دراسة مقارنة للصفات الحركية للاسباراجينيز (L-asparaginase) الحر والمقيد من العزلة المحلية *Pseudomonase aeruginosa*

غازي منعم عزيز

قسم التقنيات الاحيائية، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد– العراق.

الخلاصة

اختبرت خمس طرائق لتقييد الاسباراجينيز المنقى من العزلة المحلية لبكتريا *P.aeurginosa* تمثلت بالحجز في هلام الاكريل امايد والاكار والجينات الصوديوم والربط العرضي للجيلاتين المعامل بالكلوتر الديهايد والربط الايوني بالمبادل الايوني DEAE-cellulose .ودلت النتائج ان التقييد بالجيلاتين المعامل بالكلوترالديهايد افضل هذه الطرائق حيث احتفظ الانزيم المقيد بـ53.5%من فعالية الانزيم من فعالية الانزيم الحر . وكانت قيم الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم المقيد مساوية الى 7.5 و(6–8.5) ،على التوالي والانزيم الحر عند القيم 8.5 و(7.5–8)على التوالي. واحتفظ الانزيم المقيد بكامل فعاليته عند حضنه لمدة 30 دقيقة في درجات حرارة من 25–45م° والانزيم الحر عند حضنه في درجات حرارة من 25–37 م°. درست الثوابت الحركية للانزيم وظهر ان قيم ثابت ميكاليس Km والسرعة القصوى Vmax للانزيم المقيد كانت 0.46× 10^{-4} مولار و 12.2 مايكرومولار/دقيقة بينما للانزيم الحر بلغت 0.25× 10^{-4} مولار و16.7 مايكرومولار/دقيقة ،واظهر الانزيم المقيد تخصصا تجاه مادتي التفاعل L-asparagine و L-glutamine واحتفظ كل من الانزيم المقيد والحر بحوالي 90.2%و51%من فعاليتهما الاصلية بعدالاسبوع الثالث من الخزن في درجةحرارة 4 م°.

COMPARATIVE STUDY ON KINETIC PROPERTIES OF FREE AND IMMOBILIZED ASPARAGINASE FROM LOCAL ISOLATE OF *Pseudomonase aeruginosa*

Ghazi M.Aziz

Department of Biotechnology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad-Iraq.

Abstract

The purified asparaginase from local isolate of *P. aeruginosa*.was immobilized by gel entrapment using polyacrylamide,agar,sodium alginate,ionic binding on ionexchanger using DEAE-cellulose and immobilized in gelatin by cross-linking with glutaraldehyde.

The later method was the most efficient method for immobilization since the immobilized enzyme retained about 53.5% of original activity of free enzyme. The optimal pH for immobilized enzyme activity was 7.5 and the enzyme was most stable at pH 6-8.5, while the values of optimal pH for activity and Stability of free enzyme were 8.5 and (7.5-8) respectively. The immobilized enzyme retained its original activity when incubated at 25-45C° for 30 min., while the free enzyme retained its original activity after 30 min. at 25-37C°. The obtained values of Michaelis constant (Km) and Vmax for immobilized enzyme were 0.46×10^{-4} M and 12.2 µM/min.,respectively ,and the Km and Vmax for free enzyme were 0.25×10^{-4} M and 16.7 µM/min,respectively. The immobilized enzyme was highly specific towards L-asparagine and L-glutamine. The free and immobilized enzyme retained about 90.2% and 51% of its original activity after 3 weeks of storage at 4 C°.

