقة لاستخراج الوزن الجزيئي لانزيم الاسباراجينيز بنوعيه ERI و ERII



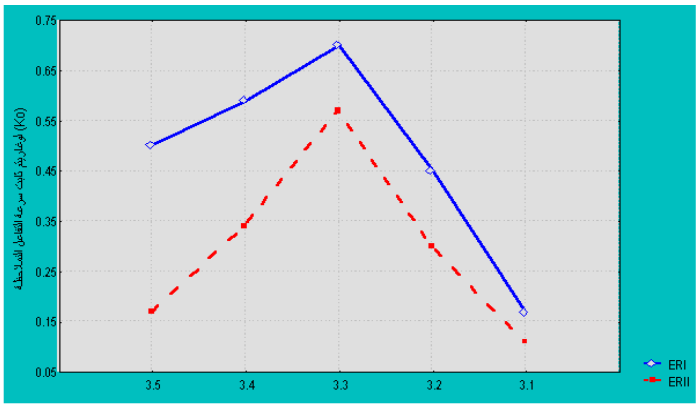
شكل(٦) : العلاقة بين لوغارتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية (Rm) للبروتينات القياسية في هلام متعدد الاكريلامايد (٧,٥) % بوجود SDS لاستخراج الوزن الجزيئي لانزيمL-asparaginase من البكتيريا *Erwinia carotovora* MM3 وبنوعيه ERI و ERII .



شكل (٧) : منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم L-asparaginase بنوعيه ERI و ERII المنتج من بكتيريا *Erwinia carotovora* MM3.

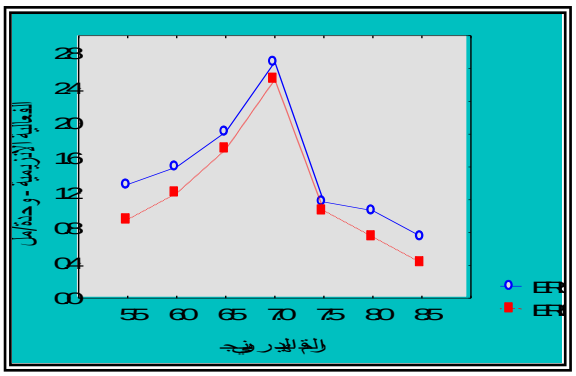


شكل (٨) : الثبات الحراري لفعالية انزيم L-asparaginase بنوعيه ERI و ERII المعاملين بدرجة حرارة ٤٠ °م بمدد زمنية مختلفة في محلول دارئ ترس برقم هيدروجيني ٧,٥.

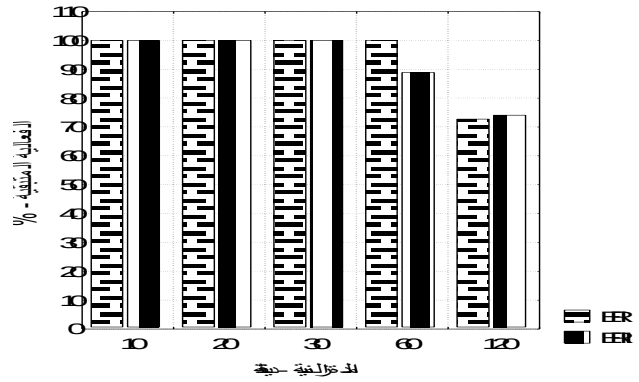


$\frac{1}{T}$ X 10^{-3} (K^{-1})

