دراسة كيموحيوية لأنزيم اليوريكيز المنتج من *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محلياً

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

عتاب عبد الأمير ابراهيم طه الموسوي

بكلوريوس علوم الحياة - جامعة كربلاء

2007

اشراف

أ . د. صاحب علي مهدي الاطرقجي

رجب 1432 هـ **حزيران 2011 م**

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ اللهُ لا إلهَ إلاّ هُوَ الحيُّ القَيّومُ لا تأخُذهُ سِنَةٌ ولا نَومٌ لهُ ما
فِي السّمَواتِ ومَا فِي الأَرْضِ مَن ذا الّذي يَشْفَعُ
عِندهُ إلّا بِإذْنِهِ يَعْلَمُ ما بَيْنَ أيدِيهِمْ ومَا خَلْفَهُمْ ولَا يُحِيطُونَ
بِشَىْءٍ مِّن عِلْمِهِ إلّا بِمَا شَآءَ وَسِعَ كُرْسِيُّهُ السّمَواتِ
وَالأَرْضَ ولَا يَؤُدُهُ حِفْظُهُمَا وهُوَ العَلِيُّ العَظِيمُ ﴾ صدق الله
العلي العظيم

(سورة البقرة – الآية – 255)

الإهـداء

إلـــى . . .

من كنت أتمنى ان أضع هذا الجهد بين يديه لأنعم بدمعتي فرحاً أبوياً تنسابان من مقلتيه

فتخضلان وجنتي بنقاء الروح وسمو العاطفة . . . . . الاّ ان الحياة اجبرتنا ان نفارق من نحب

ولكن علمتنا الأصالة ان لا ننسى من نفارق ولا في حكم الله جدال . . . والدي رحمه الله

من أوصاني بها ربي وأحبها قلبي و التي مازلت أغفو في أحضانها ، وأهدتني سنين عمرها

وغمرتني بحنانها . . . بلسم الروح ونبع الحنان الدافئ . . . والدتي رعاها الله

من بلقياهم تصفو القلوب وتمتلئ بالمودة وهم سندي وأملي بالحياة . . . إخوتي وأخواتي

من أحبهم ويسرهم نجاحي اهدي هذا الجهد المتواضع

عتاب

الشكر وتقدير

الحمدُ للهِ عددَ خلقهِ وزنةَ عرشهِ ورِضا نفسهِ وامتدادَ كلماتهِ والصلاةُ والسلامُ على خير خلقْ الله محمدٍ وآلهِ الطيبين الطاهرين وصحبهِ المنتجبين ومن والاهم بإحسانٍ الى يوم الدين ...

فمما ورد في الاثر (من لا يشكر الناس لا يشكر الله) ولأن الشكر هو سمة الأعتراف بالفضل والتعبير عما يختلج في النفس ومن دواعي الأمتنان لذا سأطيل الوقوف في مرفأ الممتنين وميدان الشاكرين .

وإن أول من يستحق ان أنحني وبتواضع وأقدم له خالص شكري ووافر إمتناني هو أستاذي الفاضل الأستاذ الدكتور صاحب على مهدي الاطرقجي الذي اقترح موضوع البحث والذي وسع أمامي آفاق البحث العلمي ، ولم يبخل عليّ بوقته ومعلوماته وملاحظاته وإشرافه الدؤوب وتوجيهاته السديدة خلال فترة العمل والكتابة بما كان له الأثر في انجاز هذه الدراسة فله مني عظيم تقديري وكبير امتناني . كما ويشرفني ان أتقدم بالشكر الجزيل الى كل من مد لي يد العون وبسخاء دون اجر ومقابل وابتدئ بعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة واخص بالذكر كل من الدكتور علي عبد الكاظم الغانمي والأستاذ عزيز ياسر العذاري والأستاذ حامد جهاد والست سند عمر الدوري الذين قد تتلمذت على أيديهم و لمساندتهم إياي وإبداء بعض الآراء في توجيه العمل . كما وأشكر طلبة الدراسات العليا وجميع منتسبي قسم علوم الحياة \ كلية العلوم وأتقدم بالشكر الوافر والتقدير المتميز للدكتور عبد الباري مهدي رئيس فرع الكيمياء الصيدلانية في كلية الصيدلة لاستقبالهِ إياي في قسمهم للعمل هناك وأقدم شكري لجميع منتسبي كلية الصيدلة وبالخصوص الست وئام علي والست ارجوان والست شيماء كما واشكر الست يسر نوري والست سعاد في قسم الكيمياء . كما واشكر مسؤول المكتبة المركزية وجميع منتسبي المكتبة المركزية في جامعة كربلاء لتقديمهم بعض التسهيلات ، وأود ان أتقدم بجليل امتناني ووافر شكري لأبي رحمه الله لانه رسم لي طريق النجاح ولأمي الغالية وجميع افراد عائلتي . واخيراً كاد القلم ان يضل في سيره لولا رعاية الله ودعوة المخلصين المحبين سائلةً المولى القدير ان يجعلهم جميعاً في حفظه ورعايته انه سميع الدعاء والحمد لله أولاً وأخيراً .

الباحثة

المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	رقم الصفحة
	المقدمة	2 - 1
الفصل الاول : استعراض المراجع		
1-1	انزيم اليوريكيز	3
2-1	آلية تفاعل الانزيم	3
3-1	قياس الفعالية الانزيمية	7
4-1	حامض اليوريك	9
1-4-1	مصادر حامض اليوريك	9
1-1-4-1	المصدر الخارجي (الغذائي)	10
2-1-4-1	المصدر الداخلي	10
2-4-1	التخليق الحيوي لحامض اليوريك	11
5-1	غياب انزيم اليوريكيز في جسم الانسان	13
6-1	الحالات السريرية المرافقة لاضطراب نسبة حامض اليوريك في الجسم	13
1-6-1	الأعراض السريرية المرافقة لارتفاع نسبة حامض اليوريك	14
1-1-6-1	النقرس (داء الملوك)	15
2-1-6-1	تكوين الحصى الكلوية	15
3-1-6-1	أمراض أخرى	16
2-6-1	حالات انخفاض نسبة حامض اليوريك	16
7-1	فوائد حامض اليوريك	17
8-1	مصادر انزيم اليوريكيز	17
1-8-1	نبذة عن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	18
2-8-1	تسمية البكتريا	20
3-8-1	الصفات التشخيصية العامة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	20

المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	رقم الصفحة
9-1	الظروف المثلى لإنتاج انزيم اليوريكيز	21
1-9-1	تحديد المكونات الرئيسية في الوسط الانتاجي	22
2-9-1	تعيين الظروف التنموية المثلى لإنتاج الانزيم	24
10-1	تنقية انزيم اليوريكيز	25
11-1	توصيف الانزيم	27
1-11-1	الخواص الفيزيوكيميائية لانزيم اليوريكيز	27
2-11-1	الخواص الحركية لانزيم اليوريكيز	28
3-11-1	تاثير الاس الهيدروجيني على فعالية انزيم اليوريكيز	28
4-11-1	تاثير درجة الحرارة على فعالية انزيم اليوريكيز	29
5-11-1	تاثير بعض الايونات الفلزية على فعالية انزيم اليوريكيز	29
12-1	الاستخدامات الطبية لانزيم اليوريكيز	30
1-12-1	استخدام الانزيم في التقدير الكمي لنسبة حامض اليوريك في الدم	30
2-12-1	استخدام الانزيم في العلاج	31
13-1	انزيم اليوريكيز واستخدام تقنية الهندسة الوراثية	32
الفصل الثاني : المواد وطرائق العمل		
2	المواد وطرائق العمل	36
1-2	الأجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة	36
1-1-2	الأجهزة المستخدمة والشركات المجهزة	36
2-1-2	المواد الكيمياوية	37
2-2	طرائق العمل	39
3-2	اختيار العزلة البكتيرية المناسبة	39
4-2	الغربلة الأولية والثانوية	40

المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	رقم الصفحة
2-4-1	المواد	40
2-4-1-1	وسط الاكار المغذي	40
2-4-1-2	حامض اليوريك	40
2-4-1-3	تحضير الوسط الانتاجي	40
2-4-2	طرائق العمل	40
2-4-2-1	الغربلة الأولية (شبه الكمية)	40
2-4-2-2	الغربلة الثانوية (الكمية)	41
2-5	تقدير الفعالية الانزيمية لانزيم اليوريكيز	41
2-5-1	المحاليل المستخدمة	41
2-5-2	طريقة العمل	42
2-6	تقدير البروتين	43
2-6-1	المحاليل المستخدمة	43
2-6-2	المنحنى القياسي للبروتين	44
2-7	الأوساط الزرعية المستخدمة	44
2-7-1	وسط الاكار المغذي	45
2-7-2	وسط أكار الدم	45
2-7-3	وسط غراء سيمون ستريت	45
2-7-4	وسط مانيتول الحركة	45
2-7-5	وسط اختزال النترات	45
2-7-6	وسط غراء الجيلاتين	46
2-7-7	الكواشف والمحاليل	46
2-7-7-1	كاشف اختزال النترات	46
2-7-7-2	كاشف اختبار الاوكسيديز	46

المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	رقم الصفحة
2-7-7-3	كاشف اختبار الكاتليز	46
2-7-8	محاليل صبغة كرام	47
2-8	الفحوصات الكيموحيوية	47
2-9	تعيين الظروف المثلى لإنتاج انزيم اليوريكيز	49
2-9-1	تعيين التركيز الامثل للمصدر الكاربوني	49
2-9-1-1	تحضير عصير التمر	49
2-9-1-2	تقدير المواد الكاربوهيدراتية الكلية	49
2-9-2	تحديد المصدر النيتروجيني الامثل لإنتاج الانزيم	51
2-9-3	تعيين التركيز المصدر النتروجيني الامثل لإنتاج الانزيم	52
2-9-4	تحديد مصدر الفسفور الامثل لإنتاج الانزيم	52
2-9-5	تعيين تركيز مصدر الفسفور الامثل لإنتاج الانزيم	52
2-9-6	تحديد نوع الملح الامثل في إنتاج الانزيم	52
2-9-7	الاس الهيدروجيني الامثل لإنتاج الانزيم	52
2-9-8	تعيين درجة الحرارة المثلى لإنتاج الانزيم	53
2-9-9	تحديد تاثير سرعة الرج في إنتاج الانزيم	53
2-9-10	تعيين حجم اللقاح الامثل في إنتاج الانزيم	53
2-9-11	تحديد مدة الحضن المثلى لإنتاج الانزيم	53
2-10	تنقية الانزيم	53
2-10-1	تركيز الانزيم بواسطة الترسيب بكبريتات الأمونيوم	54
2-10-2	كروماتوكرافيا التبادل الايوني	55
2-10-2-1	المحاليل المستخدمة في تنشيط المبادل الايوني	55
2-10-2-2	تحضير المبادل الايوني	55
2-10-2-3	اضافة النموذج	56

المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	رقم الصفحة
4-2-10-2	الاسترداد	56
11-2	دراسة بعض الخواص الحركية والفيزيوكيميائية لانزيم اليوريكيز	57
1-11-2	تقدير التركيز الاوفق للركيزة	57
2-11-2	تعيين ثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max}	58
3-11-2	تقدير الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية الانزيمية	58
4-11-2	تعيين الاس الهيدروجيني الامثل لثبوتية الانزيم	59
5-11-2	تعيين الدرجة الحرارية المثلى للفعالية الانزيمية	59
6-11-2	تعيين الثبات الحراري لانزيم اليوريكيز	60
7-11-2	تاثير بعض الاملاح والمواد الكيميائية على فعالية الانزيم	60
12-2	التطبيقات الطبية لانزيم اليوريكيز	60
1-12-2	المواد	60
1-1-12-2	العينات المصلية المستخدمة	60
2-1-12-2	المحاليل المستخدمة	61
2-12-2	استخلاص انزيم البيروكسيديز من الفجل الأبيض المحلي وتنقيته	61
3-12-2	تقدير الفعالية الانزيمية لانزيم البيروكسيديز	62
4-12-2	تنقية انزيم البيروكسيديز	62
5-12-2	تحضير عدة للتقدير الكمي لحامض اليوريك في السوائل البايولوجية (مثل الدم)	63
1-5-12-2	المحاليل المستخدمة	63
2-5-12-2	خطوات العمل	63
3-5-12-2	الحسابات	64
الفصل الثالث : النتائج والمناقشة		
3	النتائج والمناقشة	65
1-3	قابلية العزلات على انتاج انزيم اليوريكيز	65

المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	رقم الصفحة
3-1-1	الغربلة شبه الكمية	65
3-1-2	الغربلة الكمية	66
3-2	الصفات التشخيصية للعزلة *P. aeruginosa 7*	68
3-3	تعيين الظروف المثلى لانتاج انزيم اليوريكيز	69
3-3-1	تحديد تاثير تركيز المصدر الكاربوني الامثل لانتاج الانزيم	69
3-3-2	تحديد المصدر النيتروجيني الامثل لانتاج الانزيم	70
3-3-3	تعيين التركيز الامثل لحامض اليوريك في انتاج الانزيم	72
3-3-4	تحديد تاثير المصدر الفوسفاتي الامثل في انتاج انزيم اليوريكيز	73
3-3-5	تاثير التراكيز المختلفة للمصدر الفوسفاتي في انتاج انزيم اليوريكيز	74
3-3-6	تاثير نوع الملح في انتاج انزيم اليوريكيز	75
3-3-7	تاثير مدة الحضن	77
3-3-8	تاثير الاس الهيدروجيني الابتدائي الامثل في انتاج انزيم اليوريكيز	78
3-3-9	تاثير سرعة الرج في انتاج انزيم اليوريكيز	79
3-3-10	تاثير حجم اللقاح في انتاج الانزيم	81
3-3-11	دراسة تاثير درجة الحرارة في انتاج انزيم اليوريكيز	82
3-4	تنقية انزيم اليوريكيز	83
3-4-1	ترسيب انزيم اليوريكيز باستخدام كبريتات الامونيوم	83
3-4-1-1	اختيار افضل نسبة تشبع من كبريتات الامونيوم لترسيب الانزيم	83
3-4-1-2	تركيز الانزيم بكبريتات الامونيوم % 70	84
3-4-2	كروماتوكرافيا التبادل الايوني	86
3-5	الخواص الحركية والفيزيوكيميائية لانزيم اليوريكيز	88
3-5-1	الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم اليوريكيز	88
3-5-2	تاثير الاس الهيدروجيني في ثبوتية انزيم اليوريكيز	90

المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	رقم الصفحة
3-5-3	تاثير درجة الحرارة على سرعة التفاعل	92
4-5-3	الثبات الحراري لانزيم اليوريكيز	93
5-5-3	تاثير بعض الاملاح والمواد الكيميائية في فعالية الانزيم	94
6-5-3	تاثير تركيز االركيزة على سرعة االتفاعل	96
7-5-3	تقدير الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز	98
7-3	التطبيقات الطبية لانزيم اليوريكيز	101
	الاستنتاجات والتوصيات	103
	المصادر	104

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
(1-1)	بعض مصادر انتاج الانزيم	19
(2-1)	تاثير الايونات الفلزية على فعالية انزيم اليوريكيز	30
(1-2)	مصدر العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة	39
(1-3)	الغربلة الكمية للعزلات البكتيرية المنتجة لانزيم اليوريكيز	67
(2-3)	الفحوصات الكيموحيوية التي اجريت على عزلة *P. aeruginosa*	68
(3-3)	ترسيب انزيم اليوريكيز باستخدام نسب تشبع مختلفة من كبريتات الامونيوم	84
(4-3)	خطوات التنقية لانزيم اليوريكيز من بكتريا *P. aeruginosa 7*	87
(5-3)	تاثير اضافة تراكيز مختلفة من املاح ومواد كيمياوية على فعالية انزيم اليوريكيز من *P. aeruginosa* 7	96
(6-3)	الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز من بكتريا*P. aeruginosa 7*	99
(7-3)	تركيز حامض اليوريك باستخدام العدة التشخيصية RANDOX والانزيم المنتج من العزلة المحلية *P. aeruginosa 7*	102

قائمة المخططات

رقم المخطط	العنوان	رقم الصفحة
(1-1)	انتاج مركب [5-HIU] كناتج نهائي للخطوة الاولى لأكسدة حامض اليوريك بواسطة انزيم اليوريكيز	5
(2-1)	تحطم حامض اليوريك بواسطة انزيم اليوريكيز الى حامض الالنتويك واليوريا	6
(3-1)	التركيب الكيميائي لبعض المثبطات الكيميائية لانزيم اليوريكيز	8
(4-1)	التركيب الكيميائي لحامض البوليك	9
(5-1)	التخليق الحيوي لحامض اليوريك داخل الجسم من مولدات غير بيورينية	12
(1-3)	تنقية انزيم اليوريكيز من بكتريا *P. aeruginosa 7*	85

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
(1-2)	المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري لتقدير البروتين بطريقة براد فورد	44
(2-2)	المنحنى القياسي لتقدير الكلوكوز بطريقة الفينول – حامض الكبريتيك	51
(1-3)	التحري عن انزيم اليوريكيز من العزلات البكتيرية بالطريقة شبه الكمية	66
(2-3)	تاثير تراكيز مختلفة من عصير التمر على انتاجية انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa 7*	70
(3-3)	تحديد مصدر النيتروجين الامثل لانتاج انزيم اليوريكيز من العزلة *P. aeruginosa 7*	71
(4-3)	تاثير تراكيز مختلفة من حامض اليوريك على انتاجية انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa 7*	72
(5-3)	تاثير املاح الفسفور في انتاج انزيم اليوريكيز من العزلة *P. aeruginosa 7*	74
(6-3)	تاثير تراكيز مختلفة من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين على انتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa 7*	75

رقم الفقرة	العنوان	رقم الصفحة
(3-7)	تاثير نوع الملح في انتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa 7*	76
(3-8)	تاثير مدة الحضن في انتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa 7*	78
(3-9)	تاثير الاس الهيدروجيني على انتاجية انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa 7*	79
(3-10)	تاثير سرعة الرج على انتاج انزيم اليوريكيز المنتج من عزلة *P. aeruginosa 7*	80
(3-11)	تاثير حجم اللقاح على انتاجية بكتريا *P.aeruginosa 7* من انزيم اليوريكيز	81
(3-12)	تاثير درجة الحرارة في انتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa 7*	82
(3-13)	التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني DEAE-Cellulose لتنقية انزيم اليوريكيز المنتج من عزلة *P.aeruginosa 7*	88
(3-14)	الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية الانزيمية لانزيم اليوريكيز المنقى جزئياً من بكتريا *P. aeruginosa 7*	90
(3-15)	الاس الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم اليوريكيز المنتج من *P. aeruginosa*	91
(3-16)	تاثير درجة الحرارة في فعالية انزيم اليوريكيز المنتج من *P. aeruginosa 7*	92
(3-17)	الثبات الحراري لانزيم اليوريكيز المنتج من *P. aeruginosa 7*	94
(3-18)	العلاقة بين سرعة تفاعل انزيم اليوريكيز المنقى جزئياً وتركيز الركيزة	97
(3-19)	الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز بطريقة لاين وفر بيرك Lineweaver-Burk plot	99
(3-20)	الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز بطريقة أيدي – هوفست Eadie-Hoffstee plot	100
(3-21)	الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز بطريقة هانس Hanes plot	100

الخلاصة :

يعد انزيم اليوريكيز [EC 1.7.3.3] من إنزيمات الأكسدة والاختزال يعمل على أكسدة حلقة البيرمدين الموجودة في حامض اليوريك .

تهدف الدراسة الحالية البحث عن مصادر مايكروبية محلية لإنتاجها انزيم اليوريكيز وبمواصفات ملائمة للتطبيقات الطبية ، 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 .

تم تنقية انزيم اليوريكيز من الوسط الزرعي لبكتريا *P. aeruginosa* بأستخدام خطوتين :

الاولى : الترسيب بواسطة استخدام كبريتات الأمونيوم 70% .

الثانية : التبادل الايوني بأستخدام المبادل الايوني DEAE –Cellulose إذ تم الحصول على عدد مرات تنقية 7.2 مرة و حصيلة انزيمية 42.8% وبلغ الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم (8.5 , 9) وان الانزيم ثابت في مدى أس هيدروجيني بين (8 , 9.5) . وان درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم تكون هي 35 مْ ويبقى الانزيم محتفظاً بفعاليتهِ كاملةً عند درجة حرارة (25 – 40) مْ ولمدة 20 دقيقة .

أظهرت الدراسات الحركية لانزيم اليوريكيز ان العلاقة بين تركيز الركيزة (حامض اليوريك) وسرعة التفاعل تخضعان الى معادلة ميكالس منتن وقدرت الثوابت الحركية المتمثلة بثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} للأنزيم وتم تقديرها بأتباع طرائق ثلاث ، إذ بلغت معدلات قيم ثابت ميكالس K_m هو 0.0091 ملغم \ مل ، اما السرعة القصوى V_{max} فقد بلغت 6.68 مايكرومول \ مل . دقيقة ، عند استخدام حامض اليوريك كركيزة .

دُرس تاثير بعض الايونات الفلزية حيث أوضحت النتائج ان كلوريدات النيكل الزئبق و الفضة من مثبطات الانزيم ، كما ان استخدام كلوريد الحديد وبتركيز 1 ملي مولر يُفقد من الانزيم فعاليتهُ 88.93% .

بينما يُعد كلوريد الصوديوم منشطاً قوياً لفعالية الانزيم اذ بلغت الفعالية المتبقية 216.44% عند استخدامهُ بنسبة 1 ملي مولر ، كما ويُعد كلوريد المغنسيوم وكلوريد الكالسيوم من المنشطات ايضاً عند استخدامهما بتركيز 5 ملي مولر لتبلغ الفعالية المتبقية (170.35 , 129.62) % .

دُرس الاستخدام الطبي لانزيم اليوريكيز المنتج من العزلة المحلية *P. aeruginosa 7* بتحديد تركيز حامض اليوريك في الدم من خلال استخدام انزيم اليوريكيز المستخلص من جذور الفجل الأبيض والمنقى باستخدام المبادل الايوني DEAE – Cellulose وأظهرت النتائج مدى كفاءة الانزيم المنتج محلياً في التقدير الكمي لتركيز حامض اليوريك في الدم من خلال مقارنته مع نتائج قياسية تم قياسها بواسطة العدة التشخيصية (RANDOX) .

المقدمة :

استخدم الانسان الإنزيمات منذ القدم على هيئة أنسجة نباتية أو حيوانية غنية بالإنزيمات أو على هيئة مايكرو بات في صناعة الخبز والخل والنبيذ ، فمعدة العجول بما تحويه من إنزيمات استخدمت في تصنيع الجبان سنين عديدة قبل الميلاد .

يعد انزيم اليوريكيز [E C 1.7.3.3] من إنزيمات الأكسدة والاختزال يعمل على تحطيم حامض اليوريك الى مركب أكثر ذوبانية في الماء وهو الالنتوين Allantoin يكون انزيم اليوريكيز ذو أهمية كبيرة وذلك من خلال استخداماته وتطبيقاته الطبية اذ يستخدم في مجالين طبيين مختلفين : الاول هو استخدام الانزيم كعامل تشخيصي في تحديد تركيز حامض اليوريك في السوائل الجسمية اما الاستخدام الطبي الأخر فيستخدم كبروتين دوائي يعطى للمرضى الذين يعانون من داء النقرس المعقد .

ونتيجة لهذه الأهمية الطبية المتزايدة لهذا الانزيم ، وقصور المصادر الحيوانية عن تلبية هذه الاحتياجات تركز الاهتمام على إنتاج الانزيم من الاحياء المجهرية وبصورة خاصة تلك التي تطرح هذه الإنزيمات خارج الخلايا في الوسط الزرعي دون الحاجة الى تحطيم هذه الخلايا للحصول على إنزيمات ، كما أنها تكون أكثر استقراراً من الإنزيمات الموجودة داخل الخلايا ، اذ تعد الاحياء المجهرية مصدراً مهماً لإنتاج الإنزيمات وذلك لأسباب عدة منها قصر مدة التخمر وإنتاج الإنزيمات ، رخص الأوساط المستخدمة لتنمية هذه الاحياء ، سهولة التعامل مع هذه الاحياء . وان الاحياء المجهرية المختلفة تنتج إنزيمات متباينة في صفاتها من خصوصية تجاه الركائز ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني .

و لأهمية انزيم اليوريكيز طبياً و بسبب عدم التمكن من استخدام *A. flavus* كمصدر للأنزيم المستخدم في المجالات الصناعية خصوصاً في المجال الطبي وذلك لان الفطر يكون منتج لأحد أنواع السموم القاتلة . مما فتح المجال في استخدام الهندسة الوراثية لإنتاج الانزيم فقد تم استخدام التقنيات الحديثة في إنتاج هذا الانزيم منها تقنيات الدنا الهجينة (Recombinant DNA Technology) وذلك من خلال استخدام الجين المسؤول عن إنتاج الانزيم من فطر

A.flavus وكلونته في خميرة *Saccharomyces cervisiae* ، كما وان استخدام الانزيم من مصدره الطبيعي وبدون إجراء بعض التحويرات عليه يؤدي الى ظهور مناعة قوية تجاه هذا البروتين الدوائي و قد تؤدي الى حدوث بعض التفاعلات الحساسية المميتة مما يؤدي ذلك الى القضاء على الانزيم وقصر مدة بقاءه في مجرى الدم لذا كان التوجه نحو تحوير شكله لكي يتسنى أخذه كعلاج وذلك بربطه مع البولي اثلين كلايكول PEG ، وهذا بدوره يؤدي الى إطالة فترة بقاء الانزيم في مجرى الدم ، وذو ذوبانية جيدة في pH الفسيولوجي .

ان اختيار مصادر مايكروبية محلية ومنتجة لانزيم اليوريكيز خارج الخلية ذات استقرارية عالية إثناء الخزن باستخدام مصادر غذائية رخيصة وبسيطة يُعتبر ذات أهمية اقتصادية كبيرة . لذا ارتأينا دراسة بعض المصادر المايكروبية المحلية من ناحية إنتاجها لانزيم اليوريكيز ومدى ملائمتها للإغراض الطبية التطبيقية . وان إنتاج الانزيم من بكتريا *P. aeruginosa* يكون خارجي الإنتاج مما سهل استخلاصه وتنقيته واستخدامه كعدة في التقدير الكمي لحامض اليوريك في الدم تشخيص تركيز حامض اليوريك .

ونظراً لما يمتلكه انزيم اليوريكيز من اهمية تطبيقية طبية كبيرة ، فقد هدفت هذه الدراسة الى :

1. غربلة العزلات البكتيرية وتحديد الاكفأ في انتاج الانزيم .
2. تحديد الظروف المثلى لانتاج الانزيم من العزلة المنتخبة .
3. محاولة تنقية الانزيم بطريقة مبسطة .
4. دراسة الصفات الفيزيوكيميائية والثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز .
5. استخدام الانزيم في احد الجوانب الطبية التطبيقية .

1 – استعراض المراجع

1-1 انزيم اليوريكيز uricase enzyme

انزيم اليوريكيز uricase أو urate oxidase [E. C. 1.7.3.3] وهو من صنف إنزيمات الأكسدة والاختزال و التي لها دور بالغ الأهمية في أيض البيورينات لذلك فهو مهم وظيفياً لانه يكون مسؤول عن أكسدة حلقة البيرمدين لجزيئة حامض اليوريك (Rajoka . *et al* , 2006) ليعطي ناتج يعرف بالالنتوين allantoin الذي يكون مركب أكثر ذوبانية وأسهل إفرازا (~ 147 100مللتر من الماء) (Bomalaski .*et al* , 2002) ، ويساهم في التفاعل وجود الأوكسجين الجزيئي (Gabison . *et al* ,2008) حسب المعادلة الآتية :

$$\text{Uric acid} + O_2 + H_2O \longrightarrow \text{Allantoin} + H_2O_2 + CO_2$$

تشير دراسات الصيغة التركيبية ان انزيم urate oxidase هو بروتين يحتوي بتركيبهُ على ايون النحاس ويفترض ان ارتباط ايون النحاس مع الأنزيم يكون عند موقع الأحماض الأمينية 121 و 144 لذا يُعد من الأنزيمات المعدنية metallic enzyme (Rajoka. *et al* , 1989 ; Xiangwei .*et al* ,2002 ; Oda. 2006 .

كما ويُعد من الأنزيمات المستحثة induced enzymes اذ لا يُنتج الا بوجود الركيزة (Nygaard. *et al* , 2000 ; Farley and Santosa ,2002 ; Barash ,1972)

يُظهر هذا الأنزيم تخصصية عالية تجاه ركيزتهُ (حامض اليوريك) (Vogels and Drift ,1976) .

