Iraqi Journal of Science

أستخلاص وتنقية وتوصيف أنزيم Cytosine deaminase من خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae*

محمد ابراهيم نادر* ، صفاء عبد لطيف * ، لميس محمد رياض**

*معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحياتية للدراسات العليا ، جامعة بغداد، بغداد- العراق.

** قسم التقنية الاحيائية ، كلية العلوم ، جامعة بغداد، بغداد- العراق.

الخلاصة

أستخاص أنزيم السايتوسين دي أمنيز من خلايا خميرة الخبز الجاهزة بأستعمال المذيب العضوي التولوين إذ بلغت الفعالية النوعية للمستخاص الخام (9.6) ملي وحدة / ملغرام بروتين ونقي الأنزيم بخطوات عدة تضمنت الترسيب بأستعمال كبريتات الأمونيوم و بنسب إشباع مختلفة و بينت النتائج أن أفضل نسبة إشباع كانت (60%) إذ بلغت الفعالية النوعية (12.5) ملي وحدة / ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية (1.302) مرة, والحصيلة الأنزيمية 4.82%, مرر المحلول الأنزيمي على عمود المبادل الآيوني DEAE-Cellulos, وكانت الفعالية النوعية (358) ملي وحدة / ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية (37.29) مرة وحصيلة أنزيمية 2.55%, وبعدها مرر المحلول الأنزيمي على عمود هلام سيفادكس G-200, إذ بلغت قيمة الفعالية النوعية (400) ملي وحدة / ملغرام بروتين, وبعدد مرات تنقية (41.66) مرة, وحصيلة أنزيمية 1.19%.

EXTRACTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CYTOSINE DEAMINASE FROM *Saccharomyces cerevisiae*

Mohammed .I.Nader *, Safaa Abed Lateef Al-Maeny* , Lamees M. R. Abbas**

* Genetic Engineering and Biotechnology، Institute for Post graduate Studies، Baghdad - Iraq.

**Biotechnology Department ،Collage of Sciences – University of Baghdad, Baghdad - Iraq.

Abstract

The cytosine deaminase was extracted by using organic solvent toluene and the value of specific activity of crude extract was (9.6) mu/mg protein . The enzyme was purified in few steps including precipitating the enzyme by using ammonium sulfate at defferent saturation percent, The optimum percent was 60% saturation percent which gave value of specfic activity of (12.5) mu/mg protein fold of purification was (1.302) times and the yield was 4.82% . Then the enzume solution was passed through DEAE – cellulose column chromatography. The peaks was collected and the value of specific activity was measured which was (358) mu/mg protein, fold of purification was (37.29) times, and the yield was (2.55)%.

The enzyme solution was concentrated and passed through sephadex G-200 gelfilteration and the value of specific activity was (400) mu/mg protein, fold purification (41.66) times and yeid was 1.19%.

المقدمة

عرف الإنسان منذ القدم عملية التخمير لكنه لم يعرف أن خميرة *S. cerevisiae* هي التي تقوم بذلك وقد أدت عملية التخمير إلى جذب انتباه الكثير من الباحثين فقد أستعمل الإنسان الخميرة لأول مرة في صناعة الخبز 2300 قبل الميلاد (1) أطلق الأسم العلمي *(Saccharomyecs cerevisiae)* أول مرة على خمائر الجعة من قبل العالم Meyen عام 1838 ثم قام العالم Reess عام 1870 بوصفها(2).

وتوجد الخمائر فوق سطوح الفواكه والأزهار وأوراق النباتات الحية، وأستطاع العالمان Hansen و Pasteur عام (1881) من عزلها من الفواكه الناضجة واستعمالها لإنتاج (نبيذ النخيل) كمصدرغني بالفيتامينات وكعلاج للمرضى المصابين بنقص التغذية، استفاد الإنسان ومنذ زمن طويل من الخمائر في تخمير الفواكه الحلوة وصناعة الخبز وازدادت أهميتها في الوقت الحاضر لدخولها بشكل واسع في حقل التخمرات الصناعية وفي إنتاج الفيتامينات والادهون والبروتينات والكليسرول والأيثانول (3،4،5).

اكتشف الأنزيم من قبل العالمان الالمانيان Hahn and Schufer في عام 1925 وذلك عند عملهم على المستخلص الخلوي لبكتريا القولون *E. coli* والخميرة (6).