المقدمة

يعد انزيم الاسباراجينيز (L-asparaginase) احد انزيمات التحلل المائي (EC3.5.1.1) L-asparagine aminohydrolase الذي يعمل على تحليل الحامض الاميني الاسباراجين (L-asparagine) الى حامض الاسبارتيك (L-aspartic acid) والامونيا Amonia (1). سجلت العديد من الادبيات العلمية ان معظم انزيمات الاسباراجينيز من انزيمات الداخل –خلوي (Intracellular enzymes) التي تفرز داخل الخلية ضمن السايتوبلازم اوالفراغ البيربلازمي (Perplasmic)اثناء النمو الطبيعي للخلايا البكتيرية (2). سجل وجود الانزيم في مصل الحيوانات مثل خنازير غينيا وفي كبد الدجاج (3) وفي النباتات مثل *Pisum sativum*(4) ، كذلك لوحظ وجود الانزيم في الانسان (5)، فضلا عن ذلك فقد اتجة الباحثين لانتاج الانزيم من الاحياء المجهرية كالبكتريا *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruoginosa* ومن الاعفان مثل *Aspergillus niger* و *Penicillum comemberti* والخميرة *Saccharomyces cerevisiae* (6) وذلك لحاجة المؤسسات الصحية الى كميات كبيرة منه للاغراض العلاجية لدوره الفعال في تثبيط نمو الخلايا السرطانية خاصة الخلايا اللمفاوية (7). ان اختزال مستويات حامضي الاسباراجين والكلوتامين (glutamine)(التي تعد من العوامل الاساسية لنمو الخلايا السرطانية) من الدم باستخدام انزيمات الاسبارجينيز والكلوتامينيز ذو اهمية علاجية كبيرة جعلها تمتلك مجالات تطبيقية واسعة بكونها عقاقير مضادة لانواع عديدة من السرطانات مثل ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (Acute myelobastic lympholeukoses) و(Acute myelomonocytic leukemia) و (Non-Hodgkin`s lymphoma) فضلا عن استخدامه في علاج احد نواع الاورام الجلدية الناتجة بفعل الاصابة بالفايروس Epstein-Barr virus(8 و9). ولاجل تقليل التاثيرات الجانبية (السمية) عند استخدام هذه الانزيمات في العلاج فقد فضل الباحثون الى تقييد الانزيم بطرائق متنوعة مثل الترابطات العرضية (cross linking) والادمصاص الفيزيائي على اسطح الدعائم (physical adsorption) والربط الايوني(Ionic binding) والربط التساهمي (covalent binding) وطرائق الحجز في الهلام (gel entrapment) والحجز بالجينات الصوديوم sodium alginate (entrapment) (10)، وتتاتي اهمية هذه الطرائق في تقييد الانزيم لاجل زيادة ثباته تجاه الظروف المتطرفة من الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة مع احتفاظه بفعاليته العالية كعامل مضاد للتسرطن مقارنة مع الانزيم الحر . وتشير الادبيات العلمية الى الربط التساهمي للاسباراجينيز المنقى من البكتريا E.coli على الاسطح الخارجية للالياف المجوفة المكونة لجهاز تنقية الدم Hemodialyzer لغرض عزل الانزيم عن الجهاز المناعي للجسم (11).كما تم ربط الانزيم تساهميا مع الكلايكول متعدد الاثيلين لتكوين المعقد PEG-L-asparaginase حيث احتفظ الانزيم المقيد بزيادة في عمر النصف half-life في مصل الدم مع انخفاض ردود الفعل المناعي تجاهه مما يزيد من فرصة فعالية العقاقير على الاورام السرطانية (12). ان تحديد الصفات او الثوابت الحركية لاي انزيم يساعد على فهم الية تنظيم المسارات الحيوية داخل الخلية كما تعطي مؤشرا واضحا على تركيز المركبات الايضية في الخلية الحية (2).لقد اثبتت الدراسات المتعلقة بهذا الخصوص وجود تفاوت في قيم ثابت ميكاليس Kmوالسرعة القصوى Vmax والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة لفعالية وثبات انزيم الاسباراجينيز الحر والمقيدوذلك تبعا لكل من مادة التفاعل ومصدر الانزيم ،حيث بلغت قيمة Km و Vmax للانزيم المنقى من بكتريا Erwinia carotovara بـ 1×10^{-4} مولار و0.9 مايكرومولار/دقيقة ،على التوالي تجاة الاسباراجين كمادة تفاعل كما كانت قيمة Km بحدود 3.5×10^{-3}مولار للاسبرجينيز 1 المنقى من بكتريا E.coli k12 (13). فيما سجلت قيم Km لانزيم الاسباراجينيزالمنقى من مصل خنازير غينيا بحدود 3.2×10^{-5} مولار باستخدام الاسباراجين كمادة تفاعل (3). واظهر الانزيم المنقى من البكتريا *P.acidovarons* تفاعلا تجاه مادة الاسباراجين لثابت ميكاليس مقداره 1.5×10^{-5} مولار(13).ولقلة الدراسات المحلية حول تقييد هذه الانزيمات المهمة علاجيا فقد هدف البحث الى اختبار بعض الطرائق الكفؤة في تقييد انزيم الاسباراجينيزالمنقى من العزلة المحلية لبكتريا *P.aeurginosa* وتحديد الصفات الحركية له مقارنة مع الانزيم الحر.

طرائق العمل

مصدر الانزيم

استخدم في هذه الدراسة انزيم الاسباراجينيز المنقى من العزلة المحلية *P.aeruginosa* وكانت فعاليته الانزيمية 10.7 وحدة/مليليتر والفعالية النوعية 17.5 وحدة/ملغم بروتين.

- تحضير الانزيم المقيد

- الحجز بواسطة متعدد الاكريل امايدوالجينات الصوديوم والاكار

تم مزج 3 مليليتر من الانزيم المنقى المحضر (بنسبة 6 ملغم من الانزيم :3 مليليتر من دارئ الترس(Tris-HCL) بتركيز 50 ملي مولار ورقم هيدروجيني 8)مع 15 مليليتر لكل من متعددالاكريل امايد 7.5%المحضر تبعا لطريقة Carfin (14) او الجينات الصوديوم 4%او الاكار 2.5%المعقم بالموصدة والمبرد لدرجة 45 م° تبعا لطريقة Dronawat وجماعته (15) صبت مخاليط الانزيم المنقى مع كل من مواد التقييد (متعدد الاكريل امايدوالاكار)على شرائح زجاجية (stab gel)،بعدها قطع الهلام المتصلب الى مكعبات صغيرة بحدود 3 ملم^3 وتحت ظروف معقمة .اما خليط الانزيم مع الجينات الصوديوم فقد تم سكبه بشكل قطرات من خلال محقنة طبية معقمة وبقطر 3 ملم فوق اناء يحتوي على كلوريد الكالسيوم (Cacl2) بتركيز 1%المبرد لتتصلب بشكل حبيبات كروية بيضاء من الجينات الكالسيوم .غسلت المكعبات الصغيرة من هلام الاكريل امايد والاكاروحبيبات الجينات الصوديوم بدارئ الترس لاجل حساب النسبةالمئوية للوحدات الانزيمية المرتبطة بهذه الدعائم (matrix).