2-1 آلية تفاعل الأنزيم :

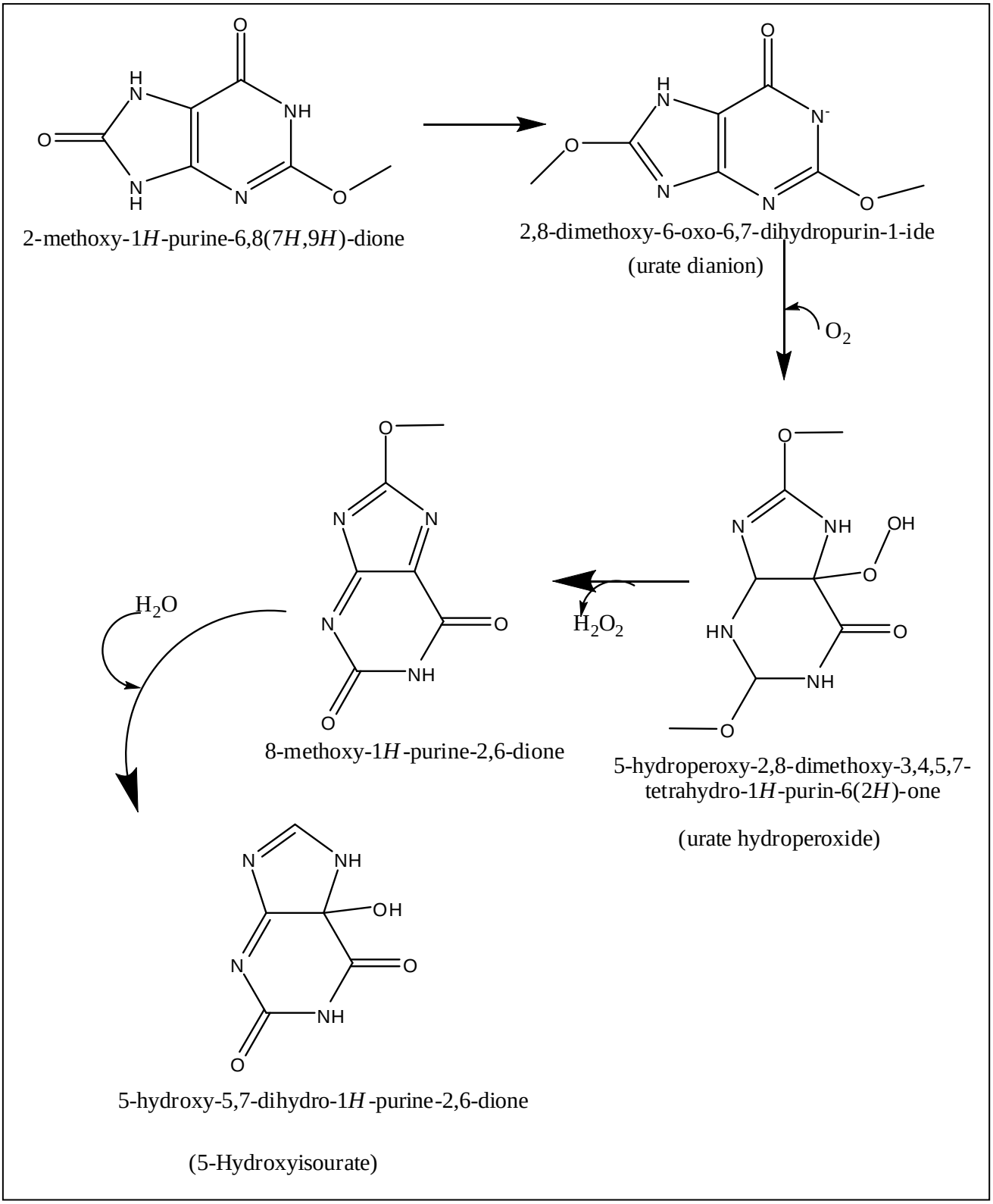
لقد تم دراسة آلية التفاعل لأنزيم اليوريكيز بشكل مستفيض خلال السنوات الماضية حيث يتحفز التفاعل الأنزيمي بوجود الأوكسجين الجزيئي وتتم أكسدة حامض اليوريك عن طريق

انتقال إلكترونين أو ذرتي هيدروجين من كل جزيئة من حامض اليوريك إلى كل جزيئة أوكسجين (Vogels and Drift ,1976 ; Budayova –spano . *et al* , 2006)

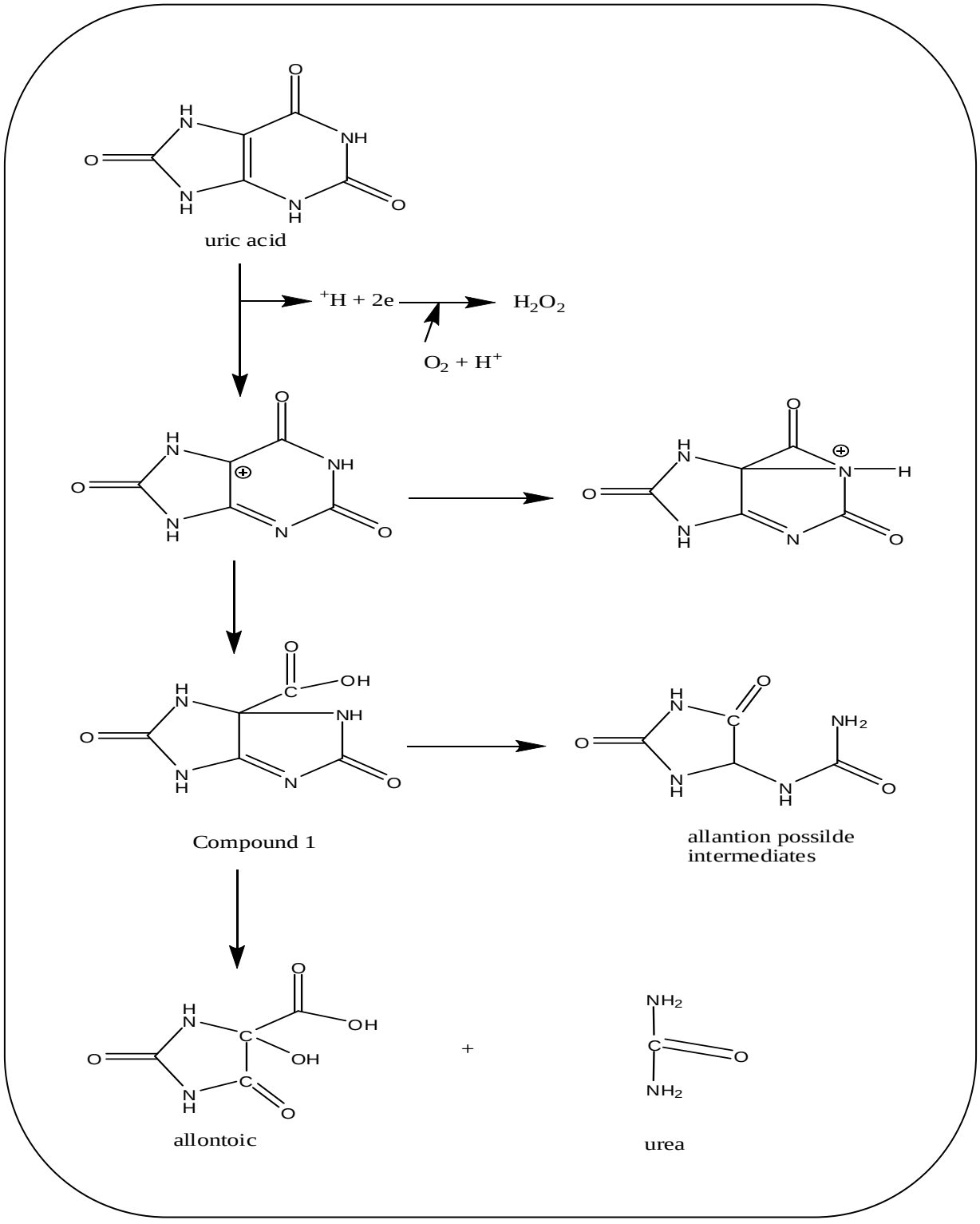
إذ تتم الأكسدة بخطوتين :

الأولى : تكون معتمدة على وجود وفرة من جزيئات الأوكسجين الجزيئي وقد أظهرت الدراسات الطيفية التي أجريت على انزيم اليوريكيز المستخرج من الباقلاء ، إنتاج مركبين وسطيين الاول هو urate dianion الذي يتفاعل مع الأوكسجين مباشرةً . أما المركب الثاني فهو urate hydroperoxide المتكون من تفاعل urate dianion مع الأوكسجين بعدها يتم إبعاد بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) من مركب urate hydroperoxide وبالتالي إنتاج المركب 5–Hydroxyisourate [5 – HIU] كمركب نهائي لهذه الخطوة (Todd *et al* ,2005) كما في الشكل (1–1) (Imhoff . *et al* , 2003) .

الخطوة الثانية: تكون غير معتمدة على وجود الأوكسجين الجزيئي حيث يتحرر المركب [5 – HIU] ويتحلل بخطوات كيميائية عدة وبصورة بطيئة جداً إلى Allantoin ، و يترافق مع هذه الخطوة تحرر لثنائي اوكسيد الكربون وحتى يتم إنتاج الالنتوين allantoin سوف يحدث فك للحلقة السداسية (شطر البيرمدين) لليوريك (Lee. *et al* ,2006 ; Azab.*et al* , 2005) كما في الشكل (1–2) (Vogels and Drift , 1976) . ان إنتاج الالنتوين وثنائي اوكسيد الكربون يعد ناتج أكسدة لحامض اليوريك أما H_2O_2 فيعد ناتج اختزال للأوكسجين الجزيئي (Huang. *et al* ,2003)



شكل (1-1) إنتاج مركب [5-HIU] كناتج نهائي للخطوة الاولى لأكسدة حامض اليوريك بواسطة أنزيم اليوريكيز (Imhoff *et al* , 2003) .



شكل (1-2) تحطم حامض اليوريك بواسطة انزيم اليوريكيز إلى حامض الالنتويك واليوريا (Vogels and Drift , 1976).

تكون مجاميع الكربونيل والأمين مهمة في التفاعلات الانزيمية حيث تكون مهمة عند ارتباط الركيزة مع الإنزيم (Fitzpatrick *et al* , 1969).

وهناك الكثير من المثبطات التي تثبط فعالية الإنزيم في تحطم حامض اليوريك ، اذ ان الآلية المعتمدة في التثبيط هي التثبيط التنافسي نتيجة لتشابه التركيب الجزيئي لكل من حامض اليوريك مع المثبطات الأخرى مثل الاكزونات Oxonat حيث يُعد كمثبط تنافسي (Montalbini , *et al* ,1997 ; Fridovich ,1965 ; Bongaerts *et al* ,1978) كذلك فقد أوضح (Fitzpatrick) وجماعته سنة 1969 ان وجود مجاميع الكربونيل والنتروجين في حامض النيكوتين Nicotinic Acid تكون مشابهة لتلك التي في حامض اليوريك. كما يمكن تثبيط الفعالية الانزيمية بواسطة كواشف السلفاهيدريل Sulfhydryl و 2-hydroxypurine (Ohe , and Watanabe ,1981) و الهايدروكسيل امين Hydroxylamine (Junnosuk , *et al* ,1966) كذلك يثبط بواسطة الزانثين xanthine و 9-methyluric acid و 8-azaxanthine كمثبطات تنافسية (Bongaerts . *et al* ,1978) شكل (1-3) .

كما ويُعد السيانيد مثبط لانزيم اليوريك ولكن ليس كمثبط تنافسي (Conley, and Priest. , 1979)

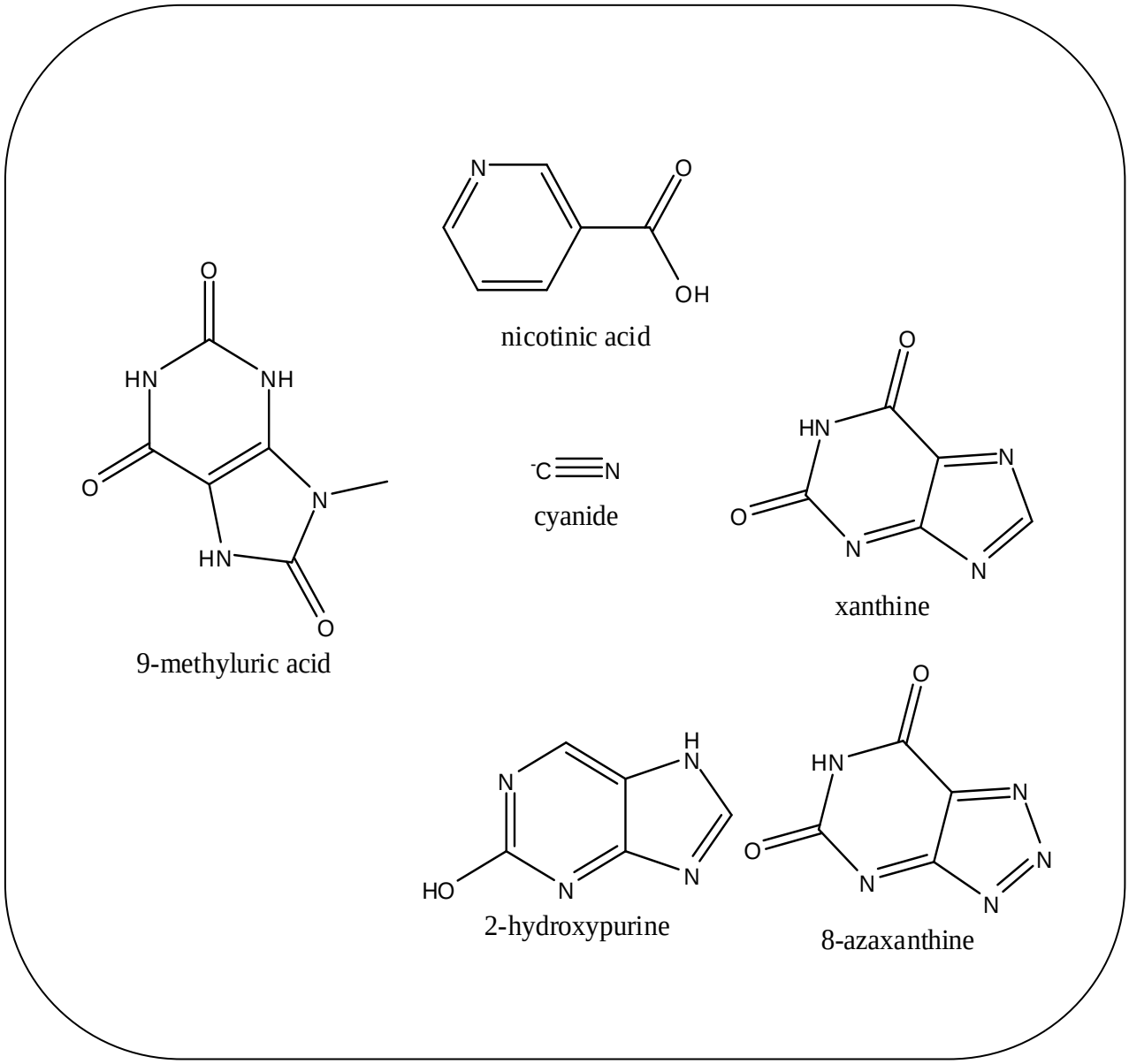
1-3 قياس الفعالية الأنزيمية :

أشارت الكثير من الدراسات والبحوث إلى ان قياس فعالية انزيم اليوريكيز تتم بأتباع الطرق غير اللونية المعتمدة على انخفاض في الامتصاصية عند الطول الموجي 293 نانوميتر وذلك توافقاً مع انخفاض تركيز اليوريك في محلول التفاعل عند اضافة الإنزيم الى محلول التفاعل . (Atalla, *et al*, 2009).

وتتلخص هذه الطريقة بحساب مقدار الانخفاض في تركيز حامض اليوريك مقارنة مع نفس العالق المستخدم لكن بعد تثبيط الإنزيم .

أما تعريف وحدة الفعالية فقد عرفها الكثير من الباحثين على إنها ، كمية الإنزيم التي تحول مايكرو مول واحد من حامض اليوريك إلى الالنتوين allantoin لكل دقيقة عند درجة حرارة 30

مْ (2009 , *et al* . Atalla) . ولكن هناك دراسات أخرى تشير إلى إمكانية عمل طريقة لونية للكشف عن فعالية الأنزيم حيث تعتمد على زيادة في الامتصاصية عند الطول الموجي 505 نانوميتر . وتتلخص هذه الطريقة في وجود انزيم البيروكسيديز الذي يتفاعل مع H_2O_2 الناتج من التفاعل الانزيمي لانزيم اليوريكيز ويتم الكشف عنه بأستخدام كاشف 4 – amino anti purine ولقد عرَف (klose) 1978 وحدة الفعالية بأنها كمية الإنزيم التي تنتج واحد مايكرو مول من H_2O_2 لكل دقيقة تحت الظروف القياسية عند درجة حرارة 25 مْ وهذه الطريقة بعكس الطريقة السابقة (2008 , *et al* . Chen) .

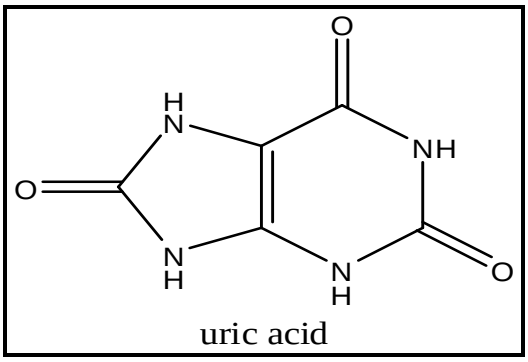


شكل (1–3) التركيب الكيميائي لبعض المثبطات الكيميائية التي تثبط فعالية انزيم اليوريكيز .

1 – 4 حامض اليوريك URIC ACID

حامض اليوريك هو عبارة عن 2 , 6 ، 8 ثلاثي هيدروكسي بيورين ، وهو موجود بشكلهِ الكحولي Lactim form يملك صفة حامضية ضعيفة pKa = 5.8 ، ويكّون املاحاً مع الصوديوم والبوتاسيوم ، ويكون الحامض و أملاحه قليل الذوبانية في الماء عند اس هيدروجيني حامضي ~ 11 ملغم لكل 100 مللتر من الماء (Bomalaski , *et al* , 2002 ; Chen, et al , 2008)

ويمثل حامض اليوريك احد المركبات النايتروجينية غير البروتينية الموجودة في الدم ، وهو الناتج النهائي لعمليات أيض البيورينات ، ويتم ترشيحها وطرحها مع البول عبر الكليتين . اما تركيبه الكيميائي فيظهر في الشكل (1–4) . ويُلاحظ إن هذا المركب الحامضي يحتوي على الحلقة الكيميائية المسماة بيورين purine وهي حلقة غنية بذرات النتروجين(Zilva. *et al* , 1988) ، .



الشكل (1–4) التركيب الكيميائي لحامض اليوريك .

1-4-1 مصادر حامض اليوريك

وفقا لكثير من الدراسات فأن لحامض اليوريك مصدرين أساسيين لتكوين هذا المركب داخل الجسم ومن ثم ضخه إلى الدم وهذان المصدران هما :

1-4-1-1 **أولاً : المصدر الخارجي (الغذائي)**

- تعد الأغذية الغنية بالقواعد النتروجينية البيورينية مصدراً هاماً لإنتاج حامض اليوريك في الجسم ، ومن هذه الأغذية الكبد ، الطحال ، صفار البيض واللحوم والكثير من الأغذية الغنية بالبروتينات والتي تجري عليها العمليات الأيضية في الكبد لتتحول اخيراً إلى حامض اليوريك (Albat , *et al* , 1993).
- يتكون حامض اليوريك من قواعد بيورينية منفردة توجد في بعض أنواع الشراب مثل الشاي والقهوة .

1-4-1-2 **ثانياً : المصدر الداخلي**

يُنتج اليوريك داخلياً من مولدات غير بيورينية و إعادة الاستفادة منها داخل الجسم كمصدر لإنتاج حامض اليوريك (Terkeltaub , *et al* , 2006) ، حيث يتم تحطيم الاحماض النووية (Nucleic acid) عندما يحصل تلف في الأنسجة والخلايا الجسمية ، مؤدياً إلى تكسير جزيئات ألدنا والرنا إلى نيوكليوتيدات ، عندها تخضع النيوكليوتيدات المتضمنة في تركيبها على قواعد الأدنين والكوانين إلى عمليات إنزيمية عدة و بمساعدة إنزيمات عدة لتؤدي في النهاية إلى إنتاج اليوريك الذي يتم إفرازه إلى الدم ومن ثم يجري ترشيحه وإزالته إلى خارج الجسم عن طريق الكليتين (Albat . *et al* ,1993).

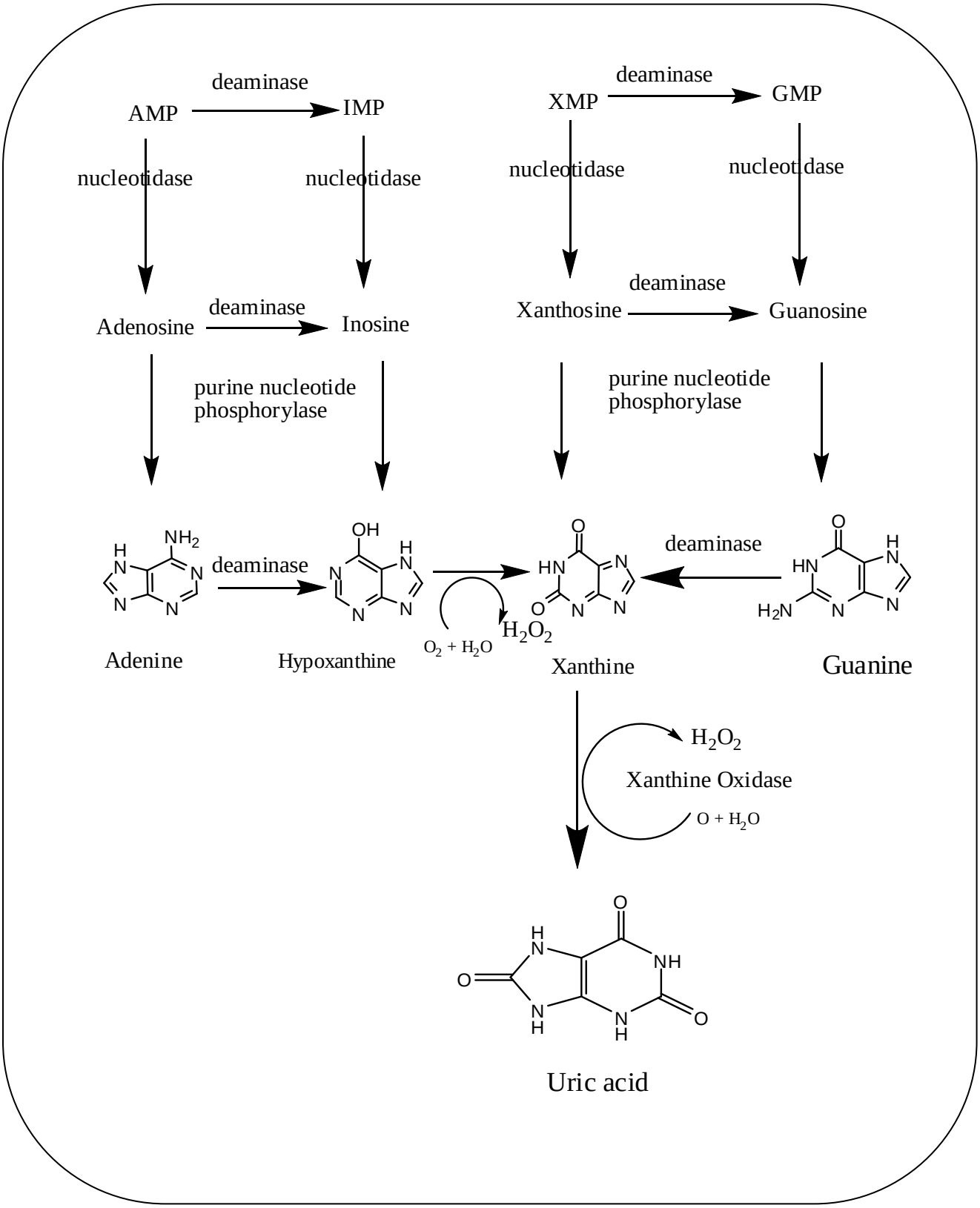
من هنا يتضح ان جزءاً من حامض اليوريك الذي يوجد في البول يكون مصدره بروتين خارجي exogenous protein metabolism ، بينما الجزء الاخر مصدره بروتين الجسم ذاته endogenus protein metabolisim .

إن مستوى حامض اليوريك بالجسم يتحدد بواسطة التوازن بين التخليق الحيوي والإفراز البولي (Pool, R. A. et al , 2006) حيث يتم قذف نسبة حوالي (35 – 25)% عن طريق الأمعاء و نسبة (75 – 65)% عن طريق الكليتين (Cammalleri , and Malaguarnera, 2007).

1-4 -2 التخليق الحيوي لحامض اليوريك : Biosynthesis of Uric acid

إن نقطة البداية في التخليق الحيوي لحامض اليوريك كما أشارت له البحوث هي المركب (ribos – 5 – phosphat) ومشتقات البنتوز من المسار الايضي للكلايسدك (glycidic pathway) حيث يتحول إلى المركب Phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) ومن ثم يتحول هذا المركب إلى (phosphoribosilamine) وهذا بدوره سوف يتحول إلى [IMP] Inosine monophosphate ومن هذا المركب الوسطي الذي يعد المحور بين تكوين حامض اليوريك وتكوين الأحماض النووية سوف يُشتق كل من Adenosin monophosphate [AMP] والمركب [GMP] Guanosin monophosphate (Cammaller and Malaguarnera 2007) وهذان المركبان سوف يدخلان في مسارين متعاكسين ،الأول هو بنائي حيث يُستفاد من هذين المركبين في تصنيع الأحماض النووية [DNA – RNA] أما المسار الثاني فيتمثل في دخول هذين المركبين [GMP – AMP] في تكوين الكوانين الذي يتحول إلى زانثين بواسطة إزالة مجموعة الأمين (Clarke . and Meadow ,1965) , أما الأنوسين (Inosine) الذي يتكون من المركب (IMP) ومن الأدنين، فأنه يتحول إلى الهايبوزانثين الذي يتحول بفعل إنزيم Xanthine oxidase إلى زانثين ، وهذا بدوره سيتحول إلى حامض اليوريك ، حيث يخضع التفاعل الأخير المكّون لحامض اليوريك ايضاً إلى فعل إنزيم Xanthine oxidase شكل (1-5) . . (Cammaller, and Malaguarnera, M. .2007)

ويُعد حامض اليوريك الناتج النهائي لتمثيل القواعد البيورينية في كبد الانسان . اما باقي الثديات ما عدا الكلاب من نوع dalmating dogs وبعض الثديات فأنه نتيجة لوجود انزيم اليوريكيز بأكبادها يكون الناتج النهائي هو مركب الالنتوين allantoin ويرجع ذلك الى تاثير انزيم اليوريكيز على حامض اليوريك . ولما كان هذا الانزيم لا يوجد في كبد الانسان لذلك يقف التفاعل عند تكوين حامض اليوريك الذي يُعد الناتج النهائي لتمثيل القواعد البيورينية .



شكل (1-5) التخليق الحيوي لحامض اليوريك داخل الجسم ومن مولدات غير بيورينية (Cammaller, and Malaguarnera, M. , 2007).

5-1 غياب انزيم اليوريكيز في جسم الإنسان :

يفتقد الإنسان لأنزيم اليوريكيز الوظيفي (Pay , *et al* ,2002 ; Chen, *et al* ,2008) وهناك مبررات بايولوجية تبرر فقدان هذا الأنزيم لأربع أنواع من الأحياء والتي يكون من ضمنها الإنسان (Xiangwei, *et al* ,1992) فعند دراسة التتابع الجيني للإنزيم وُجد أن سبب غياب الأنزيم هو وجود طفرات إنهاء في الجين أما من نوع non sense mutation أو fram shift mutation أما في الإنسان فقد دلت الدراسات إلى ان الطفرتين هي من نوع (non sense mutation) وقد تحدث في منطقتين الأولى في منطقة الحفاز والأخرى في منطقة التشفير للجين المشفر (vogt , 2004) ولقد حدد Xiangwei وجماعته سنة 1992 موقع الطفرات عند موقعي الحامضين الامينيين 33 و187 . اذ أوضح ان في كلا الحالتين فأن الشفرتين الموجودتين في هذين الموقعين تشفران للحامض الأميني الأرجنين (AGA , CGA) فأنهما سوف يعطيان شفرة إنهاء (TGA) ووجود هذه الشفرات في منطقة التشفير يشير إلى ان الجين المسؤول عن اليوريكيز في الإنسان غير فعّال (Xiangwei *et al* ,1989). كما وذكر (Bomalaski, *et al* ,2002) ان قطعة صغيرة مكونه من 10 أحماض امينية تنتج من الجين المسؤول عن انزيم اليوريكيز وتكون هذه القطعة خالية من الفعالية الأنزيمية .

6-1 الحالات السريرية المرافقة لأضطرب نسبة حامض اليوريك في الجسم

يبلغ المستوى الطبيعي لحامض اليوريك في الدم في النساء اقل من 6 ملغم \ 100 مل ، أما في الرجال فتبلغ النسبة حوالي 7 ملغم \ 100 مل (Pfrimer, *et* al, 2010) ، هناك أسباب عدة تؤدي إلى ارتفاع نسبتهُ (Hyperuricemia) في الدم منها :

1. زيادة تصنيع القواعد النتروجينية في الجسم (Zilva, *et al* , 1988) .
2. زيادة تناول الأغذية الغنية بالقواعد النتروجينية والغذاء الغني بالبروتين والدهون والكحول فضلاً عن عوامل وراثية أخرى (Schumacher and Chen , 2006) .

3. الفشل الوظيفي للجهاز الكلوي في طرح النسب الواجب إزالتها من هذا المركب اذ يتم إفراز حامض اليوريك الذائب في الماء بواسطة ترشيحها عن طريق الكلية وتتراوح الكميات الواجب طرحها ما بين 600 – 700 ملغم يومياً عند الحالات الطبيعية (R.schumacher and Chen , 2006) .
4. خلال العلاج الكيميائي لمعالجة اللوكيميا Leukaemia ، فقر الدم التحللي Haemolytic anaemia والبولي سثيميا Poly cythemia rubra وذات الرئة الانحلالي Resolving pneumonia تزداد نسبة حامض اليوريك الذي يشتق من الأحماض النووية الناتجة من التهدم السريع للأنسجة والخلايا السرطانية (Kelly , *et al* , 2001) .
5. نقص إنزيم (HGPRT) (Hypoxanthine – Guanine phosphoribosyl transferas) (Mahmoud and Helmy , 2009) حيث يسبب نقص هذا الإنزيم مرض يعرف بمتلازمة ليش – نيهان (Lesch – Nyhan syndrome) (Arslan , 2008 ; Huang , *et al* ,2003)

وفي هذه الحالة لا يتم فسفرة نوعي البيورينات (الكوانين ، الأدنين) مما يؤدي إلى حدوث خلل في تخليق (GMP , AMP) (Cammalleri , and Malagurnera , *et al* , 2007) التي تدخل في تخليق الأحماض النووية ، ومن هذا يتضح إن الأنزيم يكون مسؤول عن تحويل القواعد البيورينية بفسفرتها إلى تتابع من النيوكليوتيدات .

6. هناك بعض الأدوية التي عند تناولها يزداد مستوى حامض اليوريك ومن هذه الأدوية Cyclosporine , Diuretic (Vogt , 2004).

1-6-1 الأعراض السريرية المرافقة لأرتفاع نسبة حامض اليوريك :

إن ارتفاع نسبة حامض اليوريك في الدم أكثر من 8 ملغم \ 100 مل يؤدي إلى ظهور أعراض عدة أو أمراض سريرية قد تكون مؤلمة ومن هذه الأعراض ما يأتي :

1-1-6-1 **النقرس (داء الملوك)** Gout

هو من الأمراض الشائعة نتيجة زيادة نسبة تجمع حامض اليوريك (Nishiya , *et al* , 2002) في السوائل البايولوجية (Chen, *et* al ,2008) .

إن زيادة نسبة حامض اليوريك بشكل أملاح غير ذائبة في الماء وزيادة نسبته في السوائل الجسمية يؤدي إلى بلورتها وترسبها في نهاية العظام (Rouf, *et al* , 1968 ; Ganson, *et al* 2006) إذ يعد هذا المرض من اغلب الحالات الروماتزمية المؤلمة (Owen , 2006) التي تقود إلى استجابة التهابية حادة في المفاصل مع الآم حادة بسبب زيادة نسبة أملاح اليوريك في الدم (Vogt , 2004 ; Zare , *et al* , 2005) وان تعامل الكلية مع أملاح اليوريك يكون معقد ويصعب إفرازه بسبب عدم ذوبانيته في الماء (Poole , *et al* 2006)

ويصيب داء النقرس ما بين حوالي (0.5 ـ 2.8)% اذ يترافق هذا المرض مع تقدم السن ما بين (30 ــ 50) (Mahmoud and Helmy ,2009) وقد يترافق ايضاً مع حالات مرضية أخرى مثل زراعة الأعضاء وخصوصاً زراعة الكلية و السمنة كما ويساند هذا الزيادة المفرطة للمحتوى الغذائي من اللحوم والغذاء البحري (Reinder , *et al* ,2006 ; Bomalaski , *et al* 2002 ; Moolenburgh , *et al* ,2006)

ويمكن أن يصيب داء النقرس المفاصل المصابة بالسوفان ، وان المصابين بداء النقرس المزمن تكون النوبات لديهم متكررة لكن لا توجد إحصائيات دقيقة حول عدد النوبات للمرضى الذين لا يعالجون بالأدوية التي تخفض نسبة اليوريك بالدم (Wortmann , 2005 ; Gutman , 1961) وان تجمع أملاح اليوريك قد يسبب تقرحات شبه خبيثة وخراج قيحي وضغط عصبي (Reinders, *et al* ,2006)

2-1-6-1 **تكوين الحصى الكلوية**

قد يؤدي ارتفاع نسبة اليوريك في الدم إلى تكوين الحصى (Lee , *et al* ,1988) , وقد دلت الدراسات الحديثة إلى إن حوالي 13% من نسبة الحصى الكلوية في الإنسان سببها حامض اليوريك (Cammalleri, and Malaguarnera , 2007) اذ إن اليوريك الموجود بشكل

أملاح (يوريت الصوديوم) سوف تترسب داخل النفرون مما يؤدي إلى إعاقة النبيبات البولية والأنبوب الجامع للكبيبة عندما يكون الاس الهيدروجيني حامضي ، ينتج من هذه الترسبات تنخرات نبيبية وفشل كلوي Acute Renal Failure (A.R.F) كما ويسبب إعاقة داخلية لتدفق البول وبعد تعطيل النبيبات الكبيبية في التصفية فأن بلورات اليوريك تبدأ بالتجمع وتكوين الحصى الكلوية (Poole, *et al* , 2006 ; Cammalleri and Malaguarnera , 2007).