إذ يوجد أنزيم السايتوسين دي أمنيز ويرمز له CD في البكتريا ويسمى (bCD) وفي الخميرة والفطريات يسمى yCD و الخلايا بدائية النواة ولا يوجد في الكائنات الحقيقة النواة العليا (النبات واللبائن)، توالت الدراسات على أنزيم السايتوسين دي أمنيز فقد تم دراسته في بكتريا *Micrococcus aerogenes* (7) وبكـــــتريا *Sarratia marceseens* (8) وبكـــــــــــتريا *Pseudomonas aureofaciens* (9) وفـــــي خميرة *S. cervisiea* (10) وكذلك وجـــد فـــي بكـــتريا *Salmonella tiphimurium* (11), وبكتريا *E.coli* .(12). كذلك أكتشف الأنزيم لأول مرة في الفطريات في فطر *Aspergillus fumigatus* من قبل Yu وجماعته (13). إن عمل هذا الأنزيم يتمثل في إضافة مجموعة هيدروكسيل إلى المادة الأساس السايتوسين ومصدر هذه المجموعة هو جزيئة الماء, إذ ترتبط على موقع الكاربون رقم أربعة (C4) وبتخصص فراغي عالي مكون حالة انتقالية رباعية السطوح حتى يتفكك من خلال أزالة الامونيا متحولا إلى اليوراسيل(14). يتميزأنزيم السايتوسين دي أمنيز بقدرته على إزالة مجموعة الأمين من السايتوسين وكذلك له القدرة على إزالة مجموعة الأمين بتفاعل التحلل المائي للـ 5 – مثيل سايتوسين ويحوله الى الثايمين وهذا ما يحدث في كل من بكتريا القولون *E. coli* وبكتريا *P. aureofaciens* والخميرة *S.cerevisiae* (15،9،6) ويمكن للأنزيم ان يعمل على إزالة مجموعة الأمين من القاعدة 5- فلوروسايتوسين إذ تتحول إلى 5 -فلوروبوراسيل في بكتريا القولون *E. coli* والسالمونيلا *S. typhimurium* والخمائر(17،16) ويعمل هذا الأنزيم المستخلص من بكتريا *Serratia marceseens* على الســايتوسين فقط اما المســـتخلص من بكتريـــا *P. aureofaciens* فانه يعمل على السايتوسين و 5- مثيل سايتوسين (8،9)

إن أنزيم السايتوسين دي امنيز يعمل على نزع مجموعة الأمين من السايتوسين ويحوله إلى اليوراسيل (18) ويقوم بنفس الإلية بتحويل 5-فلوروسايتوسين الى 5-فلوروبوراسيل والأخير هو واحد من أشهر عوامل المعالجة الكيميائية التي لها دور في معالجة السرطان(20،19). ويعد هذا المركب من البيريميدينات المفلورة وهي عبارة عن مشابهات القاعدة النتروجينية الطبيعية(اليوراسيل) التي استخدمت أكثر من 30 سنة كمادة مضادة للسرطان وبالخصوص معالجة سرطان الجلد والثدي والقولون وسرطان المبيض (22،21). يعمل أنزيم السايتوسين دي امنيز على إزالة مجموعة الأمين من FC -5 وتحوله الى 5-FU (23).والمادة الأخيرة هي المادة الفعالة في معالجة الأورام السرطانية في الإنسان بالاستفادة من أنزيم السايتوسين دي أمنيز اقترح الكثير من الباحثين أعطاء (FC – 5) عن طريق الفم وزرع كبسولة أنزيم السايتوسين دي أمنيز في موضع العلاج (24).

طرائق العمل

استخلاص أنزيم السايتوسين دي أمنيز من خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae*

(Ipata and Cerignani, 1978)

أخـــذ 100 غـــرام مـــن الخميـــرة *Saccharomyces cerevisiae* الجـاهزة الجافـة ذات ماركة تجارية معروفة مجهزة من شـركة S.I. lesaffre و مزجت مع 50 مليلتر من منذيب التولوين ، وضع المزيج في حمام مائي (45) مئوية لمدة ساعة ،ثم تـرك فـي حـرارة الغرفة(25) مئوية لمدة 2 – 3 ساعة ،بعدها أضيف للمزيج 100 مليلتر من ماء مقطر بارد ، و وضع المزيج فـي قمـع فصل زجاجي Separatory Funnels و رج المزيج بقوة و بصورة جيدة لمدة نصف ساعة، حضن المزيج في درجة (4) مئوية لمدة 18 ساعة ، جمع الطور المائي المنفـصل و نبـذ بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 10000 دورة / دقيقـة لمدة 20 دقيقة بدرجة 4 مئوية ،و أهمل الراسب وأخذ الراشح ، أجريت عليه اختبارات قياس فعالية أنزيم الـسايتوسين دي أمنيز و تركيز البروتين.

قياس فعالية أنزيم السايتوسين دي أمنيز

اعتمدت طريقة (10) في قياس فعالية الأنزيم كما يأتي أضيف 0.2 مليلتر من المستخلص الخام الى 0.3 مليلتر من محلول محلول دارئ الترس – الفاعدي 0.1 مولار ذو رقم هيدروجيني 7 و 0.5 مليلتر من محلول محلول السايتوسين 0.001 مولار (حضر المحلول بإذابة 11 ملغرام من مادة الأساس السايتوسين في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم الى 100 مليلتر)، و يكون خليط التفاعل بحجم نهائي 1 مليلتر، وضع في جهاز المطياف الضوئي و على طول موجي 286 نانوميتر و أخذت القراءات على فترات (كل خمس دقائق) و لمدة نصف ساعة و أستعمل محلول الكفء المحضر بالفقرة حضر بإضافة 0.3 مليلتر من محلول دارئ الترس – الفاعدي 0.1 مولار ذو رقم هيدروجيني 7 و 0.5 مليلتر ماء مقطر و 0.2 مليلتر مستخلص الأنزيم لتصفير الجهاز.

$$\text{الفعالية الانزيمية(وحدة/مليلتر)} = \text{Slop} \times \frac{\text{الحجم الكلي لوسط التفاعل}}{0.2 \times 1 \times 8.223}$$

إذ أن :

1 : مسار الضوء (سم) .

8.223 : معامل الحيود المولاري للسايتوسين . mM^{-1} CM^{-1}

0.2 : حجم محلول الأنزيم المضاف (مليلتر) .

وحدة الفعالية الأنزيمية (وحدة) : هي كمية الأنزيم اللازمة لتحفيز نزع مجموعة الأمين من واحد ميكرومول من مادة الأساس السايتوسين خلال دقيقة واحدة .

