Study of optimum conditions for uricase enzyme production by Pseudomonas aeruginosa

Pr. Dr. Sahib Ali Mahdi Al-Atraqchi * , Etab Abdul Ameer Al-Mosawi

***karbala'a university , college of medicine**

Abstract

The ability of 15 bacterial isolates were tested to production uricase enzyme , by using the solid and submerged culture in the primary and secondary screening .

The isolate *P.aeruginosa 7* was selected for it's best in production of enzyme . the optimum fermentation condition for uricase enzyme production by *P. aeruginosa 7* were examined . Results showed that used 0.05% syrup dates as carbon source, and used o.3% from uric as inducer , 0.75% from KH_2PO_4 , 0.1% from $Mgcl_2$.

The other optimum condition for production of uricase enzyme were selected , the optimum pH was 6.5 and incubation period was after 24 hrs. , and the optimum temperature 37 C^{O} .

However the shaking was at 150 rpm , and inoculum volume was 1 from culture volume .

دراسة الظروف المثلى لانتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *Pseudomonas aeruginosa*

أ. د. صاحب علي مهدي الاطرقجي * , عتاب عبد الامير ابراهيم الموسوي

*** جامعة كربلاء , كلية الطب , قسم الكيمياء الحياتية .**

الخلاصة

تم اختبار 15 عزلة بكتيرية لمعرفة كفاءتها على إنتاج انزيم اليوريكيز بأستخدام الأوساط الصلبة والمزارع المغمورة في مرحلتي الغربلة الأولية والثانوية , اختيرت العزلة *P.aeruginosa 7* لكونها الأفضل في إنتاج الانزيم .

حُددت الظروف المثلى لإنتاج انزيم اليوريكيز وذلك بأستخدام عصير التمر وبنسبة 0.05% كمصدر كاربوني واستخدام 0.3% من حامض اليوريك كمادة حاثة للأنزيم و 0.75% من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و 0.1% من كلوريد المغنسيوم . كما وحُددت الظروف التنموية الأخرى المثلى لإنتاج الانزيم , اذ كان الاس الهيدروجيني الامثل لإنتاج الانزيم هو 6.5 اما فترة الحضانة المثلى فتكون بعد 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ اما سرعة الرج فكانت عند 150 دورة \ دقيقة وحجم لقاح 1% من حجم الوسط.

المقدمة

انزيم اليوريكيز Uricase أو Urate oxidase [1.7.3.3] هو من انزيمات الاكسدة والاختزال يحفز اكسدة وفك حلقة البيورين لحامض اليوريك للحصول على الالنتوين , ثنائي اوكسيد الكاربون و بيروكسد الهيدروجين . وهو واسع الاستخدام في المجالات الطبية , وان حامض اليوريك هو الناتج الاكسدة النهائي لأيض البيورينات [9] . يوجد انزيم اليوريكيز في اغلب الفقريات ولكن ينعدم وجوده في الانسان , وقد وُجد لأول مرة في كبد البقر وهناك مصادر طبيعية مختلفة مثل البكتريا والفطريات والكائنات المتطورة تنتج انزيم اليوريكيز[19,15] . وأول وأهم تطبيق لانزيم اليوريكيز هو استخدامه في المجال الكيمياء السريرية كدليل تشخيصي للتقدير الكمي لحامض اليوريك في الدم والسوائل البيولوجية الاخرى[5] . ان الكائنات االمتقدمة مثل الانسان والقردة تفتقد لانزيم اليوريكيز الوظيفي وتفرز حامض اليوريك كناتج نهائي لأيض البيورينات [17] . في اغلب الأشخاص ترسب حامض اليوريك يؤدي الى ظهور اعراض داء النقرس , وان علاج داء النقرس عموماً يتضمن علاج الالوبيورينول Allopurinol الذي هو مثبط تنافسي لأنزيم االزانثين اوكسيديز xanthine oxidase الأنزيم االمسؤول على تحفيز تحول الهايبوزانثين (Hypoxanthine) الى الزانثين (xanthine) والزاثين الى حامض اليوريك وبالتالي يمنع تكوّن حامض اليوريك في الجسم . كما وقد يودي تكوّن وترسب حامض اليوريك في الجسم الى ظهور أمراض اخرى مثل تكوين الحصى الكلوية إذ تمثل الحصى المتكونة من ترسب حامض اليوريك نسبة 13% من الحصى الكلوية[11] , كما وقد يؤدي الى ظهور أمراض اخرى مثل تسببه في انسداد في الصمام القلبي وتنخر في جدار الامعاء وتكلس جلدي[21] , وإن سبب غياب انزيم اليوريكيز في جسم الانسان وبعض المتقدمات هو وجود طفرتي انهاء في الجين المسؤول عن انتاج الانزيم [15] .

يُعد انزيم اليوريكيز مهم طبياً إذ يُستخدم كعامل مهم في التقدير الكمي لحامض اليوريك في السوائل البيولوجية [20] وبالتالي تشخيص داء النقرس . اما الاستخدام الثاني هو في علاج داء النقرس الحاد والمرتبط مع الفشل الكلوي , إذ ان الحقن المباشر يؤدي الى التحطم السريع لحامض اليوريك[23].

تشير الكثير من الأدبيات العلمية الى ان انزيم اليوريكيز يُنتج من اغلب الكائنات (بدائية وحقيقية النواة) إذ يمكنها الاستفادة من حامض اليوريك وتأيضهُ كمصدر نتروجيني ومصدر للطاقة . إن مصدر انزيم اليوريكيز الاصلي هو من اللبائن ولكن البحوث الحالية تركزت على انتاج انزيم اليوريكيز من الاحياء المجهرية مثل البكتريا والفطريات[12] , ويعد انزيم اليوريكيز من الانزيمات المستحثة إذ لا يُنتج الّا بوجود المادة الحاثة له وهي حامض اليوريك[15] , ويملك انزيم اليوريكيز تخصصية عالية تجاه ركيزته (حامض اليوريك) . ان تصنيع انزيم اليوريكيز في مختلف الاحياء المجهرية يُنظم بواسطة مكونات وسط النمو وان قدرة تحطيم حامض اليوريك واستخدامهُ في النمو هو صفة استحثاثية لهذه الاحياء المجهرية[26] . ان الكثير من الباحثين قد تناولوا دراسة الظروف المثلى لانتاج انزيم اليوريكيز من احياء مجهرية مختلفة من درجة حرارة , اس هيدروجيني , مصدر كاربوني ومصدر نيتروجيني وتاثيره على تكوين انزيم اليوريكيز . وان هدف البحث تركز على :

1. غربلة العزلات البكتيرية وتحديد الاكفأ في انتاج الانزيم .
2. تحديد الظروف المثلى لانتاج الانزيم من العزلة المنتخبة.

المواد وطرائق العمل :

لاختيار العزلة البكتيرية المناسبة لانتاج الانزيم فقد تم الحصول على 15 عزلة بكتيرية معزولة محلياً من ردهات المستشفى الحسيني ومن مختبرات كلية العلوم \ جامعة الكوفة ومختبرات كلية العلوم \ جامعة بابل وللفترة من 1/3/2010 ولغاية 15/5/2010 وتعود اغلبها لبكتريا *P. aeruginosa* , حيث اجريت عليها الغربلة الكمية والشبه كميه .

الغربلة الاولية أو شبه الكمية :

تم اتباع طريقة [7] مع بعض التحويرات المتمثلة في استخدام وسط الاكار المغذي بدلاً من الوسط الانتاجي لانتاج انزيم اليوريكيز و اضافة حامض اليوريك الى الوسط بنسبة 0.3%.