1-6-1-3 أمراض أخرى :

هناك أمراض عدة تترافق مع ارتفاع نسبة حامض اليوريك منها ارتفاع الكوليسترول والإمراض الكلوية و أمراض القلب (Arslan ,2008) . وبالإضافة إلى ترسبه في العظام فأنه قد يترسب في الأنسجة الناعمة مثل الغضاريف والأنسجة تحت الجلد و قد يترسب على سطح الأوردة (Vogt , 2004) كما وقد يسبب انسداد في الصمام القلبي وتنخر جدار الأمعاء وتكلس جلدي (Reinders , *et al* , 2006) .

كما ودلت الدراسات في علم الأوبئة إلى إن ارتفاع نسبة حامض اليوريك في الدم هو عامل مسبب لأمراض الأوعية القلبية (Arslan , 2008) .

1-6-2 حالات انخفاض نسبة حامض اليوريك hypouricemia

إن حالات انخفاض نسبة حامض اليوريك تكون اقل شيوعاً ، اذ تحدث نتيجة الانخفاض أو الإنتاج القليل لحامض اليوريك وكذلك اختزال نسبة حامض اليوريك عن طريق الإفراز الكلوي (Poole, *et al* , 2006)

وهناك أسباب أخرى مثل تناول الأدوية التي تعطى لعلاج ارتفاع حامض اليوريك therapy of hyperuricemia وكذلك متلازمة فانكونيس fanconic's syndrome والمجاعة الحادة المزمنة sever chronic starvation وأمراض نقص المناعة مثل الإيدز (Zilva , *et al* , 1998) .

7-1 فوائد حامض اليوريك

أشارت الكثير من الدراسات إلى ان حامض اليوريك يعد كانس للجذور الحرة لذلك فأن وجود حامض اليوريك في الدم يساهم في نقص معدل حدوث السرطانات وإطالة فترة الحياة (Xiangwei, *et al* ,1989 ; Gabison , *et al* ,2008) ولقد دلت دراسات أخرى إلى ان وجود حامض اليوريك في الدم يحدد ضغط الأكسدة وتلف الأنسجة وهو بذلك يعد اكبر مضاد للأكسدة في جهاز الدوران (Terkeltaub , 2007) .

يتمثل الدور المهم لحامض اليوريك في الجسم من خلال ما يأتي :

1. يُعد كانس للأوكسجين الذري حيث لاحظ (Ames) وجماعته سنة 1981 ان التعرض للأوكسجين الذري فأن نسبة كبيرة من حامض اليوريك سوف تتأكسد وكمية قليلة جداً (ممكن إهمالها) من ألدنا سوف تتضرر بالأكسدة فهو بذلك يرفع تأثير الأكسدة عن الأحماض النووية .
2. يُعد حامض اليوريك كانس للجذور الحرة حيث لوحظ بأن الجذور الحرة المتولدة من (H_2O_2 و$FeSO_4$ او الأشعة فوق البنفسجية) سوف تُكسح بواسطة حامض اليوريك.
3. يتأكسد حامض اليوريك بواسطة البيروكسيد فهو بهذا يحمي ايضاً غشاء كريات الدم الحمراء من تأثير البيروكسيد اذ يشارك في منع تزنخ الدهون الموجودة في غشاء كريات الدم الحمراء .

8-1 مصادر أنزيم اليوريكيز :

أشارت الكثير من البحوث العلمية والدراسات إلى ان انزيم اليوريكيز يُنتج من اغلب الكائنات (بدائية وحقيقية النواة) إذ يمكنها الاستفادة من انزيم اليوريكيز في تحطيم اليوريك وتأيضهُ كمصدر نتروجيني (Takada And Tsukiji ,1987) حيث ان البكتريا والخمائر والأعفان تمتلك أنزيم اليوريكيز الفعّال (Huang , *et al* ,2003 ; Chen , *et al* , 2008) .

كما وقد ذكرت دراسات أخرى إلى إمكانية بعض النباتات من الاستفادة من اليوريك من خلال امتلاكها لأنزيم اليوريكيز (Montalbini , *et al* , 1997) .

كما وأشارت بحوث أخرى إلى ان اغلب الفقريات يمكنها تحطيم اليوريك تحطيماً كاملاً (Lee, *et al* ,2006) إلى يوريا و كلايوكسليت ومن ثم إلى ثنائي اوكسيد الكربون CO_2

وآمونيا NH_4 مثل الفئران و البرمائيات و السمك (Montalbini , *et al* 1997) إذ يوجد في (كبد ، كلية ، دماغ) الفقريات (Moriwaki , *et al* , 1999) كما ويوجد في أغلب اللبائن (Terkeltaub , 2007) ما عدا الإنسان ، إنسان الغاب ، القردة ، كما انه لا يوجد في الطيور والزواحف واغلب الحشرات (Montalbini , *et al* ,1997) ولقد تم حصر وإيجاز بعض الكائنات التي تملك الإنزيم في الجدول (1-1) .

1-8-1 نبذة عن بكتريا *pseudomonas aeruginosa*

وهي بكتريا إمراضية انتهازية تسبب إصابات عدة وفي مواقع مختلفة من جسم الإنسان والنبات والحيوان (Iglewski ,1996) وتسبب إصابات ثانوية خصوصاً في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة (Ortiz-Herrere , *et al* ,2004) مثل داء السكري diabetes ، الايدز AIDS وتصيب كذلك التجويف الأنفي ، كما وأنها تسبب السحايا meningitis فضلاً عن تسببها في التليف الحويصلي cystic fibrosis و كذلك تسبب أمراض عدة عند الأطفال ، كما وتتواجد في الجروح والحروق (Bayer , *et al* , 1992 ; Song , *et al* , 1997).

جدول (1-1) بعض مصادر انتاج انزيم اليوريكيز .

النباتات	مصادر الانزيم	المراجع
	Cicer arietimum L.(Chickpea) *Vicia faba major L.*(broad bean) *Triticum aestivum* L.(Wheat)	Montalbini , *et al* ,1997
الطحالب	*Chlorella pyrenoidosa* *Chlorella vulgaris* *Monodus subterraneus*	Volgels and Drift, ,1976
الفطريات	*Mucor hiemalis*	Yazdi, *et al* 2005
	Aspergillus niger	Ertan and AskÖz , 2000
	Aspergillus flavus	Budayova-Spano,*et al* , 2006
	Aspergillus nidulans	Helbig, et al ,2002
	Rhizopus oryzae	Farley and Santosa , 2002
	Neurospora crassa	Nahm, and Marzluf , 1987
	Candida tropicalis	Tanaka , *et al* ,1977 ; Takada, and Tsukiji ,1987
	Geotrichum candidum	Barash , 1972
	Penicillium chrysogenum	Volgels , and Drift ,1976
البكتريا	*Bacillus sp*	Huang , *et al* ,2003
	Bacillus fastidious	Yunsheng , *et al* , 2007 ; Mtui ,2007 ; Schiavon, *et al* 2000
	Bacillus subtilis	Pfrimer *et al* ,2010 ; Lee, *et al* ,2006 ; Nygaard, *et al* ,2000
	Klebsiella pneumoniae	Rouf *et al* ,1968
	Streptococcus sp.	Potrikus, and Breznak ,1980
	Mycobacterium intracellulare and *M. scrofulaceum*	Falkinham *et al* ,1983
	Microbacterium sp.	Zhou, *et al* ,2005 ; Kai, *et al*,2007
	Streptomyces graminofaciens	Azab, *et al* 2005
	Pseudomonas aeruginosa	Saeed *et al* ,2004

1-8-2 تسمية البكتريا

مرت تسمية البكتريا بتطورات عدة (Lautrop ; 1974)

- Shroeter ,1872 عندما عزلها أول مرة وأنتجت صبغة البايوسيانين (Pyocyanen) أطلق عليها *Bacterium aeruginosa*

- Gessard , 1882 اتبع التسمية ذاتها ولم يغيرها .

- Zopf , 1884 أطلق عليها *Micrococcus pyocyanens*.

- Trevisan , 1885 أطلق عليها *Bacillus aeruginosa*.

- Migulla ,1900 أطلق عليها اسماً حسب ما تنتجه من صبغة البايوسيانين وهو *Pseudomonas aeruginosa* حيث *تعني كلمة Pseudomonas* (الوحدة الكاذبة) ، وهي كلمة مشتقة من كلمة إغريقية (*pseudo = كاذب*) و(*Monas*) كلمة لاتينية تعني (الوحدة المتحركة) .

أما كلمة *aeruginosa* فهي كلمة لاتينية تعني (صدأ النحاس) وهي صبغة خضراء مزرقة تنتجها البكتريا عند زراعتها مختبرياً .

وهذه الصبغة ناتجة من ازدواج صبغتين احدهما البايوسيانين (الزرقاء) والأخرى البايوفريدين (الصفراء) ويعد إنتاج هذه الصبغة صفة تشخيصية لمزرعة *Pseudomonas aeruginosa*.

1-8-3 الصفات التشخيصية العامة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

تنتمي هذه البكتريا إلى مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام وتعتبر بكتريا هوائية وغير مكونة للسبورات وتكون هذه البكتريا متحركة وتكون حركتها من خلال سوط قطبي واحد كما وإنها موجبة لاختبار الاوكسيديز و الكاتليز (Ortiz-Herrera,*et al* , 2004) شكلها قضيبي (عصوي) قياسها (1.5 X 3.0 µm 0.5 X 0.8 µm) (Iglewski, 1996).

على الرغم من إن معيشة هذه البكتريا تكون هوائية فأن البكتريا تعتبر هوائية اختيارياً حيث إن هذه البكتريا يمكنها إن تنمو لا هوائياً مع النترات كمستقبل نهائي للالكترونات .

وقد تكيفت هذه البكتريا للمعيشة في بيئات لا هوائية أو قليلة التهوية ،اذ إن هذه البيئات اللاهوائية تكون أساسية عند بعض أنماط حياة هذه البكتريا مثلا خلال إصابتها للرئة في مرض التليف الحويصلي cystic fibrosis ، فقد تكون الطبقة السميكة للالجنيت و التي تكون محيطة للخلايا البكتيرية المخاطية سبباً في الحد من انتشار الأوكسجين .

يمكن تشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* سريرياً بإنتاجها كلاً من pyocyanin و fluorescein فضلاً عن قدرتها على النمو عند درجة الحرارة 42 مْ ،كما ولها القدرة على النمو على المركبات البترولية (ديزل) حيث إنها تنتمي إلى الأحياء المجهرية التي تستفيد من الهايدروكاربونات Hydrocarbon ـ utilizing microorganism (HUM) (Hassett , 1996 ; Worlitzsch, *et al* ,2002 ; Cooper, *et al* , 2003 ; Williams, *et* al ,2007) .

تنتج بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ثلاثة أنواع من المستعمرات :

العزلات الطبيعية المعزولة من الماء والتربة تظهر مستعمراتها بشكل مستعمرات خشنة صغيرة ، أما المستعمرات السريرية فأنها عادة تنتج نوعين من المستعمرات الناعمة : النوع الأول تكون واسعة كبيرة مع حواف ملساء و مظهر مرتفع ،النوع الثاني المستحصل عليها من افرازات القناة التنفسية و القناة البولية فتكون ذات مظهر مخاطي (Touder , 1997)

9-1 **الظروف المثلى لإنتاج انزيم اليوريكيز**

تنتج اغلب الأحياء المجهرية أكثر من انزيم واحد أثناء نموها والبعض الأخر لا يفرز أي انزيم خارجي ، وقد يكون من المهم إجراء الموازنة فيما بين وفرة الإنتاجية من الإنزيمات وسهولة وقابلية تلك الإنزيمات في الاستخلاص والتنقية ، ومن أهم العوامل التي تؤثر في تخليق الإنزيمات هي :

1. المكونات الغذائية في وسط التخمر ومصادر الطاقة .
2. فترة النمو ومراحل النمو الميكروبي.
3. الاس الهيدروجيني .
4. درجة الحرارة .
5. التهوية .
6. اختلاف سلالات الأحياء المجهرية .

1-9-1 **تحديد المكونات الرئيسة في الوسط الإنتاجي** :

يمثل الوسط الزرعي الإنتاجي من أهم العوامل المؤثرة ، إذ يُعد البيئة المناسبة التي تنمو عليها الكائنات المجهرية المستخدمة في إنتاج العديد من المواد الفعالة حيوياً (الربيعي ، 1998).

وان نوع مكونات الوسط الزرعي مهمة في إنتاج الإنزيم المشار إليه فقد ذكر عدد من الباحثين إلى ان الوسط الزرعي المناسب لإنتاج انزيم اليوريكيز يجب ان يحتوي في مكوناته على حامض اليوريك الذي يعد هاماً جداً في استحثاث الإنزيم (Saeed, *et al* , 2004) أما مكونات الوسط الإنتاجي فهي كما يأتي :

1) **المصدر الكربوني** :

يتطلب إنتاج الإنزيمات من الأحياء المجهرية مصدر طاقة ، إذ ان اغلب الأحياء المجهرية تستخدم مركبات الكاربوهيدرات القابلة للتحلل لهذا الغرض (الدليمي ، 2002) حيث يلعب المصدر الكربوني دوراً هاماً ، إذ يمثل الكربون من أهم العناصر الرئيسة لحياة الخلايا إذ تصل نسبتهُ 50% من الوزن الجاف للخلايا وكذلك يمثل أهم مصدر للطاقة و هناك الكثير من المصادر الكربونية التي تكون متوفرة للخلايا الحية (الخفاجي ، 1990).

وقد استخدمت الكثير من المصادر الكربونية في انتاج انزيم اليوريكيز حيث استخدم (Saeed *et al* , 2004) الكلوكوز بنسبة % 0.35 كما وتطرق (Liu and Li , 1989) إلى استخدام السكروز كمصدر كاربوني بنسبة % 5 ، بينما (Yazdi , *et al* , 2005) استخدم المالتوز بنسبة 0.6% كمصدر كاربوني .

2) **المصدر النيتروجيني** :

يعد النيتروجين من العناصر المهمة في الوسط الزرعي الذي يعد وجوده في غاية الأهمية حيث يدخل في تركيب الاحماض الأمينية والتي هي الوحدة الأساسية في تركيب البروتينات وبالتالي تبرز أهمية هذا العنصر في إنتاج الإنزيمات الميكروبية (ساجدي والباقر ، 1987) وبصورة عامة فان اضافة المركبات النتروجينية المعقدة التركيب إلى وسط النمو قد تؤثر في تحفيز نمو الأحياء المجهرية ولكن بعض الأحياء المجهرية تتطلب اضافة هذه المركبات النتروجينية لغرض إنتاج الإنزيمات (الدليمي ، 2002). وقد ركزت الدراسات والبحوث العلمية التي تناولت في دراستها التحري عن انزيم اليوريكيز على استخدام حامض اليوريك كمصدر وحيد للنتروجين والطاقة . حيث استخدم (Saeed , *et al* , 2004) حامض اليوريك كمصدر للنتروجين وكمادة حاثة لإنتاج الإنزيم من عزلة بكتريا *p. aeruginosa* وبنسبة 0.3% ، أما (Falkinham *et al* , 1983) فقد استخدم حامض اليوريك وبنسبة 0.02 %، بينما (Yazdi , *et al* , 2005) فأنه استخدم حامض اليوريك وبنسبة 0.7% .

3) **مصدر الفسفور** :

تؤدي المصادر الفوسفاتية دوراً هاماً في الوسط الزرعي حيث يدخل في فسفرة الدهون لتكوين الدهون الفوسفاتية الموجودة في الأغشية الخلوية و الاحماض النووية وعمليات إنتاج الطاقة . ولكي ينمو الكائن المجهري يحتاج إلى وجود فسفور غير عضوي في بيئته وتحتوي الأوساط الزرعية على الفوسفات كمواد دارئة لإعطاء دالة حموضة بإسس هيدروجينية تتراوح بين (4.5 ــ 8) (صالح ، 1991) .

فقد استخدمت فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين مصدراً للفسفور من قبل (Chen *et al* , 2008) ، أما (Falkinham , *et al* , 1983) فقد استخدم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وبنسبة 0.05% ، بينما (Saeed , *et al* , 2004) استخدم K_3PO_4 كمصدر للفسفور وبنسبة 1% .

4. **المصدر الملحي** :

بعض العناصر الضئيلة مثل الكالسيوم والحديد والنحاس والكوبلت تكون ضرورية لنمو الأحياء المجهرية وبعضها يكون جزءاً من الانزيم (الدليمي ، 2002) كما وقد تحتاج البكتريا إلى كلوريد الصوديوم لكونه ضرورياً لفعالية بعض الإنزيمات في حالة التأيض الأولي والثانوي (الخفاجي ، 1990) .

ويُعد المصدر الملحي مهم في المساعدة في انتاج أنزيم اليوريكيز فقد تم اضافة كلوريد المغنسيوم وبنسبة 0.1% إلى الوسط الانتاجي (Saeed , *et al* , 2004) ، اما (Falkinham , *et al* , 1983) فقد استخدم كبريتات المغنسيوم وبنسبة 0.05% .

1-9-2 **تعيين الظروف التنموية المثلى لإنتاج الانزيم**

ان للعوامل البيئية (الفيزياوية ،الكيمياوية) تأثير بالغ الأهمية في تحديد انتاجية الاحياء المجهرية للإنزيمات وتشتمل هذه الظروف التنموية على ما يأتي :

- تأثير الاس الهيدروجيني الذي يقوم بدور فعال في نمو وتكاثر الاحياء المجهرية وبالتالي فهذا يعكس إنتاجية الأنزيمات وهذا يتبين في مدى ذوبانية المكونات الغذائية في الوسط الزرعي وتأين هذه المكونات ومدى جاهزيتها للكائن الحي المجهري ويتحدد الأس الهيدروجيني حسب نوع الكائن المجهري ودرجة ملائمة الأس الهيدروجيني لنمو هذا الكائن المجهري ونوع الانزيم المنتج من الكائن المجهري (الحيدري والمصلح ، 1989) ولقد دلت دراسات عدة إلى ان درجة الحموضة تختلف من كائن لأخر ، اذ أشار (Atalla , *et al*, 2009) إلى ان أفضل اس هيدروجيني لانتاج انزيم اليوريكيز هو 8 ، اما (Yazdi , *et al* , 2005) فقد أشار إلى ان الأس الهيدروجيني الامثل هو عند pH 6 .
- تاثير درجة الحرارة في إنتاج الانزيم ، تعد درجة الحرارة عاملاً مؤثراً لمعظم الفعاليات الحيوية للأحياء المجهرية كالنمو والإنتاج ، فهي تؤثر في مختلف النشاطات الانزيمية في الخلية ، اذ تعتمد درجة حرارة النشاط الانزيمي المثلى على الموقع البيئي لذلك الكائن الحي (السعد ، 1991) . ان درجة الحرارة المثلى لنمو الكائن المجهري لا تكون

دائماً المثلى لإنتاج الإنزيمات ، اذ توجد حالات عدة تكون فيها درجة الحرارة المثلى لإنتاج الانزيم اوطأ من تلك التي تكون مثلى لنمو الكائن المجهري ، اذ ذكر (Yazdi *et al* 2005), ان الدرجة الحرارية الملائمة لإنتاج الانزيم تكون عند 30 مْ .

- تاثير التهوية ، إن التهوية والتحريك للأوساط الزرعية ذو أهمية في إنتاج الإنزيمات من الاحياء المجهرية الهوائية و تتباين التقارير العلمية التي تتعلق بأهمية هذه التهوية في إنتاج بعض الإنزيمات الخارجية بواسطة الاحياء المجهرية الهوائية ، وقد تكون التهوية أحيانا مهمة لتنمية الكائن المجهري وإنتاج الانزيم ولكن شدة هذه التهوية تختلف باختلاف كل كائن مجهري والانزيم حيث تقع أهمية التهوية والتحريك في هذا المضمار في حاجة الاحياء المجهرية للأوكسجين الذائب وتوزيع المادة الركيزة في وسط التنمية (الدليمي ، 2002) ، فقد بين (Saeed) وجماعته سنة 2004 إلى استخدامهم سرع رج مقدارها 200 دورة \ دقيقة في إنتاج الانزيم .
- لا توجد علاقة ثابتة بين فترة نمو الاحياء المجهرية وإنتاج الإنزيمات الخارجية حيث تتباين العلاقة تبعاً للكائن المجهري والانزيم وعوامل النمو المختلفة ، بصورة عامة يكون إنتاج الإنزيمات الخارجية جنباً إلى جنب مع النمو الميكروبي وان افي انتاجية للإنزيمات تكون بعد توقف النمو بشرط استمرار توفر المحثات الضرورية لإنتاج الإنزيمات و تعتمد فترة النمو على عوامل منها الوسط الزرعي ودرجة الحرارة وعوامل أخرى (الدليمي ، 2002).

لقد أشار (Chen) وجماعته سنة 2008 إلى ان الفترة المناسبة لإنتاج انزيم اليوريكيز يكون بعد 72 ساعة من فطر *Hansenula polymorpha* .

1-10 تنقية انزيم اليوريكيز

تناولت بحوث كثيرة طرق مختلفة في تنقية الانزيم من مصادر مجهريه مختلفة . فقد تم تنقية الانزيم بطريقة كروماتوكرافيا التبادل الايوني ، بأستخدام المبادل الأيوني DEAE – Cellulose في عمود زجاجي وبإبعاد (12 x 1) سم وتم استرداده بواسطة استخدام تدرج ملحي من (0.0 – 0.5) مولر لملح كلوريد الصوديوم بعدها طبقت خطوة كروماتوكرافيا الألفة الحيوية

Bio affinity chromatography وبهذه الخطوة استخدم السيفاروز 4B في عمود ابعاده (1 X 7) سم (Salleh ,1980) ، اما (Montalbini) فقد ذكر هو وجماعته سنة 1997 ان الانزيم يمكن ان ينقى بواسطة كروماتوكرافيا الألفة ولكن بأستخدام الزانثين ـ اكاروز – xanthine agarose affinity chromatography كخطوة رئيسة .

ولقد اقترحت طرق أخرى في تنقية انزيم اليوريكيز منها ما ذكرها الباحث (Liu) وجماعته سنة 1993 حيث أشاروا إلى إمكانية تنقية انزيم اليوريكيز من خميرة .*Candida* sp بأتباع خطوات ثلاث ، بدأ أولها بترسيب الانزيم بواسطة استخدام كبريتات الأمونيوم ومن ثم استخدام سيفادكس 200 – G واخيراً استكمل خطواته عندما استخدم كروماتوكرافيا التبادل الايوني باستخدام DEAE – Cellulose DE52 .

اما(Rajoka) فقد قدم هو وجماعته سنة 2006 طريقة تنقية الانزيم المستخرج من كلية الخنزير بأتباع خطوات ثلاث تبدأ بالترسيب بكبريتات الأمونيوم ومن ثم استخدام التبادل الايوني واخيراً الترشيح الهلامي .

وقد اتبعت خطوات تنقية أربع من قبل (Alamillo) وجماعته سنة 2003 بتنقية الانزيم من الطحالب اذ بدأت التنقية بالترسيب بكبريتات الأمونيوم ومن ثم التبادل الايوني و كروماتوكرافيا الألفة واخيراً الترشيح الهلامي .

كما وقد اتبع بعض الباحثين طرق تنقية لانزيم اليوريكيز فكانت الحصيلة الانزيمية 37% عند تنقيتها بكروماتوكرافيا العمود (Mtui , 2007) ، ايضاً تم تنقية الانزيم بإتباع الترسيب بكبريتات الأمونيوم ومن ثم التبادل الايوني بأستخدام DEAE–Cellulose كروماتوكرافيا الغربلة الجزيئية والكارهة للماء فكانت الحصيلة من إتباع هذه الطريقة 31% وعدد مرات التنقية كانت 19.7 مرة (Kai , *et al* , 2007) .

1-11 توصيف الانزيم

1-11-1 الخواص الفيزيوكيميائية لانزيم اليوريكيز :

- تعرف نقطة التعادل الكهربائي للأنزيم بأنها الأس الهيدروجيني الذي تكون عنده محصلة الشحنة للبروتين (الانزيم) تساوي صفراً . وقد ذكرت الكثير من البحوث نقطة التعادل الكهربائي لانزيم اليوريكيز فقد أشار (Liu , *et al* , 1993) الى ان نقطة التعادل الكهربائي تكون عند pH=5.6 ، كما وذكر (Ohe and Watanabe , 1981) ان نقطة التعادل الكهربائي تكون عند pH= 4 ، بينما أشار(Bongaerts) وجماعته سنة 1978 الى ان الانزيم يملك نقطة التعادل عند pH= 4.3 .
- يعد الوزن الجزيئي من أهم الصفات الفيزيوكيميائية للأنزيم وقد تم تحديد الوزن الجزيئي للأنزيم باستخدام الترشيح الهلامي اذ أوضح (Montalbini , *et al* , 1997) الى ان الوزن الجزيئي لانزيم اليوريكيز يبلغ (120 – 130) كيلو دالتون وقد بين انه يتكون من أربع وحدات متجانسة بالحجم تبلغ الواحدة منها (32– 34) كيلو دالتون عند دراسته للأنزيم المستخلص من النباتات ، كما وقد ذكر (Ohe and Watanabe , 1981) الى ان الوزن الجزيئي لانزيم اليوريكيز المنتج من *Streptomyces cyanogenus* يبلغ (100) كيلو دالتون وانه يتكون من ثلاث وحدات تبلغ الوحدة الواحدة 32 كيلو دالتون ، بينما أشار (Yunsheng) وجماعته سنه 2007 الى ان الوزن الجزيئي للأنزيم قد يبلغ 151 كيلو دالتون وان الوحدة الواحدة قد تبلغ 36 كيلو دالتون تقريباً باستخدام الترشيح الهلامي ، وقد يبلغ الوزن الجزيئي 150 – 145 كيلو دالتون ويملك نوعين من الوحدات (Mr = 36 and 39) كيلو دالتون وبنسبة 1:1 (Bongaerts *et al* , 1978,). بينما يكون الوزن الجزيئي لانزيم اليوريكيز المنتج من فطر *Gliomastix gueg* يساوي 60 كيلو دالتون (Mabrouk , *et al* ,2010)

1-11-2 الخواص الحركية لانزيم اليوريكيز:

إن من أهم الثوابت الحركية هي ثابت ميكالس K_m الذي يمثل تركيز الركيزة عندما تكون سرعة التفاعل تساوي نصف السرعة القصوى ، والسرعة القصوى V_{max} التي تمثل السرعة التفاعلية عندما يكون الانزيم مشبعا بالركيزة (الدليمي ، 2002) .

لقد ذكر Bomalaski وجماعته سنة 2002 ان ثابت ميكالس يساوي 20 مايكرومول لانزيم اليوريكيز المنتج من خميرة *Candida utilis* والسرعة القصوى تساوي 10 مايكرومول \دقيقة \ملغم ، كما ان ثابت ميكالس لانزيم اليوريكيز المستخلص من كبد الخنزير يعادل 20 مايكرو مول ، بينما السرعة القصوى للأنزيم تساوي 5 مايكرومول\دقيقة\ملغم .

1-11-3 تأثير الأس الهيدروجيني على فعالية انزيم اليوريكيز

ان لايون الهيدروجين تأثير مهم في فعالية انزيم اليوريكيز حيث انه يُؤثر على الحالة الأيونية للموقع الفعّال فقد يؤدي التغير في تركيز أيون الهيدروجين إلى تأين المجاميع الجانبية للاحماض الامينية في الموقع الفعّال وبالتالي يُؤثر على الحالة التحفيزية للأنزيم كما ويؤثر على مدى ذوبانية الركيزة عند اس هيدروجيني معين فقد تتأثر خصوصاً عندما يكون في الركيزة مجاميع قابلة للتأين ، وبهذا فقد يُغير قابلية الارتباط مع الأنزيم ، كما ويُؤثر الأس الهيدروجيني على مسخ الأنزيم بصورة كاملة غير عكسية نتيجة لتشوه التركيب البروتيني الثالثي للأنزيم (Mckee & Mckee , 1996) ان الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية انزيم اليوريكيز المنتج من بعض الخلايا البكتيرية تكون عند الأس الهيدروجيني (8.5 , 8.8) (Junnosuke , *et al* , 1966) .

اما (Ohe and Watanabe ,1981) فقد ذكرا ان الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية الأنزيمية لأنزيم اليوريكيز المنتج من *Streptomyces cyanogenus* هي عند pH=8 ، اما Yunsheng وجماعته سنة 2007 فقد ذكروا ان الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية انزيم اليوريكيز يكون بمدى من الأس الهيدروجيني يتراوح بين (9 – 10.5).

1-11-4 تاثير درجة الحرارة على فعالية انزيم اليوريكيز :

ان لدرجة الحرارة تأثير مهم جداً على الفعالية الأنزيمية إذ تزداد كلما ازدادت درجة الحرارة بسبب زيادة الحركات الاهتزازية (طاقة التنشيط) للركيزة وجزيئات الأنزيم لكن قد تصل إلى حدٍ معين لتعمل الحرارة على إضعاف الفعالية الأنزيمية بسبب تأثير الحرارة على مسخ الانزيم بتغير التركيب الثلاثي للبروتين وبالتالي التأثير على شكل الموقع الفعَال (Mckee & Mckee , 1996)

كما وقد تؤثر الحرارة على نواحٍ عدة في ثبات الأنزيم وذائبيته و الأس الهيدروجيني للمحلول الدارئ وكذلك ألفة الأنزيم للمواد النشطة والمثبطة وتأين المجموعات المهمة في التفاعل وألفة الأنزيم للركيزة واخيراً درجة الارتباط سلاسل متعدد الببتيد للأنزيم (whitakar ,1972) .

ان درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم اليوريكيز تكون عند 30 مْ كما ذكرها Kai وجماعته سنة 2007 عند دراستهم لأنزيم اليوريكيز المنتج من *Microbacterium* SP. ، اما Bongaerts وجماعته سنة 1978 ذكروا ان الدرجة الحرارية المثلى لفعالية انزيم اليوريكيز المنتج من بكتريا *Bacillus fastidiosus* هي عند (35 – 30) مْ .

1-11-5 تأثير بعض الايونات الفلزية على فعالية انزيم اليوريكيز :

ان للعناصر المعدنية تأثيرات مختلفة على فعالية انزيم اليوريكيز فمنها ما يعمل كمنشط لفعالية الانزيم ومنها ما يعمل كمثبط جزئياً أو كلياً لفعالية الأنزيم ومنها ما ليس لها أي تاثير (محمود ،1992) .

درس (Saeed , *et al* , 2004) تأثير بعض الايونات الفلزية على الفعالية الانزيمية اذ ان هناك بعض الايونات تكون محفزة وهناك ايونات أخرى تكون مثبطة للفعالية الانزيمية كما موضح بالجدول (1-2).

جدول (1–2) تاثير الايونات الفلزية على فعالية انزيم اليوريكيز

الايونات المعدنية	التركيز (mM)	الفعالية الانزيمية المتبقية%
بدون ايون معدني	0.0	100%
EDTA	10.0	80 %
KCN	1.0	0.0 %
Fe^{+2}	1.0	5.2 %
Zn^{+2}	1.0	20.4%
Cu^{+2}	1.0	275.0%
CO^{+2}	1.0	20.0%
Na^{+2}	1.0	182.0%
Ca^{+2}	1.0	236.0%

1-12 **الاستخدامات الطبية لانزيم اليوريكيز** :

تبرز الأهمية الطبية لانزيم اليوريكيز على انه من الإنزيمات ذات التأثير الطبي المهم لغيابه في جسم الانسان اذ يستخدم الانزيم بمجالين طبيين مهمين وهما :

1-12-1 **استخدام الانزيم في التقدير الكمي لنسبة حامض اليوريك في الدم** :

بسب ارتفاع نسبة حامض اليوريك في الدم والإمراض التي يسببها هذا الارتفاع ، فقد يستخدم الانزيم كعامل مهم في قياس نسبة حامض اليوريك في السوائل البايولوجية (Rajoka , *et al* , 2006 ; Fukumoto , *et al* , 1969) وبالتالي استخدامه في تشخيص حالات ارتفاع حامض اليوريك مثل داء النقرس (Terkeltaub , *et al* , 2006 ; Mtui , 2007). تكون آلية استخدام انزيم اليوريكيز في الكشف عن نسبة حامض اليوريك في الدم من خلال تقييد انزيم اليوريكيز مع انزيم البيروكسيديز اذ تعتمد هذه الطريقة على بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (الناتج من تحلل حامض اليوريك بفعل انزيم اليوريكيز) ، وان بيروكسيد الهيدروجين سوف يتفاعل مع انزيم البيروكسيديز ليعطي معقد لوني يستدل من خلاله على كمية حامض اليوريك الموجودة في السوائل الجسمية (Bhargava , *et al* , 1999) .