تقدير تركيز البروتين الكلي Estimation of Total protein

اتبعت طريقة بايوريت Biuret (25) في تقدير كمية البروتين في محلول الأنزيم المستخلص من خميرة *S. cerevisiae* وكذلك في جميع مراحل الاستخلاص والتنقية، وتعتمد هذه الطريقة على تفاعل محلول النحاس القاعدي (كبريتات النحاس القاعدية) الموجودة ضمن محتويات محلول الكاشف مع ذرات النتروجين الموجودة في الأواصر البيتيدية للبروتين لتعطي معقد ذا لون بنفسجي.

الكشف عن الأنزيم بطريقة الأقراص

أستعملت طريقة الاقراص للكشف عن الفعالية الأنزيمية لأنزيم السايتوسين دي أمنيز في الجزاء المكونة للقمم البروتينية في عملية التنقية (المبادل الايوني والترشيح الهلامي) و كما موصوف في (12)، حضرت أطباق بتري تحوي على (السايتوسين بتركيز 0.05 مولار و أضيف لها صبغة الفينول الحمراء بنسبة 0.01% الاكار1.5 % مضافة الى 100 مليلتر من محلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.1 مولار و رقم هيدروجيني 5.9) ، وصبت هذه المواد بسمك 2 مليلتر لكل طبق و جرى عمل اقراص ورقية من أوراق ترشيح Watman No.1 بقطر 6 مليمتر و غمرت هذه الاقراص في أجزاء القمم البروتينية ووضعت على سطح الاكار، أستعمل طبق السيطرة بغمر القرص الورقي بدارئ الاسترداد ، و حضنت الأطباق بدرجة 37 مئوية لمدة 8-12 ساعة و النتيجة الموجبة هي ظهور منطقة حمراء حول القرص.

تنقية أنزيم السايتوسين دي أمنيز

الترسيب بأملاح كبريتات الأمونيوم

أستعملت نسبة أشباع مختلفة (20-80)% من ملح كبريتات الامونيوم اذ اختبرت هذه النسب المختلفة كلا على حدة لحين الحصول على نسبة الاشباع الافضل ، اضيفت اوزان معينة من بلورات كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ الى المستخلص الخام للحصول على نسبة اشباع 20% بصورة تدريجية في حمام ثلجي مع التحريك المستمر بأستعمال جهاز المحرك المغناطيسي لمدة ساعة ،نبذ المحلول مركزيا بسرعة 10000 دورة/دقيقة بدرجة 4 مئوية لمدة 20 دقيقة,وأخذ الرائق و أضيفت له بلورات كبريتات الامونيوم لتصل نسبة الاشباع الى 40% تحت الظروف نفسها, ثم كررت هذه العملية للحصول على نسب اشباع 60%و80%، اذيب الراسب من مختلف نسب الاشباع كل على حدة في اقل حجم من دارئ الترس بتركيز 0.1 مولار ذي رقم هيدروجيني7، وجرت عملية الديلزة حيال عدة تبديلات من محلول دارئ الترس لمدة 24 ساعة، وقدرت الفعالية الأنزيمية و تركيز البروتين في النموذج لكل نسبة اشباع، وحفظ النموذج بدرجة 20 مئوية لحين اجراء خطوات عملية التنقية الاخرى.

كروماتوغرافيا التبادل الأيوني
(Ion-exchang chromatography)

حضر المبادل الآيوني ثنائي أثيل أمينو – أثيل سـليلوز (DEAE-Cellulose) بالطريقـة الموصـوفة مـن قبـل الباحث (26) ، اذ علق 20 غراما من المبادل المجهز مـن قبل شركة Whatman في لتر مـن المـاء المقطـر فـي أسطوانة مدرجة وترك ليركد ثم سكب السائل العلوي وغسل المبادل عدة مرات بالماء المقطر إلـى أن أصـبح الـسائل العلوي رائقاً, و رشح العالق على ورق الترشيح واتمـان – رقم1 (Watman No. 1) في قمع بخنر تحت التفريغ ، ثم علق المبادل في 500 مليلتـر مـن محلـول هيدروكـسيد الصوديوم NaOH 0.25 مولار وكلوريد البوتاسـيوم KCl 0.25 مولار لمدة 24 ساعة ، و فصل المبادل بالترشـيح كما تقدم وصفه وغسل عدة مرات بالماء المقطـر إلـى أن يصبح الرقم الهيدروجيني 7 ثم علق بمحلول محلول حامض الهيدروكلوريك HCl 0.25 مولار لمدة 24 ساعة ثم غـسل بالماء المقطر لعدة مرات إلى أن يصبح الرقم الهيـدروجيني 7.

تمت تعبئة عمود المبادل DEAE-Cellulose لتصبح أبعاده (2 × 21) سم وتمت موازنته بمحلول دارئ الموازنة محلول محلول دارئ الترس – الفاعدي بتركيز (0.05 مولار) برقم هيـدروجيني 7.2 ونظمـت سـرعة الجريـان لتكـون 30 مليلتر/ساعة . أضيف 10 مليلتر مـن المحلـول البروتينـي المركز الناتج من خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيـوم بعـد ديلزته الى سطح عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بهدوء وغسل العمود بمحلول دارئ الترس – الفاعدي بتركيز (0.05 مولار) برقم هيدروجيني 7.2لأنزال البروتينات غير المرتبطة بسرعة جريـان 30 مليلتـر/سـاعة ،وجمـع المحلول النافذ خلال العمود من أسفل العمود على شكل أجزاء فكان حجم الجزء الواحد 3 مليلتر/جزء تمت متابعة الاجـزاء المتجمعـة بأسـتعمال جهـاز المطيـاف الـضوئي بقيـاس الامتصاص الضوئي لكل جزء نافذ عند طول مـوجي 280 نانوميتر.