- الربط العرضي بواسطة الجيلاتين المعامل بالكلوترالديهايد

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Shora (16) في تقييد الاسباراجينيز بالربط العرضي (cross-linking) بواسطة الكلوترالديهايد .اذيب حوالي 1.13 غم من الجيلاتين (gelatin powder) في 15 مليليتر من دارئ الترس بتركيز 50 ملي مولار ورقم هيدروجيني 8 وتم تسخين الخليط في درجة حرارة 50 م° لمدة 5 دقائق لاكمال الاذابة للجيلاتين . برد الخليط واضيف اليه 3 مليليترمن محلول الانزيم المنقى ثم مزج جيدا واضيف له المركب الكلوترالديهايد بنسبة 0.6%.حرك الخليط بثبات في درجة حرارة 28 م° ثم صب على لوح زجاجي وترك لمدة 18 ساعة بدرجة حرارة 4 م° لاكمال التقييد للانزيم ،بعدها قطع الى قطع صغيرة وغسلت بالدارئ نفسه لاجل حساب النسبة المئوية لوحدات الانزيم المقيدة.

- تحضير معقد DEAE-cellulose-asparaginase

قيد الاسباراجينيز بالمبادل الايوني DEAE-cellulose- باضافة 10 مليليتر من المحلول الانزيمي المنقى (المحتوي على 6 ملغم من الانزيم) الى 4 غم من الوزن الرطب للمبادل الايوني والمنشط تبعا لطريقة Whitaker و Bernard (17) في رقم هيدروجيني 8. حرك الخليط لمدة 60 دقيقة في درجة حرارة 25 م°، ثم رشح الخليط خلال ورقة ترشيح Whatman No.1 باستعمال مضخة تخلخل الضغط (Vaccum pump) وغسل بكمية من دارئ الترس وحسبت النسبة المئوية للوحدات الانزيمية المرتبطة بالمبادل الايوني.

- تقدير فعالية الاسباراجينيز الحر والمقيد

قدرت فعالية الاسباراجينيز الحر والمقيد تبعا لطريقة النسلرة المباشرة والموصوفة من قبل Mori وجماعته (10) من طريق حساب تركيز الامونيا المتحررة بفعل الانزيم باستعمال كاشف نسلر ومادة التفاعل L-asparagin المحضرة بتركيز 0.1 ملي مولار في دارئ الترس بتركيز 0.1 مولر ورقم هيدروجيني 8 وبالاعتماد على المنحنى القياسي للامونيا،حيث حضن الخليط المتكون من مادة التفاعل والانزيم الحر والمقيد بدرجة حرارة 37م° لمدة 30 دقيقة ثم اوقف التفاعل بحامض الخليك ثلاثي الكلور TCA بتركيز 1.5 مولر. بعدها نبذ الخليط بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة واهمل الراسب المتكون ونقل المحلول الرائق الى انابيب اختبار نظيفة لتقدير محتواه من الامونيا لحساب فعالية الاسباراجينيز .

تعرف وحدة الانزيم : بانها كمية الانزيم اللازمة لتحرير مايكرومولر من الامونيا خلال دقيقة واحدة تحت ظروف التجربة.

- تقدير تركيز البروتين

حسب تركيزالبروتين حسب طريقة Bradford (18) باستعمال صبغة الكوماسي الزرقاء coomassie brilliant blue G- 250 وبالاعتماد على المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري (BSA).

- تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الاسباراجينيز الحر والمقيد

حضرت مادة التفاعل L-asparagine بتركيز 0.1 ملي مولارعند قيم من الارقام الهيدروجينية 4.0–6.0 باستعمال خلات الصوديوم والترس للقيم الهيدروجينية 6.5–9.0وبتركيز 0.1 مولار ثم اضيف الانزيم الحر والمقيد وقدرت الفعالية الانزيمية بطريقة النسلرة (المذكورة سابقا).رسمت العلاقة بين الفعالية الانزيمية مقابل الرقم الهيدروجيني لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم .اما لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم الحر والمقيد فقد تم حضن كل من الانزيم الحر والمقيد في قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4.5–9.0) (المحضرة سابقا) لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 م° ثم بردت العينات مباشرة في حمام ثلجي ، بعدها قدرت الفعالية الانزيمية باستعمال مادة التفاعل المحضرة عند الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية لكل من الانزيم الحر والمقيد لاجل حساب الفعالية المتبقية%.

– الثبات الحراري للاسباراجينيزالحر والمقيد

حضنت الانابيب الحاوية على كل من الانزيم الحر والمقيد بدرجات حرارية مختلفة 25–60 م°لمدة 30 دقيقة .ثم بردت الانابيب مباشرة في حمام ثلجي بعدها قدرت الفعالية الانزيمية تبعا للطريقة المذكورة سابقا ثم رسمت العلاقة البيانية بين الفعالية المتبقية % لكل من الانزيم الحر والمقيد بدلالة درجات الحرارة المختلفة.

– تقدير قيم Km و Vmax للاسباراجينيز الحر والمقيد

حضرت مادة التفاعل L-asparagine بتراكيز شملت (0 و0.15 و0.2 و0.3 و0.4 و0.5 و1.0 و1.25 و1.5 و2.0)× 10^{-4} مولار في دارئ الترس بتركيز 0.1 مولر وتم حساب قيم السرعة الاولية (v_o) للتفاعل ورسمت العلاقة بين مقلوب السرعة الاولية للتفاعل $1/[v_o]$ مقابل مقلوب تركيز مادة التفاعل $1/[S_o]$ لاستخراج قيم Km و Vmax تبعا لطريقة لاينويفر–بيرك (Lineweaver-Burk reciprocal plot).