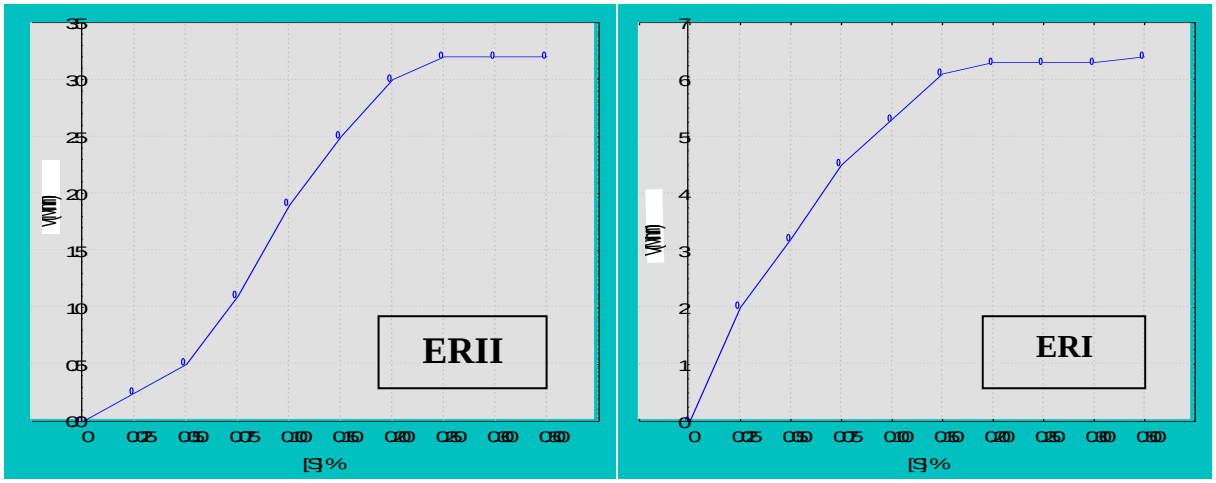
شكل(٩) : منحني ارينيوس لتعيين طاقة التنشيط لأنزيم L-asparaginase من البكتيريا *Erwinia carotovora* MM3 وبنوعيه ERI و ERII و طاقة التنشيط لمسخ نفس الأنزيم



شكل (١٠) : منحني الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم L-asparaginase بنوعيه ERI و ERII المنتج من البكتيريا *Erwinia carotovora* MM3.



شكل (١١) : ثبات انزيم L-asparaginase بنوعيه ERI و ERII المنتج من البكتيريا MM3 في الرقم الهيدروجيني ٧,٠ في المحلول الدارئ ترس في مدد زمنية مختلفة.



شكل (١٢) : منحنى ميكاليس – منتن لانزيم L-asp بنوعيه ERI و ERII المنتج من البكتيريا MM3 لاستخراج قيم(.Vmax) و Km.

المصادر:

١- محي الدين، محمد عمر. تنقية و توصيف انزيم البروتييز الحامضي- بديل المنفحة- المنتج من العفن Rhizomucor miehei MO-46 بطريقة تخمرات الحالة الصلبة. (١٩٩٨) اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة – جامعة بغداد – العراق .

2- Goward, C.R. Stevens, G.B. Tattersall, R. & Atkinson, T. Rapid large-scale preparation recombinant Erwinia chrysanthemi L- asparaginase. (absorption). Biochemistry. 2(6) (1992): 335-341.

3-Maladkar, N.K. Singh, V.K. & Naik, S.R. Fermentative production & isolation of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, EC- 113. Hindustan. Antibiot. Bull. 35 (1-2) (1993):77-86.

٤-الذهبي ، حسنة وضاح معيبد. استخلاص وتنقية وتوصيف انزيم-L-Asparaginase من عزلات محلية لبكتيريا Escherichia coli . (٢٠٠٠) رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة بغداد .العراق.

5-Sobis, M. & Mikucki, J.. Staphylococcal L-asparaginase enzyme kinetics. Acta. Microbiol. Pol. 40(1991): 143-152.

6-Nawaz, M.S. Zhang, D. Khan, A. A. & Cerniglia, C. E. Isolation & characterization of Enterobacter cloacae capable of metabolizing asparagine. Appl. Microbiol. Biotech. 50(5) (1998): 568-572.