استردت البروتينات المرتبطة بالعمود بتـدرج ملحـي 0.1-0.5 بأستعمال محلول محلول دارئ الترس – الفاعدي 0.05 مولار برقم هيدروجيني 7.2 يحتوي على كلوريد البوتاسيوم بتركيز0.5 مولار وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وجمع المحلـول النافـذ مـن أسـفل العمـود بـأجزاء بحجـم 3مليلتر/جزء،تمت متابعة البروتين في الأجزاء النافذة بقراءة الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانوميتر ، وتـم الكشف عن وجود الأنزيم بأستعمال طريقـة الأقـراص فـي الأجزاء المكونة للقمم ، جمعت أجزاء القمم المتكونة كلاً على حدة و التي أظهرت فعالية أنزيمية ركزت بأستعمال السكروز بدرجة حرارة 4 مئوية. قدرت الفعاليـة الأنزيميـة وكميـة البروتين ، حفظت هذه الاجزاء بدرجة (-20) مئوية لاجراء خطوات التنقية الأخرى.

الترشيح الهلامي بأستعمال عمود Sephadex G-200

حـضر الهـلام وفقـا لتعليمـات الـشركة المجهـزة Pharmacia Fine chemicals اذ علـق 10 غـرام مـن مسحوق السيفاديكس في 200 مليلتر من الماء المقطر و سخن في حمام مائي بدرجة حرارة 90 مئوية لمدة 5 سـاعات ثـم ترك ليبرد و غسل مرتين بمحلول الدارئ الترس – الفاعـدي بتركيز 0.25 مولار ورقم هيدروجيني 7.2، وأجريت عملية إزالة الهواء (Degassing) بمـضخة تفريـغ مختبريـة (Vacuum pump) ، و عبئ الهلام فـي عمـود زجـاجي ليعطي أبعاد (1.5 × 70) سم ، أجريت عمليـة الموازنـة بأستعمال محلول دارئ الترس – الفاعدي 0.25 مولار برقم هيدروجيني 7.2 وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقـع 3 مليلتر لكل جزء .

أضيف النموذج بعد تركيزه بأسـتعمال الـسكروز وبـشكل تدريجي على جدار العمود الداخلي بالقرب من سطح الهـلام ,أسترد الأنزيم بأستعمال دارئ الموازنة وبسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة. و جمع المحلول النافذ خلال الهلام من أسـفل العمود على شكل أجزاء حجم الجزء الواحد 3 مليلتـر لكـل جزء وتمت متابعة الأجزاء بقراءة قيمة الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانوميتر ، و جـرى الكـشف عـن الفعالية الأنزيمية في الأجزاء التي أعطـت قمـة بروتينيـة بطريقة الأقراص ، وجمعت الأجـزاء التـي أعطـت قمـة بروتينية و فعالية أنزيمية وركزت بأستعمال السكروز بدرجة حرارة 4 مئوية ،قدرت الفعالية الأنزيمية و كمية البروتين.

النتائج والمناقشة

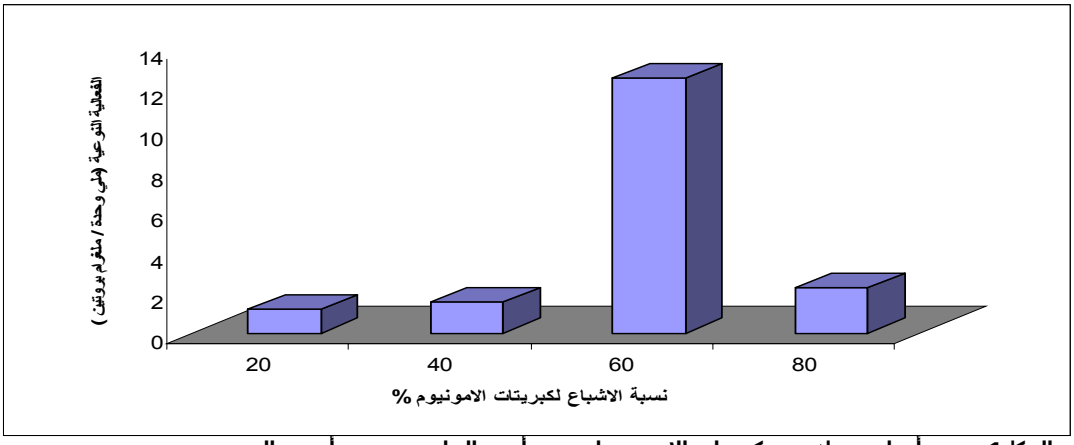
استخلص أنزيم السايتوسين دي أمنيز بأسـتعمال مـذيب التولوين وفقاً للطريقة الموصوفة مـن قبـل (10) إذ بلغـت الفعالية النوعية للمستخلص الخام (9.6) ملي وحدة / ملغـرام بروتين . جدول (3-1) وهي الطريقة ذاتها التي اسـتخلص

فيها الأنزيم من خميرة الخبز بأستعمال مذيب خلات الأثيل إذ بلغت الفعالية النوعية (0.037) وحدة/ملغرام بروتين (27).