– تحديد تخصص الاسباراجينيز تجاه مواد التفاعل المختلفة

حضرت مواد تفاعل متنوعة شملت L-asparagine و D–asparagine و L-glutamine وD–glutamine و L-aspartic acid و L–glutamic acid بتركيز 0.1 ملي مولارلكل منها في دارئ الترس بتركيز 0.1 مولار وتم تقدير الفعالية الانزيمية للاسباراجينيز الحر والمقيد تبعا للطريقة المذكورة سابقا لتحديد تخصص الانزيم تجاه مواد التفاعل.

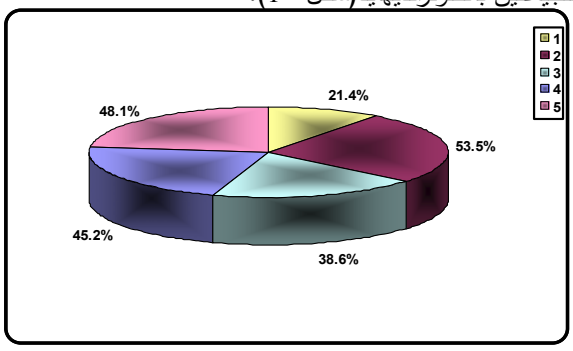
– الثبات الخزني لانزيم الاسباراجينيز الحر والمقيد

حفظت كميات من الانزيم الحر والمقيد في درجة حرارة 4م°لمدة 4 اسابيع وتم متابعة فعالية الاسباراجينيز كل اسبوع لاجل حساب الفعالية المتبقية %للانزيم الحر والمقيد.

النتائج والمناقشة

– كفاءة دعائم تقييد الاسباراجينيز المنقى من *pseudomonas aeurginosa*

اختبرت خمسة دعائم لتقييد الاسباراجينيز المنقى من العزلة المحلية *Pseudomonas aeruginosa* شملت الحجز في الاكار 2.5% ومتعدد الاكريل اميد 7.5% والجينات الصوديوم 4%والربط الايوني DEAE-cellulose والربط العرضي للجيلاتين بالكلوترالديهايد(شكل –1).



شكل 1 : كفاءة دعائم تقييد الاسباراجينيز المنقى من العزلة المحلية *Psudomonas aeurginosa*.

1:الحجز بالاكار .

2:الربط العرضي للجيلاتين المعامل بالكلوترالديهايد .

3:الحجز بالبولي اكريل اميد.

4:الربط الايوني بالمبادل الايوني DEAE-cellulose .

5:الحجز بالجينات الصوديوم

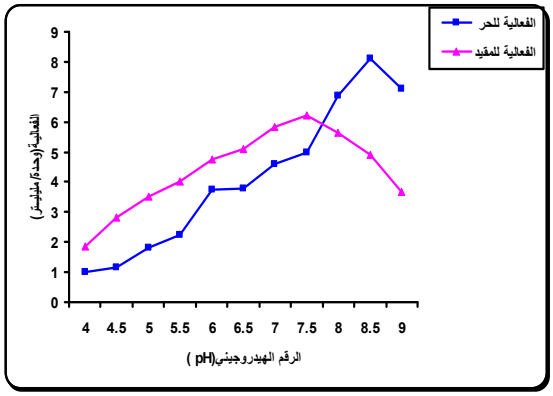
اظهرت النتائج كفاءة طرائق الربط العرضي للجيلاتين المعامل بالكلوترالديهايد والحجز بالجينات الصوديوم والربط الايوني بالمبادل DEAE-cellulose حيث احتفظ الاسباراجينيز المقيد بحوالي 53.5%و48.1%و45.2%من فعاليته الاصلية وعلى التوالي . كما احتفظ الانزيم المقيد بهلام الاكريل اميد بـ38.6% من فعاليته الاصلية بينما تميز هلام الاكار بضعف قدرته على حجز الانزيم حيث احتفظ

بحوالي 21.0% من فعاليته الاصلية .تشير الادبيات العلمية الى وجود تفاوت في كفاءة دعائم التقييد المستعملة في تقييد الانزيمات تبعا الى نوعية هذه الدعائم اذ ابدت طريقة الربط العرضي بالجيلاتين المعامل بالكلوترالديهايد كفاءة عالية في ربط الانزيم مع سهولة انتشار مواد التفاعل والنواتج خلالها (16) كذلك اتصفت طرائق التقييد بالجينات الصوديوم وهلام الاكريل امايد بكفاءتها في احتجازالانزيمات كونها ذات مسامية جيدة وثباتية عالية عند الاستخدام (19،20).ويمكن ان يعود انخفاض النسبة المئوية للفعالية المتبقية للاسباراجينيز المقيد بالاكار الى ضعف تماسك الهلام لاحتجاز الانزيم وسهولة انحلاله وتفككه وذائبيته العالية اثناء تقييد واستخدام الانزيم .سجل Mori (10) النسبة المئوية لاحتفاظ الاسباراجينيز المنقى من البكتريا *Proteus vulgaris* بحوالي 32%من فعاليته الاصلية عند حجزه في هلام الاكريل امايد وفي دراسة اخرى احتفظ الانزيم بحوالي 62.5%عند تقييده في جزيئات صغيرة من silk sericin prtein بواسطة الكلوترالديهايد(21). بناءا على النتائج المستحصلة فقد اعتمدت طريقة الربط العرضي بالجيلاتين باستعمال الكلوترالديهايد في التجارب اللاحقة لتحديد الصفات الحركية للاسباراجينيز المقيد مقارنة مع الانزيم الحر.

الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم الحر والمقيد

تبين النتائج الموضحة في الشكل (2) تاثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني في فعالية الاسباراجينيزالحر والمقيد ولوحظ تغيرا في قيمة الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الاسباراجينيز المقيد 7.5 مقارنة مع قيمته للانزيم الحر(PH=8.5) .

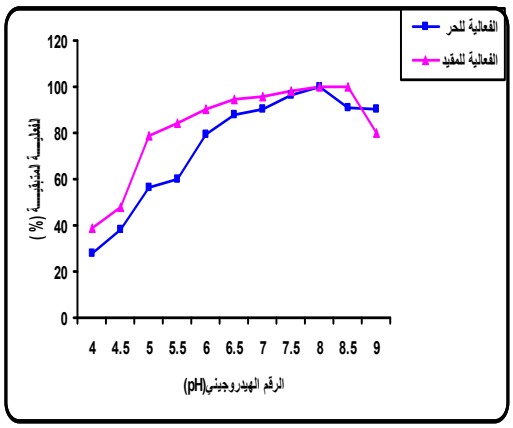
كذلك ابدى الانزيم المقيد فعالية جيدة عند القيم المتعادلة والقريبة من المتعادل (6.0،6.5،7.0،7.5،8.0،8.5،9.0) مع انخفاض ملحوظ عند الرقم الهيدروجيني 4.0 بفعالية انزيمية مقدارها 1.86 وحدة/مليليتر.ان هذه القيمة للرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الاسباراجينيز المقيد تشجع على استعماله العلاجي في اختزال تركيز الاسباراجينيز من مصل الدم ذي الرقم الهيدروجيني القريب من المتعادل (7.4).يعتمد تاثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الانزيم على تاثيره في تاين كل من جزيئات الانزيم ومادة التفاعل (17) وتتفاوت هذه القيمة باختلاف مصدر الانزيم ومادة التفاعل حيث اشار Mesas وجماعته (22)ان الاسباراجينيز المنقى من خلايا *Corynebacterium glutamicum* يكون فعالا عند الرقم 7.0–8.0 مع انخفاض واضح عند الرقم 6.0 بينما في دراسة اخرى بلغ الرقم الهيدروجيني الامثل للاسباراجينيز المنقى من خلايا *Enterobacter cloacae* بحدود 8.5 (23). وتميز الاسباراجينيز المنقى من بكتريا *P.acidovorans* بفعالية جيدة عند مدى واسع من الرقم الهيدروجيني وبشكل امثل عند الرقم 9.5 (24).



شكل 2 : تاثيرقيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4–9) في فعالية الاسباراجينيز الحر و المقيد.

الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الاسباراجينيزالحر والمقيد

ابدى الاسباراجينيز المقيد ثباتا عاليا في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني (6.0–8.5) حيث احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 8 و 8.5 وبحوالي 80%من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 5.0 و9.0 ، مع انخفاض واضح في الفعالية الانزيمية عند الرقم 4.0 اذ فقد حوالي 60% من فعاليته عند هذه القيمة شكل(3).

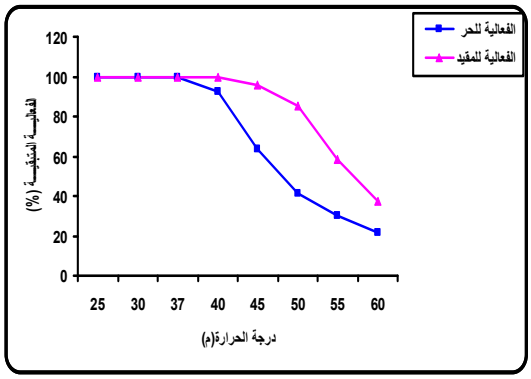


شكل 3 :ثباتية الاسباراجينيز الحر والمقيد عند قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4–9).

اما النتائج المتعلقة بالانزيم الحر فقد لوحظ ان الانزيم قد احتفظ بفعالية عند الرقم 7.5 و8.0 مع انخفاض واضح بفعاليته عند الرقم الهيدروجيني 4.0 حيث فقد حوالي 72.5%من فعاليته .يعد ثبات الانزيم تجاه مدى واسع من الرقم الهيدروجيني مهما في تحديد المحلول الملائم لخزن الانزيم وان لقيم المتطرفة من الرقم الهيدروجيني قد يؤثر سلبا ويؤدي الى مسخ الانزيم لاعكسيا (irreversible denaturation).سجلت الدراسات السابقة المتعلقة بهذ الانزيم بوجود تفاوت في ثبات الانزيم تجاه الرقم الهيدروجيني حيث وجد ان انزيم الكلوتامينيز–اسباراجينيز المنقى من خلايا *Pseudomonas boreopolis* 526 قد امتلك فعالية عالية عند قيم الرقم الهيدروجيني الاعلى من 5.0 ويفقد حوالي 24% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 4.0(24).