7-Tiwari, N. & Dua, R. D. Purification & preliminary characterization of L-asparaginase from *Erwinia aroideae*. Indian. J. Biochem. Biophys. 33(5) (1996): 371-376.

K12 of the L- asparaginase I coding ans A gene & its blanking regions. Gene 78(1989): 37-46.
22-Dunlop, P. C. Meyer, G. M. Ban, D. & Roon, R. J. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae* J. Biol. Chem. 253(4) (1978): 1297-1403.
23-Whitaker, J. R. Principles of enzymology for the food science. Marcell-Dekker, Inc. New York. (1972).
24-Arens , A. Rauenbusch , E. Iron , Wagnk & Kaufma nn W. Isolation & properties of L- asparaginase from *E. coli* . Hoppe-seylers physiology chem.. 351(1970):197-212 .
25-Muller, H. j. & Boose, J. Use of L- asparaginase in childhood ALL. Crit. Revw. Oncol. Heamatol. 28(1998): 97-113.
26-Alfieri, D. Pegasparagase. Pediatr. Nurs. 21(5) (1995) : 471-490.
27-Jennings, M. P. & Beacham, I. R. Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L- asparaginase II, ans B & its regulation by cyclic AMP receptor & FNR proteins. J. Bacteriol. 172(1990): 1491-1498.
28- Mesas, J. Gil, J. & Martin J. Characterization & partial purificationof L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. J. Gen. Microbiol. 136 (pt.3) (1990): 515-519.
29-Ho, P.P. Milikin , E.B. Bobbitt , J.L. & Squires , R.W. Crystalline L-asparaginase from Escherichia coli B . J.Biol.Chem. 245 (14) (1970) :3708-3715.
30-Tower, D. W. Peter, E. L. & Curtis, W. C. Guinea Pig serum L-asparaginase J. Biol. Chem. 238(1963): 389-993.
31-Guy, G. R. & Daniel, R. M. The purification & some properties of a stereospecific D- asparaginase from the extremely thermophilic bacterium. *Thermus aquaticus*. Biochem J. 203(1982): 787-790.
32-Marlborough, D. I. Miller, D. S. & Cammack, K. A. Comparative study on conformational stability & subuniyts interactions of two bacterial asparaginase. Biochem. Biophys. Acta. 386(1975): 756-589.
33-Swain, A. L. Jaskolski, M. Housset, D. & Wlodawer , A. Crystal structure of *Escherishia coli* L-asparaginase an enzyme used in cancer therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.: 90(1993): 1474-1478.
34-North, M. J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. Microb. Rev. 49 (1982): 308 -340.

8-Borkotaky, B. production & properties of asparaginase from new *Erwinia* sp. Folia. Microbiol. 47(5) (2003):473-476.
٩–العاني، محمد قيس عبد مصطفى انتاج انزيم L-asparaginase من بكتيريا *Erwinia carotovora MM3* وتنقيته واستخدامه في تثبيط الخلايا السرطانية. (٢٠٠٥) اطروحة دكتوراه – كلية العلوم– جامعة الانبار . العراق
10-Hames, B. D. Rickwood, D. Gel electrophoresis of proteins, Apractical approach. 3rd ed. IRL press limited. Engl. (1984)
11-Segel, I. H. Biochemical calculations. John Wiley & sons. New York. (1976).
12-Rowley, B. & Wriston, J. C. Partial purification & antilymphoma activity of *Serratia marcescens* L-asparaginase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 28(1967): 160-165.
١٣– مقران ، سليم عبد الحميد . دراسة كيموحيوية لانزيم الاسباراجينيز المنتج من عزلة محلية لبكتيريا *Escherichia coli* . (٢٠٠٣) أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بغداد . العراق.
14-Roberts, J. Burson, G. & Hill, J. New procedures for purification of L-asparaginase with high yield from *Escherichia coli* J. Bact. 95(6) (1968): 2117-2123.
15-Liu , F. & Zajic j.purification & properties of L-Asparaginase from *Erwinia aroideae* . Can. J. Microbiol. 18(1972):1953-1957 .
١٦-Al-Selami , AA.J. Purification & properties of (L-Asparagine Amidohydrolase) E.C.3.5.1.1. from *Bacillus kaustophilus*. Ph.D. in Bacteriology. Utah state university . Utah. (1972)
17-Zanin, V. A. & Pekov, A. A. Isolation, purification & stability of glutaminase-asparaginase from Pseudomonas boreopolis. Biochem. Microbiol. 23(6) (1987): 747-753.
18-Campbell , H.A. Marshbur , L.T. Boyse , E.A. & Old , L.J Two L-Asparaginases from E. coli B.Their separation , purification , & antitiumor activity . Biochem. 6(1967):721-729.
19-Schwartz, J. H. Reeves, j. Y. & Broome, J. D. Two L-asparaginase from E. coli & their action against tumors. Proc. Natl. Acad Sci. U. S. 56(1966): 1516- 1519.
20-Peterson, R.E. & Ciegler, A. L-asparaginase production *by Erwinia aroideae*. Appl. Microbiol. 18(1969):64-67.
21-Jerlstrom, P. G. Bezjak, D. A. Jennings, M. P. & Becham. I. R. Structure & expression in *Escherichia coli*.