أستعملت طرق عدة في استخلاص الأنزيم من بعض الأحياء المجهرية مثل أستخلاص أنزيم السايتوسين دي أمنيز من بكتريا *E.coli* اذ أستعمل في الاستخلاص طريقة طحن الأنسجة بجهاز المجانسة Homogenizer إذ بلغت الفعالية النوعية (3.5) وحدة / ملغرام بروتين (28) . كذلك أستعمل جهاز الذبذبات فوق الصوتية في استخلاص الأنزيم من بكتريا *E.coli* إذ بلغت الفعالية النوعية (5.28) وحدة / ملغرام بروتين (29) وهي الطريقة نفسها التي استخلص بها الأنزيم من بكتريا *Bacillus subtilis* إذ بلغت الفعالية النوعية (1.69) وحدة / ملغرام بروتين (30).

أستعملت نسب إشباع مختلفة من ملح كبريتات الأمونيوم لترسيب الأنزيم شملت (20 ، 40 ، 60 ، 80)% ، وحسبت الفعالية الأنزيمية والفعالية النوعية بعد إجراء عملية الديلزة لنموذج لكل نسبة إشباع لتحديد نسبة الإشباع الأفضل.

وقد أظهرت النتائج في الشكل 1 بأن أفضل نسب الإشباع كانت 60% إذ أعطى أعلى فعالية نوعية بلغت (12.5) ملي وحدة / ملغرام بروتين وبعدد مرات تنقية 1.302 مرة وحصيلة أنزيمية بلغت 4.82% الجدول 1.



الشكل1: نسب أشباع مختلفة من كبريتات الامونيوم لترسيب أنزيم السايتوسين دي أمنيز المنتج من خميرة الخبز *Scccharomyces cerevisiae*

أستعملت في دراسة سابقة على أنزيم السايتوسين دي أمنيز المنتج من خميرة الخبز بنسبة إشباع (60 – 70 %) من ملح كبريتات الأمونيوم في تركيز أنزيم السايتوسين دي أمنيز. إذ بلغت الفعالية النوعية (14.3) ملي وحدة / ملغرام بروتين والحصيلة الأنزيمية (53%) وبعدد مرات تنقية (1.5) مرة (10) بينما أستعمل العالم Katsuragi وجماعته (27) في ترسيب أنزيم السايتوسين دي أمنيز المنتج من خميرة الخبز بملح كبريتات الأمونيوم نسبة إشباع (50 – 73%) وحصل على فعالية نوعية (0.077) وحدة / ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية (2.1) مرة وبحصيلة أنزيمية 82% .

وأستعمل الباحث يونس ، (30) ملح كبريتات الأمونيوم في ترسيب أنزيم السايتوسين دي أمنيز المنتج من بكتريا *B.subtilis* بنسبة إشباع (50 – 60%) وقد حصل على فعالية نوعية (7.88) وحدة / ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية (4.7) مرة وبحصيلة أنزيمية (79%) بينما أستعمل محمد, (29) في تركيز الأنزيم المنتج من بكتريا *E.coli* بأستعمال ملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع (30 – 55%) وحصل على فعالية نوعية (10.8) وحدة / ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية (2.04) مرة وحصيلة أنزيمية (5.5%).

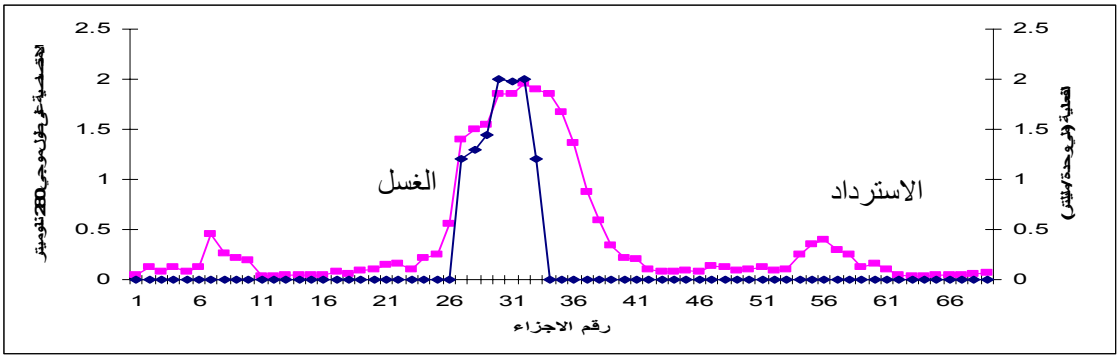
أن السبب في اختيار كبريتات الأمونيوم في تركيز المستخلص الخام خلال خطوات التنقية لأذابتها العالية وتوافرها وكلفتها المناسبة وعدم إضرارها بالمستخلص الخام (31) وتعمل على أزاحة وإبدال الأنزيمات وترسيبها في الوسط الموجودة فيه ، ويعتمد الأساس الذي يقوم عليه الترسيب بالأملاح على ظاهرة التملح الخارجي (Salting out) بسبب معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والإخلال بطبقة الماء المحيطة بالبروتين مما يؤدي الى خفض ذائبيته ، ويؤثر حجم وشكل البروتين ووجود مركبات أخرى معه في ذوبانه (32,33).