الثبات الحراري للاسباراجينيز الحر والمقيد

لقد ابدى الاسباراجينيز المقيد ثباتا واسعا عند حضنه في درجات حرارة بين 25–50م° لمدة 30 دقيقة مقارنة مع الانزيم الحر (شكل–4).حيث احتفظ الانزيم المقيد بكامل فعاليته عند درجات حرارة 25–45م°كما احتفظ بحوالي 85%من فعاليته عند حضنه في درجة 50م°لمدة 30 دقيقة فضلا عن ذلك فقد لوحظ انخفاض في فعالية الانزيم عند حضنه بدرجة 60م°حيث فقد حوالي 72.5% من فعاليته عند هذه الدرجة .وتشير النتائج (شكل –4)الى احتفاظ الانزيم الحر بفعاليته عند الدرجات 25–37م°واحتفظ بحوالي 21.6%من فعاليته عند درجة 60م°. ينحصر تاثير درجات الحرارة العالية في فعالية الانزيمات على كسر الاواصر المسؤولة عن المستويات التركيبية (الثانوي والثالثي والرابعي)للانزيم مسببا المسخ وفقدان الفعالية (17).وتعد صفة الثبات الحراري للانزيم مهمة عند الاستخدام العلاجي حيث يفضل احتفاظ الانزيم بكامل فعاليته خلال فترة عمله في تحليل الاسباراجين في مصل الدم . تختلف هذه النتائج قليلا عن المثبتة في دراسات اخرى حيث سجل Davidon وجماعته (13)الثبات الحراري للاسبارجينيز المنقى من خلايا *Pseudomonas acidovorans* اذ احتفظ بحوالي50%من فعاليته عند حضنه لمدة 10 دقائق في درجة حرارة 50م°،بينما ذكر Kitto وجماعته (25) ان الاسباراجينيز A قد احتفظ بـ 70% من فعاليته عند حضنه في 60م° لمدة 10 دقائق. تميز الاسبارجينيز Π المنقى من خلايا Rhizobium elti بكونه حساس حراريا (thermolabile) اذ يفقد 50%من فعاليته عند حضنه بدرجة 50م°لمدة 11 دقيقة بينما تميز نظيره الاسباراجينيز 1 بثباته الحراري (thermostabl) تحت الظروف نفسها (26)،وفي دراسة اخرى وجد ان الاسباراجينيز المقيد في silk sericin protein بالكلوترالديهايد قد ازداد ثباته الحراري عند درجات حرارة 40–50م°مقارنة مع الانزيم الحر (21).

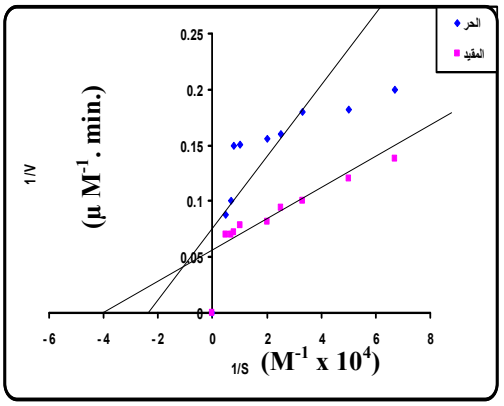


شكل 4 : الثبات الحراري للاسباراجينيز الحر والمقيد عند درجات حرارة مختلفة (25–60)م°.

تقدير قيم Km و Vmax للاسباراجينيز الحروالمقيد

يبين الشكل(5) العلاقة بين مقلوب تركيز مادة التفاعل 1/[s◦] ومقلوب السرعة الاولية 1/[v◦] للاسباراجينيزالحر والمقيد معبرا عنها بطريقة لاينويفر–بيرك (Lineweaver-Burk reciprocal plot) وتشير النتائج ان قيمة ثابت ميكاليس Km والسرعة القصوى للانزيم المقيد بحدود 0.46 ×10^{-4} مولار و12.2مايكرومولار/دقيقة،على التوالي .بينما بلغت هذه القيم للانزيم الحر بحدود 0.25 ×10^{-4} مولارو 16.7 مايكرومولار/دقيقةعلى التوالي ، بالرغم من ارتفاع قيم Km للانزيم المقيد مقارنة مع قيمته للانزيم الحر الا ان الاسباراجينيز الحر والمقيد قيد الدراسة يمتلكان الفة عالية تجاة مادة التفاعل L-asparagine مما يجعله مهما للاستعمال العلاجي كمواد مضادة للتسرطن . ان هذه النتائج متقاربة مع القيم المستحصلة في دراسات سابقة حيث كانت0.41× 10^{-4} مولار للاسباراجينيز المنقى من مصل خنازير غينيا بينما كانت بحدود3.2 ±0.3× 10^{-3} مولار للانزيم المنقى من المصدر ذاته (3). وفي دراسة اخرى (22) سجلت قيم Km للاسباراجينيزالمنقى من خلايا بكتريا *Corynebacterium glutamicum* و *Vibrio succinogenes* بـ 2.5 ×10^{-3} مولار و 1.7 ×10^{-5} مولار على التوالي، بينما بلغت قيمة Km للانزيم المنقى من بكتريا.