الغربلة الثانوية أو الكمية :

تم استخدام وسط النمو الموصوف من قبل [23] و المتكون من 0.35% من الكلوكوز و 0.3% من حامض اليوريك و 1% من فوسفات البوتاسيوم و 0.1% من كلوريد المغنسيوم . إذ يتم تنشيط البكتريا على الوسط الانتاجي لمدة ليلة وعند درجة حرارة 37 مْ وسرعة رج 200 دورة \ دقيقة . في اليوم التالي يتم اخذ نسبة 1% من اللقاح البكتيري وتلقيح الوسط الانتاجي وتُحضن في درجة حرارة 37 مْ وسرعة رج 200 دورة \ دقيقة وبعد الحضن لمدة 24 ساعة يتم اخذ العالق البكتيري وتم عمل نبذ مبرد له في جهاز الطرد المركزي المبرد 6000 دورة \ دقيقة ولمدة 15 دقيقة . بعدها يُهمل الراسب (الكتلة الحيوية) وأُخذ الراشح الانزيمي لتقدير الفعالية الانزيمية عند الطول الموجي 293 نانوميتر و كذلك تقدير كمية البروتين .

تقدير الفعالية الانزيمية :

أُتبعت الطريقة الموصوفة من قبل[7] في تقدير الفعالية الانزيمية لانزيم اليوريكيز بالاعتماد على الانخفاض في الامتصاصية عند الطول الموجي 293 نانوميتر لعالق الركيزة بالمقارنة مع عالق مماثل خالٍ من الفعالية الانزيمية , يحتوي مزيج التفاعل على 2 مل من محلول مادة التفاعل (10 μm من حامض اليوريك لكل 1 مل من دارئ البورات 0.2 مولر) pH , و0.3 مل من الماء المقطر و 0.5 مل محلول الانزيم الخام , يُترك مزيج التفاعل لمدة 15 دقيقة وعند درجة حرارة 30 مْ لاجراء التفاعل الانزيمي ومن ثم يضاف 0.2 مل من محلول سيانيد البوتاسيوم 0.2 مولر لإيقاف التفاعل , يتم عمل معاملات قياسية بدون اجراء التفاعل الانزيمي وذلك بإضافة محلول سيانيد البوتاسيوم قبل اضافة المحلول الانزيمي كي لا يحدث اي تفاعل انزيمي ويبقى التركيز الاصلي لحامض اليوريك , سجلت قيم الامتصاصية على الطول الموجي 293 نانوميتر بعدها اخذ الفرق بين المعاملات التي حصل فيها التفاعل الانزيمي والمعاملات التي لم يحصل فيها التفاعل (التي بقت محتفظة بتركيز حامض اليوريك الاصلي) لاستخراج الفعالية الانزيمية لها . وتعرف وحدة الفعالية الانزيمية هي كمية الأنزيم اللازمة لتحول 1 مايكرومول من الركيزة الى ناتج الالنتوين Allantoin تحت الظروف القياسية .

تقدير البروتين :

تم تقدير البروتين في جميع التجارب بواسطة طريقة برادفورد و بإستخدام محلول البومين المصل البقري لعمل المنحنى القياسي للبروتين لاستخراج تركيز البروتين في المحلول الانزيمي [10] .

تعيين العوامل المؤثرة في انتاج الأنزيم :

تم دراسة تأثير عوامل عدة لتحديد الظروف المثلى لإنتاج أنزيم اليوريكيز من العزلة المحلية المنتخبة , ولقد تضمنت هذه العوامل تركيز المصدر الكاربوني والمصدر

النيتروجيني وتركيزه وكذلك مصدر الفسفور وتركيزه والملح الأمثل لإنتاج الأنزيم .

كما تم دراسة تأثير الاس الهيدروجيني الابتدائي وسرعة الرج ودرجة الحرارة وحجم اللقاح وزمن التخمر , إذ نُميت العزلة البكتيرية في وسط إنتاج أنزيم اليوريكيز وقد قيست الفعالية وتركيز البروتين كما وُضح سابقاً .

1. **تعيين التركيز الامثل للمصدر الكربوني :**

تم استخدام عصير التمر كمصدر كربوني بدلاً من الكلوكوز لتدعيم الوسط الانتاجي , إذ تم إضافة تراكيز متدرجة من عصير التمر وهي (0.15 , 0.35 , 0.55 , 0.75 , 0.05)% إلى الوسط الإنتاجي لاختيار أفضلها في إنتاج الأنزيم .

2. **تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم :**

لدراسة تأثير نوع المصادر النيتروجيني على إنتاج أنزيم اليوريكيز في الوسط الإنتاجي تم اختيار مصادر نتروجينية عدة وبتركيز 0.3% لكل مصدر كما ورد في الجدول أدناه:

ت	المصدر النيتروجيني 0.3 %	
1	$(NH4)_2SO_4$	0
2	% 0.15 $(NH4)_2SO_4$	% 0.15 Uric acid
3	NH_4CL	0
4	% 0.15 NH_4CL	% 0.15 Uric acid
5	Uric acid	0

3. **تعيين تركيز المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم :**

بعد إن تبين إن أفضل مصدر نتروجيني لإنتاج أنزيم اليوريكيز هو حامض اليوريك تم استخدام تراكيز متدرجة منهُ تراوحت بين (0.1 , 0.3 , 0.5 , 0.7 , 1) % لتحديد التركيز الأمثل لإنتاج الأنزيم .

4. **تحديد مصدر الفسفور الأمثل لإنتاج الأنزيم :**

اعتمدت ثلاثة أنواع من مصادر الفسفور بإضافتها إلى الوسط الإنتاجي بتركيز 1% كما ورد في وسط إنتاج أنزيم اليوريكيز , وهذه المصادر , هي فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين وثنائية الهيدروجين و فوسفات الصوديوم أُحادية الهيدروجين لاختيار أفضلها في إنتاج الأنزيم .

5. **تعيين تركيز مصدر الفسفور الأمثل لإنتاج الأنزيم :**

استخدمت تراكيز مختلفة من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين , وقد اشتملت التراكيز على (1.5 , 1 , 0.75 , 0.5 , 0.25) % لإختيار التركيز الأمثل لإنتاج الأنزيم .

6. **تحديد نوع الملح الامثل في إنتاج الأنزيم :**

تم اختبار أربعة أنواع من الأملاح وبتركيز 0.1 % كما هو مذكور في الوسط الإنتاجي للأنزيم وهذه المصادر هي كلوريد المغنسيوم , كلوريد الكالسيوم , كبريتات الحديد , وكبريتات المغنسيوم.

7. **الاس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم :**

تم اعتماد الوسط السائل المتكون من (0.05% من عصير التمر ؛ 0.3 % من حامض اليوريك؛ 0.75% من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ؛ 0.1 % من كلوريد المغنسيوم) كوسط إنتاجي في هذه التجربة والتجارب اللاحقة بناءً على التجارب الآنفة الذكر, وحُضر الوسط الإنتاجي هذا بأسس هيدروجينية تراوحت ما بين (5.5-7.5) وبفارق نصف درجة من وسط لأخر لتحديد الاس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم .

8. تعيين درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم :

بعد تحضير الوسط الإنتاجي وتلقيحهُ بالبكتريا تم حضن الوسط المُلقح بدرجات حرارية مختلفة ما بين (25 – 45) مْ وبفارق 5 درجات من وسط لأخر لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم .

9. تحديد تأثير سرعة الرج في إنتاج الأنزيم :

لتحديد تأثير سرعة الرج على إنتاج الأنزيم لُقح الوسط الإنتاجي بالبكتريا وتم حضن الأوساط لمدة 24 ساعة في حاضنة هزازة وباستخدام سرع رج مختلفة تراوحت بين (50 , 100 , 150 , 200) بينما تركت إحدى المعاملات في ظروف ساكنة .

10.تعيين حجم اللقاح الأمثل في إنتاج الأنزيم :

تم تلقيح الوسط الإنتاجي بحجوم مختلفة من المزروع البكتيري المنشَط على نفس الوسط الإنتاجي لاختيار أفضلها في إنتاج الأنزيم , وقد تراوحت حجوم التلقيح ما بين (0.5 , 3 , 5) 1 % من حجم الوسط وحضنت النماذج في حاضنة هزازة على سرعة رج 150 دورة \ دقيقة وبدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة .

11 . تحديد مدة الحضن المثلى لإنتاج الأنزيم :

تم متابعة إنتاج إنزيم اليوريكيز من البكتريا المنتخبة خلال فترات متباينة ولفترة يومين بسحب نماذج لتقدير الفعالية الانزيمية والبروتين خلال الفترات الآتية (6 , 9 , 18 , 21 , 24 , 30 , 36 , 42 , 48) ساعة .

النتائج والمناقشة :

أمكن إخضاع العزلات البكتيرية إلى الغربلة شبه الكمية لمعرفة ما إذا كانت هذه العزلات منتجة لانزيم اليوريكيز وذلك بتنميتها على وسط الاكار المغذي بعد اضافة حامض اليوريك إليه وبنسبة 0.3% وبعد تعقيمها وتنميه البكتريا على الوسط ولمدة 24 ساعة من الحضن ظهر تكون هالة شفافة واضحة جداً خصوصاً حول المستعمرات البكتيرية العائدة لبكتريا *P.aeruginosa* ويعتبر هذا دليل على إنتاج انزيم اليوريكيز الذي يكون إنتاجه بشكل خارج خلوي وقدرة العزلات على تحطيم حامض اليوريك شكل (1).

شكل (1) التحري عن انزيم اليوريكيز من العزلات البكتيرية بالطريقة شبه الكمية .

الغربلة الكمية

بعد ان تم اختبار قابلية إنتاج العزلات البكتيرية لانزيم اليوريكيز في الغربلة شبه الكمية , تم اختبار العزلات البكتيرية المكونة للهالة الشفافة حول المستعمرات البكتيرية وإجراء الغربلة الكمية عليها لاختيار اكفأها في إنتاج انزيم اليوريكيز وذلك بتنميتها على الوسط الانتاجي لانزيم اليوريكيز ولمدة 24 ساعة , ولقد أظهرت النتائج المستحصلة والمبينة في الجدول (1) أن العزلات البكتيرية لها القدرة على إنتاج الانزيم وبدرجات متفاوتة وان العزلة *P.aeruginosa 7* قد تميزت بكفاءتها العالية لإنتاج انزيم اليوريكيز اذ بلغت الفعالية الانزيمية (1.9) وحدة \ مل , أما الفعالية النوعية فقد بلغت 17.59 وحدة \ملغم بروتين , بينما تراوحت الفعالية الانزيمية

للعزلات البكتيرية الأخرى ما بين (0.3 – 1.7) وحدة \ مل في حين أن الفعالية النوعية فهي قد تراوحت بين (15.178 – 1.99) وحدة \ ملغم بروتين وفي ضوء هذه النتائج اختيرت العزلة *P.aeruginosa 7* كمصدر لإنتاج انزيم اليوريكيز كونها أكفاء العزلات المستخدمة .

إن قابلية الاحياء المجهرية لإنتاج الإنزيمات تتباين تبعاً لاختلاف سلالات تلك الاحياء المجهرية في النوع الواحد وفي الأنواع المختلفة والظروف المستعملة للإنتاج , كما وتختلف الإنزيمات في موقعها فمنها ما يعمل داخل الخلية وأخرى خارج الخلية كما وان بعضها ما يكون مستحثاً ومنها ما يكون أصيلا . كما ان الوسط المستخدم في عملية الغربلة هذه مناسباً لتحديد قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج انزيم اليوريكيز , كما وتشير المصادر العلمية الى ان الوسط يعد عاملاً مهماً في تحديد نمو الكائن المجهري وزيادة الإنتاج وتحسين نوعيته [(1)] .

جدول (1) الغربلة الكمية للعزلات البكتيرية المنتجة لانزيم اليوريكيز .

العزلة	الفعالية وحدة \مل	تركيز البروتين ملغم\مل	الفعالية النوعية وحدة\ ملغم بروتين
p. aeruginosa 1	**1.115**	**0.210**	**5.309**
p. aeruginosa 2	1.570	0.276	5.688
p. aeruginosa 3	0.980	0.390	2.512
p. aeruginosa 4	1.600	0.211	7.583
p. aeruginosa 5	0.800	0.191	4.188
p. aeruginosa 6	1.200	0.231	5.194
p. aeruginosa 7	1.900	0.108	17.59
p. aeruginosa 8	1.700	0.112	15.178
***Bacillus* sp. 1**	0.400	0.132	3.030
***Bacillus* sp. 2**	0.800	0.208	3.846
***Bacillus* sp. 3**	0.900	0.200	4.500
***Bacillus* sp. 4**	1.300	0.203	6.404
***Bacillus* sp. 5**	1.600	0.235	6.808
Klebsiella pneumonia 1	0.500	0.251	1.992
Klebsiella pneumonia 2	0.300	0.105	2.857

تعيين الظروف المثلى لإنتاج انزيم اليوريكيز

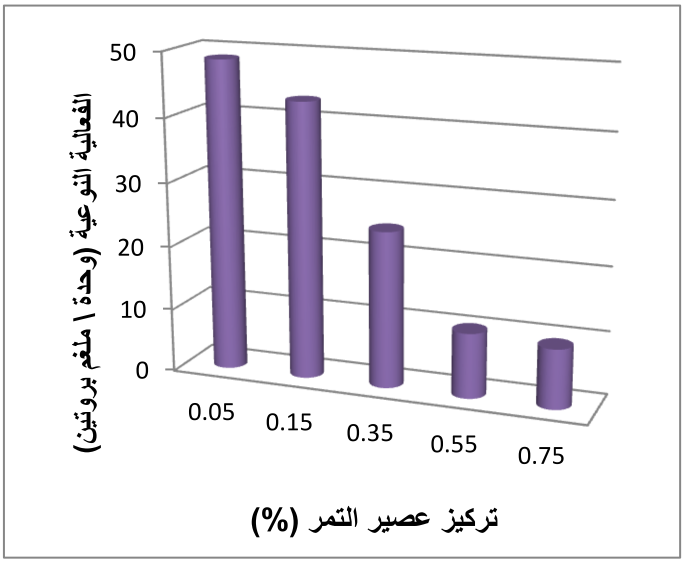
1) **تحديد تأثير تركيز المصدر الكاربوني الأمثل لإنتاج الإنزيم :**

تم اختيار عصير التمر بدلاً من الكلوكوز كمصدر كاربوني لإنتاج انزيم اليوريكيز لكونه من المصادر الرخيصة والمتوفرة محلياً , اذ تم استخدام تراكيز متدرجة منه (0.05 , 0.15 0.35 , 0.55 , 0.75) % للتحري عن التركيز الأمثل وتأثيره في إنتاج انزيم اليوريكيز , وقد أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (2) إلى ان أفضل تركيز لعصير التمر هو 0.05% (حجم \حجم) اذ بلغت الفعالية الانزيمية 3.967 وحدة\مللتر أما الفعالية النوعية فكانت قد بلغت 48.615 وحدة \ ملغم بروتين .