يلاحظ من خلال الشكل رقم 2 ظهور قمة بروتينية واحدة في خطوة الغسل بينما ظهرت قمتين بروتينيـة عنـد الاسـترداد بأستعمال محلول كلوريد البوتاسيوم ، وعنـد الكـشف عـن الفعالية الأنزيمية في الأجزاء المكونة لهذه القمـم بأسـتعمال طريقة الأقراص أظهرت الأجزاء المكونة للقمـة البروتينيـة (36-45) في مرحلة الاسترداد فعالية أنزيمية وعدم وجـود فعالية في الأجزاء المكونة للقمم البروتينية الاخرى، ويوضح الشكل رقم 3 طريقة الكشف عن الفعالية الأنزيميـة بطريقـة الأقراص إذ يلاحظ تكون هالة حمراء حول القـرص نتيجـة نزع مجموعة الأمين من السايتوسين وتحويله الى يوراسيل و تكوين أمونيا وبالتالي تغير الرقم الهيدروجيني للوسط وتغيـر لونه من اللون المصفر الى اللون الأحمر ، بعدها ركزت هذه الأجزاء المكونة للقمة البروتينية التي أعطت فعالية وقيـست الفعالية النوعية ، وكانت (358) ملي وحدة / ملغرام بروتين وبعدد مرات تنقية (37.29) مرة بحصيلة أنزيمية مقـدارها (2.55)%.

ان العديد من الدراسات التي أستعملت هذا المبادل في تنقيـة أنزيم السايتوسين دي أمنيز من مصادر مختلفة . ففي أحـدى الدراسـات أسـتعمل المبـادل الآيـوني DEAE-Cellulose كخطوة ثالثة لتنقيـة الـسايتوسين دي أمنيز المنتج من خميرة الخبز بعد كروماتوغرافيـا الترشـيح الهلامي إذ بلغت الفعالية النوعية (1973) ملـي وحـدة / ملغرام بروتين وبعدد مرات تنقية (214.4) مـرة وحـصيلة أنزيمية (14%) (10)

أستعمل Katsuragi وجماعته (27) هذا المبـادل كمرحلـة ثانية للتنقية الأنزيم السايتوسين دي أمنيز المـستخاص مـن خميرة الخبز بعد عملية الترسيب بكبريتات الأمونيوم إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم (5.5) وحدة / ملغرام بروتين وبعـدد مرات تنقية (150) مرة وحصيلة أنزيمية (12%).

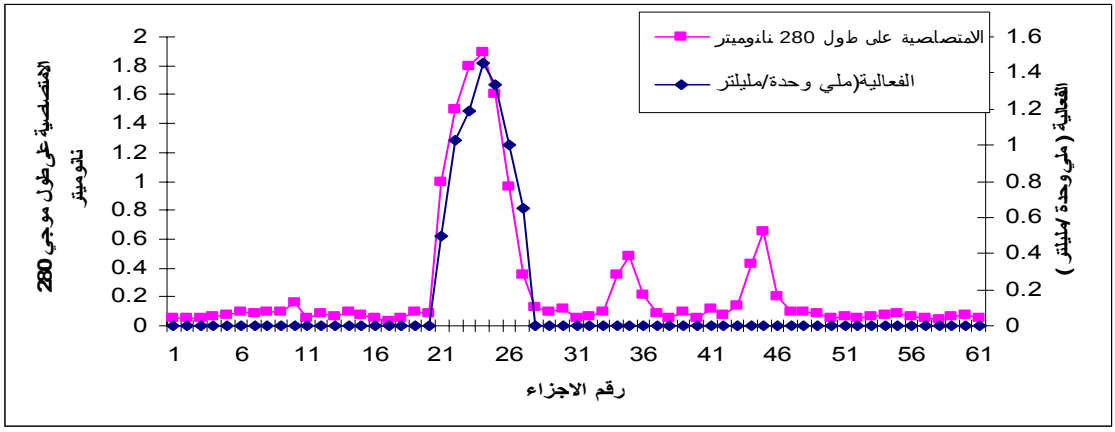
وفي دراسة أخرى على أنزيم السايتوسين دي أمنيز المنتج من بكتريا *B. subtilis* نقي أنـزيم الـسايتوسين دي أمنيـز كمرحلة ثانية بأستعمال عمود الفصل الكروماتوغرافي الـذي يحتوي Ultro Gel ACA34 بعدد مرات تنقية (120.3) مرة وحصيلة أنزيمية (74%) وفعالية نوعية (203.34) وحـدة /ملغرام بروتين (30) ، بينما أستعمل محمد، (29) المبـادل الآيوني DEAE-Cellulose كمرحلة ثانية لتنقيـة الأنـزيم سايتوسين دي أمنيز المنتج من بكتريا *E.coli* إذ بلغت الفعالية النوعية (189.52) وحدة / ملغرام بروتين وبعدد مرات تنقية (35.89) مرة وحصيلة أنزيميـة (5.025%). إن ارتبـاط الأنزيم بالمبادل الآيوني يدل على أن أنـزيم الـسايتوسين دي أمنيز المنتج من خميرة الخبز يحمل محصلة شحنة سالبة عند الرقم الهيدروجيني (7.2) وهي معاكـسة لـشحنة المبـادل الآيوني التي ساعدت في ارتباطه بالمجاميع الموجبـة التـي يمتلكها المبادل الآيوني وأستعمل المبادل الآيـوني DEAE-Cellulose بما يتصف به من مميزات عديدة جعلته من أكثر أنظمة كروموتوغرافيا شيوعاً في الاستعمال ومن ضمن هـذه المميزات : القدرة العالية علـى الفـصل والـسعة العاليـة لاستيعاب البروتينات المرتبطة ووضوح وبساطة مبدئ الفصل الذي يعتمد بشكل أساس على اختلاف في الشحنة (34).