Pseudomonas acidovorans بحدود 1.5×10^{-5} مولار تجاه مادة التفاعل الاسباراجين فضلا عن امتلاكه فعالية تجاة الكلوتامين بثابت ميكاليس مقداره 2.2×10^{-5} مولار (1). بينما وجد ان قيمة Km للاسباراجينيز المقيد بجزيئات silk sericin protein بواسطة الكلوترالديهايد قد انخفضت بحوالي 8 مرات عن قيمته للانزيم الحر.



شكل 5: العلاقة بين مقلوب تركيز مادة التفاعل [1/s_o] ومقلوب السرعة الاولية [1/v_o] للانزيم الحر والمقيد بطريقة لاينويفربيرك.

التخصص الحيوي للاسباراجينيز المقيد تجاه مواد التفاعل المختلفة

اختبرت فعالية الاسباراجينيز المقيد تجاه ست مواد تفاعل متنوعة بتركيز 0.1 ملي مولار لاجل تحديد التخصص الحيوي للانزيم المقيد جدول(1).

جدول 1: التخصص الحيوي للاسباراجينيز المقيد تجاه مواد تفاعل مختلفة.

مواد التفاعل(0.1 ملي مولار)	الفعالية المتبقية %
L-asparagine	100
L-glutamine	64
D-asparagine	1.7
D-glutamine	0.5
L-aspartic acid	6.5
L-glutamic acid	4.3

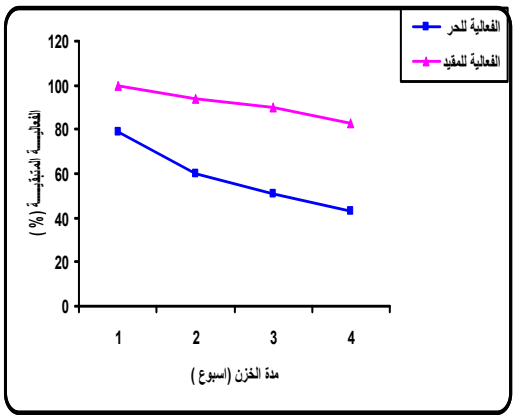
تبين ان الاسباراجينيز المقيد له الفة عالية تجاه مادة التفاعل L-asparagine بفعالية متبقية 100% وبنسبة اقل تجاه L-glutamine بفعالية متبقية 64% نسبة الى تحليل L-asparagine. كما تميز الانزيم المقيد بانخفاض قدرته على تحليل الحوامض الامينية الاخرى (L-aspartic acid , L-glutamic acid , D-asparagine , D- glutamine) حيث لم تتجاوز النسبة المئوية للفعالية المتبقية عن 6.5%.ان تباين فعالية الاسباراجينيز المقيد تجاه مواد التفاعل قيد الدراسة يمكن ان يعود الى التخصص الفراغي ثلاثي الابعاد لكل من مادة التفاعل والموقع الفعال للانزيم الذي يجب ان يكون في هيئته المثلى لاجل نجاح خطوتي الارتباط والحفز لتحويل مادة التفاعل الى ناتج (27) .

كذلك لوحظ قدرة الانزيم على تحليل الاحماض الامينية من النوع L-configuration مثل L-asparagine و L-glutamine ومدى وجود مجموعتي free carboxyl group و α −aminogroup في الترتيب والموقع الملائم مؤديا زيادة ثبات المعقد E-complex (28) وهذه النتائج متوافقة مع ماوجده Kitto وجماعته (25) للاسباراجينيز المنقى من البكتريا *Pseudmonas geniculata* ذات التخصص العالي تجاه مادتي التفاعل L-asparagine و L-glutamineمقارنة مع الحوامض الاخرى بينما اتصف الانزيم المقيد بالبولي اكريل امايد بفعالية عالية تجاه مواد تفاعل متنوعة تعود الى النوعين D و L من الحوامض الـ asparagines و glutamine و aspartic acid و glutamic acid (10).

تاثير الخزن في فعالية الاسباراجينيز الحر والمقيد

تم متابعة فعالية الاسباراجينيز الحر والمقيد خلال اربعة اسابيع في درجة حرارة 4 م° الشكل(6). وتبين ان الانزيم المقيد اكثر ثباتا عند الخزن في درجة حرارة 4م° مقارنة مع الانزيم الحر حيث احتفظ الانزيم المقيد بحوالي 90.2% من فعاليته الاصلية بعد الاسبوع الثالث بينما انخفضت هذه النسبة الى النصف للانزيم الحر.كما احتفظ الانزيم المقيد والحر بحوالي 82.5%و43.0% من فعاليته الاصلية بعد الاسبوع الرابع على التوالي. تشير الادبيات العلمية بهذا الخصوص الى تميز انزيم الكلوتامينيز–اسباراجينيز المنقى من خلايا *P.acidovorans* بالثبات الخزني العالي عند حفظه بدرجة حرارة 4 م° لمدة 3–4 اشهر(13).كما احتفظ الانزيم المنقى من البكتريا

C.glutamicum بفعاليـة كاملـة عنـد خزنـه بدرجـة –80 م° وفقدانه 50% من فعاليته بعد 5 ايام من حضنه بدرجة حرارة 4 م°(22).



شكل6 : الثبات الخزني للاسباراجينيز الحر والمقيد خلال مدة 4 اسابيع في درجة حرارة 4 م°.