أما التراكيز الأخرى فقد أظهرت فعالية نوعية تتراوح ما بين (5.6 , 43.07) وحدة \ ملغم بروتين. كما أشارت دراسات عدة إلى استخدام مصادر كاربونية عدة منها الكلوكوز و مزيج الالكان n-Alkane mixture كمصدرين للكاربون فقد كان n-Alkane mixture وبنسبة 1% هو الأفضل في إنتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *Candida tropicalis*[24] , كما ذكر [6] ان أفضل مصدر كاربوني هو السكروز وبنسبة 2% عند دراسته لمصادر كاربونية عدة وتأثيرها على انتاج انزيم اليوريكيز منها (كلوكوز , فركتوز , لاكتوز , نشأ , سليلوز , كليسرول و اخيراً السكروز), كما وقد أشار [3] إلى استخدام السكروز كمصدر كاربوني عند دراستهِ لفطر *A. flavus* .

واوضح [14] عند دراسته تأثير مصادر كاربونية عدة على انتاج انزيم اليوريكيز من فطر *A. niger* اذ استخدم (السكروز , كلوكوز , فركتوز , مالتوز) فقد كان الكلوكوز أفضلها في انتاج انزيم اليوريكيز وبنسبة 3% .

كما وقد اختير أفضل مصدر كاربوني هو المالتوز عند اختبار عدد من المصادر الكاربونية اذ أعطى المالتوز اعلى انتاج لانزيم اليوريكيز من *Saccharopolyspora* Sp [18] .

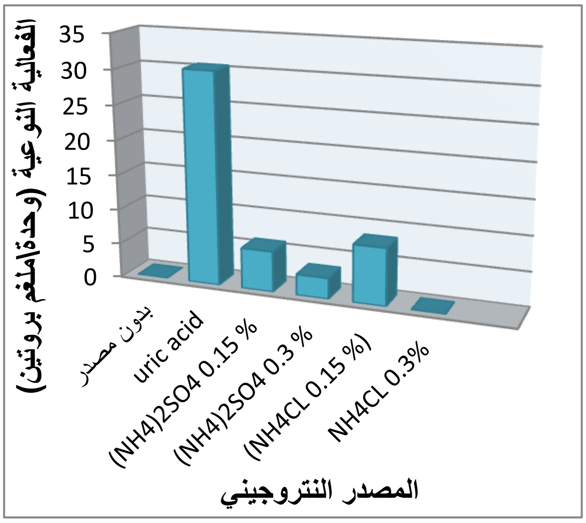


الشكل (2) تأثير تراكيز مختلفة من عصير التمر في انتاج انزيم اليوريكيز من عزله 7 *P. aeruginosa* .

2) **تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم :**

اختبرت مصادر نتروجينية عدة لدراسة تأثيرها في إنتاج انزيم اليوريكيز من بكتريا *P. aeruginosa* فقد تم استخدام خمسة مصادر نتروجينية اشتملت على (حامض اليوريك , كبريتات الأمونيوم , كلوريد الأمونيوم) بنسبة 0.3% كما وتم عمل توليفة من (كبريتات الأمونيوم , كلوريد الأمونيوم) بنسبة 0.15% ولكن بإضافة 0.15% من حامض اليوريك وبهذا يكون التركيز النهائي للمصدر النتروجيني هو 0.3% في الوسط الانتاجي لكل معاملة مع ترك إحدى المعاملات بدون مصدر نتروجيني للمقارنة وكان السبب في اختيار هذه المصادر كونها مصادر رخيصة و متوفرة محلياً وسهولة التعامل معه .

تشير النتائج التي تم الحصول عليها و المبينه في الشكل (3) الى أفضل مصدر نتروجيني هو حامض اليوريك فقد بلغت الفعالية 2.525 وحدة \مللتر , أما الفعالية النوعية فقد بلغت 30 وحدة \ ملغم بروتين وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره [14] عنده تناوله لدراسة مصادر نتروجينية وتأثيرها في إنتاج انزيم اليوريكيز المنتج من فطر *A. niger* فقد كانت أعلى انتاج عند استخدام حامض اليوريك بنسبة 0.1% اذ بلغت الفعالية 0.989 وحدة \مللتر أما [24] فقد استخدم حامض اليوريك وبنسبة 0.03% .



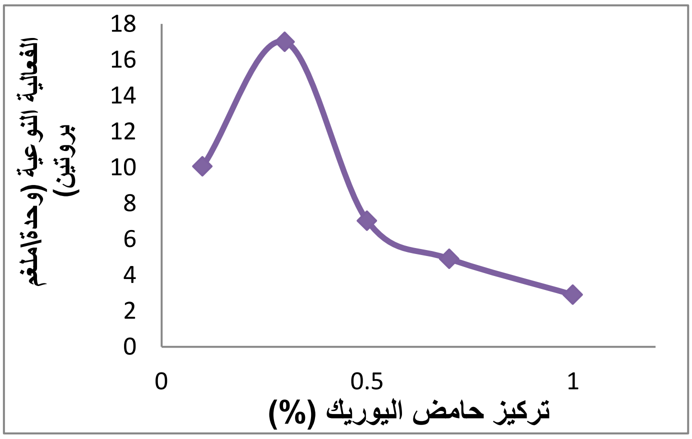
الشكل (3) : تحديد مصدر النيتروجين الأمثل لإنتاج انزيم اليوريكيز من العزلة *P. aeruginosa 7*

ويمكن تفسير هذه النتيجة بأن حامض اليوريك هو مادة حاثة لانزيم اليوريكيز اذ بدونه لا يتم إنتاج الإنزيم وعند وجوده سوف تزداد الفعالية الانزيمية .

كما تشير معظم المصادر العلمية بأن اغلب الإنزيمات التي لها تطبيقات طبية وصناعية تكون إنزيمات مستحثة تحتاج الى ضرورة وجود مواد محفزة , تكون هذه المواد عادة الركيزة التي تعمل عليها الإنزيمات في الوسط الغذائي , وان لتركيز هذه المواد اثر كبير على عملية الإنتاج الانزيمي[1] .

3) <u>تعيين التركيز الأمثل لحامض اليوريك في إنتاج الإنزيم :</u>

تم دراسة تأثير تراكيز عدة ومتدرجة من حامض اليوريك للتحري عن تأثيرها على إنتاج انزيم اليوريكيز وهذه التراكيز هي (0.1 , 0.3 , 0.5 , 0.7 , 1)% . تشير النتائج الموضحة في الشكل (4) إلى ان أعلى فعالية نوعية لانزيم اليوريكيز قد بلغت 17 وحدة \ ملغم بروتين عند استخدام نسبة 0.3% من حامض اليوريك , أما التراكيز الأخرى (1 , 0.7 , 0.5 , 0.1) % فكانت الفعالية النوعية على التوالي (2.8 , 4.65 , 7 , 10) وحدة \ ملغم بروتين . ان النتائج التي تم الحصول عليها تتوافق مع النتائج الذي حصل عليها [7] اذ أضاف حامض اليوريك كمادة حاثة وبنسبة 0.2% عند دراسته لانزيم اليوريكيز من بكتريا *P. vulgaris* بينما استخدم نسبة 0.5% من حامض اليوريك عند دراسته للإنزيم من عزلات *Streptomyces* sp. بينما استخدم نسبة 0.7% من حامض اليوريك لاستحثاث الإنزيم من الفطر *Mucor hiemalis* [27] . كما استخدم حامض اليوريك بنسبة 0.1% كمادة حاثة , من المعروف ان اضافة الركيزة الخاصة بالإنزيم المراد استخلاصه الى الوسط الغذائي للأحياء المجهرية وبتراكيز محددة يؤدي الى حث بناء الانزيم وبالتالي زيادة ما يمكن الحصول عليه من الانزيم [6] .