شكل 2: كروموتوغرافيا التبادل الآيوني بأستعمال المبادل الآيوني DEAE-Cellulose بإبعاد (2 × 21) سم لتنقية أنزيم السايتوسين دي أمنيز الموازن بمحلول دارئ Tris-base (تركيز 0.05 مولار برقم هيدروجيني 7.2)، تم الاسترداد بمحلـول درائ Tris-base (بتركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7.2) محتوي على 0.5 – 0.1 مولار من كلوريد البوتاسيوم وسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مليلتر / جزء.

يلاحظ من خلال الشكل رقم 3 ظهورثلاث قمم بروتينية عند قياس الأجزاء على طول موجي 280 نانوميتر ، و عند الكشف عن الفعالية الأنزيمية في الاجزاء المكونة لهذه القمم بأستعمال طريقة الاقراص أظهرت الاجزاء المكونة للقمة البروتينية (21-29) فعالية أنزيمية و عدم وجود فعالية في الاجزاء المكونة للقمم البروتينية الاخرى , بعدها ركزت الاجزاء المكونة للقمة البروتينية التي أعطت فعالية و قيست الفعالية النوعية و كانت (400) ملي وحدة / ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية (41.6) مرة وبحصيلة أنزيمية (1.19)% كما في جدول (3-1).

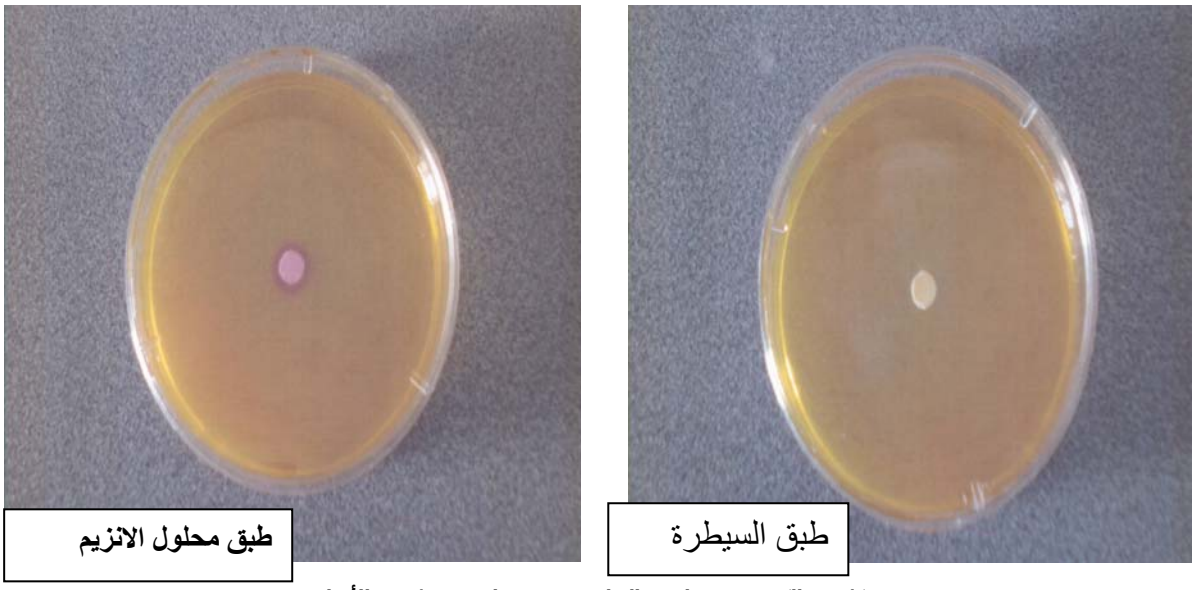
أستعمل الباحث Ipata and Cercgneni, (10) عمود الفصل Sephadex G-100 كخطوة ثانية من خطوات التنقية أنزيم السايتوسين دي أمنيز المنتج من خميرة الخبز بعد عملية الترسيب بكبريتات الأمونيوم إذ بلغت الفعالية النوعية (494)ملي وحدة / ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية (53.69) مرة وحصيلة أنزيمية (19%) بينما أستعمل Katsuragi وجماعته (27) الترشيح الهلامي من نوع Sepharose CL-4B كخطوة ثالثة في تنقية أنزيم السايتوسين دي أمنيز المنتج من خميرة الخبز إذ بلغت الفعالية النوعية (42) وحدة / ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية (1.100) مرة وحصيلة أنزيمية (5.7%) بينما أستعمل محمد ،(29) الترشيح الهلامي من نوع Sepharose 6B كخطوة ثالثة في تنقية أنزيم السايتوسين دي أمنيز المستخلص من بكتريا *E.coli* إذ بلغت الفعالية النوعية (302.272) وحدة / ملغرام بروتين وعدد مرات تنقية (57.248) مرة وبحصيلة أنزيمية (2.099%).



شكل 3: الترشيح الهلامي لتنقية أنزيم السايتوسين دي أمينيز المنتج من الخميرة بأستعمال عمود Sephadex G-200 (1.5 x 70 سم) وبسرعة جريان 30 مليلتر /ساعة وتمت الموازنة بدارئ Tris-base 0.25 مولار وبرقم هيدروجيني 7.2 وجمعت الأجزاء بواقع 3 مليلتر /جزء.