و تأتي الأهمية السريرية لانزيم اليوريكيز واستخدامه في التشخيص السريري من التخصصية العالية تجاه حامض اليوريك (Tanaka , *et al* , 1977) كما وان الثباتية العالية للأنزيم والفعالية في مدى واسع من الأس الهيدروجيني الأثر المهم في استخدام الانزيم في التشخيص السريري (Huang and Wu , 2004).

1-12-2 **استخدام الانزيم في العلاج** :

نظراً لخطورة داء النقرس وما يسببه من الآم والتهابات مؤلمة جداً ، فقد عمل الباحثون على اكتشاف الكثير من العلاجات الكيمياوية لاختزال خطورة هذا المرض ، إذ يبدأ العلاج أو يعتمد على :

- تثبيط إنتاج حامض اليوريك (تثبيط عمل انزيم xanthine oxidase) .
- زيادة إفرازه وإخراجه خارج الجسم والتخلص من تأثيره السام .
- فضلاً عن ذلك فأن الأنسجة الملتهبة يمكن علاجها بواسطة Colchicine كذلك الادوية المضادة للالتهابات غير الستيرويدية non – steroidal anti – inflammatory drugs (NSAIDs) (Owen , 2006).

ومن ضمن العلاجات المستخدمة في علاج مرض النقرس هو البنزبروماورون Benzbromarone حيث يُعد من العلاجات الكيميائية التي تعطي استجابة جيدة في علاج الزيادة الحاصلة في نسبة حامض اليوريك في الدم ولكن هذا العلاج لا يُستخدم كثيراً ، بسبب ارتباطه مع الفشل الوظيفي للكبد (Vogt , 2004) .

ولذلك فقد انصرف الباحثون إلى اختيار علاج كيميائي اكثر كفاءة من غيره ، فقد أستخدم العلاج Allopurinol لعلاج داء النقرس (Chen *et al* , 2008) حيث يعمل على اختزال نسبة حامض اليوريك في الدم وذلك من خلال عمله على انه مثبط تنافسي لانزيم الزانثين اوكسيديز xanthine oxidase (Ganson , *et al* , 2006) والذي يحول الزانثين إلى حامض اليوريك ولكن في بعض الحالات المعقدة يُؤخذ علاج Allopurinol مزدوجاً مع uricosuric الذي هو أساسي في علاج النقرس حالياً (Moolenburgh , *et al* , 2006) أو يزدوج مع probenecid (Reinders , *et al* , 2006).

ان حوالي أكثر من 5% من المرضى غير قادرين على تحمَل Allopurinol بسبب التفاعلات الجانبية المؤذية وخطر تفاعلات الحساسية الخطيرة (Owen , 2006) . والتداخلات الدوائية والسمية الكبدية في بعض المرضى خصوصاً عند وجود الفشل الكلوي

(pay , 2002) ، من جهة أخرى فأن الدوام على العلاج قد يكون غير مؤثر في النهاية (Owen , 2006) . لذا كان التوجه إلى اكتشاف علاج أكثر فائدةً واقلُ ضرراً من العلاجات الكيميائية ، حيث تم استخدام انزيم اليوريكيز المنتج من الفطر *A. flavus* كبروتين دوائي لاختزال تجمع حامض اليوريك السام (Budayova–Spano *et al* , 2006) .

ان استخدام الانزيم الفطري لعلاج مرض التهاب المفاصل المزمن (داء النقرس) يتحدد بواسطة :

- التخلص السريع منه بواسطة المناعة القوية .
- والسبب الثاني هو الذوبانية القليلة جداً عند الأس الهيدروجيني الفسيولوجي وهو حاجز إضافي للعلاج بأنزيم اليوريكيز غير المحور للبائن (Kelly , 2001).

لذا كان التوجه إلى تحوير الانزيم بالارتباط المكافئ للبولي اثلين كلايكول PEG للمجاميع الأمينية البارزة من البروتين للمساعدة في :

1. الذوبانية في الأس الهيدروجيني الفسيولوجي .
2. طول فترة حياته في جهاز الدوران واختزال المناعة (Kelly , 2001).

كما ان الحقن المباشر لانزيم اليوريكيز المرتبط مع PEG للمرضى الذين يعانون من النقرس الحاد المرتبط مع الفشل الكلوي سوف يؤدي إلى التحطم السريع لحامض اليوريك (Saeed , *et al* , 2004) .

13-1 انزيم اليوريكيز واستخدام تقنية الهندسة الوراثية

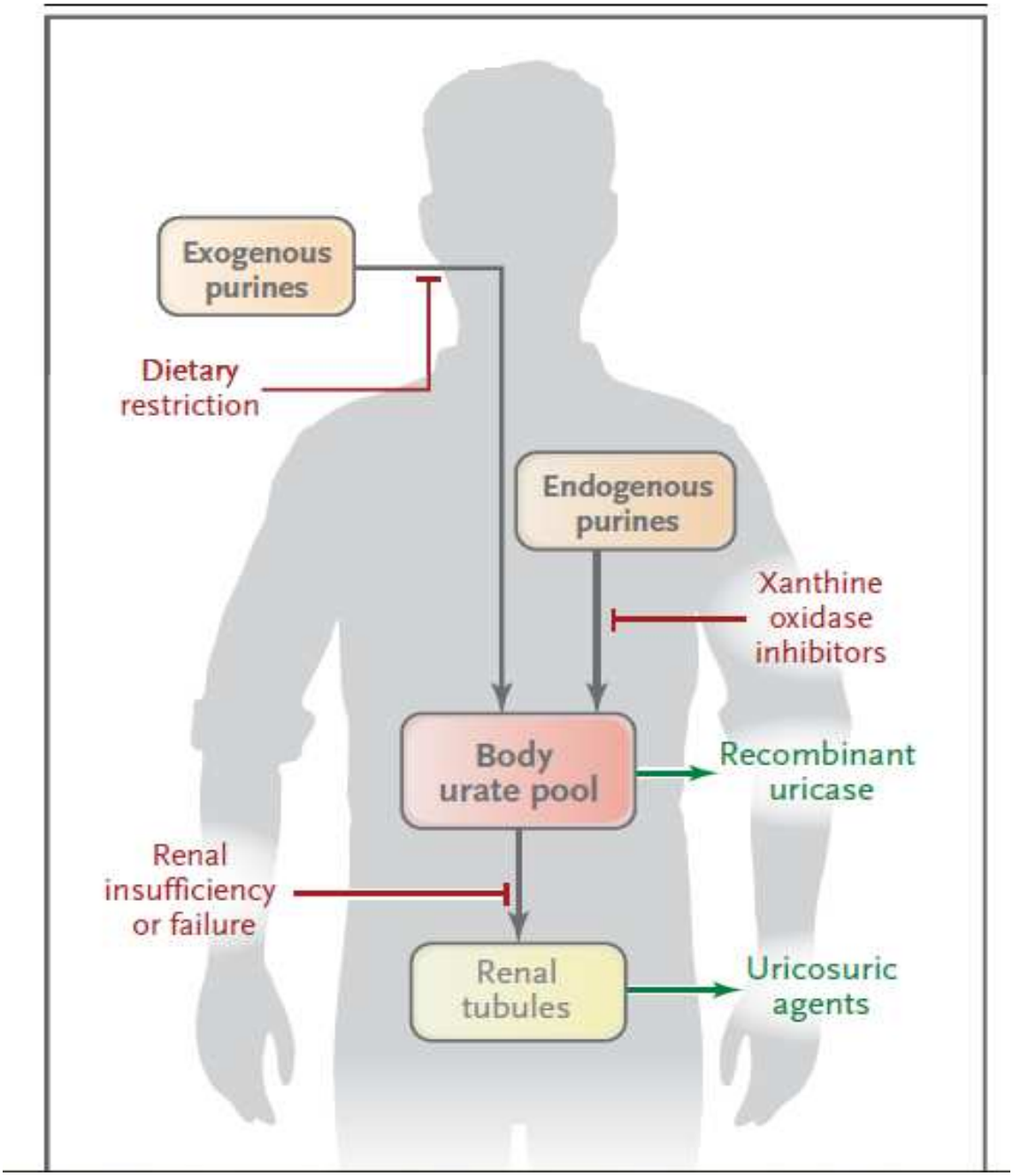
ان أول جزيئة إنزيمية لانزيم اليوريكيز أنتجت من فطر *A. flavus* سنة 1968 واستخدمت لعلاج حالات ارتفاع حامض اليوريك الذي يحدث خلال العلاج الكيميائي لإمراض السرطان فقد سعت الدول الأوربية مثل فرنسا ، ايطاليا وغيرها منذ نهاية الستينات من القرن الماضي الى إنتاج انزيم اليوريكيز أو ما يعرف بمؤكسد اليوريت

urate oxidase من الاحياء المجهرية دون إخضاعها لأي تغير في التركيب الوراثي (non Recombinant) أي استخدم الانزيم المنتج طبيعياً من خلال الحصول عليه من المزارع ثم أخضاعه الى عمليات التنقية الى حد التجانس . لكن مناعة الجسم تلعب دوراً مهماً قي تكوين الأجسام المضادة مع اختزال التأثير الدوائي للأنزيم ، كما ان فرط التحسس المرافق للطفح الجلدي وارتشاح السوائل بالأوعية (Angioedema) يحدث في حوالي 5% من المرضى ، ان مثل تفاعلات الحساسية هذه تحدث خلال 1-17 دقيقة بعد اخذ أول جرعة (Cammalleri L. and Malaguarnera M. , 2007) .

ولكن منذ عام 1996 كان التوجه إلى استخدام تقنيات الهندسة الوراثية في إنتاج انزيم اليوريكيز المكلون باستخدام تقنيه تهجين ألدنا (Recombinant DNA Technology) من خلال كلونه الجين المسؤول عن إنتاج انزيم اليوريكيز في فطر *A. flavus* والتعبير عنه في خميرة *Saccharomyces cervisiae* (Reinders , *et al* , 2006) .

وقد سمي الانزيم المنتج من الخميرة بأنزيم الراسب يوريكيز Rasburicase والذي يستخدم حالياً في علاج مرضى النقرس في الولايات المتحدة اذ أجيز استخدامه منذ سنة 2001 (Reinders , *et al* , 2006) حيث يُستخدم كبروتين علاجي في علاج مرضى ارتفاع حامض اليوريك المرافق لسرطان الدم الخبيث (Moolenburgh, *et al* , 2006 ; Terkeltaub ,2007)

يمتلك انزيم (الراسب يوريكيز) نقاوة عالية ، كما ويكون ذا فعالية نوعية أفضل (Bayol *et al* , 2010) ، حيث يعمل على تحطيم حامض اليوريك في الجسم للمرضى الذين يعانون من العقد النقرسية المعقدة والتي يصعب علاجها بواسطة الالوبيورينول Allopurinol و يختلف علاج مرض النقرس بواسطة الالوبيورينول عن العلاج بواسطة انزيم الراسب يوريكيز اذ يعمل الالوبيورينول على منع إنتاج حامض اليوريك لكن لا يعمل على تحطيمه ، بينما يعمل انزيم الراسب يوريكيز على تحطيم حامض اليوريك إلى مركب أسهل إفرازا هو Allantoin كما موضح في الشكل (1-6) (Neogi , 2011) .



شكل (1–6) الاستخدام الطبي لانزيم اليوريكيز في مرضى ارتفاع نسبة حامض اليوريك في الدم (Neogi , 2011) .

اما الحالات التي يسمح بها اخذ انزيم الراسب اليوريكيز فهي كالأتي :

- يعطى للمرضى الذين يعانون من اللوكيميا myeloblastic leukemia مع عدد من كريات الدم البيض أكثر من $100000/mm^3$.

- المرضى الذين يكونون في المرحلة الثالثة والرابعة من ورم الغدد اللمفاوية وزيادة من مستوى LDH و مستوى عالي من حامض اليوريك .
- للمرضى المتضمنين للفشل الكلوي او الضعف الكلوي .
- لمرضى مع اللوكيميا من نوع L3 leukemia .
- المرضى بالمرحلة الثالثة والرابعة من ورم الغدد اللمفاوية lymphoblastic lymphoma وكتلة الورم تبلغ اكبر من 10 سم مع الفشل الكلوي .

كما ويعطى انزيم الراسب يوريكيز عن طريق الحقن الوريدي (Al Shehri , *et al* , 2005) .

2 – المواد وطرائق العمل : Material and Methods

2-1 الأجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة :

2-1-1 الأجهزة المستخدمة و الشركات المجهزة :

ت	اسم الجهاز	الشركة المجهزة
1	ميزان حساس (sensitive balance)	Sartorious – Germany
2	مقياس الاس الهيدروجيني (pH – meter)	Mauritius – Germany
3	المؤصدة (Autoclave)	Y X – 280 B – china
4	ماصات دقيقة (micropipettes)	Humman – Germany
5	جهاز تقطير (Distillater)	GFL – Germany
6	فرن كهربائي (oven)	Memmert – Germany
7	حاضنة (Incubator)	Fisher scientific – Germany
8	حمام مائي هزاز (Reciprocal shaker water bath)	Julabo SW23 – Germany
9	جهاز المطياف الضوئي(spectrophotometer)	Tudor – Korea
10	حمام مائي (water bath)	Tafesa – Germany
11	جهاز الطرد المركزي (centrifuge)	Hettich – Germany
12	جهاز مزج ذو الصفيحة المزدوجة الساخنة (Hot – plate magnetic stirrer	Labtach – Korea
13	حاضنة هزازة (shaker incubator)	Labtach – Korea
14	جهاز المطياف الضوئي ذو الأشعة فوق البنفسجية – UV visible spectrophotometer	Shimadzu UV –Visible Spectro photometer – 1800 Japan
15	حمام مائي مبرد بالماء الدائر (Cooling circulating water bath	HAAKE – Germany
16	مجهر ضوئي (microscope)	Motic – Germany
17	جهاز الطرد المركزي المبرد(cooling centrifuge)	Hettich – Germany
18	مضخة تفريغ (vacuum pump)	japan
19	مازج للأنابيب (vortex shaker test tube shaker)	Mariobrunoroma . SRL
20	حجيرة تلقيح (Laminar flow cabinet)	Jeio-tech – Korea

2-1-2 المواد الكيمياوية

تم الحصول على المواد الكيمياوية المستخدمة في هذه الدراسة من الشركات المبينة أدناه :

ت	المواد الكيمياوية	الشركة المجهزة
1	الكلوكوز ($C_6H_{12}O_6$) ، ألبومين المصل ألبقري (BSA)	AFCO / India
2	فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين (NaH_2PO4)	BDH
3	كبريتات المغنسيوم المائية ($MgSO_4-H_2O$) ، كلوريد المغنسيوم (NH_4CL) ، حامض البوريك ($H3PO4$) ، كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ ، كلوريد الفضة ($AgCl$) ، كلوريد الحديد ($FeCl_2$) ، كلوريد الزئبق($HgCl_2$) ، كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) ، كلوريد المنغنيز ($MnCl_2$) ، EDTA ، كلوريد الامونيوم NH_4Cl ، الفينول Phenol	CAELO ERBA
4	فوسفات البوتاسيوم ثنائيه الهيدروجين (KH_2PO_4) ، الترس القاعدي Tris-Base	Fluka-switzerland
5	حامض الهيدروكلوريك (HCl)	GFS-Chemicals-Germany
6	الايثانول المطلق (C_2H_5OH) ، الاسيتون (C_3H_{60}) ، حامض الفسفوريك phosphoric acid	HAZARD-VK
7	DEAE-Cellulose	Pharmacia/sweden
8	صبغة الكوماسي الزرقاء (Coomasiae Brilliant Blue G250)	SIGMA-ALDRICW-VSA
9	هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) ، كلوريد الصوديوم (NaCl)	THOMAS BAKE
10	بيروكسيد الهيدروجين	GCC (ANACYT)
11	حامض اليوريك	BDH (England)
12	Uricase kit	RANDOX - UK
13	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K_2HPO_4	Analar - England
14	حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4	Sd. Fine-chem. Limitd-Mumbai

15	الاكار المغذي Nutrient agar ، اكار الدم Blood agar ، الجيلاتين Gelatin ، وسط سيمون ستريت Simmons citrate agar ، ببتون pepton ، مانيتول Manitol ،	HIMEDIA (India)
16	دليل احمر الفينول phenol red indicator	MERCK
17	الاكار Agar	Rashmi Diagnostic (India)
18	حامض الخليك Acitic acid	Biosolve
19	صبغة غرام gram stain	معهد المصول واللقاح العراقية (VSI)

2- 2 **طرائق العمل**

2-3 اختيار العزلة البكتيرية المناسبة :

تم الحصول على 15 عزلة بكتيرية معزولة ومشخصة تعود اغلبها إلى جنس بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كما موضح في الجدول (2-1) .

جدول (2-1) مصدر العزلات البكتيرية المستخدمة في هذه الدراسة .

ت	نوع البكتريا	المصدر
1	*Pseudomonas aeruginosa 1*	كليه الزراعة \ جامعة كربلاء
2	*Pseudomonas aeruginosa 2*	كليه الزراعة \جامعة كربلاء
3	*Pseudomonas aeruginosa 3*	كلية العلوم \ جامعه الكوفة
4	*Pseudomonas aeruginosa 4*	كلية العلوم \ جامعة بابل
5	*Pseudomonas aeruginosa 5*	مستشفى الأطفال \كربلاء المقدسة
6	*Pseudomonas aeruginosa 6*	مستشفى الأطفال \ كربلاء المقدسة
7	*Pseudomonas aeruginosa 7*	مستشفى الأطفال \ كربلاء المقدسة
8	*Pseudomonas aeruginosa 8*	مستشفى الأطفال \ كربلاء المقدسة
9	*Bacillus* sp. 1	مختبر الصحة العام \ كربلاء المقدسة
10	*Bacillus* sp. 2	مختبر الصحة العام \ كربلاء المقدسة
11	*Bacillus* sp. 3	مختبر الصحة العام \ كربلاء المقدسة
12	*Bacillus* sp. 4	مختبر الصحة العام \ كربلاء المقدسة
13	*Bacillus* sp. 5	مختبر الصحة العام \ كربلاء المقدسة
14	*Klebsiella pneumonia 1*	مختبر الشرق الأهلي \ كربلاء المقدسة
15	*Klebsiella pneumonia 2*	مختبر الشرق الأهلي \ كربلاء المقدسة

2-4 **الغربلة الأولية و الثانوية** :

2-4-1 **المواد** :

2-4-1-1 وسط الاكار المغذي

2-4-1-2 حامض اليوريك

2-4-1-3 تحضير الوسط الإنتاجي

حُضر الوسط الإنتاجي لإنزيم اليوريكيز حسب طريقة (saeed , *et al* , 2004) ولكن مع بعض التحويرات التي تتمثل باستخدام K_2HPO_4 بدلاً من K_3PO_4 و يتكون الوسط الإنتاجي مما يأتي :

تم تحضير الوسط الإنتاجي بأذابة 10 غم من K_2HPO_4 و 3 غم من حامض اليوريك و 1 غم من $MgCl_2$ و 3.5 غم من الكلوكوز كمصدر كاربوني في 900 مللتر ، عُدل الاس الهيدروجيني إلى 7.0 ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر .

2-4-2 **طرائق العمل**

2-4-2-1 **الغربلة الأولية (شبه الكمية)** semi quantitative screening

تم إتباع طريقة (Azab , *et al* , 2005) مع بعض التحويرات ، إذ تم استخدام وسط الاكار المغذي بدل الوسط الإنتاجي للأنزيم وإضافة نسبة 0.3% من حامض اليوريك إلى الاكار المغذي ، عُقم بعدها الوسط بالمؤصدة .

وأُستخدم هذا الوسط للكشف أو الغربلة شبه الكمية وذلك بتخطيط المزروع البكتيري على الوسط وحضن الإطباق بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة حيث إن ظهور الهالة الشفافة حول المستعمرات البكتيرية دلالة على إنتاج إنزيم اليوريكيز من العزلات البكتيرية .

2-2-4-2 **الغربلة الثانوية (الكمية)** quantitative screening

تم اختيار العزلات التي أظهرت نتائج ايجابية في تكوينها للهالة الشفافة حول المستعمرات في الغربلة شبه الكمية والتي حُضنت بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة

نشطت العزلات البكتيرية وذلك بزراعتها على الوسط الإنتاجي بعد تعقيمهُ بالمؤصدة ، ويتم ذلك اخذ مسحة من البكتريا المزروعة على وسط الاكار المغذي وتلقيح الوسط الإنتاجي وحُضن الوسط في حاضنة هزازة عند درجة حرارة 37 مْ وسرعة رج 200 دورة \ دقيقة و لمدة 24 ساعة .

في اليوم التالي يتم تحضير الوسط الإنتاجي لإنزيم اليوريكيز وذلك بحجم 25 مللتر في دورق مخروطي سعة 250 مل وبواقع مكررين لكل عزلة ، بعد تعقيمها يتم تلقيحها بلقاح حجمه (1% من الوسط الإنتاجي) من المزروع البكتيري النشط ، حضنت الدوارق تحت نفس الظروف الانفة الذكر وبعد انتهاء فترة الحضن نبذ المزروع البكتيري بسرعة 6000 دورة ادقيقة ولمدة 5 دقائق وذلك لفصل الكتلة الحيوية عن الراشح الأنزيمي ، بعدها تم تقدير الفعالية وتركيز البروتين لحساب الفعالية النوعية والتي اعتمدت كمقياس لتحديد العزلة الأكفأ في إنتاج الأنزيم .

2-5 **تقدير الفعالية الأنزيمية لأنزيم اليوريكيز** :

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (Azab *et al* , 2005) في تقدير فعالية أنزيم اليوريكيز بالاعتماد على الانخفاض في قيم الامتصاصية لعالق الركيزة بالمقارنة مع عالق مماثل خالٍ من الفعالية الأنزيمية وكما يأتي :

2-5-1 **المحاليل المستخدمة** :

محلول رقم (1) : 0.1 M من محلول دارئ بورات الصوديوم

حُضر هذا المحلول بأذابة 6.2 غم من حامض البوريك في كمية من الماء المقطر (900 مل) ومن ثم تم تعديل الاس الهيدروجيني إلى 9.0 بعدها يكمل الحجم إلى 1 لتر .

محلول رقم (2) : M 0.2 من محلول سيانيد البوتاسيوم

تم تحضير هذا المحلول بإذابة 1.3 غم من سيانيد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر .

محلول رقم (3) : محلول مادة التفاعل

حُضر محلول مادة التفاعل وذلك بنسبة (20 µg من حامض اليوريك لكل 1 مل من دارئ بورات الصوديوم (pH = 9.0 إذ تم إذابة 0.002 غم من حامض اليوريك في 100 من محلول رقم (1) .

2-5-2 **طريقة العمل** :

1. وُضع 2 مل من محلول رقم (3) في انابيب اختبار .
2. ثم أضيف لها 0.3 مل من الماء المقطر .
3. بعدها أضيف 0.5 مل من المحلول الأنزيمي لإجراء التفاعل الأنزيمي عند درجة حرارة 30 مْ ولمدة 15 دقيقة .
4. تم إيقاف التفاعل وذلك بإضافة 0.2 مل من محلول رقم (2) .

يتم عمل معاملات قياسية بدون إجراء التفاعل الأنزيمي وذلك بإضافة محلول رقم (2) قبل إضافة المحلول الأنزيمي كي لا يحدث أي تفاعل أنزيمي ويبقى التركيز الأصلي لحامض اليوريك نفسهُ في الأنابيب .

5. سجلت قيم الامتصاص على الطول الموجي 293 نانوميتر بعد تصفير الجهاز واخذ الفرق بين الأنابيب التي حصل فيها التفاعل الأنزيمي والمعاملات القياسية .

تعرّف وحدة الفعالية الأنزيمية بأنها (كمية الأنزيم اللازمة لتحويل 1 µmol من الركيزة إلى الالنتوين allantoin تحت الظروف القياسية) .

2-6 **تقدير البروتين**

لغرض تقدير تركيز البروتين خلال مراحل انتاج وتنقية انزيم اليوريكيز فقد اتبعت طريقة براد فورد (Bradford , 1976).

2-6-1 **المحاليل المستخدمة** :

محلول رقم (1) محلول الصبغة (Coomassie Birlliant Blue G250) :

حُضر محلول الصبغة بأذابة 100 ملغم من صبغة الكوماسي الزرقاء G250 في 50 مل من الكحول الاثيلي (95%) ، ثم إضافة 100 مل من حامض الفسفوريك (85%) مع التبريد ، ثم إكمال الحجم إلى 1 لتر بإضافة الماء المقطر .

محلول رقم (2) محلول دارئ الفوسفات :

تم تحضير دارئ فوسفات البوتاسيوم وذلك بأذابة 1.36 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر و عُدل الاس الهيدروجيني الى pH = 7 ثم إكمال الحجم الى 100 مل .

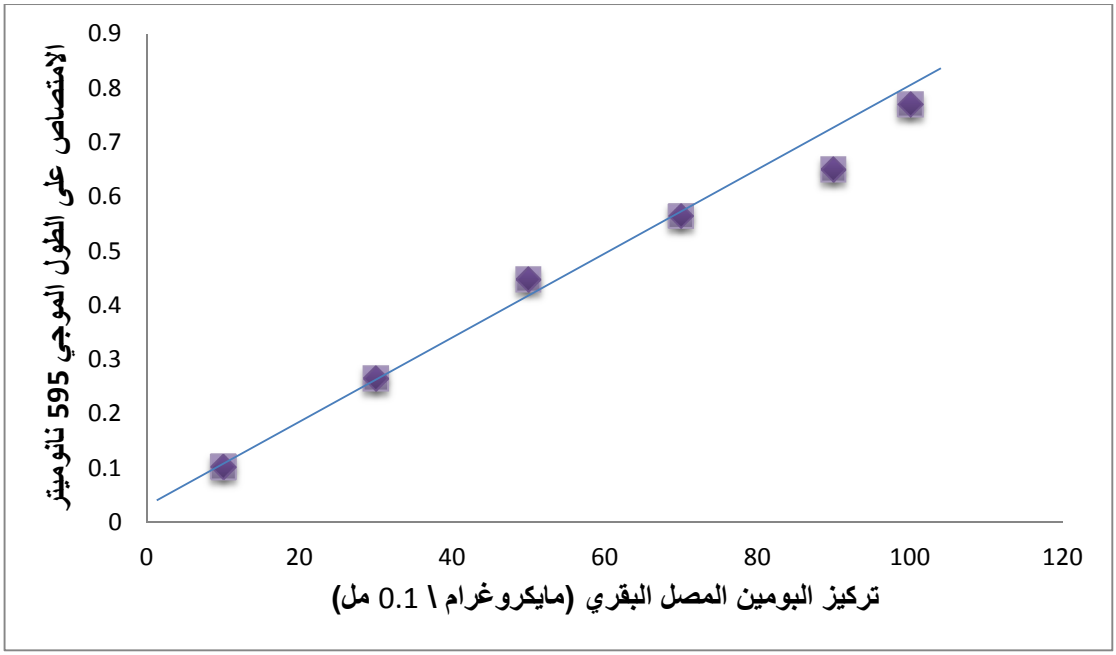
محلول رقم (3) محلول ألبومين المصل ألبقري القياسي (1 ملغم \مل)

حُضرت تراكيز متدرجة من ألبومين المصل ألبقري حسب الجدول الأتي :

ت	حجم البروتين القياسي (µL) BSA	كمية المحلول الدارئ المضاف (µL)	الحجم النهائي (µL)	التركيز النهائي للبروتين (BSA) مايكروغرام \ 0.1 مل
1	10	90	100	10
2	30	70	100	30
3	50	50	100	50
4	70	30	100	70
5	90	10	100	90
6	100	0.0	100	100

2-6-2 المنحنى القياسي للبروتين :

أُخذ 100 مايكروليتر من كل تركيز وأُضيف إليها 5 مل من صبغة الكوماسي الزرقاء G250 ، ومزج الخليط بصورة جيدة ثم تُرك لمدة 5 دقائق . بعدها قرأ الامتصاص لكل تركيز (مكررين) عند الطول الموجي 595 نانوميتر ، بعد أن صُفر جهاز المطياف بمحلول الكفء (Blank) الذي يتكون من 100 مايكروليتر من دارئ الفوسفات (pH = 7.0) و5 مل من محلول صبغة الكوماسي الزرقاء G250. رُسم المنحنى القياسي لامتصاص الضوء عند الطول الموجي 595 نانوميتر مقابل تركيز ألبومين المصل ألبقري . (الشكل 2-1)



الشكل (2-1) المنحنى القياسي لألبومين المصل ألبقري لتقدير البروتين بطريقة براد فورد .

2-7 الأوساط الزرعية المستخدمة culture media

حُضرت الأوساط الزرعية جميعها وفقاً لتعليمات الشركات المجهزة وعقمت بالمؤصدة وبدرجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة .

2-7-1 وسط الاكار المغذي Nutrient agar

استعمل هذا الوسط لغرض تنمية البكتريا ودراسة الخواص الزرعية والمظهرية للبكتريا .

2-7-2 وسط أكار الدم Blood agar

تم تحضير وسط أكار الدم بإضافة 5% من دم الإنسان إلى الوسط الأساس blood agar base المعقم بالمؤصدة والمبرد إلى درجة حرارة (50 – 45) مْ وأستعمل هذا الوسط لتنمية أنواع البكتريا كلّها ومعرفة قابليتها على تحليل الدم (Deboyīī *et al* 1980) .

2-7-3 وسط غراء سيمون ستريت Simmons Citrate Agar

استعمل هذا الوسط لتحديد قابلية البكتريا على استغلال السترات كمصدر وحيد للكاربون والطاقة إذ حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة .

2-7-4 وسط مانيتول الحركة Mannitol Motility Medium

تم تحضير هذا الوسط بأذابة 3 غم من خلاصة اللحم (meat extract) و 10 غم من الببتون peptone و 50 غم من المانيتول Mannitol و 0.3 غم من الأكار و 0.018 من دليل احمر الفينول في لتر من الماء المقطر عندها عُدل الاس الهيدروجيني إلى 7 و وُزع في انابيب نظيفة بعدها تم تعقيمها بالمؤصدة (Finegold and mortin , 1982) . وقد استعمل هذا الوسط لغرض تحديد قابلية البكتريا للحركة .

2-7-5 وسط اختزال النترات Nitrate Reduction Medium

استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على اختزال النترات إلى نتريت ، حيث تم تحضير هذا الوسط بأذابة 0.2 غم من نترات البوتاسيوم KNO_3 و 5 غم من الببتون في لتر من الماء المقطر ثم وُزعت في انابيب زجاجية نظيفة و عُقمت بالمؤصدة (collee *et al* , 1996) .

2-7-6 وسط غراء الجيلاتين Gelatine agar

حُضر بأذابة 4.4 غم من الجيلاتين في لتر من الوسط المغذي الصلب Nutrient agare ، وعُقم بالمؤصدة ليستعمل هذا الوسط في التحري عن قابلية البكتريا على تحلل الجيلاتين (Collee *et al* , 1996) .

2-7-7 **الكواشف والمحاليل** Solutions and Reagents

2-7-7-1 **كاشف اختزال النترات** Nitrate Reduction

يتكون هذا الكاشف حسب ما ذكره (Collee *et al* , 1996) من محلولين هما :

(A) **محلول السلفانليك** Sulfanilic acid Reagent

وقد حُضر بأذابة 8 غم من حامض السلفانليك Sulfanilic acid في لتر من حامض الخليك (5N) Acetic acid .