الشكل (4) تأثير تراكيز مختلفة من حامض اليوريك على انتاجية انزيم اليوريكيز من عزلة *p. aeruginosa* 7.

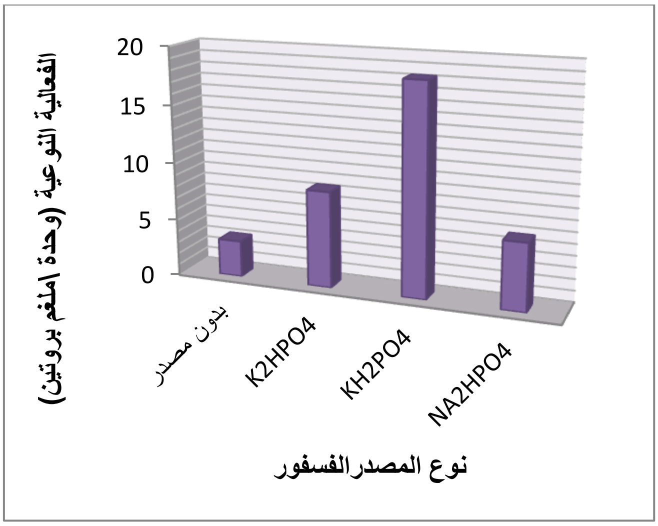
4) **تحديد المصدر الفوسفاتي الأمثل في إنتاج انزيم اليوريكيز :**

تم دراسة تاثير ثلاثة مصادر فوسفاتية لمعرفة أفضلها في إنتاج انزيم اليوريكيز , وهذه المصادر هي (فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين , فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين , وفوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين) بينما تركت احدى المعاملات بدون اضافة المصدر الفوسفاتي للمقارنة . ولقد أوضحت النتائج المبينة في الشكل (5) الى ان أفضل إنتاج لانزيم اليوريكيز يكون باستخدام فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين كمصدر للفوسفات , اذ بلغت الفعالية النوعية أقصاها (18.23 وحدة \ملغم بروتين) مقارنة مع المصادر الفوسفاتية الأخرى اذ بلغت الفعالية النوعية (8.4 , 6.86) وحدة \ملغم بروتين لكل من Na_2HPO_4 , K_2HPO_4) على التوالي.

بينما أظهرت المعاملة التي لم يستخدم فيها مصدر فوسفاتي أوطأ فعالية نوعية اذ بلغت (3.18 وحدة \ ملغم بروتين) ان هذه النتيجة تتفق مع ما أشار إليها [4] عند استخدامهم KH_2PO_4 كأفضل مصدر فوسفاتي مقارنة مع K_2HPO_4 مما يعني ان ايون الهيدروجين يلعب دوراً مهماً في توازن درجة الحموضة في الوسط الانتاجي .

أما [7] فقد استخدموا K_2HPO_4 كمصدر فوسفاتي لإنتاج انزيم اليوريكيز من جنس *Streptomyces* SP. . و تعد المصادر الفوسفاتية احد المغذيات الأساسية التي تحتاجها الأحياء المجهرية بمقادير ضئيلة للنمو وتكوين الناتج , لذلك ينبغي إضافتها الى الوسط الغذائي لتدعيمهُ . وهذا يبدو واضحاً في الحصول على أوطأ فعالية إنزيمية في المعاملة الخالية من المصدر الفوسفاتي .

تؤدي فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في الوسط الزرعي دوراً في توازن درجة الحموضة بالوسط الانتاجي كونهُ محلولاً منظماً , كما انه يعتبر مصدراً مغذياً للبكتريا بالفسفور, ولكن اغلب عمليات التأيض تكون حساسة لوجود تراكيز عالية من الفوسفات , وقد وجد أن للفوسفات دوراً تنظيمياً مهماً لعمليات التأيض الثانوي كما هو الحال في انتاج بعض الحوامض العضوية والمضادات الحيوية[1] .



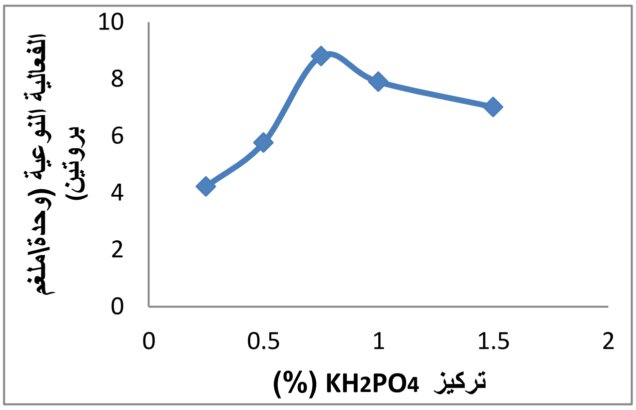
الشكل (5) تأثير أملاح الفسفور في إنتاج انزيم اليوريكيز من العزلة *P. aeruginosa* 7 .

5) **تأثير التراكيز المختلفة للمصدر الفوسفاتي في إنتاج انزيم اليوريكيز :**

بعد ان تم تحديد المصدر الفوسفاتي في إنتاج الانزيم , تم التحري عن أفضل تركيز للمصدر الفوسفاتي والذي يحدد أفضل انتاج لانزيم اليوريكيز من بكتريا *P. aeruginosa* حيث تم اختبار تراكيز متدرجة من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين تبدأ من (0.25 , 0.5 , 0.75 , 1 , 1.5) % من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين . وتشير النتائج المبينة في الشكل (6) إلى ان تركيز 0.75% من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين هو الأمثل للحصول على أعلى انتاج من الإنزيم حيث بلغت الفعالية النوعية 8.8 وحدة \ملغم بروتين جاءت هذه النتيجة قريبة مما ذكره [24] عند استخدامهِ

فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وبنسبة 0.61% كأفضل نسبة من المصدر الفوسفاتي .

أما التراكيز الأخرى (0.25 , 0.5 , 1 , 1.5) % فقد بلغت فعاليتها النوعية (4.22 , 5.76 , 7.9 , 7.01) وحدة \ ملغم بروتين على التوالي . إذ لوحظ أن زيادة تركيز KH_2PO_4 تؤدي إلى انخفاض الانتاجية و قد يعود السبب في ذلك إلى تأثيرها السمي على الخلايا عند تلك التراكيز و يأتي تأثير الفوسفات في الوسط الانتاجي سبب كونه يدخل في تصنيع بعض المركبات الخلوية مثل الاحماض النووية والدهون الفوسفاتية , تتباين الاحياء المجهرية في احتياجاتها الغذائية لكونها تختلف في مقدرتها على استهلاك وتخليق المواد المختلفة , فقد ورد ذلك في العديد من الدراسات اذ استخدمت فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وبتركيز 0.05%[16] , بينما أشارت دراسة أخرى قام بها [14] الى استخدام فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين كمصدر فوسفاتي وبنسبة 0.3%

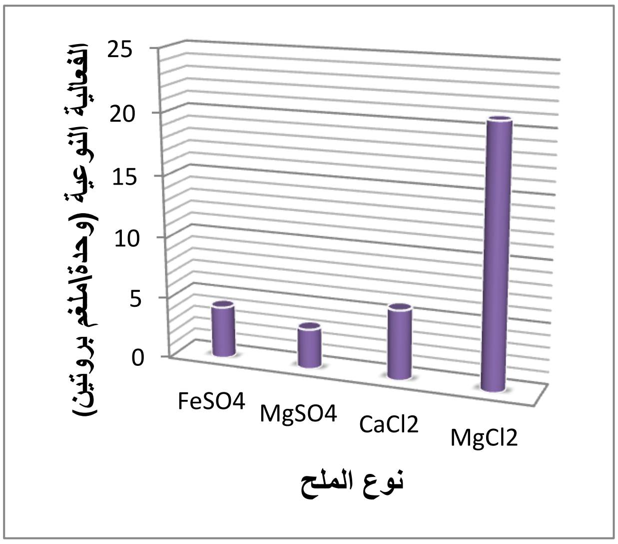


الشكل (6) تأثير تراكيز مختلفة من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين على إنتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa 7* .