L-asparaginase production from bacteria and using it in cancer cells inhibition. 3.Purification and characteraization for L-asparaginase from *Erwinia carotovora* MM3

Mohammed O. Mohhideen , Khalid F. Abdul-Gaffor , Mohammed Q.Al-Ani , Nahi Y. Yassen
Depth Biology,College of Science ,University of Anbar ,Anbar,Iraq
(Received 14 / 6 / 2009 , Accepted 27 / 4 /2010)

Abstaract
The aim of this study is to Purification and characteraization for L-asparaginase from Erwinia carotovora MM3 and study its kinetics and effective factors in enzyme production .The purification of L-asparaginase by ammonium sulfate precipitation was done , the yield and purification number was 44% and 1.46 times respectively. Ion exchange by DEAE-sephacyl was done , the yield and purification number was 42.57% and 3.05 time respectively. The gel filtration

by sephacryl S-300 gel showed two peaks for enzyme,s activity, ERI and ERII , the yield and purification number for ERI was 21.6% and 3.36 times respectively, the yield and purification number for ERII 32.17% and 5.03 times respectively . each peak was separated by gel filtration in the same conditions ERI fraction has a yield and purification number 18.30% and 7.92 times respectively, while ERII has a yield and purification number 29.19% and 12.50 times respectively. Both ERI and ERII are running on Polyacrylamide Gel Electrophoresis PAGE (7%) to explain the purity of enzymes , ERI has one band while ERII has three bands.

The molecular weight for L-asparaginase was determined by gel filtration and PAGE-SDS showed the different values according to the useful method . The molecular weight for ERI and ERII was 39800 and 10200 daltons respectively by gel filtration method and 45700 and 16600 daltons respectively in PAGE-SDS method. The optimum temperature for ERI and ERII was 30°C for both enzymes, the activation energy for ERI was 13.5 X 10^3 cal/mole and ERII was 10.9 X 10^3 cal/mole , while the activation energy for denaturation for ERI was 4.6 X 10^3 cal/mole and ERII was 9.4 X 10^3 cal/mole . The optimum pH for both enzymes was neutral equal 7.00 , ERI keeps all its activity when treated by pH = 7.00 for 60 min. while ERII keeps all activity when treated by pH= 7.00 for 30 min. Km for ERI was 6 X 10^{-3} molar and ERII was 3 X 10^{-3} molar , V max foe ERI was 3.2 molar/ min. and ERII was 6.1 molar/ min when they were estimated by Michaelis – Menten plot method. Both ERI and ERII resistance NaCl and KCl in 0.2% concentration where keeps all activity in this concentration, the activity of ERI and ERII decreased when increased concentration of EDTA and 2- mercaptoethanol.