(B) **محلول الفا نفثيل امين** Alpha naphthyl amine

حُضر هذا المحلول بأذابة 5 غم من مادة الفا نفثيل امين في لتر من حامض الخليك قبل الاستعمال إذ مُزج حجمين متساويين من محلول (B) و (A) لتكوين الكاشف .

2-7-7-2 **كاشف اختبار الاوكسيديز** Oxidase test reagent

تم تحضير هذا المحلول فور الاستخدام بأذابة 1 غم من Tetra Methyl P. Para Phenylen diamen dihydrochloride في 100 مللتر من الماء المقطر في قنينة معتمة ومعقمة (Baron *et al* , 1995) .

2-7-7-3 **كاشف اختبار الكاتليز** Catalase test reagent

حضُر محلول بيروكسيد الهيدروجين بنسبة 3% وذلك بأخذ 6.667 مل من بيروكسيد الهيدروجين ذي التركيز 45% وأكمل الحجم بالماء المقطر الى 100مل و وُضع الكاشف في قنينة معتمة ومعقمة (Baron *et al* , 1995) .

2-7-8 **محاليل صبغة كرام** **gram stain**

حُضرت هذه المحاليل بحسب ما ذكرهُ Wisteriech and Lechman سنة 1980 حيث استخدمت لدراسة الخصائص المظهرية للبكتريا قيد الدراسة .

2-8 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical test

لغرض إجراء هذه الفحوصات تم استخدام المزروع البكتيري للعزلة المنتخبة والنامية على وسط الاكار المغذي وبعمر 24 ساعة ، وتشمل هذه الفحوصات ما يأتي :

(A) فحص الاوكسيديز Oxidase test

تم إجراء هذا الفحص بنقل كمية قليلة من المزروع البكتيري بواسطة الناقل الزجاجي أو سلك بلاتيني على ورقة ترشيح نظيفة وجافة ومن ثم وضع بضع قطرات من كاشف الاوكسيديز ، فعندما تتلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي فذلك يدل على إن النتيجة موجبة (Baron *et al* , 1995) .

(B) فحص الكاتليز Catalase test

أُجري هذا الفحص بنقل النمو البكتيري المزروع على وسط الاكار المغذي بواسطة حلقة الناقل إلى شريحة زجاجية نظيفة وجافة ، ثم إضافة قطرة واحدة من محلول 3% من بيرو كسيد الهيدروجين ، إن ظهور الفقاعات الغازية دلالة على النتيجة الموجبة (Baron *et al* , 1995) .

(C) اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

تم تلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد اختياره ، وحُضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 – 96 ساعة ، فإذا ما تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق وظهور النمو على خطوط الزرع فذلك يدل إن النتيجة الموجبة (Collee *et al* , 1996) .

(D) قابلية الحركة Motility test

أُجري هذا الفحص بتلقيح وسط الحركة بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 – 48 ساعة . وإن انتشار النمو خارج حدود الطعنة دلالة على قابلية البكتريا على الحركة (Finegold and martin , 1982) .

(E) فحص اختزال النترات Nitrate reduction test

تم تلقيح وسط اختزال النترات بالمزروع البكتيري وحُضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 – 96 ساعة ، بعدها تم إضافة 1 مللتر من حامض السلفانليك و 1 مللتر من كاشف الفا نفثيل امين المخلوطان فوراً قبل الاستعمال فعندما يظهر اللون الأحمر خلال 30 ثانية فذلك يدل إن النتيجة الموجبة التي تشير إلى اختزال النترات Nitrate إلى نتريت Nitrite (Collee et al , 1996) .

(F) الكشف عن إنتاج الهيمولايسين Haemolysin production

لُقح وسط غراء الدم بعد التأكد من عدم تلوثهُ بالمزروع البكتيري المراد فحصهُ ، ثم حُضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 – 48 ساعة فان ظهور مناطق تحلل حول المستعمرات النامية تعبير عن قابلية البكتريا على إفراز سموم الهيمولايسين (Deboy, *et al* ., 1980)

(G) الكشف عن قابلية البكتريا على النمو بدرجة حرارة 42 مْ

تم تلقيح وسط الاكار المغذي بالمزروع البكتيري المراد فحصهُ ثم تم حضنهُ بدرجة حرارة 42 مْ لمدة (2– 4) أيام فأن ظهور النمو الواضح دلالة على إمكانية البكتريا على النمو في هذه الدرجة الحرارية (Claus and Berkeley , 1984) .

2-9 تعيين الظروف المثلى لإنتاج أنزيم اليوريكيز

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 .

2-9-1 تعيين التركيز الأمثل للمصدر الكاربوني

تم استخدام عصير التمر كمصدر كاربوني بدلاً عن الكلوكوز .

2-9-1-1 تحضير عصير التمر:

استخدم عصير التمر كمصدر كاربوني في وسط إنتاج إنزيم اليوريكيز تم تحضيرهُ حسب الطريقة الموصوفة من قبل Al – Obaidi et al , 1987 وذلك بإضافة 500 غم من التمر ألزهدي بعد إزالة النوى والأقماع إلى لتر من الماء الساخن ويُترك لمدة ليلة كاملة ، في اليوم التالي يتم ترشيح المزيج باستخدام ورق الترشيح للحصول على عصير التمر بشكل رائق .

2-9-1-2 تقدير المواد الكاربوهيدراتية الكلية :

المحاليل المستخدمة:

1. حامض الكبريتيك المركز 98% .
2. محلول 5% فينول :تم تحضيرهُ بإذابة 5 غم من الفينول في 100مل من الماء المقطر .
3. محلول الكلوكوز الخزين 80 مايكروغرام \مل : تم تحضيرهُ وذلك بإذابة 0.008 غم من الكلوكوز في 100 مل من الماء المقطر .

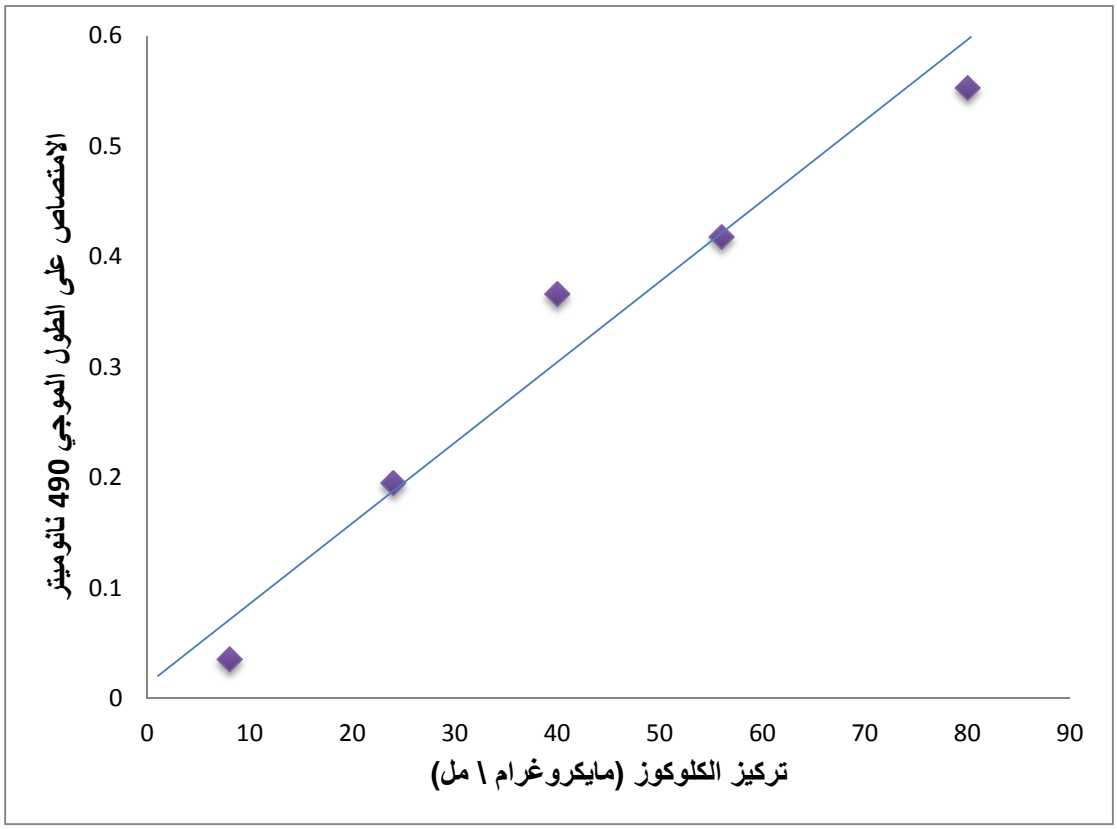
تم تقدير الكاربوهيدرات الكلية في محتوى عصير التمر بطريقة الفينول – حامض الكبريتيك phenol – sulfuric acid الموصوفة من قبل (Dubois *et al* 1956) وأجريت بحسب الخطوات الآتية :

أضيفت الحجوم الآتية من محلول الكلوكوز الخزين في انابيب اختبار بواقع مكررين لكل حجم ، بعدها إضافة الحجوم المناسبة من الماء المقطر حسب الجدول الأتي:

رقم الأنبوب	حجم محلول الكلوكوز الخزين (مل)	حجم الماء المقطر المضاف (مل)	كمية الكلوكوز (مايكروغرام \ مل)
1	0	1.0	0
2	0.1	0.9	8
3	0.3	0.7	24
4	0.5	0.5	40
5	0.7	0.3	56
6	1.0	0	80

تم إضافة 1 مل من محلول 5% فينول لكل أنبوب اختبار ثم إضافة 5 مل من حامض الكبريتيك ، وبعد الرج الشديد للأنابيب تركت حتى تبرد ، بعدها تمت قراءة الامتصاص في جهاز المطياف الضوئي على الطول الموجي 490 نانوميتر .

استعمل الأنبوب الأول في تصفير الجهاز و استحصل على المنحنى القياسي برسم العلاقة البيانية بين الامتصاص على الطول الموجي 490 نانوميتر وكمية الكلوكوز (مايكروغرام) كما موضح في الشكل (2-2) .



الشكل (2-2) المنحنى القياسي لتقدير الكلوكوز بطريقة الفينول – حامض الكبريتيك

أُختير عصير التمر كمصدر كاربوني لتدعيم الوسط الإنتاجي ، إذ تم إضافة تراكيز متدرجة من عصير التمر وهي (0.05 , 0.15 , 0.35 , 0.55 , 0.75)% إلى الوسط الإنتاجي لاختيار أفضلها في إنتاج الأنزيم .

2-9-2 تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم :

لدراسة تأثير نوع المصادر النيتروجيني ة 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	$(NH_4)_2SO_4$	0
2	% 0.15 $(NH_4)SO_4$	% 0.15 Uric acid
3	NH_4CL	0
4	% 0.15 NH_4CL	% 0.15 Uric acid
5	Uric acid	0

2-9-3 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 .

2-9-4 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 .

2-9-5 تعيين تركيز مصدر الفسفور الأمثل لإنتاج الأنزيم :

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

2-9-6 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.

2-9-7 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 .

2-9-8 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.

2-9-9 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 .

2-9-10 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 ، 1 ، 3 , 5) % من حجم الوسط وحضنت النماذج في حاضنة هزازة على سرعة رج 150 دورة \ دقيقة وبدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة .

2-9-11 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 .

2-10 تنقية الأنزيم

لغرض تنقية انزيم اليوريكيز ، تم تنمية البكتريا *P. aeruginosa* على الوسط الإنتاجي المتكون من (0.05% من عصير التمر ، 0.3 % من حامض اليوريك ، 0.75 % من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ، 0.1% من كلوريد المغنسيوم) وتحت الظروف التنموية المثلى

الأخرى ، وتم اجراء النبذ المركزي للوسط الزرعي لغرض فصل الخلايا عن المستخلص السائل الذي يحتوي على الانزيم وبسرعة 8000 دورة \ دقيقة ولمدة 15 دقيقة وعند درجة حرارة 4 مْ .

حيث اعتمدت خطوتان لتنقية الأنزيم من المستخلص السائل ، أولهما هي تركيز الأنزيم بخطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم و من ثم أُتبعت هذه الخطوة بخطوة كروماتوكرافيا التبادل الأيوني ليتم تنقية الأنزيم جزئياً وفي ما يأتي ملخص لهاتين الخطوتين :

2-10-1 تركيز الأنزيم بواسطة الترسيب بكبريتات الأمونيوم :

تم إعتماد خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم في تركيز الأنزيم والتخلص من بعض البروتينات الصغيرة الوزن الجزيئي ، فقد تم إجراء الترسيب بنسب تشبع مختلفة وهي (20 , 40 60 , 70) % لإختيار النسبة الأفضل في ترسيب الأنزيم واعتمادها في التنقية ، إذ تتم إضافة كبريتات الأمونيوم الصلبة بهدوء على مستخلص الأنزيم الخام مع التحريك البطيء حتى ذوبان كبريتات الأمونيوم ، وتتم هذه الخطوة تحت ظروف مبردة .

بعد الإذابة التامة لكبريتات الأمونيوم يتم حضن المستخلص الأنزيمي مع كبريتات الأمونيوم ولمدة ليلة واحدة في الثلاجة وفي اليوم التالي يتم إجراء عملية النبذ المبرد في جهاز الطرد المركزي المبرد على المزيج وبسرعة 8000 دورة \ دقيقة ولمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 4 مْ وبعد هذه الخطوة يتم إذابة الراسب بإضافة 10 مل من محلول دارئ Tris – HCL بتركيز 0.01 M وبالأس الهيدروجيني عند 8.5 و جمع الراسب ، ومن ثم إجراء عملية الديلزة وذلك بوضع الراسب الأنزيمي بكيس الديلزة وإجراء الديلزة في 1 لتر من المحلول الدارئ نفسه ولمدة ليلة واحدة .

بعدها يتم قياس الحجم النهائي لهذه الخطوة بعد الديلزة و قياس الفعالية وتقدير كمية البروتين لها ، لاختيار أفضل نسبة تشبع من كبريتات الأمونيوم واتخاذها كخطوة أولى للتنقية .

2-10-2 كروماتوكرافيا التبادل الأيوني :

1-2-10-2 المحاليل المستخدمة في تنشيط المبادل الأيوني :

(A) تحضير محلول هيدروكسيد الصوديوم – كلوريد الصوديوم

تم تحضير هذا الدارئ وذلك بوزن 2.5 غم من هيدروكسيد الصوديوم يُضاف إليها 3.625 غم من كلوريد الصوديوم وإذابتها جميعاً في 250 مل من الماء المقطر ليكون المحلول ذو مولارية 0.25 M .

(B) تحضير محلول حامض الهيدروكلوريك

يُحضر هذا المحلول عن طريق نقل حجم 5.38 مل من حامض HCL إلى دورق حجمي سعة 250 مل ومن ثم يتم إكمال الحجم بواسطة الماء المقطر للحصول على عياريه 0.25 N .

(C) تحضير دارئ Tris – HCL

حُضر المحلول بأذابة 1.57 غم من Tris –HCL في مقدار مناسب من الماء المقطر ، يُعدل الاس الهيدروجيني إلى 8.5 ثم إكمال الحجم إلى اللتر للحصول في النهاية على محلول ذو مولارية 0.01 M .

(D) محلول كلوريد الصوديوم ذو مولارية 0.6

حيث حُضر بأذابة 17.55 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من محلول (C)، ثم أكمل الحجم إلى 500 مل من المحلول ذاته.

2-2-10-2 تحضير المبادل الأيوني DEAE – Cellulose

حُضر المبادل الأيوني DEAE – Cellulose حسب الطريقة الموصوفة من قبل Whitaker and Bernard , 1972 :

1. يُوزن 20 غم من المبادل الأيوني ويُعلق في 1 لتر من الماء المقطر في اسطوانة مدرجة لنتركها بعد ذلك لتركد ثم يُزال السائل العلوي ، وتُكرر هذه الخطوة مرات عدة الى أن يصبح السائل العلوي رائق ، ثم يُرشح بعدها بواسطة قمع بخنر .

2. يتم تنشيط المبادل مع التحريك في 250 مل من دارئ مكون من 0.25 M من NaoH مع 0.25 M من NaCL ولمدة 30 دقيقة ، ثم يُغسل بالماء المقطر ويُرشح بواسطة قمع بخنر ثم يُعلق بمحلول 250 مل من 0.25 M من حامض الهيدروكلوريك مع التحريك البطيء ولمدة 30 دقيقة ، يُغسل بعدها المبادل الأيوني تحت التفريغ بالماء المقطر .
3. يُعلق المبادل في محلول دارئ وهو Tris – HCL وبتركيز 0.01 M ويُزال منه الهواء (Degassing) بأستخدام مضخة تفريغ ، ثم يتم تعبئة المبادل الأيوني برفق في عمود زجاجي ذو أبعاد (21 x 1.8) سم .
4. تجري موازنة العمود بأستخدام المحلول الدارئ Tris –HCL ذي المولارية 0.01 M وعند الاس الهيدروجيني 8.5 وبسرعة 30 مل \ ساعة .

2-10-2-3 إضافة النموذج

تم إضافة 25 مل من المحلول الأنزيمي المستحصل عليه من خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم 70 % إلى سطح المبادل الأيوني بهدوء ، جُمعت الأجزاء المنفصلة والتي حصل عليها بسرعة جريان ثابتة وهي 60 مل اساعة ، كما وتمت متابعة تركيز البروتين في الأجزاء المنفصلة وذلك بمتابعة الامتصاص لكل جزء من هذه الأجزاء عند الطول الموجي 280 نانوميتر لحين التأكد من نزول جميع الأجزاء التي لم ترتبط بالمبادل .

2-10-2-4 الاسترداد

أُجريت عملية الاسترداد بأستخدام 150 مل من محلول (D) مقابل 150 مل من محلول (C) ، وتم متابعة تركيز البروتين للأجزاء المنفصلة (بعد إجراء الاسترداد) عند الطول الموجي (280) نانوميتر .

قُدرت الفعالية الأنزيمية عند القمم البروتينية المنفصلة ، بعدها قُدرت الفعالية الأنزيمية للأجزاء التابعة للقمم البروتينية التي أظهرت فعالية إنزيمية ، وجُمعت الأجزاء التابعة لهذه القمم

وقد تم قياس حجمها وتقدير الفعالية فيها فضلاً عن تقدير البروتين ، رُسمت العلاقة بين الامتصاص وعدد الأجزاء وكذلك العلاقة بين الفعالية الأنزيمية (وحدة \مل) وعدد الأجزاء .

2-11 دراسة بعض الخواص الحركية والفيزيوكيميائية لانزيم اليوريكيز :

2-11-1 تقدير التركيز الاوفق للركيزة :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) : 0.1 مولر محلول دارئ البورات (PH = 9) حُضر بأذابة 0.618 غم من حامض البورك في كمية مناسبة من الماء المقطر ، يُعدل الاس الهيدروجيني إلى 9.0 ويُكمل الحجم إلى 100 .

محلول رقم (2) : محلول مادة التفاعل 0.040 ملغم\مل يحضر بإذابة 0.008 غم من حامض اليوريك في 200 مل من محلول رقم (1) ، ويُعتبر هذا المحلول هو المحلول الأساس الذي عمل منه تخافيف كما في الجدول ادناه .

(مل) من محلول مادة التفاعل	(مل) من دارئ البورات	الحجم النهائي (مل)	التركيز النهائي لمادة التفاعل (ملغم\مل)
2.5	17.5	20	0.005
5	15	20	0.010
7.5	12.5	20	0.015
10	10	20	0.020
12.5	7.5	20	0.025
15	5	20	0.030
17.5	2.5	20	0.035
20	0.0	20	0.040

وتم قياس الفعالية باستخدام محاليل الركيزة المختلفة التركيز والمذكورة في الجدول السابق باتباع طريقة تقدير الفعالية الانزيمية المذكورة في الفقرة (2-5) .

2-11-2 تعيين ثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} :

تم دراسة الثوابت الحركية والتي تضم ثابت ميكالس K_m و السرعة القصوى V_{max} وذلك باتباع الخطوات المتبعة في تجربة تعيين التركيز الاوفق للركيزة نفسها وذلك لغرض تعيين قيمة ثابت ميكالس Km والسرعة القصوى Vmax للركيزة ، وفي رسم المعلومات المستحصل عليها تم استخدام الطرق الأتية :

A. طريقة لينويفر – بيرك Line weaver and Burk والتي تظهر العلاقة بين مقلوب السرعة ومقلوب تركيز الركيزة { 1/V vs 1/[s]}
B. طريقة ايدي – هوفست Eadie – Hoffstee plot والتي تُظهر العلاقة بين سرعة التفاعل ونسبة سرعة التفاعل الى تركيز الركيزة { V vs V/[S] }
C. طريقة هانس – وولف Hanes – Woolf plot والتي تُظهر العلاقة بين تركيز الركيزة الى سرعة التفاعل وتركيز الركيزة { [s] vs [s] /V } .

2-11-3 تقدير الاس الهيدروجيني الأمثل للفعالية الإنزيمية:

تم تحضير الركيزة (حامض اليوريك) في محاليل دارئة مختلفة ذات أسس هيدروجينية تتراوح بين (7 – 10.5) ذات مولارية ثابتة 0.1 مولر ، تمثلت هذه المحاليل بما يأتي:

- محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم : يستخدم محلول دارئ الفوسفات لتحضير دارئ ذو الاس الهيدروجيني (7 , 7.5) .
- محلول دارئ بورات الصوديوم : يستخدم هذا المحلول لتحضير دارئ ذي الاس الهيدروجيني (8 , 8.5 , 9 , 9.5) .
- محلول دارئ الترس حامض الهيدروكلوريك : إذ يستخدم هذا الدارئ لتحضير محاليل ذات الاس الهيدروجيني (10 , 10.5) .

وتم قياس الفعالية الإنزيمية في قيم الاس الهيدروجيني المحضرة حسب الطريقة المذكورة في الفقرة (2-5) ، كما ورسمت العلاقة بين الفعالية الإنزيمية وبين الأسس الهيدروجينية .

2-11-4 تعيين الاس الهيدروجيني الأمثل لثبوتية الإنزيم:

تم مزج حجوم متساوية من المحلول الإنزيمي مع محاليل ذات أسس هيدروجينية مختلفة من المحاليل الدارئة بقوة أيونية (0.1) مولر وحضنت الأنابيب في حمام مائي و لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 30 مْ وتمثلت هذه المحاليل بما يأتي :

- محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم : يستخدم محلول دارئ الفوسفات لتحضير دارئ ذو الاس الهيدروجيني (7 , 7.5) .
- محلول دارئ بورات الصوديوم : يستخدم هذا المحلول لتحضير دارئ ذي الاس الهيدروجيني (8 , 8.5 , 9 , 9.5) .
- محلول دارئ الترس حامض الهيدروكلوريك : إذ يستخدم هذا الدارئ لتحضير محاليل ذات الاس الهيدروجيني (10 , 10.5) .
- محلول دارئ الترس القاعدي : إذ يستخدم هذا الدارئ لتحضير دارئ ذات أرقام هيدروجينية من (11 , 11.5 , 12) . ومن ثم يتم قياس الفعالية المتبقية لأنزيم اليوريكيز حسب طريقة تقدير الفعالية الانزيمية في الفقرة (2 – 5).

2-11-5 تعيين الدرجة الحرارية المثلى للفعالية الإنزيمية :

قدرت الفعالية الإنزيمية في مدى من درجات الحرارة تتراوح بين (25 ,65) مْ بفارق (5) درجات بين معاملة وأخرى ، تم رسم العلاقة بين الفعالية الإنزيمية والدرجات الحرارية المذكورة لغرض ايجاد درجة الحرارة المثلى للفعالية .

2-11-6 تعيين الثبات الحراري لإنزيم اليوريكيز :

تم حضن 2 مللتر من المحلول الإنزيمي في درجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25 ، 65) ولمدة 20 دقيقة بعدها نُقلت الأنابيب إلى حمام ثلجي مباشرةً ، ثم قُدرت الفعالية الإنزيمية بدرجة حرارة 35 مْ ، و رسمت العلاقة بين الفعالية الإنزيمية ودرجات الحرارة .

2-11-7 تأثير بعض الاملاح والمواد الكيميائية على فعالية الانزيم :

تم تحضير الكلوريدات الفلزية بإذابتها في ماء خالٍ من الايونات ، مزجت حجوم متساوية من المحلول الإنزيمي مع محاليل الكلوريدات الفلزية وبدرجة حرارة 35 مْ ولمدة 10 دقائق ، الايونات الفلزية المستخدمة في الدراسة هي (كلوريد الفضة ، كلوريد البوتاسيوم ، كلوريد الصوديوم ، كلوريد الزئبق ، كلوريد النيكل ، كلوريد الكالسيوم ، كلوريد الحديد ، كلوريد المغنسيوم واخيراً EDTA) وبتركيزين (1 , 5) ملي مولر ، بعدها تم تقدير الفعالية الإنزيمية للمزيج الإنزيمي ، وقُدرت النسبة المئوية للفعالية بالمقارنة مع فعالية الإنزيم غير المعامل.

2-12 التطبيقات الطبية لإنزيم اليوريكيز :

تم استخدام إنزيم اليوريكيز المنتج محلياً من بكتريا *P. aeruginosa* 7 والمنقى جزئياً لتحضير عدة تستخدم في التقدير الكمي لحامض اليوريك في السوائل البايولوجية (الدم) ، وتم تجربته على 7 عينات مصلية من أشخاص عدة مصابين بارتفاع حامض اليوريك في الجسم وآخرين غير مصابين ، لمعرفة كفاءة الإنزيم ومقارنتهُ بالعدة التشخيصية المستخدمة على النطاق التجاري من نوع RANDOX .

2-12-1 المواد

2-12-1-1 العينات المصلية

استخدمت 7 عينات مصلية من مرضى مصابين بارتفاع حامض اليوريك و عينات أخرى لأشخاص غير مصابين .

2-12-1-2 **المحاليل المستخدمة** :

- ❖ دارئ فوسفات البوتاسيوم :

تم تحضير دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.1 مولر ، و تعديل الاس الهيدروجيني إلى (7).

- ❖ محلول كاشف الكوايوكول الخزين:

تم تحضير كاشف الكوايوكول باذابة 0.1 مللتر من الكوايوكول guiacol المركز في كمية قليلة (5) مللتر من كحول اثيلي 70% ثم يكمل الحجم إلى 100 مللتر بالماء المقطر ليصبح تركيزه 0.1% .

- ❖ محلول بيروكسيد الهيدروجين : تم تحضير محلول بيروكسيد الهيدروجين بنسبة 3% وذلك بأخذ 6.667 مل من بيروكسيد الهيدروجين ذي التركيز 45% وأكمل الحجم بالماء المقطر الى 100مل .
- ❖ انزيم البيروكسيديز .

2-12-2 **استخلاص إنزيم البيروكسيديز من الفجل الأبيض المحلي وتنقيته** :

تم استخلاص إنزيم البيروكسيديز من جذور الفجل الأبيض بعد غسلها و تقطيعها الى قطع صغيرة ووضعها في هاون ، أضيف 50 مللتر من دارئ فوسفات البوتاسيوم 0.1 M إلى 10 غم من جذور الفجل ، ثم سحقت الخلايا الجذرية للفجل في هاون (لحين التمكن من سحق اغلب الخلايا) وتحت ظروف مبردة بوضع الهاون في حمام ثلجي لاستخلاص إنزيم البيروكسيديز ، بعدها تم ترشيح المزيج بواسطة قطع من الشاش ، ومن ثم بواسطة ورق الترشيح للحصول على المستخلص الإنزيمي الرائق لتنقيته واستخدامه في العدة التشخيصية وإبعاد أجزاء الخلايا المسحوقة .

2-12-3 تقدير الفعالية الانزيمية لانزيم البيروكسيديز

تم تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز وفقاً لطريقة (Whitaker and Bernhard ,1972) مع بعض التحويرات وكما يأتي :

يتم مزج 1 مللتر من دارئ فوسفات البوتاسيوم مع 1 مللتر من بيروكسيد الهيدروجين مع 1مللتر من كاشف الكوايوكول ومن ثم اضافة 7 مللتر من الماء المقطر ، ثم يؤخذ 3 مللتر من المزيج ويضاف إليها 0.1 مللتر من المستخلص الانزيمي ، يتم بعدها قياس الامتصاصية على الطول الموجي 436 نانوميتر ، ويتم مراقبة التغير بالامتصاصية لكل 30 ثانية ولمدة خمس دقائق.

2-12-4 تنقية انزيم البيروكسيديز :

تم تنقية انزيم البيروكسيديز المستخلص من جذور الفجل بإتباع خطوتين للتنقية بحسب طريقة (Whitaker and Bernard , 1972)

الأولى : هي خطوة الترسيب بواسطة الاسيتون بنسبة ترسيب 65% ، بعد حضن الانزيم مع الاسيتون يتم نبذ المزيج بجهاز الطرد المركزي 6000 دورة \ دقيقة ولمدة 15 دقيقة ، و فصل الراشح عن الراسب وإذابة الراسب في 10 مللتر من محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم 0.1 M وعند الاس الهيدروجيني 7.

الثانية : هي التبادل الأيوني بطريقة الوجبة Bach ، بعد تنشيط المبادل الأيوني DEAE – Cellulose كما موضح في الفقرة (2-10-2-2) ، من خلال ضبط الاس الهيدروجيني على pH = 7 ، اذ يتم وزن 1.5 غم من المبادل الأيوني ويضاف إليه 10 مللتر من المستخلص الانزيمي، ويحضن المزيج لمدة نصف 45 دقيقة بعدها يتم ترشيح المبادل بواسطة مضخة التفريغ للحصول على محلول الغسل ، بعدها يتم الاسترداد بواسطة محلول ملحي 0.3 مولر من NaCl و يتم تقدير الفعالية الانزيمية لكل من محلول الغسل والاسترداد لمعرفة ما إذا كان الانزيم موجوداً في محلول الغسل أو في محلول الاسترداد .

2-12-5 **تحضير عدة للتقدير الكمي لحامض اليوريك في السوائل البايولوجية (مثل الدم)** :

تم تصميم عدة لهذا الغرض وكما يأتي :

2-12-5-1 **المحاليل المستخدمة** :

- محلول رقم (1) : محلول انزيم اليوريكيز المنقى جزئياً .
- محلول رقم (2) : محلول انزيم البيروكسيديز المنقى جزئياً .
- محلول رقم (3) : محلول كاشف الكوايوكول .
- محلول رقم (4) : دارئ الفوسفات PH = 7 ، 0.1 مولر .
- محلول رقم (5) : محلول اليوريك القياسي .

2-12-5-2 **خطوات العمل** :

أ- محلول الفحص TEST

1) تم اضافة 0.3 مل من محلول انزيم اليوريكيز (محلول رقم 1) الى 20 مايكروليتر من المصل ، يترك التفاعل لمدة 15 دقيقة .
2) اضافة 0.3 مل من محلول انزيم البيروكسيديز (محلول رقم 2) و0.4 مل من كاشف الكوايوكول (محلول رقم 3) ، اجري التفاعل عند درجة حرارة 30 مْ .
3) ثم بعدها تم قياس الامتصاصية على الطول الموجي 436 نانوميتر .

ب- المحلول القياسي Standard

1) أُضيف 0.3 مل من محلول انزيم اليوريكيز (محلول رقم 1) الى 20 مايكروليتر من محلول اليوريك القياسي (محلول رقم 5) .
2) أُعيدت الخطوات 2 , 3 في الفقرة اعلاه كما في اختبار الفحص .

ت- محلول الكفء Blank

1) تم اضافة :

- 0.3 مل من محلول اليوريكيز .
- 0.3 مل محلول البيروكسيديز .
- 0.4 مل من كاشف الكواياكول .
- 20 مايكروليتر من محلول دارئ الفوسفات (محلول رقم 4) .