6) تأثير نوع الملح في إنتاج انزيم اليوريكيز

لمعرفة دور بعض الأملاح في إنتاج انزيم اليوريكيز , تم اختيار أربعة أنواع من الأملاح وهي كبريتات الحديد وكبريتات المغنسيوم و كلوريد الكالسيوم واخيراً كلوريد المغنسيوم وبنسبة 0.1%. تشير النتائج الموضحة في الشكل (7) إلى ان اضافة 0.1% من كلوريد المغنسيوم يؤدي الى الحصول على اعلى فعالية نوعية لانزيم اليوريكيز اذ بلغت (20.9) وحدة \ملغم بروتين مقارنة بالوسط الزرعي الحاوي على 0.1% من كل من كبريتات الحديد , كلوريد الكالسيوم وكبريتات المغنسيوم فقد أعطت فعالية نوعية (4.285 , 5.757 , 3.3) وحدة \ملغم بروتين على التوالي . اذ تشير النتائج التي تم الحصول عليها بأن ايونات المغنسيوم تلعب دورا مهماً ومتميزاً في زيادة الفعالية والفعالية النوعية لانزيم اليوريكيز المنتج من بكتريا *P. aeruginosa 7* و قد أشارت بحوث كثيرة إلى أهمية الأملاح في مساعدتها للخلايا البكتيرية على إنتاج انزيم اليوريكيز فقد ذكر[6] ان كلوريد الحديد هو الأفضل في إنتاج الإنزيم اليوريكيز عند دراسته تأثير عناصر عدة في انتاج انزيم اليوريكيز .

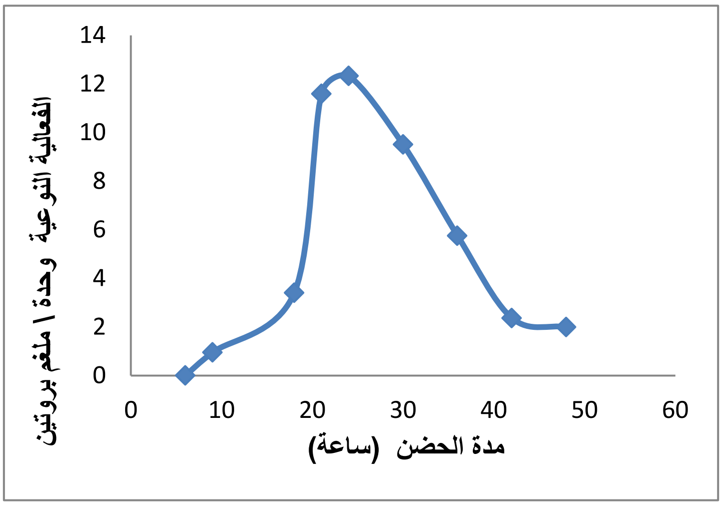
بينما [24] اختبر مصادر ملحية مختلفة ودرس تأثيرها في انتاج انزيم اليوريكيز المنتج من خميرة *Candida tropicalis* و حصل على أفضل انتاج عند استخدامه كبريتات المغنسيوم . وفي دراسة أخرى قام بها [14] فقد ذكر ان أعلى فعالية إنزيمية تمثلت عند استخدام كبريتات المغنسيوم المائية وبنسبة 0.1% لإنتاج الإنزيم من فطر *A. niger* .



الشكل (7) تأثير نوع الملح في إنتاج انزيم اليوريكيز من عزلة 7 *P.aeruginosa* .

7) <u>تأثير مدة الحضن</u>

تم متابعة إنتاج انزيم اليوريكيز المنتج من بكتريا *P. aeruginosa* لمدة يومين وذلك بسحب نموذج بفترات مختلفة تراوحت بين (3−6) ساعات لتقدير الفعالية الانزيمية والبروتين . ويُلاحظ من الشكل (8) ان إنتاج انزيم اليوريكيز يبدأ بعد تسع ساعات من التلقيح , اذ كانت الفعالية النوعية 0.95 وحدة\ ملغم بروتين ثم ارتفعت الفعالية النوعية بشكل تدريجي لتبلغ أقصاها في غضون يوم واحد أي بعد 24 ساعة لتصبح 12.32 وحدة \ ملغم بروتين , بعدها يبدأ الانتاج بالانخفاض إلى ان تصل الفعالية النوعية في اليوم التالي أي بعد 48 ساعة إلى 1.37 وحدة \ ملغم بروتين . وإستناداً الى هذه النتائج تم تثبيت أفضل فترة حضن وهي التي تتم خلال 24 ساعة حيث تم استخدامها في التجارب كافة .



الشكل (8) تأثير مدة الحضن في إنتاج انزيم اليوريكيز من العزلة 7 *p. aeruginosa* .

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره [23] اذ استخدموا فترة حضن لمدة 24 ساعة عند إنتاج انزيم اليوريكيز من بكتريا *P. aeruginosa* .

كما ذكر[22] ان حامض اليوريك يبدأ بالتحطم والاختفاء من الوسط الزرعي خلال 18 ساعة لكن يتحطم نهائياً خلال 24 ساعة . بينما ذكر [6] ان فترة الحضن المثلى لانزيم اليوريكيز من فطر *Gliomastix gueg* تكون عند ثمانية أيام .

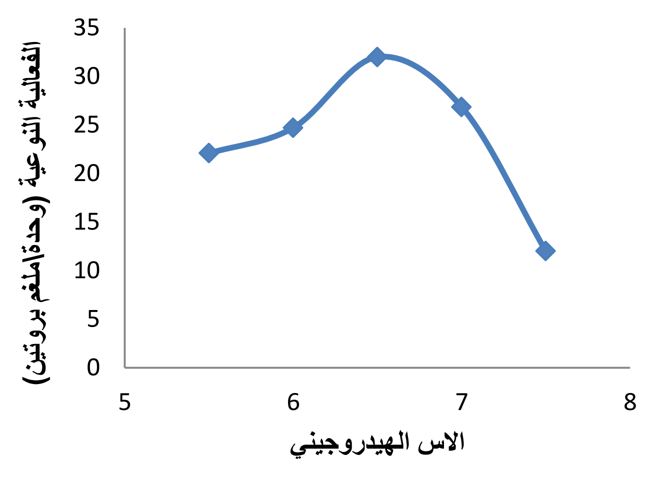
أما [3] فقد ذكر ان إنتاج الإنزيم من الفطرين *A. flavus* و *A. terreus* يكون بعد أربعة أيام و من جنس *Trichoderma* SP. بعد ستة أيام .