المصادر

1. Swain, A. L.; Jaskolski, M.; Housset, D.; Rao,J .K . and Wlodawer, A. **1993**. Crystal Structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *proc. Natl.Acad.Sci.*USA. **90**:1474-1478.
2. Jenning, M. P. and Beacham, I. R.**1990.** Analysis of the Escherichia coli gene encoding L-asparaginase Π,ans B, and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins. *J. Bact*. **172**(3):1491-1498.
3. Zhang, N.; Clarke, F.; Trapani, G. D.; Keough, D. and Beacham, I. **1995**. Guinea pig serum L-asparaginase: Purification, and immunological relation ship to liver L-asparaginase and Serum L-asparaginases in other mammls Comp. *Biochem. Physio* l.**112B**(4): 607-612.
4. Siechiechowicz, K. and Ireland, R. **1989**. Isolation and Properties of an asparaginase from leaves of *Pisum sativum*. *Phytochem*., 28 :22751.
5. Cornea, C. P.; Lupescu, I.; Vatafu, I,; Caraiani, T.; Savoiu, V. G.; Campeanu ,G. H.; Grebenisan,I.; Negulescu, G.H.P. and Constatinescu ,D. **2002**. Production of L - asparaginase Π by recombinant *Escherichia coli* cells. *Roum. Biotecnol. Lett*. **7**(3):717-722.
6. Kim, K. W.; Kamerurd, J. Q .; Livingston, D. MandRoom , R. T. **1988**. Asparaginase Π of *Saccharomyces cerevisiae* . Characterization of the ASP3 gene. *J. Biol. Chem*. **263** (24):11948-11953.
7. Parsons, S.K.; Skapek, S.X.; Neufeld. E.J.; Kuhlman, C. ; Young, M.L. ; Donnelly, M. ; Brrunzell, J.D. ; Otvos, J.D; Sallan, S.E. and Rifai , N. **1997**. Asaragiinase- associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **89**(6): 1886-1895.
8. Krogh, C. M. E**. 1992**. Ed. *Compendium of pharmaceuticals and Specialties*, 27 th ed. ottawa: Canadian Pharmaceutical Association, P.590.
9. Obama, K.; Tara, M. and Nina, K. **1999**.L-asparaginase induced complete remession in Epstein - Barr virus, positive, multidrug resistant, cutaneous T-cell lymphoma. *Int. J. Hemato*.**69**:260-262.
10. Mori, T.; Tosa, T. and Chibata, I**. 1974**. Preparation and Properties of asparaginase entrapped in the Lattice of poolyarylamide gel. *Cancer Res.*, **34:**3066-3068.
11. Edman, P.; Nylen, U. and Sjoholm, I. **1983**. Use of immobilized L-asparaginase in Acrylic microparticles hollow-fiber dialyzer *J. pharmacol.Exp. Ther*. **255** (1):164-167.
12. Adeishvili, K. **2001**. Glycerol - Induced aggregation of the oligomeric L-asparaginase Π from *Escherichia coli* monitored with ATR-FTIR. *Int. J. Mol. Sci*. **2**:109-120.
13. Davidson, L., Bear, D. R.; Wingard, P.; Hawkins, J. and Kitto, G. B. **1977**. Purification and Properties of L-glutaminase -L-asparaginase from *Pseudomonas acidovorans. J. Bact*. **129** (3):1379-1386.
14. Garfin,D.E.**1990**. Purification Procedures: Electrophoretic methods. *In Methods In*

Enzymology. (Ed. Murray, E. D. and Deutsher, P.), **182**: 425 - 441.
15. Dronawat, S.; Svihla, C.; Hanley. I**. 1995**. *Applied Biochemistry and Bio-technology*. U. S. A. Vol.**51**, P347-354.
16. Ei-shora, H. M. **2001**. Properties and Immobilization of urease from leaves of Chenopodium album (C3). *Bol. Bull. Acad. Sin.***42**:251-258.
17. Whitaker, J. R. and Bernard, R. A.**1972**. *Experiments for An Introduction to Enzymology*. The Wibber Press. Davis.
18. Bradford, M. M. **1976.**Arapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Bioch*.**72**: 248-254.
19. Wiseman, A. **1988**. *Priciples of Biotechnology*, *Surrvey University Press.* U.S.A. 2nd ed.
20. Hall, B .M. and Loughlin, J. M. **2000**. *Immobilized cells in bioremediation* .In: *Immobilized cells.* (ed.Wijffels, R. H). pp.213-233.
21. Reports on chemical immobilization of protein and enzymes (Internet.1).
22. Mesas, J. M.; Gil, J. A. and Martin, J. F. **1990**. Characterization and partical purification of L - asparaginase from Corynebactrium glutamicum. *J. Gen. Micro*biol. **136**:515-519.
23. Nawaz, M. S.; Zhang, D.; Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. **1998**. Isolation and Characterization of Enterobacter cloacae capable of metabolizing asparaginase. *Appl. Microbiol. Biot*. **50**(5):568-572.
24. Pekhov, A. A and Zanin, V, A. **1987.** Isolation, Purification, and Stability of glutaminase - asparaginase from Pseudomonas boreopolis 526. *Priklanaya Bio- khimiyal Mikrobiolgiya***.23**(6):747-753.
25. Kitto, G. B.; Smith, G.; Thiet, T.; Mason, M. and Davidson, L. **1979**.Tumor inhibitory and non-tumor inhibitory L-asparaginase from Pseudomonas geniculata. *J. Bact*. **137**(1):204-212