3-5-12-2 **الحسابات** :

تم احتساب تركيز حامض اليوريك ملغم \ 100 مل بأستخدام المعادلة الآتية (Bergmeyer H. U. et al , 1985):

$$\text{تركيز حامض اليوريك} = \frac{\text{امتصاصية النموذج(الفحص)} - \text{امتصاصية المحلول الكفء}}{\text{امتصاصية المحلول القياسي} - \text{امتصاصية المحلول الكفء}} \times \text{تركيز حامض اليوريك القياسي}$$

3- النتائج والمناقشة :

إن الجهود المبذولة في هذا البحث قد انصبت بشكل رئيسي حول امكانية إنتاج اكبر كمية ممكنة من انزيم اليوريكيز من مصادر مايكروبية محلية و بسبب اهمية الانزيم الطبية والتشخيصية فقد اكتسب البحث عن مصادر مايكروبية محلية لإنتاجها وبمواصفات ملائمة لهذه الأغراض أهمية كبيرة ، وكانت أولى محاولاتنا فيه البحث عن سلالات فطرية تتميز بإنتاجها هذا الانزيم فقد تم عزل 50عزلة فطرية من مخلفات الدواجن وتم التحري عن انتاجها لأنزيم اليوريكيز، إذ كانت اغلب العزلات الفطرية تعود الى جنس *Pencillium sp.* كما وقد كانت هناك عزلات فطرية تعود الى جنس *Aspergillus sp.* وقد شكّل نوع *Aspergillus niger* اغلب عزلات جنس *Aspergillus* .

كما وقد كان هناك عزلات ترجع الى جنس *Rhizopus sp.* بالاضافة الى ذلك تم الحصول *على* 10 عزلات فطرية من قبل قسم علوم الحياة تعود الى جنس *Aspergillus sp.* ومنها :

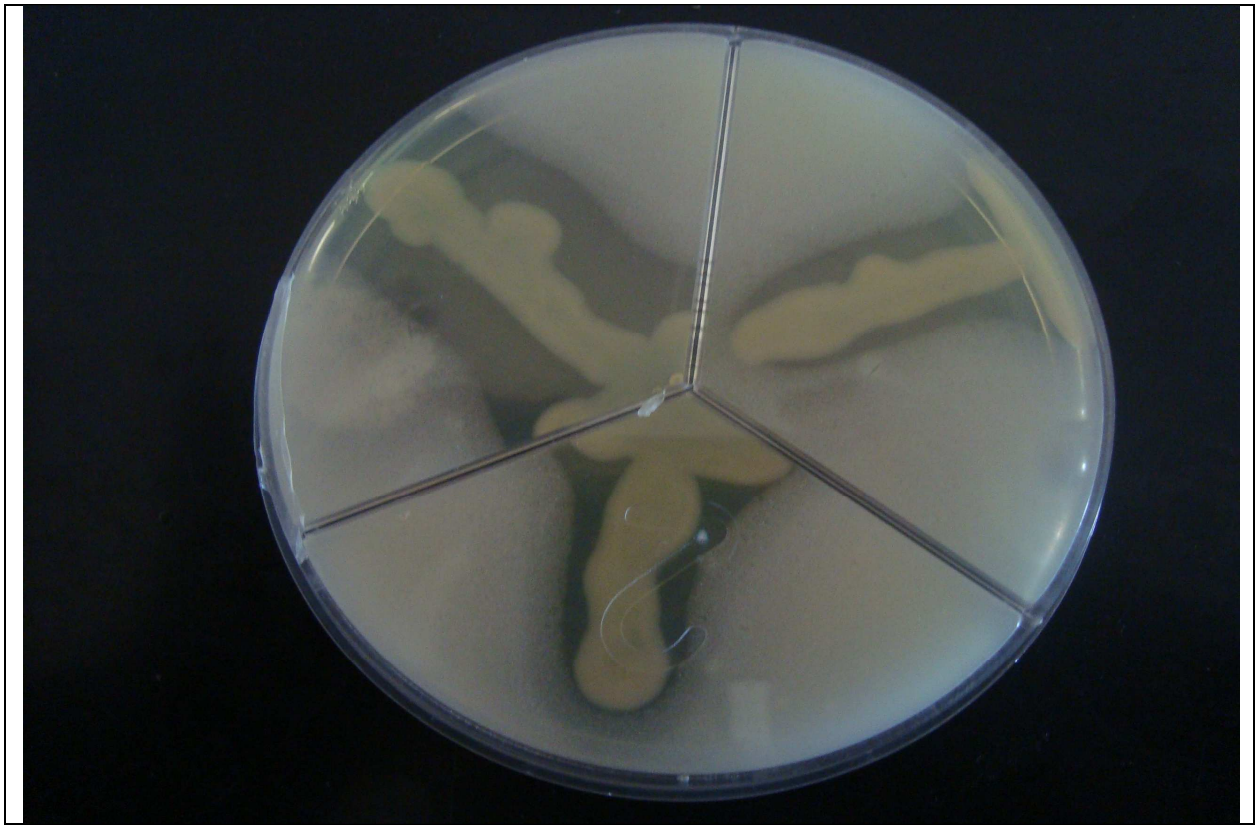
A . usttus , A. niger , A. terrus , ، وجميع المحاولات التي بذلت من قبلنا لم تلقَ نجاحاً كبيراً في الحصول على سلالات فطرية تتميز بإنتاج كميات كبيرة من هذا الانزيم وبشكل ملائم . لذا اتجهت الأنظار الى البحث عن سلالات بكتيرية تتميز بالصفات الانتاجية الجيدة والمواصفات الأخرى لكي يمكن اعتمادها كمصدر محلي لإنتاج انزيم اليوريكيز ، وقد أكملت المحاولات بالحصول على العزلة البكتيرية 7 *P.aeruginosa* .

3-1 قابلية العزلات على إنتاج انزيم اليوريكيز :

3-1-1 الغربلة شبه الكمية :

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 (3-1).



شكل (3-1) التحري عن انزيم اليوريكيز من العزلات البكتيرية بالطريقة شبه الكمية .

3-1-2 **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 (3-1) 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 (1.99 – 15.178) وحدة \ ملغم بروتين وفي ضوء هذه النتائج اختيرت العزلة *P.aeruginosa 7* كمصدر لإنتاج انزيم اليوريكيز كونها أكفاء العزلات المستخدمة .

جدول (3–1) 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

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 (الخفاجي ،1990) .

3-2 الصفات التشخيصية للعزلة *P. aeruginosa 7* :

أخضعت العزلة *P. aeruginosa* 7 المنتخبة من مرحلتي الغربلة الأولية والثانوية لمجموعة من الاختبارات الفسلجية الكيموحيوية ، تظهر البكتريا عند زراعتها على طبق الاكار المغذي بشكل مستعمرات ملساء مرتفعة قليلاً ذات لون اخضر مزرق الى لون الأخضر المصفر ، كما وظهرت البكتريا تحت المجهر بأنها بكتريا عصوية أو بيضوية سالبة لصبغة كرام ، كما أظهرت أنها تملك الصفات الموضحة في الجدول (3-2) .

جدول (3-2) بعض الفحوصات الكيموحيوية التي أجريت على عزلة *P. aeruginosa* 7

ت	الاختبار	النتيجة
1	صبغة كرام	-
2	فحص الاوكسيديز	+
3	إنتاج الهيمولايسين	+
4	اختزال النترات	+
5	فحص الكاتليز	+
6	النمو بدرجة حرارة 42 مْ	+
7	تحلل الجيلاتين	+
8	استهلاك السترات	+
9	قابلية الحركة	+

(+) فحص موجب

(-) فحص سالب

3-3 تعيين الظروف المثلى لإنتاج انزيم اليوريكيز

3-3-1 تحديد تأثير تركيز المصدر الكاربوني الأمثل لإنتاج الإنزيم :

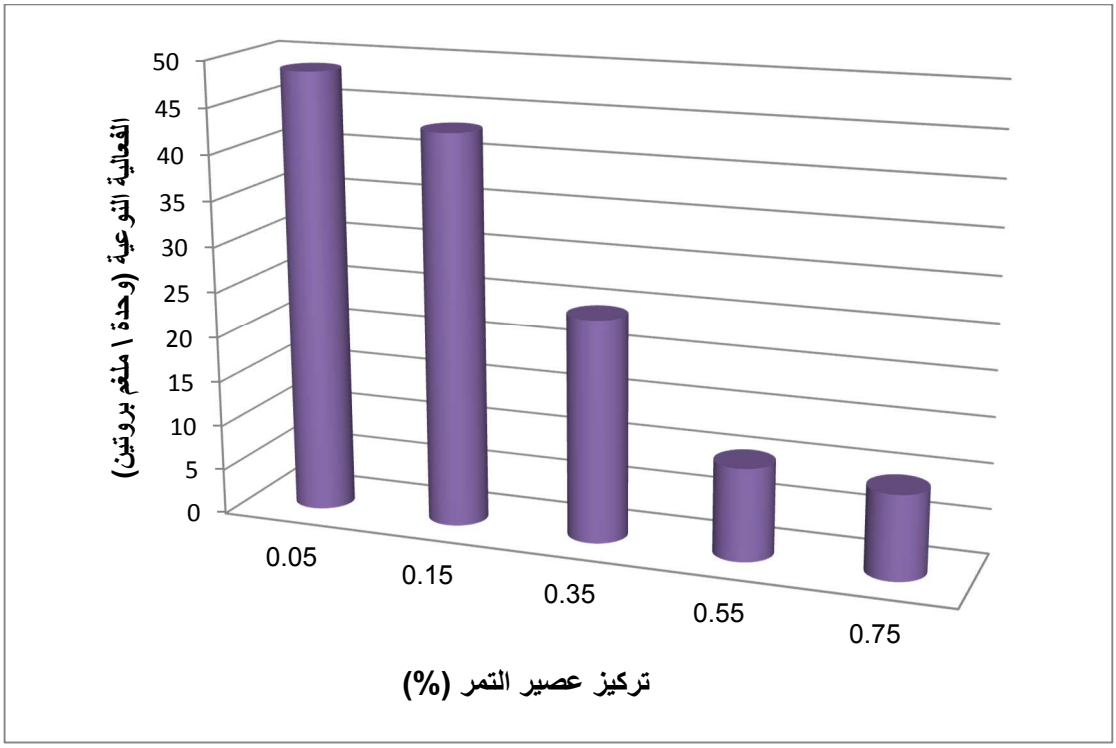
تم اختيار عصير التمر بدلاً من الكلوكوز كمصدر كاربوني لإنتاج انزيم اليوريكيز لكونه من المصادر الرخيصة والمتوفرة محلياً ، اذ تم استخدام تراكيز متدرجة منه (0.05 ، 0.15 0.35 , 0.55 , 0.75) % للتحري عن التركيز الأمثل وتأثيره في إنتاج انزيم اليوريكيز ، وقد أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (3-2) إلى ان أفضل تركيز لعصير التمر هو 0.05% (حجم \حجم) اذ بلغت الفعالية الانزيمية 3.967 وحدةاملليتر 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 ما ذكره (Tanaka *et al* , 1977) عند استخدامه 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* كما ذكر (Atalla *et al* , 2009) 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(Abd EL- Fattah and Abo-Hamed , 2002) إلى استخدام السكروز كمصدر كاربوني عند دراستهِ لفطر *A. flavus* .

واوضح (Ertan and Aksoz , 2000) 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. (Khucharoenphaisan and Sinma , 2011).

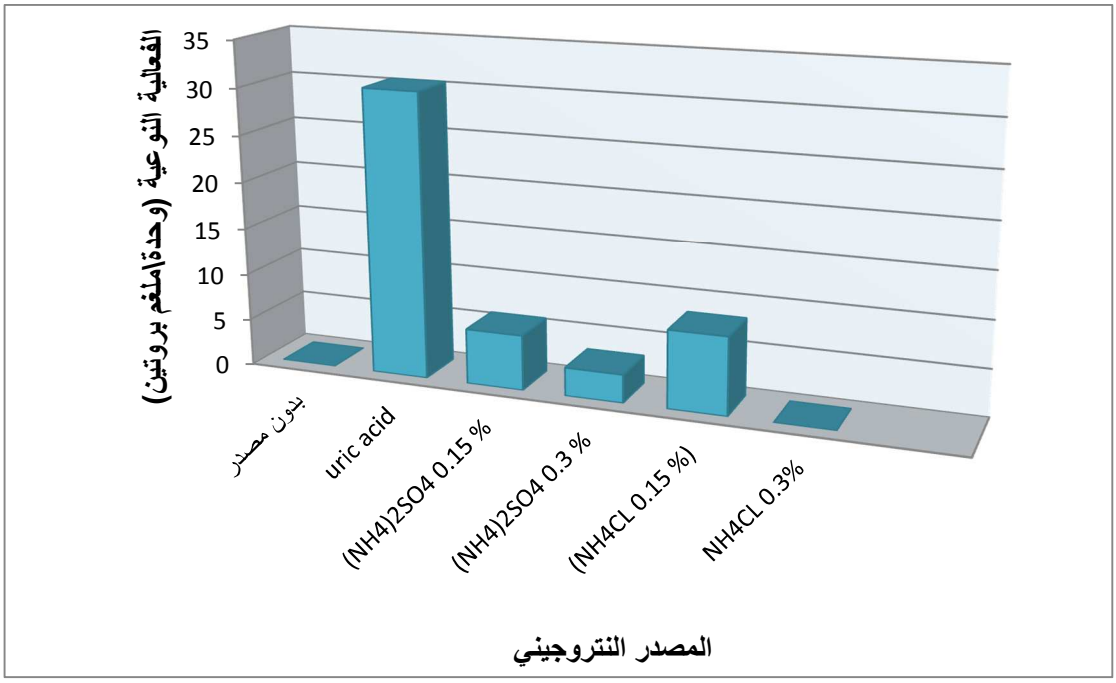


الشكل (3-2) تأثير تراكيز مختلفة من عصير التمر في انتاج انزيم اليوريكيز من عزله *P. aeruginosa* 7 .

3-3-2 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 (3-3) الى أفضل مصدر نتروجيني هو حامض اليوريك فقد بلغت الفعالية 2.525 وحدة \ملتر ، أما الفعالية النوعية فقد بلغت 30 وحدة \ ملغم بروتين وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره , Ertan and Aksoz) (2000 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 \ملتر أما (Tanaka *et al* , 1977) فقد استخدم حامض اليوريك وبنسبة 0.03% .



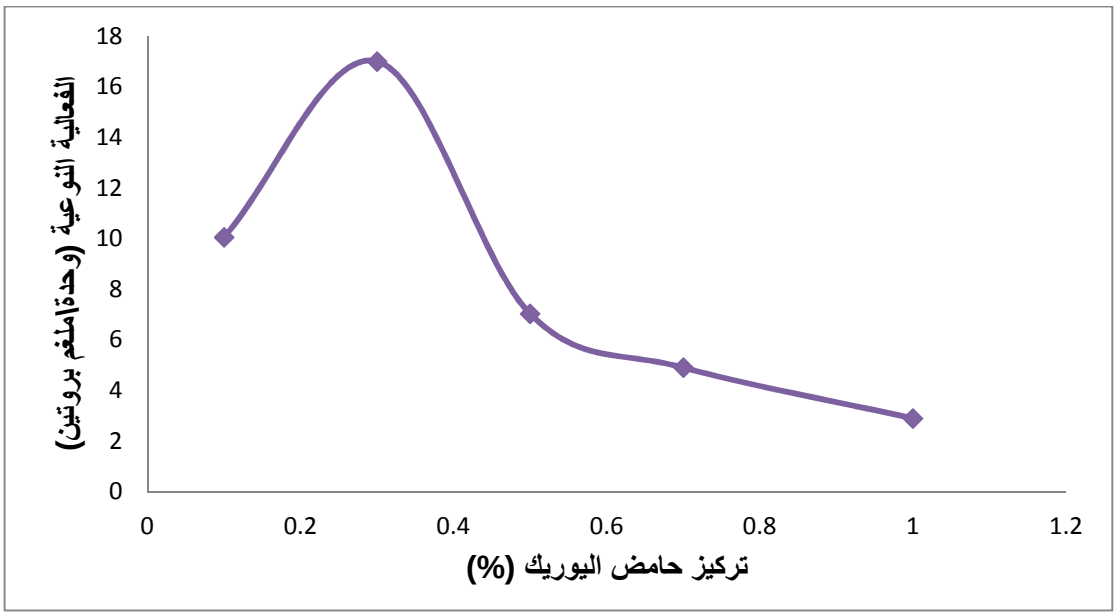
الشكل (3-3) : تحديد مصدر النيتروجين الأمثل لإنتاج انزيم اليوريكيز من العزلة *P. aeruginosa 7*

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 (الخفاجي ، 1990) .

3-3-3 تعيين التركيز الأمثل لحامض اليوريك في إنتاج الإنزيم :

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 (3-4) إلى ان أعلى فعالية نوعية لانزيم اليوريكيز قد بلغت 17 وحدة \ ملغم بروتين عند استخدام نسبة 0.3% من حامض اليوريك ، أما التراكيز الأخرى (0.1 , 0.5 , 0.7 , 1) % فكانت الفعالية النوعية على التوالي (10 , 7 , 4.65 , 2.8) وحدة \ ملغم بروتين . ان النتائج التي تم الحصول عليها تتوافق مع النتائج الذي حصل عليها (Azab) وجماعتهُ سنة 2005 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 (Yazdi) وجماعتهُ سنة 2005 فقد استخدم نسبة 0.7% من حامض اليوريك لاستحثاث الإنزيم من الفطر *Mucor hiemalis* . أما (Atalla *et al* , 2009) فقد 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 .



الشكل (3-4) تأثير تراكيز مختلفة من حامض اليوريك على انتاجية انزيم اليوريكيز من عزلة *p. aeruginosa* 7.

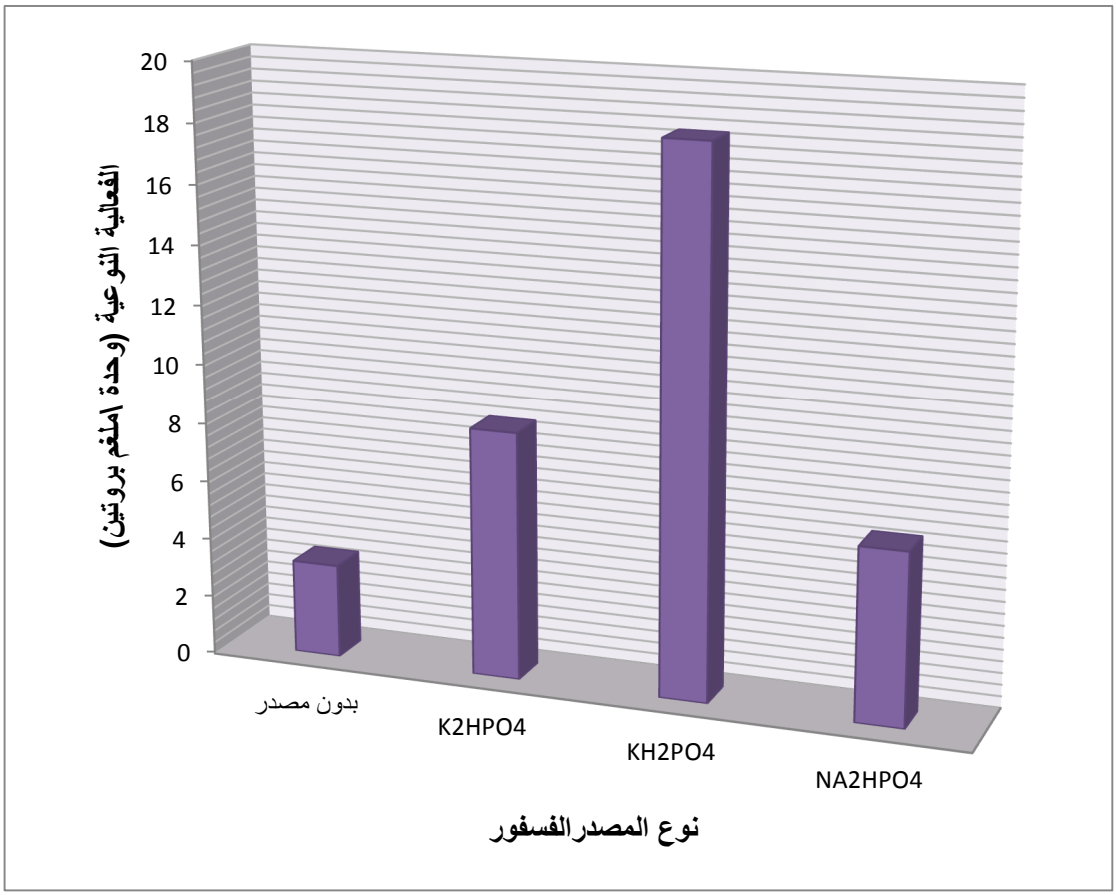
4-3-3 تحديد المصدر الفوسفاتي الأمثل في إنتاج انزيم اليوريكيز :

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 (3-5) 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 إليه (Abd EL Fattah) وجماعته سنة 2005 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(Azab *et al* ,2005) 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 . (الخفاجي ، 1990) .



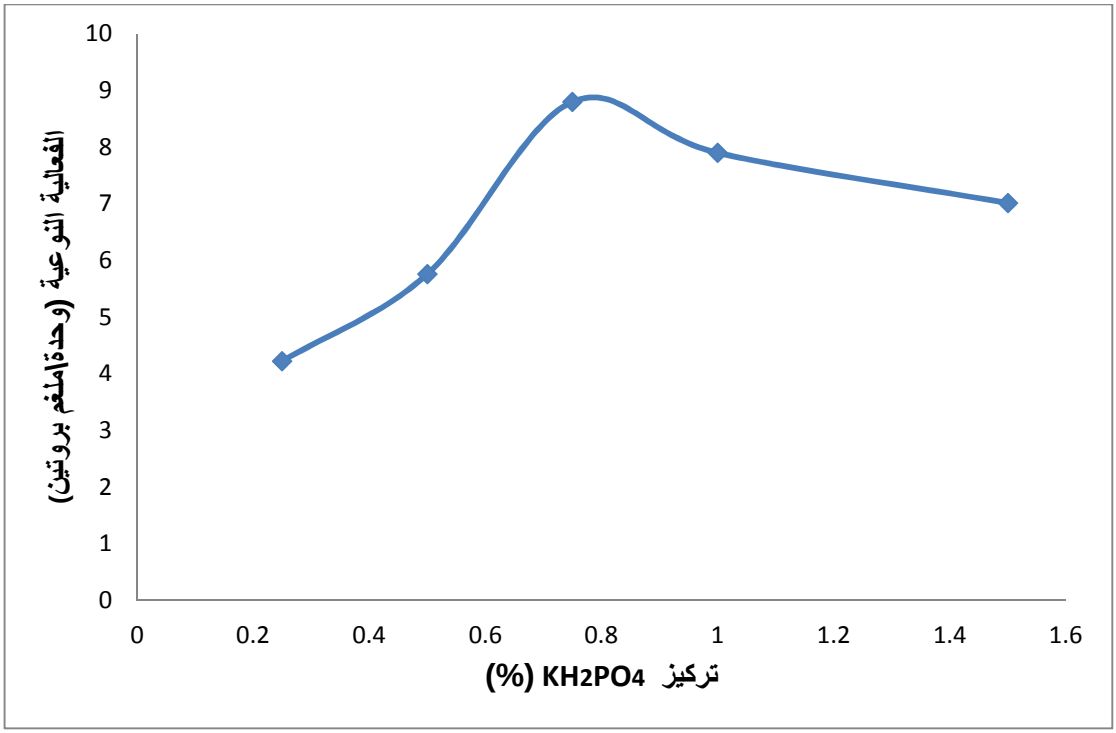
الشكل (3-5) تأثير أملاح الفسفور في إنتاج انزيم اليوريكيز من العزلة 7 *P. aeruginosa* .

3-3-5 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 (1.5 , 1 , 0.75 , 0.5 , 0.25) % من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين . وتشير النتائج المبينة في الشكل (3-6) 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 (Tanaka *et al* , 1977) عند استخدامِ فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وبنسبة 0.61% كأفضل نسبة من المصدر الفوسفاتي .

أما التراكيز الأخرى (1.5 , 1 , 0.5 , 0.25) % فقد بلغت فعاليتها النوعية (7.01 , 4.22 , 5.76 , 7.9) 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% (Falkinham *et al* , 1983) ، بينما أشارت دراسة أخرى قام بها (Ertan and Aksoz , 2000) الى استخدام فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين كمصدر فوسفاتي وبنسبة 0.3% .



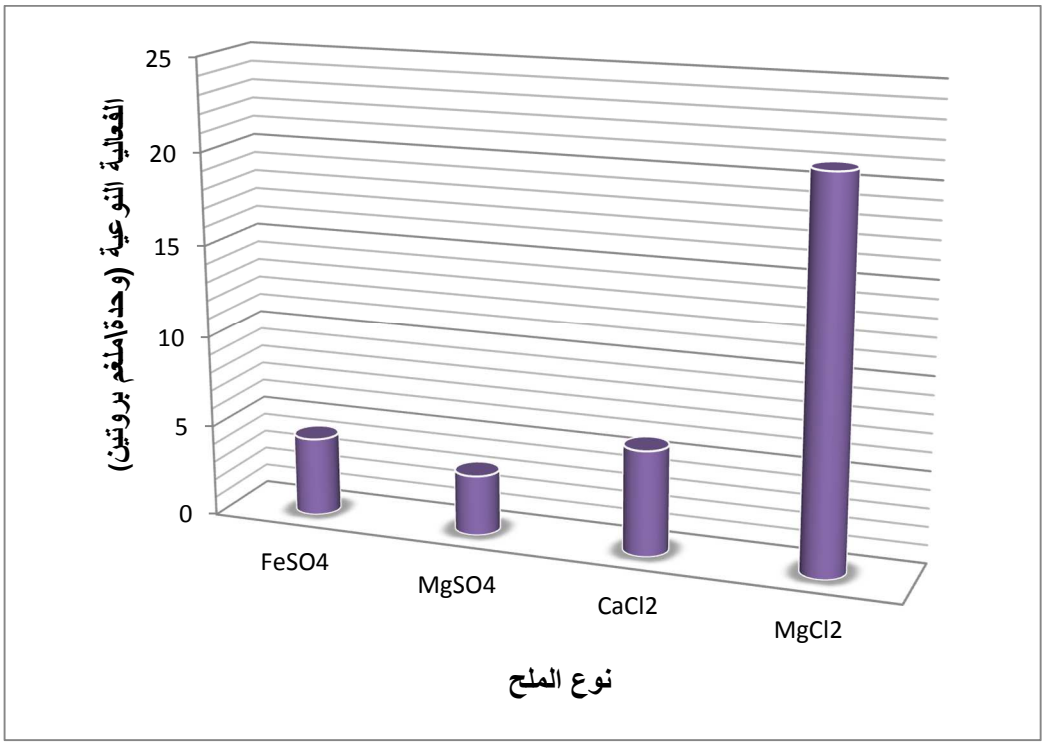
الشكل (3-6) تأثير تراكيز مختلفة من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين على إنتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa* 7 .

3-3-6 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 (3-7) 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 (Atalla *et al* , 2009) ان كلوريد الحديد هو الأفضل في إنتاج الإنزيم اليوريكيز عند دراسته تأثير عناصر عدة في انتاج انزيم اليوريكيز .

بينما (Tanaka *et al* , 1977) 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 (Ertan and Aksoz , 2000) فقد ذكر ان أعلى فعالية إنزيمية تمثلت عند استخدام كبريتات المغنسيوم المائية وبنسبة 0.1% لإنتاج الإنزيم من فطر *A. niger* .



الشكل (3-7) تأثير نوع الملح في إنتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P.aeruginosa* 7 .

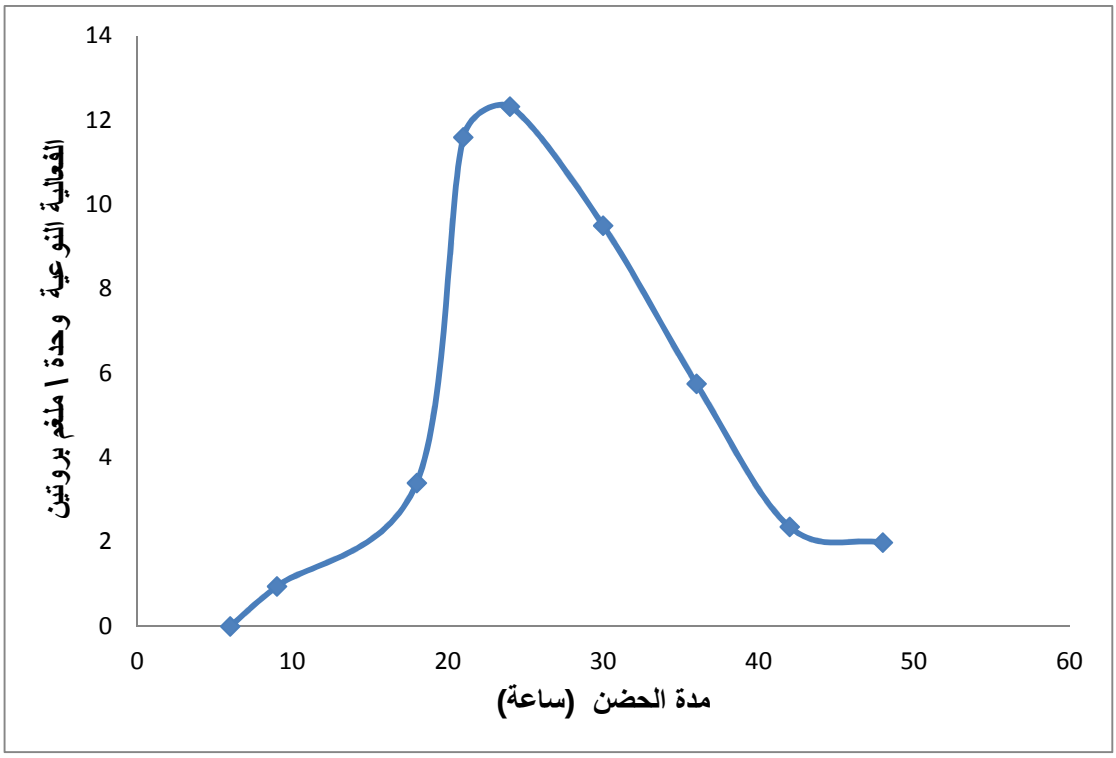
3-3-7 تأثير مدة الحضن

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 (3-8) 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 .

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره (Saeed *et al* , 2004) اذ استخدموا فترة حضن لمدة 24 ساعة عند إنتاج انزيم اليوريكيز من بكتريا *P. aeruginosa* .

كما ذكر (Rouf *et al* , 1968) ان حامض اليوريك يبدأ بالتحطم والاختفاء من الوسط الزرعي خلال 18 ساعة لكن يتحطم نهائياً خلال 24 ساعة . بينما ذكر (Atalla *et al* , 2009) ان فترة الحضن المثلى لانزيم اليوريكيز من فطر *Gliomastix gueg* تكون عند ثمانية أيام .

أما (Abd El Fattah *et al* , 2002) فقد ذكر ان إنتاج الإنزيم من الفطرين *A. flavus* و *A. terreus* يكون بعد أربعة أيام و من جنس *Trichoderma* SP. بعد ستة أيام .



الشكل (3-8) تأثير مدة الحضن في إنتاج انزيم اليوريكيز من العزلة 7 *p. aeruginosa* .