8) <u>تأثير الاس الهيدروجيني الابتدائي الأمثل في إنتاج انزيم اليوريكيز:</u>

تم تحضير الوسط الانتاجي المُعد لإنتاج انزيم اليوريكيز من عزلة بكتريا *P. aeruginosa* بأرقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (5.5 − 7.5) وبفارق نصف درجة لكل وسط .

يتضح من الشكل (9) إلى ان الاس الهيدروجيني 6.5 هو الأمثل في إنتاج انزيم اليوريكيز , اذ بلغت الفعالية النوعية 31.985 وحدة \ ملغم بروتين .

كما يُلاحظ ان الفعالية النوعية للإنزيم تأخذ بالازدياد من الاس الهيدروجيني 5.5 اذ كانت الفعالية النوعية 22.07 وحدة \ ملغم بروتين إلى ان تبلغ أقصاها عند الاس الهيدروجيني 6.5 ثم تبدأ بالانخفاض إلى ان تصل 11.99 وحدة \ ملغم بروتين عند الاس الهيدروجيني 7.5 .



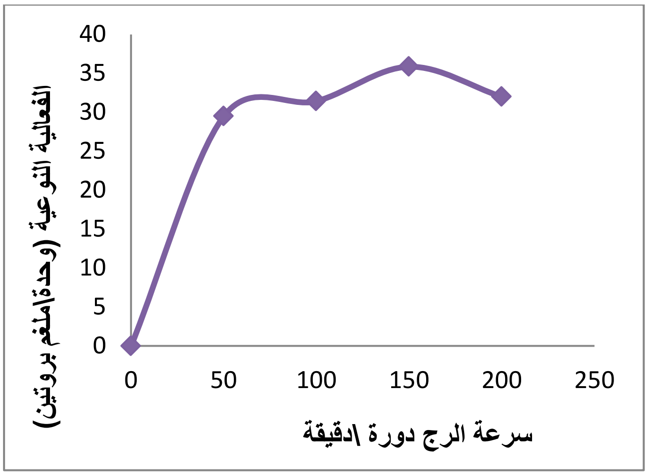
شكل (9) تأثير الاس الهيدروجيني في انتاج انزيم اليوريكيز من عزلة 7 *P. aeruginosa* .

تتفق هذه النتيجة مع ما ذكره [12] حيث ان الاس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج انزيم اليوريكيز من *Hansenula polymorpha* المهجن بجين اليوريكيز من *Candida utilis* هو عند 6.5 , كما ذكر [24] ان الاس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم من *C. tropicalis* هو 6 حصيلة النواتج النهائية لايض الاحياء المجهرية[2] , وفي دراسة أخرى فان الاس الهيدروجيني الأمثل هو 6 عند إنتاج الإنزيم من فطر *A. niger* [14] . ويعد الاس الهيدروجيني للوسط مهماً جداً لنمو الاحياء المجهرية ولتوجه ايضها , كما وتعد التغيرات في الاس الهيدروجيني مهمة جداً ايضاً لفعالية إنزيمات الاحياء المجهرية والنواتج الوسطية وعدم تحللها وذائبيتها[13] .

9) **تأثير سرعة الرج في إنتاج انزيم اليوريكيز .**

تم حضن الوسط الغذائي لإنتاج اليوريكيز في نوعين من الحاضنات هي الحاضنة الساكنة والحاضنة الهزازة بسرع رج مختلفة (50 , 100 , 150 , 200) دورة \دقيقة , و يتضح من الشكل (10) ارتفاع الفعالية الانزيمية عندما تزداد سرع الرج لتصل إلى 150 دورة \ دقيقة حيث بلغت الفعالية النوعية 35.84 وحدة \ ملغم بروتين ثم تنخفض عند سرعة الرج 200 دورة \ الدقيقة , بينما في الحاضنة الساكنة لم نلحظ أية فعالية إنزيمية , وقد يعود السبب في ذلك إلى عدم توفر التهوية اللازمة لنمو البكتريا .

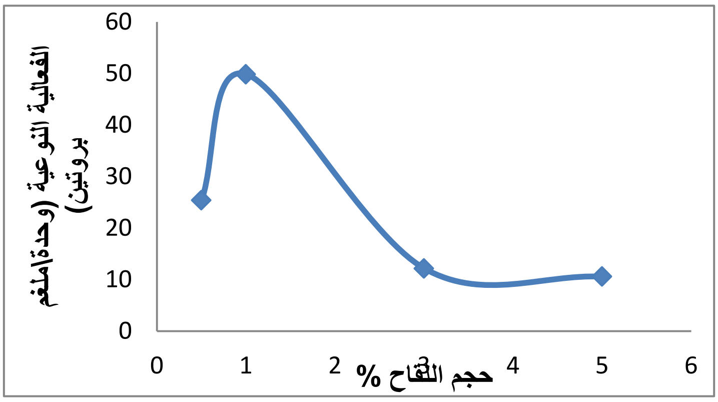
جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره [6] عند دراستهِ تأثير سرعة الرج في إنتاج انزيم اليوريكيز من فطر *G. gueg* إذ كانت أفضل سرعة رج هي عند 150 دورة \ دقيقة أما [24] فقد ذكر ان سرعة الرج هي 220 دورة \ دقيقة. تشير المصادر العلمية الى ان استخدام الحاضنة الهزازة في إنتاج الإنزيمات بواسطة الاحياء المجهرية الهوائية يسمح بالاستغلال الامثل لمكونات البيئة فضلاً عن تكوين البيئة ذات تهوية جيدة , حيث يسمح الرج أو التحريك بمزج وتجانس مكونات البيئة بشكل جيد وكفوء بحيث يستطيع الاحياء المجهرية من النمو بشكل امثل , ولكن شدة التهوية تختلف باختلاف كل من الكائن المجهري والانزيم وتقع أهمية التهوية والتحريك في هذا المضمار في حاجة الاحياء المجهرية للأوكسجين الذائب وتوزيع المادة الركيزة في وسط التنمية .



شكل (10) تأثير سرعة الرج في إنتاج انزيم اليوريكيز المنتج من العزلة *P. aeruginosa 7* .

10) **<u>تأثير حجم اللقاح في إنتاج الإنزيم</u>** :

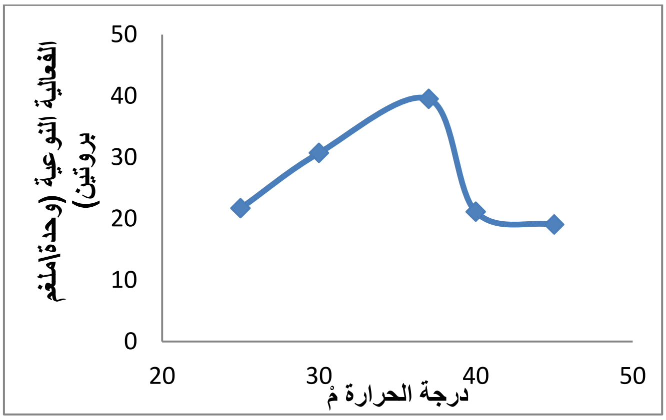
يعد حجم اللقاح مهماً في أية عملية حيوية لذا يجب إضافتها بالمستوى المطلوب الأمثل ، لذا تم تلقيح الوسط الإنتاجي لإنتاج انزيم اليوريكيز باستخدام حجوم متدرجة من اللقاح البكتيري وبنسب تراوحت ما بين (0.5 , 1 , 3 , 5) %من حجم الوسط لغرض معرفة تأثير حجم اللقاح في إنتاج انزيم اليوريكيز و تشير النتائج الموضحة في الشكل (11) إلى ان إنتاج الإنزيم قيد الدراسة يصل أقصاه باستخدام نسبة تلقيح 1%من حجم الوسط اذ بلغت الفعالية النوعية عند استخدام هذه النسبة 49.84 وحدة \ ملغم بروتين , لذا اعتمدت هذه النسبة واستخدمت في جميع مراحل الدراسة اللاحقة , توافقت هذه النتيجة مع ما استخدمهُ (Saeed *et al* , 2004) عند دراستهُ لانزيم اليوريكيز المنتج من بكتريا *P. aeruginosa* اذ استخدم نسبة تلقيح 1% من حجم الوسط . وبالرجوع الى الشكل يلاحظ انخفاض الفعالية النوعية للأنزيم باستخدام حجوم كبيرة من اللقاح وذلك لانخفاض مستوى المواد الغذائية نتيجة استخدامها لتكوين الكتلة الحيوية والنمو السريع