جدول 1: مراحل تنقية السايتوسين دي أمنيزالمستخلص من خميرة الخبز

خطوات التنقية	الحجم (مليلتر)	الفعالية الأنزيمية (ملي وحدة/مليلتر)	تركيز البروتين (مليغرام/ مليلتر)	الفعالية النوعية (ملي وحدة/مليغرام بروتين)	الفعالية الكلية (ملي وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الأنزيمية %
المستخلص الخام	200	8.4	0.87	9.6	1680	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم 60 % تشبع	15	5.4	0.43	12.5	81	1.302	4.821
التنقية على مبادل DEAE	10	4.3	0.012	358	43	37.291	2.559
التنقية على هلام Sephadex G-200	5	4.0	0.010	400	20	41.666	1.190



شكل 4: الكشف عن انزيم السايتوسين دي امنيز بطريقة الأقراص.

المصادر

1. Perrler, J. and Reed, G. **1973**. *Yeast Technology*. AVI Publishkng Company USA.
2. Lodder,J.**1970**. *The Yeast*. 2nd ed., North Holland Publishing Company. Netherlands.
3. السباعي ، ليلى عبد المنعم **2002** . الخبز *والمخبوزات بخميـرة الخبـز*. الطبعـة الأولـى . منـشأة المعـارف . الإسكندرية – مصر
4. Dixon, D.M.; Rhodes, J.C. and Fromtling, R.A. **1999**.*Taxonomy*, *Classification and Morphology of Fungi*. In: Manual of Clinical Microbiology.v 7thed. (Ed. ByMurray,P.R.;Baron,E.J.;Pfaller,M.A.;Ten ovar,F.C.andYolken,R.H.) ASM Press, Washington D.C.
5. Phaff, H. J.; Miller, M.W. and Mark ,E.M..**1971**. *The Life of Yeast*. Harvard University Press, Cambridge,PP.:20 – 30.
6. Kream,J.P. and Chargaff,E.**1952**. On the cytosine deaminase of Yeast. *J. Am. Soci*.,**74**:5157 – 5160.
7. Whiteley, H.R.**1952**. The fermentation of purines by *Micrococcus aerogens*. *J. Bacteriol*.,**63**:163 – 175.
8. Yu,T.S.;Sakai,T. and Omata,S.**1976a**. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agric. Biol. Chem*.,**40**(3):543 – 549.
9. Yu,T.S.;Sakai,T. and Omata,S.**1976b**. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Pseudomonas aursfciens. Agric. Biol. Chem*.,**40**(3):551 – 557.
10. Ipata, P.L. and Cercignani,G.**1978**. Cytosine and cytidine deaminase from Yeast . In: Method in Enzymology. (Ed. Patricia,A.H. of the cytosine deaminase gene delivered by the adenoviruses vector in the murine gastric cancer. *Chin. J. Diag*.,**2**:1 – 4.
11. Greco,O. and Daochs,G.U.**2001**. Gene directed enzyme / prodrug therapy of cancer : historical appraisal and future prospective. *J. Cell. Physiol*.,**187**:22 – 36.
12. Aghi, M.; Hochberg, F. and Breakefield, X.O. **2000**. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J. Gene Med*.,**2**:148 – 164.
13. Nishiyma,T.; Kawaamura,Y.; Kawamoto, K.; Matsumura, H.; Yamamoto, N.; and Ito, T.; Ohyama, K. ;Katsuragi, T. and Sakai, T. **1985**. Antineoplastic effect in rats of 5 – fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. *Cancer Res.,* **45**:1753 – 1761.
14. Gornal, A. G. and Hunter, A. **1943**. Stable isotopecs in biochemical research. *J. Biol. Chem*.**147**,593
15. Whitaker, J. R. and Bernard, R. A. **1972**. *Experiment for an Introduction of Enzymology.* The Wibber press. Davis.
16. Katsuragi, T.; Sonoda, T.; Matsumoto, K.; Sakai, T. and Tonomura, K. **1989**. Purification and some properties of cytosine deaminase from baker's yeast. *Agric. Biol. Chem*.,**53**(5):1313 – 1319.
17. Porter,D.J.T.and Austin ,E.A. **1993**. cytosine deaminase, The role of divalent metal ions

in catalysis. *J. Biol. Chem*.**268** (32):24005-24011.

18. محمد،عائشة مهنا. **2006**.تحديد الظروف المثلى لأنتاج أنزيم Cytosine deaminase من بكتريا *Escherichia coli*. رسالة ماجستير. قسم الصناعات الغذائية.كلية الزراعة.جامعة بغداد.
19. يونس،دعاء عبد المنعم.**1995**.تواجد وخواص أنزيم السايتوسين دي أمنيزفي بكتريا الباسلس سبتلس *Bacillus subtilis*. رسالة ماجستير .قسم علوم الحياة.كلية العلوم.جامعة الموصل.
20. Volesky, B. and Luong, I. **1985**. Microbiol enzymes production, purification and isolation.*(CRC)Critical Reviews in Biotechnology,* **2**:119-146.
21. White, A., Handler, P., and Smith, E. **1973**. *principles of Biochemistry*,Mc Grow-Hill Book company Ablakiston publication.New York.
22. Garfin, D, E. **1990**. Purification Procedures Electrophoretic Methods in Enzymology ed. *Murray,E,D. and Dentscher,P.J.* **182**: 425 - 441.
23. Brummer, W. and Gunzer, G. **1987** Labrotary techniques of enzymes recovery In: *Biotchnology* (ed. Rehm,J.H. and Reed, G.).**70**:213-278.Vch.Deerfield Beach.