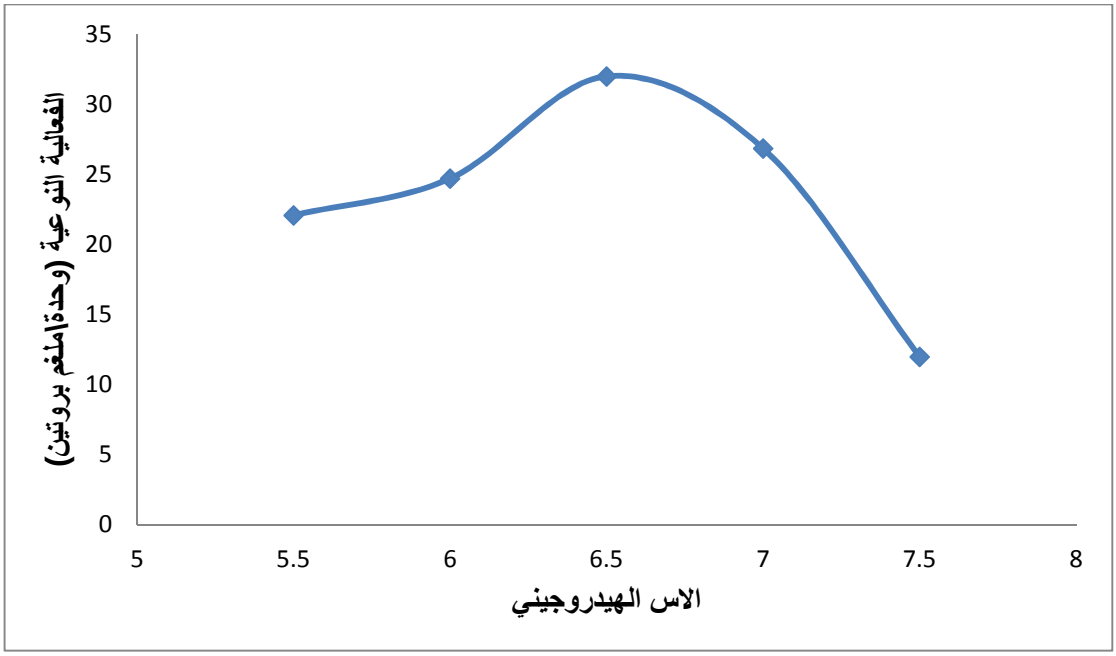
3-3-8 تأثير الاس الهيدروجيني الابتدائي الأمثل في إنتاج انزيم اليوريكيز:

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 (3-9) 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 .

تتفق هذه النتيجة مع ما ذكره (Chen *et al* ,2008) حيث ان الاس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج انزيم اليوريكيز من *Hansenula polymorpha* المهجن بجين اليوريكيز من *Candida utilis* هو عند 6.5 ، كما ذكر (Tanaka *et al* , 1977) ان الاس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم من *C. tropicalis* هو 6 حصيلة النواتج النهائية لايض الاحياء المجهرية (الدليمي ، 2002) .2. ، وفي دراسة أخرى فان الاس الهيدروجيني الأمثل هو 6 عند إنتاج الإنزيم من فطر *A. niger*) (Ertan and Aksoz , 2000 . 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 (Egorov , 1985) .



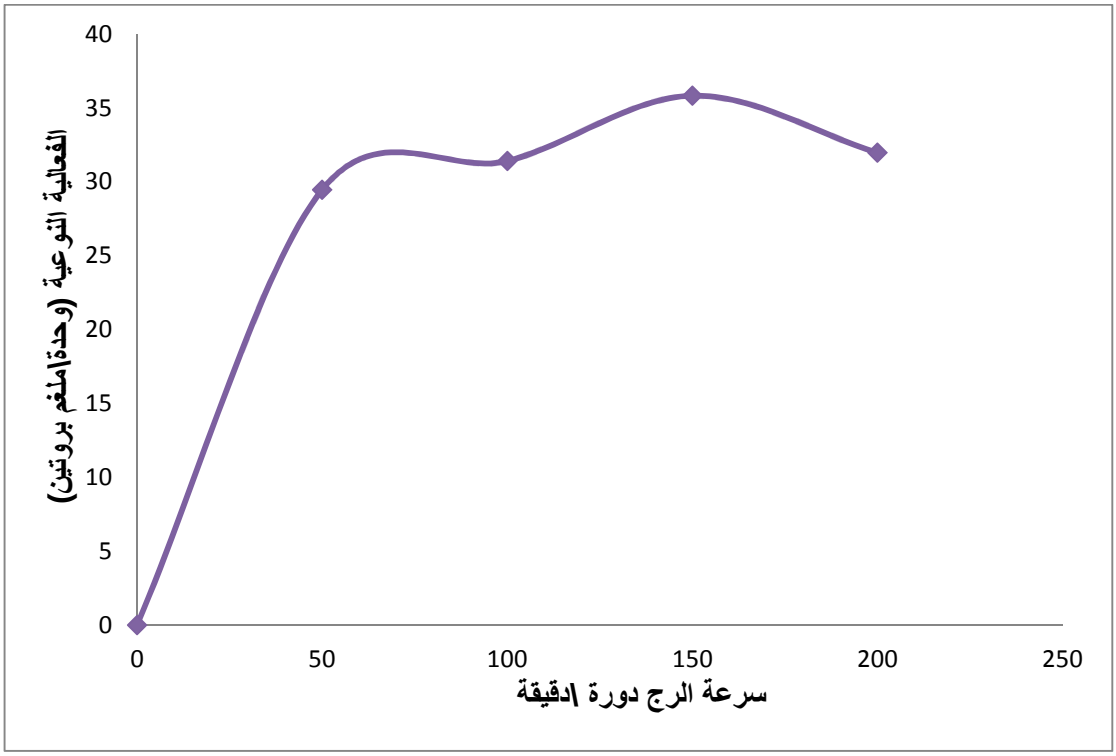
شكل (3–9) تأثير الاس الهيدروجيني في انتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa* 7 .

3–3–9 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 (3 – 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 .

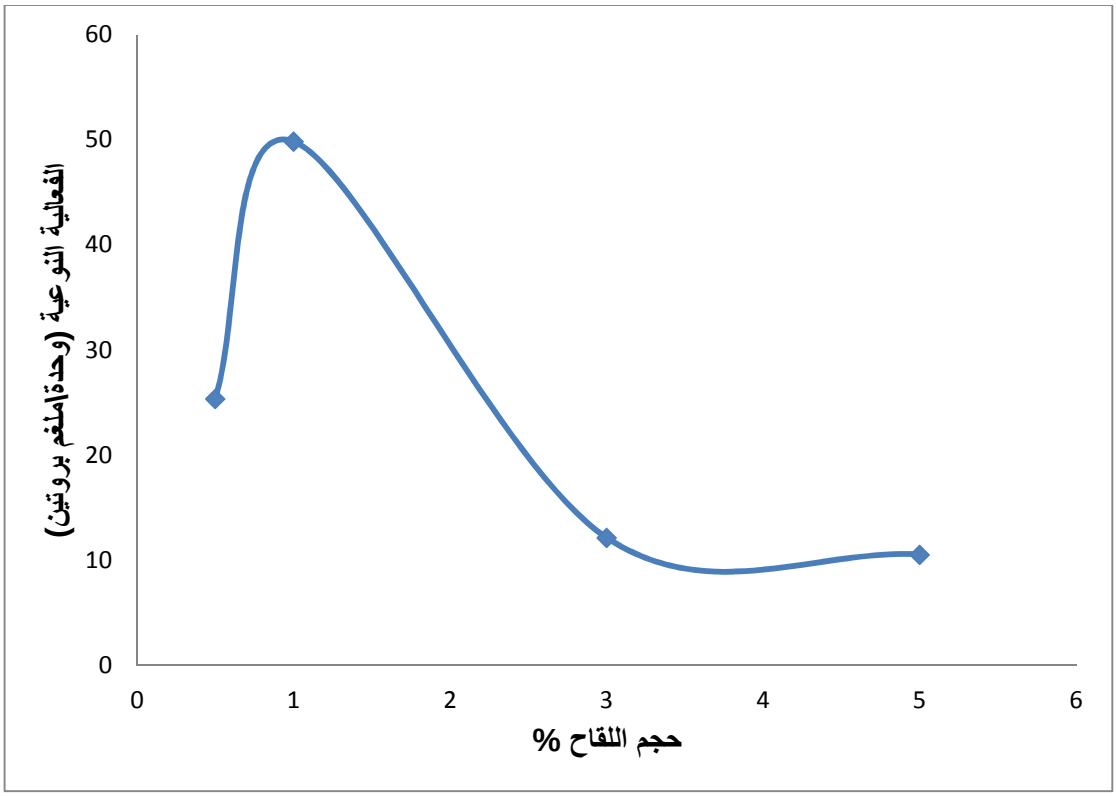
جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره (Atalla *et al* ,2009) عند دراستهِ تأثير سرعة الرج في إنتاج انزيم اليوريكيز من فطر *G. gueg* إذ كانت أفضل سرعة رج هي عند 150 دورة \ دقيقة أما (Tanaka *et al* , 1977) فقد ذكر ان سرعة الرج هي 220 دورة \ دقيقة. تشير المصادر العلمية الى ان استخدام الحاضنة الهزازة في إنتاج 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 (3-10) تأثير سرعة الرج في إنتاج انزيم اليوريكيز المنتج من العزلة *P. aeruginosa* 7 .

3-3-10 تأثير حجم اللقاح في إنتاج الإنزيم :

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 (3 – 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 .

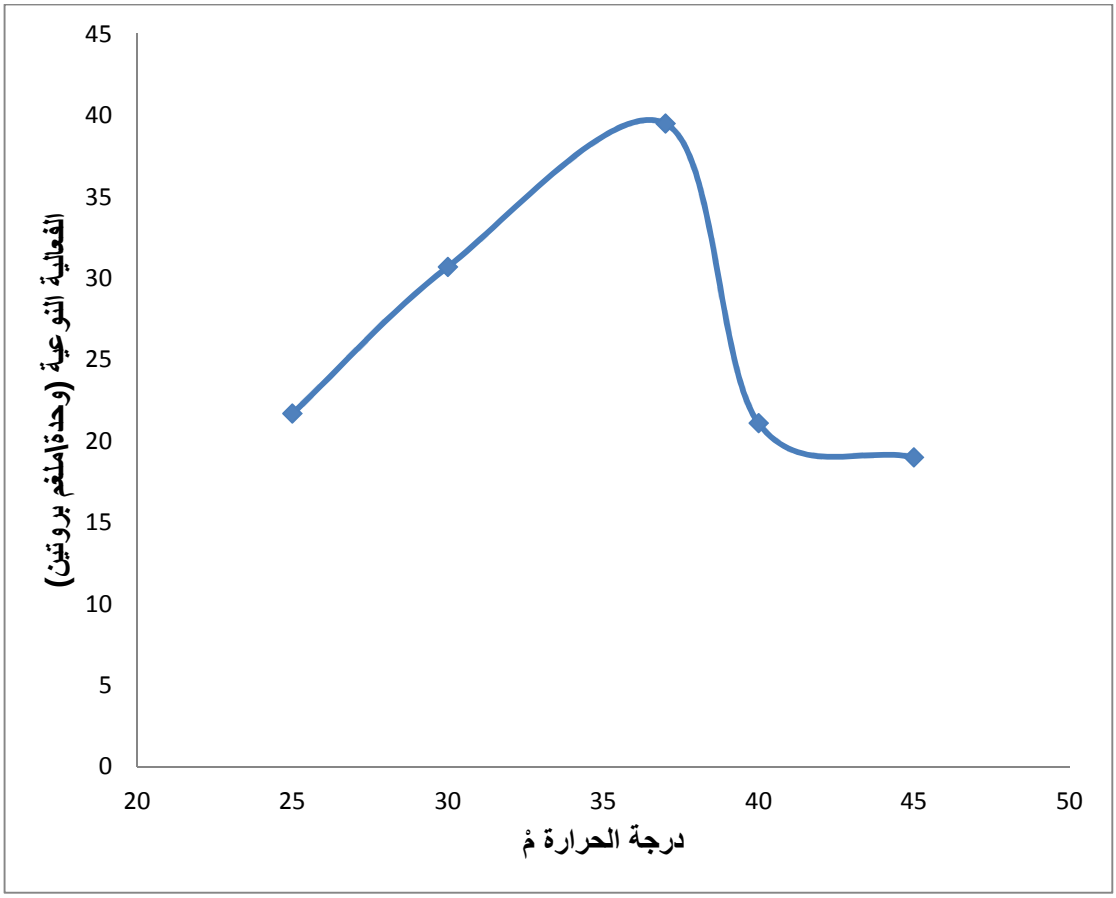


شكل (3-11) تأثير حجم اللقاح على انتاجية بكتريا *P. aeruginosa* 7 من انزيم اليوريكيز .

3-3-11 دراسة تأثير درجة الحرارة في إنتاج انزيم اليوريكيز :

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 (3- 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 (21.69 , 30.7 , 21.1 , 19) وحدة \ ملغم بروتين على التوالي .

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره (Bongaerts and Vogels , 1975) عند دراستهِ لبكتريا *Bacillus. fastidious* اذ قام بتنمية البكتريا على درجة حرارة 37 مْ لإنتاج انزيم اليوريكيز ، بينما (Ertan and Aksoz , 2000) ذكر ان أفضل درجة حرارية لإنتاج الإنزيم من *A. niger* عند 30 مْ .



شكل (3-12) تأثير درجة الحرارة في إنتاج انزيم اليوريكيز من عزلة *P. aeruginosa* 7 .

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 .

3-4 تنقية انزيم اليوريكيز

بعد تنمية بكتريا *P. aeruginosa* على وسط إنتاج انزيم اليوريكيز وتحت الظروف المثلى للوسط الانتاجي والظروف التنموية الأخرى والتي تم تحديدها من خلال التجارب السابقة ، تم تنقية انزيم اليوريكيز بعد إنتاج كمية كافية من الإنزيم ، حيث اتبعت خطوات التنقية حسب المخطط (3-1) علماً ان كافة خطوات التنقية أجريت تحت ظروف مبردة .

3-4-1 ترسيب انزيم اليوريكيز باستخدام كبريتات الأمونيوم:

3-4-1-1 اختيار أفضل نسبة تشبع من كبريتات الأمونيوم لترسيب الانزيم :

تم اختيار نسب تشبع مختلفة من كبريتات الأمونيوم لترسيب إنزيم اليوريكيز لمحاولة الاستفادة منها كخطوة من خطوات التنقية ، وكانت التراكيز المختارة هي (0.0 ، 20 ، 40 ، 60 ، 70) % وتشير النتائج المدرجة في الجدول (3-3) الى ان جميع الأجزاء المفصولة تحوي على فعالية إنزيمية باستثناء استخدام نسبة 20% ، الا ان الجزء المفصول بنسبة 70% تشبع يمتلك اعلى فعالية نوعية للأنزيم حيث تبلغ 34.705 وحدة \ ملغم بروتين ، بينما تكون الفعالية النوعية منخفضة عند استخدام نسب اقل ، وذلك لبقاء بعض الجزيئات الانزيمية في الراشح الانزيمي لذا فقد اختيرت نسبة 70% من كبريتات الأمونيوم كأفضل نسبة ترسيب إذ تم استخدامها كأول خطوة في تنقية الإنزيم .

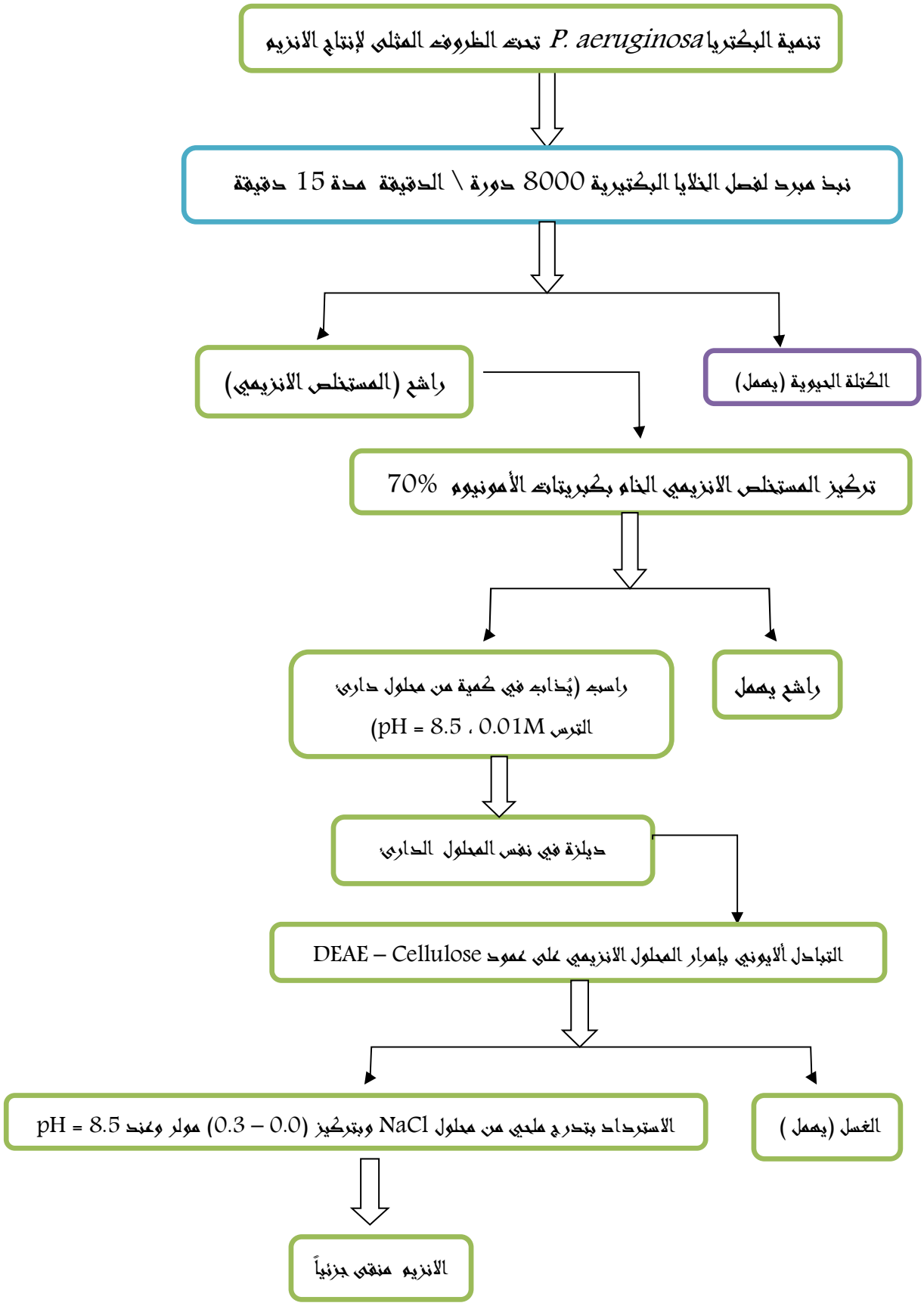
جدول (3–3) ترسيب انزيم اليوريكيز باستخدام نسب تشبع مختلفة من كبريتات الامونيوم .

نسبة كبريتات الأمونيوم المستخدمة في الترسيب	الفعالية (وحدة \ مل)	تركيز البروتين(ملغم \ مل)	الفعالية النوعية (وحدة \ ملغم بروتين)
0.0	0.72	0.025	28.8
20	0.0	0.023	0.0
40	0.5	0.030	16.667
60	0.9	0.038	23.684
70	1.18	0.034	34.705

3-4-1-2 تركيز الإنزيم بكبريتات الأمونيوم % 70 :

تم إنتاج انزيم اليوريكيز من العزلة البكتيرية *P. aeruginosa* بعد تنميتها على الوسط الانتاجي تحت الظروف المثلى التي ذكرت سابقاً ، وبعد انتهاء فترة الحضن نبذ المزروع البكتيري تحت التبريد بسرعة 8000 دورة \ دقيقة ولمدة 15 دقيقة للتخلص من الخلايا البكتيرية والحصول على المستخلص الانزيمي الذي يتم بعد هذا إخضاعه إلى خطوات التنقية التي تبدأ بتركيز الإنزيم باستخدام كبريتات الأمونيوم بنسبة تشبع 70% للتخلص من بعض الملوثات البروتينية التي لا تترسب عند 70% والحصول على معظم الانزيم المنتج في المزروع البكتيري ، حققت هذه الخطوة تنقية جزيئية لانزيم اليوريكيز بعدد مرات تنقية مقدارها 1.75 مرة ، وحصيلة إنزيمية مقدارها 53.22 %، كما موضح في الجدول (3 – 4) .

واشارت بعض الدراسات الى استخدام كبريتات الامونيوم في تنقية انزيم اليوريكيز، فقد قام Mabrouk وآخرون سنة 2010 باستخدام كبريتات الأمونيوم كأول خطوة في تنقية انزيم اليوريكيز المنتج من الفطر *G. guog* وقد حققت هذه الخطوة عدد مرات تنقية 12.19 مرة وحصيلة إنزيمية 90% .



مخطط (3-1) تنقية انزيم اليوريكيز من بكتريا *P. aeruginosa* 7 .

وأشار Saeed وجماعتهُ سنة 2004 الى استخدام كبريتات الأمونيوم ايضاً و بنسبة تشبع 70% كأول خطوة من خطوات تنقية انزيم اليوريكيز بحصيلة إنزيمية 99% وعدد مرات تنقية 1.82 مرة .

ان سبب ترسيب البروتينات باستخدام كبريتات الأمونيوم هو ما يسمى التمليح الخارجي salting out اذ ان جزيئات البروتين المستحلبة سوف تفقد جزيئات الماء (بفعل ايونات الملح) وكذلك بسبب تعادل الشحنات الكهربائية في البروتين مع الشحنات الكهربائية المعاكسة لايونات الملح وبذلك يسبب نقص في ذوبان البروتين ، والملح المفضل للترسيب هو كبريتات الأمونيوم لما يتميز به من ميزات عدة ، ان الإذابة بكبريتات الأمونيوم لا ينتج حرارة كبيرة والحرارة الناتجة جراء عملية الإذابة لا تسبب تغيراً في التركيب الطبيعي للبروتين Denaturation كما ان التراكيز الملحية العالية تمنع أو تحدد من نمو البكتريا فضلاً عن توفره بشكل متبلور ورخيص وبشكل نقي (سليمان وفضل الله ، 1989) .

3-4-2 كروماتوكرافيا التبادل ألايوني :

استخدمت كروماتوكرافيا التبادل الايوني كخطوة ثانية في عملية تنقية المستخلص الانزيمي المتحصل عليها من الخطوة السابقة باستخدام المبادل الايوني DEAE – Cellulose ، في عمود ذي الإبعاد (1.8 x 20) سم والموازن حيال محلول دارئ Tris – HCl مولر (0.01) وعند الاس الهيدروجيني 8.5 وبسرعة جريان 1 مل \ دقيقة ، وإنّ تفضيل الاس الهيدروجيني 8.5 في الخطوة هذه جاء لغرض رفع كفاءتها حيث يرتبط الانزيم بالمبادل عند هذا الاس الهيدروجيني بينما لا ترتبط بعض البروتينات الأخرى الموجودة في النموذج الانزيمي . ثم استرداد الانزيم المرتبط على المبادل الايوني باستخدام التدرج الملحي الخطي (Linear salt gradient) بواسطة كلوريد الصوديوم على مدى تركيز (0.0 – 0.3) مولر .

يوضح الشكل (3 – 13) ظهور القمة الرئيسة للأنزيم والمنفصلة وفق هذه الخطوة والتي أعطت عدد مرات تنقية قدرها 7.2 وحصيلة إنزيمية قدرها 42.85% كما موضح في الجدول (3-4). وان هذه الخطوة كانت كفوءة في تنقية الانزيم بسبب استرداد الانزيم المرتبط على عمود المبادل عند قوة أيونية محددة . ان استخدام هذه الخطوة في التنقية يتفق مع ما قام به

(Mabrouk *et al* , 2010) بأستخدام المبادل ألايوني DEAE – Cellulose في تنقية انزيم اليوريكيز من فطر *G. guog* وبلغت عدد مرات التنقية المستحصلة من هذه الخطوة 33.20 مرة ، وحصيلة إنزيمية قد بلغت 17.60% .

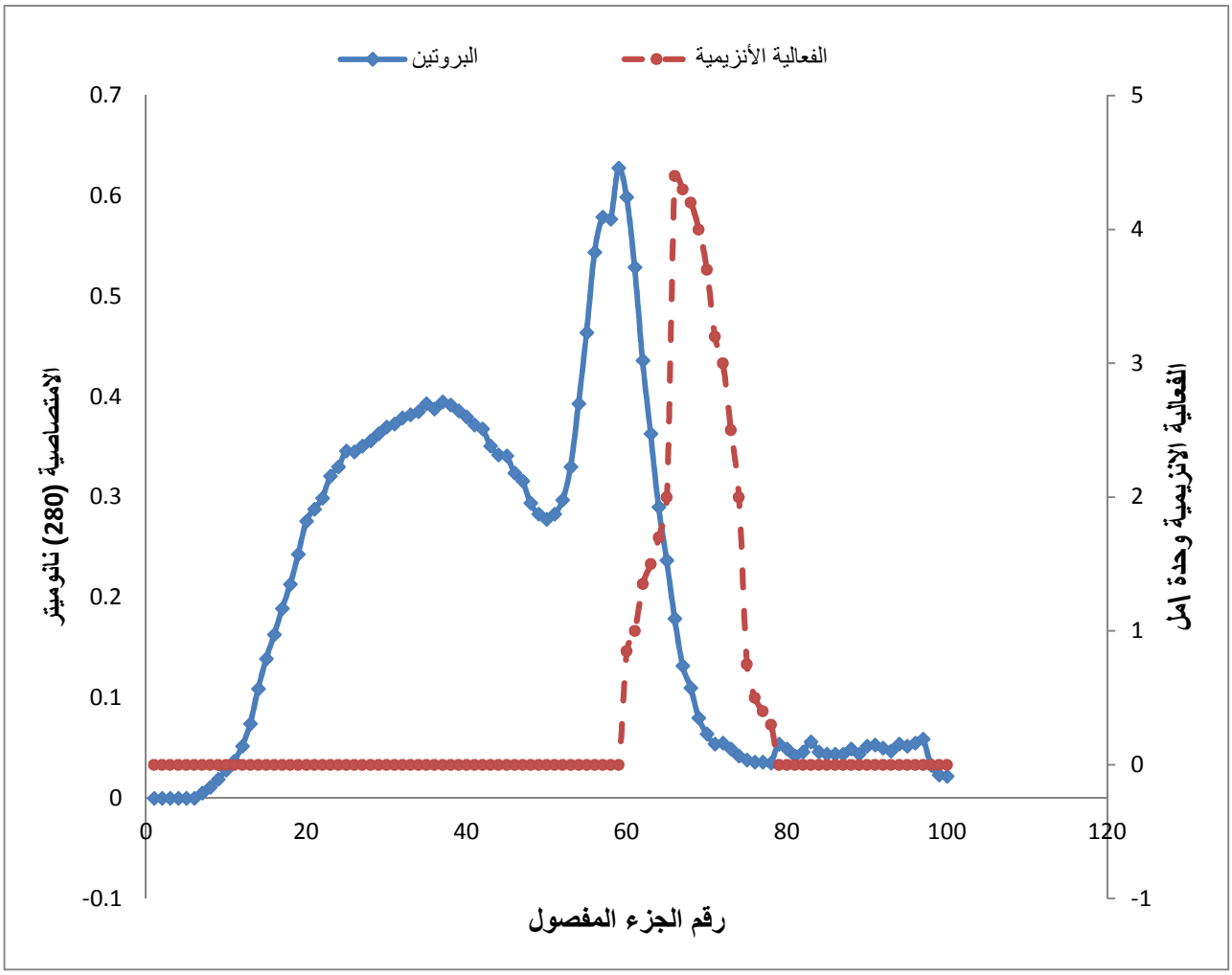
بينما ذكر (Kai *et al* , 2007) انه قد حصل على عدد مرات تنقية تصل إلى 19.7 مرة ، وحصيلة إنزيمية بلغت 31% وذلك بإتباعه خطوتين لتنقية الإنزيم بالترسيب بكبريتات الأمونيوم ومن ثم بكروماتوكرافيا التبادل ألايوني كروماتوكرافيا الغربلة الجزيئية الكارهة للماء .

لم تلاحظ أيّة فعالية إنزيمية في جزء الغسل ولهذا السبب أهملت من الدراسة الحالية وقد اكتفى العديد من الباحثين بخطوة التبادل الايوني لتنقية انزيم اليوريكيز بأستخدام مادة التبادل الايوني من نوع anions exchanger الذي ترتبط بالبروتينات الحاملة للشحنات السالبة في ظروف الفصل من الاس الهيدروجيني المستخدم .

وللمبادل الايوني DEAE – Cellulose سماتهُ التي تجعلهُ مرغوباً في التنقية والتي من أبرزها ، فصلهُ العالي للمواد وسهولة تحضيرهِ وسعتهِ التبادلية العالية وإمكانية إعادة تنشيطهِ واستعمالهِ لمرات عدة .

جدول (3–4) خطوات التنقية لانزيم اليوريكيز المنتج من بكتريا *P. aeruginosa* 7 .

ت	خطوات التنقية	الحجم(مللتر)	الفعالية (وحدةاملليتر)	تركيزالبروتين (ملغماملليتر)	الفعالية النوعية (وحدةاملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية %
1	**المستخلص الإنزيمي**	95	1.34	0.082	16.34	127.3	1	100
2	**الترسيب بكبريتات الأمونيوم(70%) وبعد الديلزة**	25	2.71	0.095	28.52	67.75	1.75	53.22
3	**التبادل الأيوني بعمود DEAE – Cellulose**	14	3.896	0.034	114.588	54.54	7.012	42.85



شكل (3-13) التبادل ألايوني باستخدام المبادل الايوني DEAE –Cellulose لتنقية انزيم اليوريكيز المنتج من عزلة *p. aeruginosa 7* . تمت الموازنة بواسطة محلول دارئ Tris – HCl ذو تركيز 0.01 مولر ، والاسترداد بواسطة تدرج ملحي من (0.0 – 0.3) مولر وبسرعة جريان 1 مل \ دقيقة .

3-5 الخواص الحركية والفيزيوكيميائية لانزيم اليوريكيز :

3-5-1 الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية انزيم اليوريكيز :

استخدم المستخلص الانزيمي المتحصل عليه من خطوة كروماتوكرافيا التبادل الايوني في دراسة بعض الخواص الفيزيوكيميائية والحركية .

دُرس تأثير الاس الهيدروجيني الأمثل على فعالية انزيم اليوريكيز المنتج من قبل *P. aeruginosa* والمنقى جزئياً ،وذلك بأجراء التفاعل الانزيمي بمدى من درجات الاس الهيدروجيني المتدرجة من (7 , 10.5) .

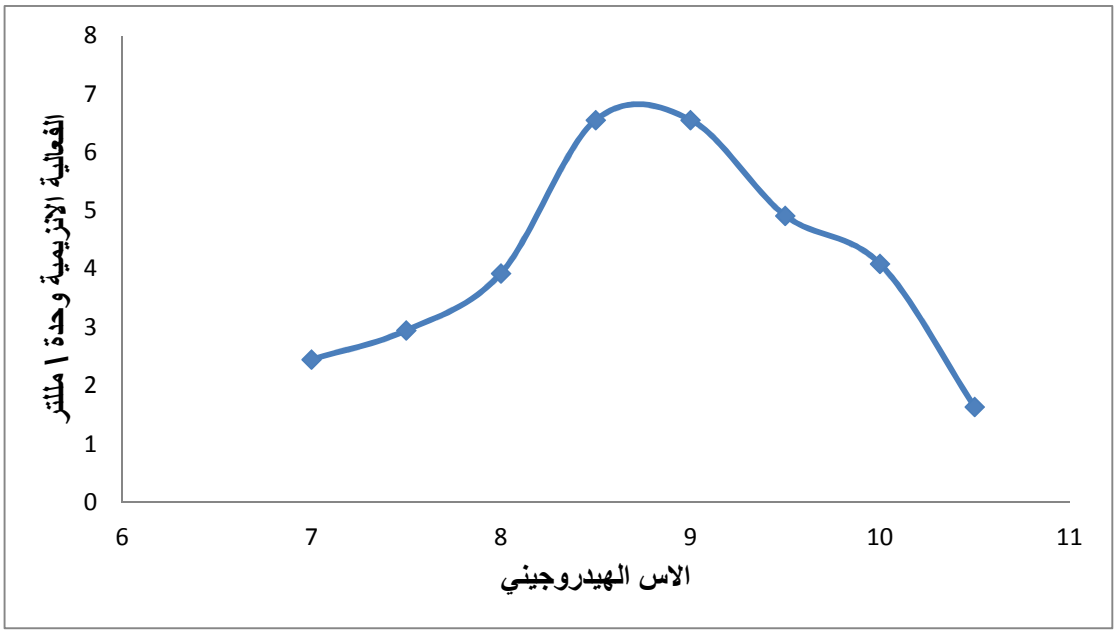
وتشير النتائج الموضحة في الشكل (3 – 14) الى أن الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم هي (8.5 , 9) في حين يلاحظ ان الفعالية قد انخفضت عند الأسس الهيدروجينية المتطرفة .