شكل (11) تأثير حجم اللقاح على انتاجية بكتريا *P. aeruginosa* 7 من انزيم اليوريكيز .

11) **<u>دراسة تأثير درجة الحرارة في إنتاج انزيم اليوريكيز</u>** :

لقد تم حضن الوسط الانتاجي لانزيم اليوريكيز عند درجات حرارية مختلفة ومتدرجة من (25 , 45) مْ للتحري على الدرجة الحرارية لانتاج انزيم اليوريكيز ويتضح من الشكل (12) , ان الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم هي عند 37 مْ اذ بلغت الفعالية النوعية 39.5 وحدة \ ملغم بروتين , أما الدرجات الحرارية الأخرى والتي هي (25 , 30 , 40 , 45) فقد بلغت الفعالية النوعية لهذه الدرجات , 21.1 , 19) (21.69 , 30.7 وحدة \ ملغم بروتين على التوالي .



شكل (12) تأثير درجة الحرارة في إنتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa* 7 .

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره[8] عند دراستهِ لبكتريا *Bacillus. fastidious* اذ قام بتنمية البكتريا على درجة حرارة 37 مْ لإنتاج انزيم اليوريكيز , بينما [14] ذكر ان أفضل درجة حرارية لإنتاج الإنزيم من *A. niger* عند 30 مْ .

ان سبب انخفاض الفعالية الانزيمية عند الدرجات الحرارية المتطرفة (البعيدة) عن 37 مْ يمكن ان يُعزى إلى عدم ملائمة هذه الدرجات الحرارية لنمو البكتريا لذا يتباطأ النمو ويتأثر التخليق الحيوي للإنزيم نتيجة انخفاض الحرارة بينما تقل الفعالية الانزيمية عند الدرجات الحرارية العالية ليس بسبب عدم ملائمة الحرارة لنمو الكائن المجهري وإنما قد تسبب درجة الحرارة العالية في تلف الأنزيم وبذا يفقد الفعالية الانزيمية.

الاستنتاجات :

1. كفاءة العزلة البكتيرية المحلية *P. aeruginosa 7* في انتاج انزيم اليوريكيز .
2. تم التوصل الى تحديد مكونات الوسط الغذائي الامثل في انتاج الانزيم وتحديد الظروف التنموية المثلى لانتاج الانزيم.

المصادر :

1- الخفاجي , زهرة محمود . (1990) . دار الحكمة للطباعة والنشر . الموصل .

2- الدليمي , خلف صوفي داوود . (2002) .. جامعة فيلادلفيا , عمان الأردن . المكتبة الوطنية .

3) Abd El Fattah, M. G. and Abo – Hamed, N.A. , (2002) . Acta Microbiologic and immuniligica Hungarica 49,p. 445 – 454 .

4) Abd El Fattah, Y. R. ; Saeed, H. M. ; Goher, Y.M. and El- Baz, M. A. (2005) . . process Biochemistry 40, p. 1707- 1714 .

5) Adamek, V., Kralova, B., Suchova, M., Valentova, O. and Demnerova, K. (1989) . *Journal of Chromatography* 497, 268-275.

6) Atalla, M.M ; M. M. Farag ; R. H. Eman ; M. S. Abd-El-lataif and E. A. Nehad , (2009) . Malaysian J. of microbiology , vol. 5(1) 2009, p.45-50.

7) Azab E.A. , Ali M. Magda and Fareed M. F. , (2005) . . J. of biology , 2005 , Vol. 7, p. 44 – 54.

8) Bongaerts G.P.A. and Vogels G.D. , (1975) . J. of bacteriology , 1976, p. 689-687.

9) Bertrand , K.E., N. Mathieu, G. Inocet and F.K. Honore, (2008) . Pak. J. Biol. Sci., 11:1646-1649.

10) Bradford, M. M. (1976) . Biochem . 72 : 248 -254 .

11) Cammalleri , L. and Malaguarnera ,M. , (2007) . J. Med . sci. 2007, 4 (2) : 83-93 .

12) Chen , Z. ; Wang , Z. ; He , X. ; Guo , X. ; Li , W. ; and Zhang , B. ,(2008) . appl. Microbial biotechnol (2008) 79 ; p. 545- 554.

13) Egarov , N. S. , (1985) . mir publishrs . Moscow .

14) Ertan, F. and AksÖz, E. , (2000) . J. of biology , 24 (2000) EK .

15) Farley P. C. and Santosa S. , (2002) J. of Microbiology , vol. 48, NO. 12, p. 1104- 1108 .

16) Falkinham III ,J. O. ;George, K. L. ; Parker, B. C. and Gruft ,H. , (1983) . J. of bacteriology, vol. 155, No. 1 , P. 36-39 ..

17) Friedman, T. B., Polanco, G. E. Appold, J. C. and Mayle, J. E. (1985). Comparative Biochemistry and Physiology 81B, 653-659.

18) Khucharoenphaisan, K. and Sinma K. , (2011) . J. Biological Sciences , 14(3): p. 226-231.

19) Montalbini , P. ; Redondo , J. ; Caballero , J. L. ; Cárdenas J. and Pineda , M. , (1997) . J. of planta 202 , p.277-283 .

20) Rajoka, M. I. ; Rehman, K. ; Tabish, T. and Zia, M. A. , (2006) J. of microbiology & biotechnology (2006) 22, P . 288-291.

21) Reinders, M. K. Brouwers, J. R. B. J. and Jansen, T. L. Th. A. , (2006) . Clin Rheum 2006 ; 25 : 749-52 .

22) Rouf, M. A.; F. Robert and J .R . Lomprey , (1968) . J. bacteriology , p. 617-622 .

23) Saeed H.M. ; yousry Y.A. ; Gohar M. ; and Elbaz M. A. , (2004) . journal of microbiology , vol. 53 , No 1, 45-52 .

24) Tanaka, A. ; Yamamura, M. ; Kawamoto, S.and Fukui, S. , (1977) . J. applied and environmental microbiology , vol. 34, No. 4 , pp. 342-346 .

25) Vogt B. , (2004) J. of Nephrology dialysis transplantation , vol. 20, No. 2, p. 431-433 .

26) Vogels , G. D. and Drift , C. V. D. , (1976) . American society for microbiology, Vol. 40 , No. 2 , P. 403 – 468.

27) Yazdi , M. T. ; Zarrini G. ; Mohit E. ; Faramarzi M. A. ; Setayesh N. ; Sedighi N. and Mohseni F.A. , (2005) . J. of microbiology and biotechnology . p. 325-330 .