ولقد توافقت هذه النتيجة مع ما ذكره (Rajoka *et al* , 2006) حيث كان الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية انزيم اليوريكيز المنتج من كلية الخنزير هو عند pH = 8.5 كما وتوافقت مع (Alamillo *et al* , 2003) الذي ذكر ان الاس الهيدروجيني الأمثل لفعالية انزيم اليوريكيز المنقى من *Chlamydomonas reinhardtii* هو 8.5 .

كما وتوافقت مع (Liu *et al* , 1993) عند تنقيته لانزيم اليوريكيز من الخميرة *Candida* SP. . كما وذكر (Kinsella *et al* , 2002) ان الاس الهيدروجيني الأمثل يكون عند pH =8.8 لانزيم اليوريكيز المنتج من كبد السمك ، بينما ذكر (Montalbini *et al* 1997) , ان الاس الهيدروجيني الأمثل هو عند (9 , 9.5) عند دراسته لانزيم اليوريكيز المستخرج من أوراق النباتات و تحتفظ الإنزيمات بنشاطها في حيز محدود من درجات الاس الهيدروجيني .

ان للاس الهيدروجيني أثر واضح على معدل سرعة التفاعل الوسيط بالإنزيمات بصورة عامة مع اختلافات خاصة تتبع طبيعة الانزيم وتركيبهُ الكيمياوي وبالتالي ما يحملهُ من مجاميع أيونية. ومن خلال النتائج المستحصل عليها فأن هناك هبوطاً في سرعة التفاعل الانزيمي في الأرقام الهيدروجينية التي هي اعلى من الاس الهيدروجيني الامثل وهذا يعود الى أسباب عدة من أهمها التأثير العكسي على السرعة القصوى ، أو الى عدم تشبع الانزيم بمادتهِ الاساس ، أو الى قلة الألفة ، أو تاثير الاس الهيدروجيني مما يسبب تلف أو تغير في الجوهر الطبيعي للأنزيم Denaturation . وتتفق هذه النتائج مع ما ورد في الأدبيات بان لانزيم اليوريكيز اس

هيدروجيني امثل يعتمد على مصدر الانزيم ودرجة التنقية ونوع الدارئ المنظم المستعمل ودرجة تركيزهِ .



شكل (3-14) الاس الهيدروجيني الأمثل للفعالية الانزيمية لانزيم اليوريكيز المنقى جزئياً من بكتريا *P. aeruginosa* 7.

3-5-2 تاثير الاس الهيدروجيني في ثبوتية إنزيم اليوريكيز :

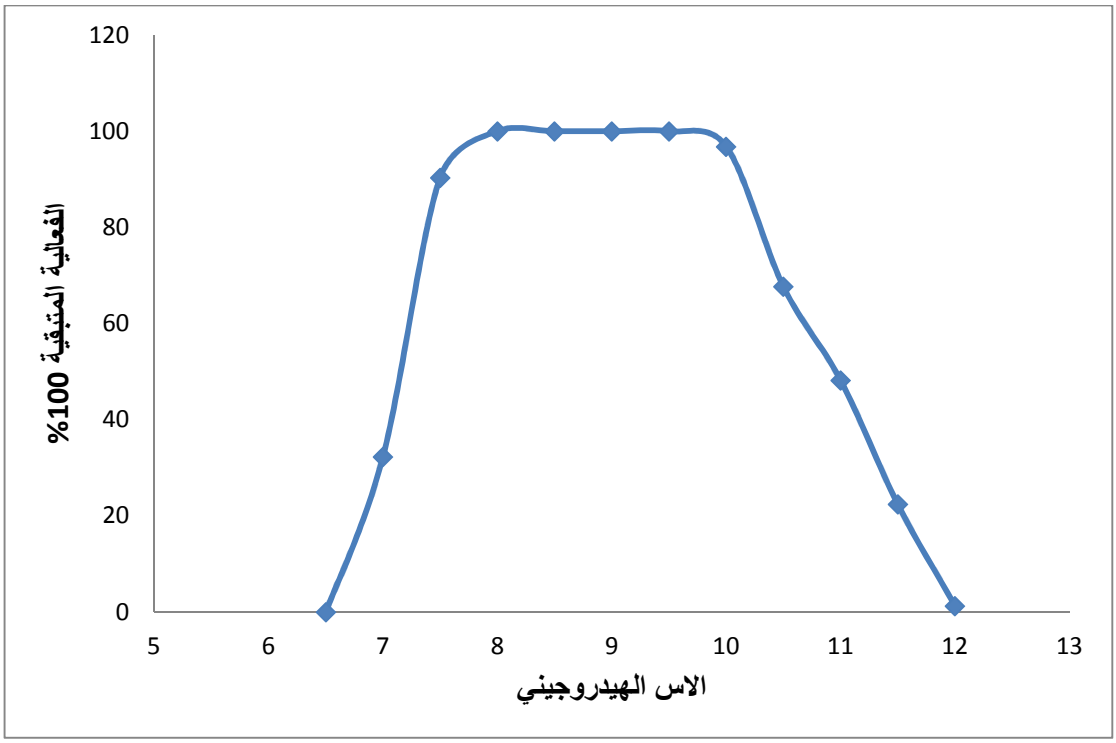
دُرس تاثير الاس الهيدروجيني على ثبات الانزيم المنقى جزئياً ، وذلك بحضن الإنزيم مع محاليل دارئة ذات أرقام هيدروجينية تراوحت بين (7 , 12) ولمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 30 مْ وقد أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (3 – 15) ان الإنزيم يبقى محتفظاً بكامل فعاليته بحدود من الاس الهيدروجيني (8 , 9.5) ، في حين بقي الإنزيم محتفظاً بـ (90.35 و 96.85)% من فعاليته المتبقية عند الأرقام الهيدروجينية (7.5 , 10) على التوالي وبدرجة حرارة 30 مْ ولمدة 20 دقيقة .

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكره (Liu, *et al* , 1993) عند دراسته ثبوتية انزيم اليوريكيز المنقى من خميرة *Candida* SP. اذ كان ثابتاً ما بين (8.5 , 9.5) ، بينما أشار (Ohe and Watanabe , 1981) ان الإنزيم يكون أكثر ثباتية ومحتفظاً بفعاليته في مدى

من الاس الهيدروجيني ما بين (6 , 11) عند درجة حرارة 35 مْ ولمدة ساعة عند دراسته ثبوتية الإنزيم المنتج من البكتريا *Streptomyces cyanogenus* .

أما (Lei *et al* , 2007) فقد ذكر ان ثبوتية انزيم اليوريكيز المنتج من *Microbacterium* SP. يكون عند مدى من pH يتراوح بين (7- 10) ، كما وأشار (Huang and Wu , 2004) إلى ان الانزيم يكون ذا ثباتية عند مدى من الاس الهيدروجيني من (6-9) . وفي ضوء هذه النتائج يمكن القول ان انزيم اليوريكيز ثابت نسبياً في مدى من درجات الاس الهيدروجيني القاعدية والقريبة من التعادل لكنه غير ثابت في الظروف الحامضية والقاعدية الأعلى من pH = 10 .

ان هذه الظاهرة يمكن ان تعزى الى الحساسية العالية للأنزيم لتغيرات الاس الهيدروجيني حيث يسبب تغيرهُ في كسر الأواصر الأيونية التي تربط الانزيم بركيزتهِ والتي بدورها تفقد الانزيم فعاليته عند تعرضه لظروف حامضية أو قاعدية اعلى من (pH=10) ، حيث يتزامن تفكك الانزيم مع الركيزة الى فقدان الفعالية في حين يكون احتفاظهِ بفعاليتهِ مرتبطاً باحتفاظهِ بتركيبهِ الكامل .

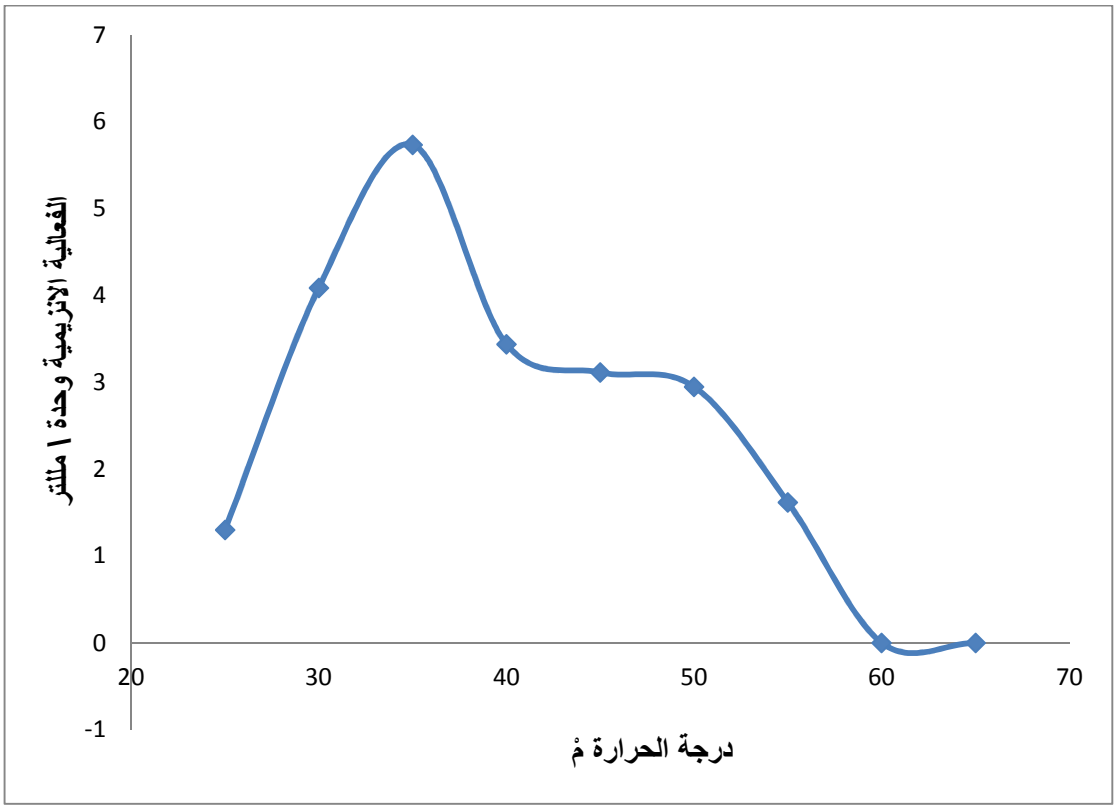


شكل (3-15) الاس الهيدروجيني الأمثل لثبوت انزيم اليوريكيز المنتج من *P. aeruginosa 7*.

3-5-3 تاثير درجة الحرارة على سرعة التفاعل :

من المعروف بان سرعة التفاعلات الانزيمية تزداد بأزدياد درجة الحرارة في مدى محدد بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات الى ان تصل درجة الحرارة المثلى التي تبلغ عندها سرعة التفاعل قيمتها القصوى ، عندما يكون للأنزيم أفضل قدرة للارتباط مع ركيزتهِ ، وبذلك يعطي أعلى سرعة للتفاعل الانزيمي ، ان الارتفاع الكبير في درجات الحرارة يؤدي الى خفض سرعة التفاعل المحفز انزيمياً بسبب تلف التركيب الثلاثي الأبعاد للأنزيم وفقدانهِ لخواصهِ التحفيزية (الدليمي ، 2002) . دُرس تأثير درجات الحرارة على فعالية الانزيم بتثبيت جميع ظروف التجربة باستثناء تغير درجات الحرارة بمدى من (25 – 65) مْ .

يتبين من الشكل (3 – 16) بأن سرعة التفاعل تزداد بأزدياد درجة الحرارة الى ان تصل الى درجة الحرارة المثلى وهي 35 مْ وتنخفض هذه السرعة في درجات حرارية 40 مْ فما فوق ويمكن ان يرجع السبب الى تمسخ Denaturation لجزيئة البروتين .



شكل (3-16) تاثير درجة الحرارة في فعالية انزيم اليوريكيز المنتج من *P.aeruginosa 7* .

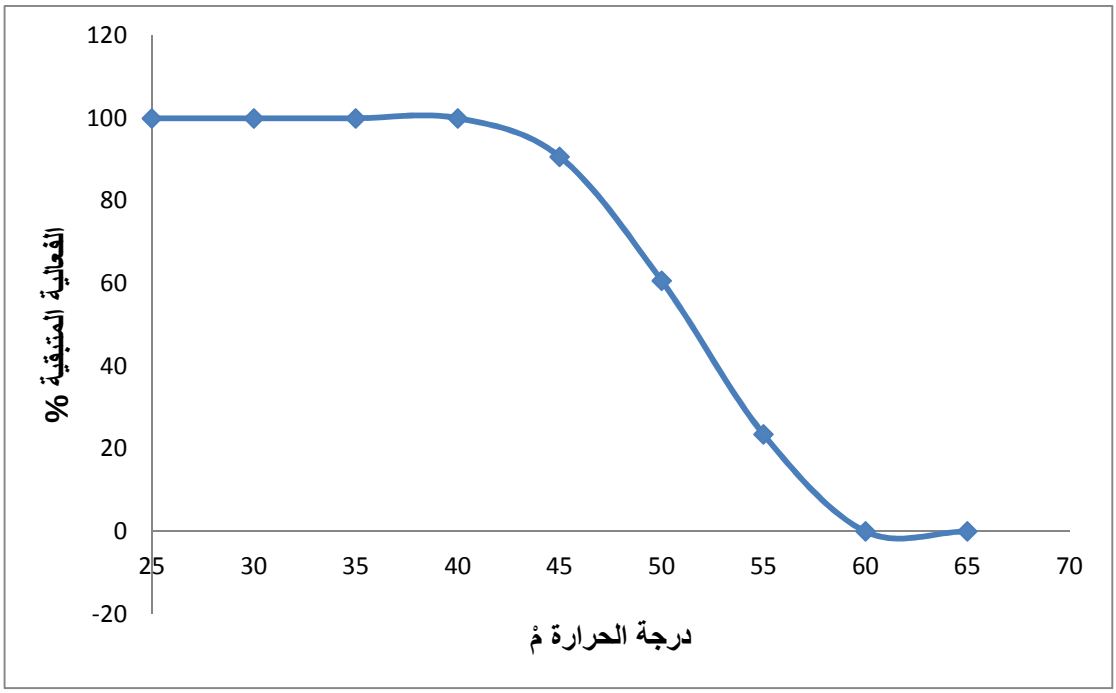
وان هذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه العديد من الباحثين منهم (Ohe and Watanabe , 1981) الذي ذكر ان الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم المنتج من *Streptomyces cyanogenus* هي *35* ْم ، بينما ذكر (Alamillo *et al* , 2003) ان الحرارة المثلى لفعالية انزيم اليوريكيز المنتج من *Chlamydomonas reinhardtii* هي عند 40 مْ . أما (Liu, *et al* , 1993) فقد ذكر ان الدرجة الحرارية 30 مْ هي المثلى لفعالية انزيم اليوريكيز المنتج من خميرة *Candida* SP. .

3-5-4 **الثبات الحراري لانزيم اليوريكيز :**

لغرض دراسة تاثير درجة الحرارة في ثبات انزيم اليوريكيز ، تم معاملة الانزيم بدرجات حرارية تراوحت بين (25 – 65) مْ ، وقد أظهرت النتائج المبينة في الشكل (3-17) احتفاظ الانزيم بكامل فعاليتهِ الانزيمية عند حضنهِ لمدة 20 دقيقة بمدى من درجات الحرارة بين (25 – 40) مْ ، وان الانزيم احتفظ بحوالي 90% من فعاليتهِ الانزيمية عند معاملتهِ بدرجة حرارية 45 مْ، بيد انه فقد فعاليتهِ كلياً عند درجة حرارة اعلى من 60 مْ فما فوق .

لقد أشارت عدد من الدراسات الى الثبات الحراري لانزيم اليوريكيز ، اذ جاءت هذه النتيجة متقاربة مع ما ذكرهُ (Ohe and Watanabe , 1981) عند دراستهِ لانزيم اليوريكيز المعزول من بكتريا *Streptomyces cyanogenus* حيث ذكر ان الإنزيم يحتفظ بفعاليتهِ عند 50 مْ ولمدة 10 دقائق ، بينما (Zhou *et al* , 2005) ذكروا عند دراستهم للإنزيم انه يبقى محتفظاً بفعاليتهِ كاملة 100 % عند 70 مْ ولمدة 30 دقيقة .

وفي دراسة اخرى وجد ان الانزيم يبقى محتفظاً بنسبة 66.06% من فعاليتهِ عند حضنهِ على درجة حرارة 40 مْ ولمدة 10 دقائق وذلك للإنزيم المنقى من فطر *G. guog* (Mabrouk *et al* , 2010) .



شكل (3-17) الثبات الحراري لانزيم اليوريكيز المنتج من *P. aeruginosa 7*

3-5-5 تأثير بعض الاملاح والمواد الكيميائية في فعالية الانزيم :

ارتأينا ان ندرس تأثير استخدام تراكيز مختلفة من أملاح مختلفة ومواد كيماوية على ثبات الانزيم أو المساهمة في زيادة فعاليته من خلال تكوين معقدات بين هذه الاملاح وبين التركيب الثلاثي الأبعاد لجزيئة الانزيم . إذ تم إستخدام تركيزين (1 , 5) ملي مولر من الاملاح القيد الدراسة ، وحضنت مع الانزيم بدرجة حرارة 30 مْ ورقم هيدروجيني (9) لمدة عشرة دقائق ، ثم قيست الفعالية الانزيمية المتبقية وتشير النتائج المدرجة في الجدول (3-5) الى تباين تأثير الكلوريدات الفلزية على فعالية الانزيم ، فقد كان الانزيم محتفظاً بكامل فعاليتهِ عند حضنهِ مع كلوريد الصوديوم بتركيز 5 ملي مولر ، بينما تزداد الفعالية المتبقية لتصل الى 216.448% عند حضن الانزيم مع كلوريد الصوديوم بتركيز 1 ملي مولر ، ويمكن ان يعزى ذلك الى ان جزيئة الانزيم لها ميل أو الفة تجاه ايونات الصوديوم وثباتيتها بوجوده ، حيث تتشبع بتركيز 1 ملي مولر من كلوريد الصوديوم الذي جهزها بايونات الصوديوم اللازم للارتباط بجزيئة الانزيم الذي يؤدي الى إظهار مواقعها الفعالة .

اما انخفاض الفعالية الانزيمية بتركيز 5 ملي مولر من كلوريد الصوديوم مقارنة بتركيز 1 ملي مولر فقد يكون بسبب تجمع نواتج فعل الانزيم على الركيزة بمساعدة ايونات الصوديوم مما يؤثر بالتالي على نتيجة الاختبار الكمي للفعالية الانزيمية .

اما بالنسبة للأملاح ، كلوريد المنغنيز ، كلوريد النيكل و كلوريد الكالسيوم فأن زيادة التراكيز المستخدمة من 1 ملي مولر الى 5 ملي مولر تؤدي الى زيادة الفعالية الانزيمية المتبقية ، وقد يعزى ذلك الى زيادة القوة الأيونية وليس الى تأثير الايون بصورة محددة . وهذه القوة الأيونية قد تكون كافية لكسر الارتباط بين جزيئة الانزيم وبين جزيئة المثبط الذي قد يكون موجود في محيط التفاعل .

اما فيما يخص تأثير أملاح كلوريد الفضة وكلوريد الزئبق وكلوريد البوتاسيوم فأن لهذه الاملاح تأثير مثبط في فعالية الانزيم ،والزيادة في التراكيز المستخدمة منها يؤدي الى تثبيط فعالية الانزيم ويمكن ان يعزى تأثير ايونات الزئبق والفضة والبوتاسيوم على خفض فعالية الانزيم الى تكوينها معقدات مع جزيئة الانزيم وتؤدي الى تغير التركيب الثلاثي الأبعاد وبالتالي لا يكون مركزها الفعال مؤهلاً للارتباط بصورة جيدة مع الركيزة .

قام عدد من الباحثين بدراسة تأثير بعض الايونات الفلزية اذ لاحظ (Mabrouk , 2010) الى ان كلوريد الكالسيوم من المنشطات القوية لانزيم اليوريكيز ، كما وان كبريتات المنغنيز ايضاً من المنشطات الجيدة للأنزيم بينما اعتبر كلوريد الحديد وكبريتات المغنسيوم وكلوريد الكوبلت من المثبطات للفعالية الانزيمية لانزيم اليوريكيز .

كما ودُرس تأثير الاثيلين ثنائي امين رباعي حامض الخليك (EDTA) على فعالية انزيم اليوريكيز لمعرفة المزيد عن طبيعة تركيبه ، وقد بينت النتائج في الجدول (3-5) ان المعاملة بـ EDTA اختزلت الفعالية الانزيمية قليلاً أي ان هناك تثبيطاً ضئيلاً بسبب سحب بعض الايونات المعدنية الضرورية لثبات الانزيم .

جدول (3-5) تأثير اضافة تراكيز مختلفة من املاح مختلفة ومواد كيمياوية على فعالية انزيم اليوريكيز المنتج من عزلة *P.aeruginosa 7* .

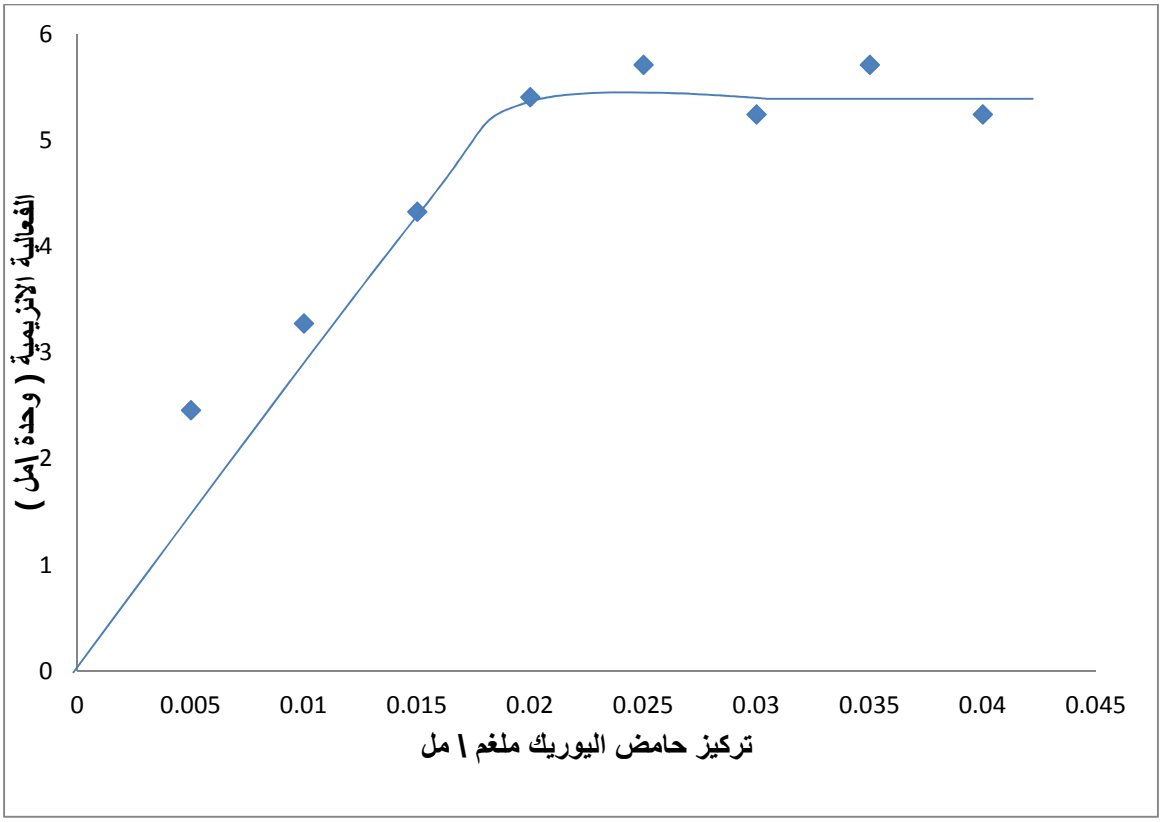
ت	الكلوريدات	التركيز (ملي مولر)	الفعالية المتبقية %
1	بدون معاملة	-	100
2	كلوريد الفضة	1	51.85
		5	18.504
3	كلوريد الصوديوم	1	216.448
		5	100
4	كلوريد الزئبق	1	37.03
		5	11.07
5	كلوريد المنغنيز	1	37.03
		5	170.35
6	كلوريد النيكل	1	55.558
		5	66.65
7	كلوريد الكالسيوم	1	48.124
		5	129.62
8	كلوريد الحديد	1	11.07
		5	73.88
9	كلوريد البوتاسيوم	1	59.195
		5	25.915
10	EDTA	5	85.178

3-5-6 **تاثير تركيز الركيزة على سرعة التفاعل** :

تعتمد سرعة التفاعلات الانزيمية على تركيز المادة الركيزة ، و تقاس سرعة التفاعل الانزيمي بمتابعة تناقص الركيزة أو تكوين الناتج خلال فترة زمنية معينة ، وتعتمد قيمة السرعة على رتبة التفاعل الانزيمي . فالنظام الانزيمي ذو الركيزة الواحدة يعطى علاقة طردية بين سرعة التفاعل وتركيز الانزيم المستعمل كما وان كمية تكوين المنتج النهائي تتناسب تناسباً طردياً مع الوقت . في هذا التفاعل يتضاعف المنتج النهائي عندما تتضاعف فترة التفاعل (الدليمي ، 2002) .

تم استخدام تراكيز مختلفة للركيزة (حامض اليوريك) في مدى من (0.005 – 0.04) ملغم مع تثبيت الظروف الأخرى من درجة الحرارة والاس الهيدروجيني و يظهر من خلال الشكل (3–18) ان تركيز الركيزة الاوفق للأنزيم مساوٍ الى (0.02) ملغم إي (20) مايكروغرام لكل 1 مل من المحلول الدارئ الذي يتم تحضير المادة الاساس فيه و تزداد السرعة الابتدائية للتفاعل الانزيمي (وهي السرعة التي يمكن قياسها عندما تتفاعل اقل كمية من الركيزة) الى ان تصل الى السرعة القصوى V_{max} عند تثبيت جميع ظروف التفاعل من الاس الهيدروجيني ، درجة الحرارة، تركيز الانزيم ، وتغير تركيز الركيزة فقط .

ان التركيز الاوفق للركيزة هو التركيز الذي تبلغ عندهُ سرعة التفاعل الانزيمي قيمتها القصوى ، والذي يصبح فيه الانزيم في حالة إشباع مع ركيزتهِ ويلاحظ من الشكل (3–18) حصول حالة الإشباع بين التركيز (20–40) مايكروغرام \ مل وان هذه النتيجة تتفق مع ما جاء به Mabrouk وجماعته عند دراستهم لانزيم اليوريكيز المنتج من فطر *G.* gueg .



شكل (3–18) العلاقة بين سرعة تفاعل انزيم اليوريكيز المنقى جزئياً وتركيز الركيزة (حامض اليوريك) .

3-5-7 تقدير الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز :

تم تقدير الثوابت الحركية للأنزيم والمتمثلة بثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} لانزيم اليوريكيز المنتج والمنقى من بكتريا *P. aeruginosa* 7 باستخدام حامض اليوريك مادة التفاعل ، وقد استخدمت ثلاثة طرائق في رسم العلاقة بين سرعة التفاعل (V) وتراكيز المادة الأساس [S] لتعين الثوابت الحركية ، و توضح الاشكال (3-19) و (3-20) و (3-21) الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز المنقى جزئياً من بكتريا *P.aeruginosa 7* بطرائق لاينويفر- بيرك و هانس وولف و ايدي هوفست ، على التوالي . اما الجدول (3-6) فيوضح قيم الثوابت الحركية المستحصل عليها من الطرائق المذكورة ،إذ بلغ معدل القيم بالنسبة لثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} 0.0091 ملغم\ملليتر و6.68 مايكرومول \ مل . دقيقة على التوالي.

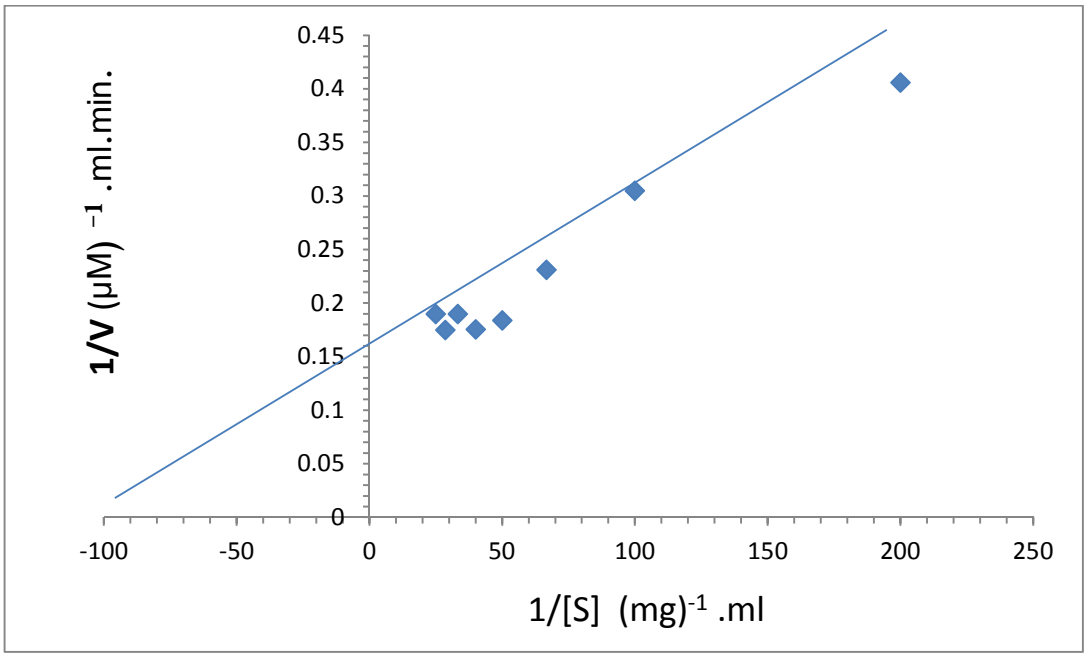
يعد ثابت ميكالس أهم الثوابت الحركية المميزة للأنزيم ومادة الأساس لأنه يختلف باختلاف الانزيم ومصدره والمادة الأساس المستعملة .

ذكر (Bomalaski *et al* , 2002) ان ثابت ميكالس يعادل 50 مايكرومول لانزيم اليوريكيز المنتج من البكتريا *Arthrobacter protoformiae* ، ومن الفطر *Aspergillus flavus* فان ثابت ميكالس يعادل 61 مايكرومول . اما (Montalbini *et al* , 1997) فقد ذكر ان قيمة ثابت ميكالس هي (24-9) مايكرومول لانزيم اليوريكيز المنتج من أوراق النباتات ، اما (Kai *et al* , 2007) أشار إلى ان ثابت ميكالس يعادل 0.31 ملي مول بينما (Liu *et al* , 1993) ذكر ان ثابت ميكالس يساوي 5.26×10^{-3} مول \ لتر. كما وذكرت دراسات اخرى ان قيم السرعة القصوى قد بلغت 0.033922 ملي مول \ دقيقة (Sarkar , 2010) ، وقد يكون ثابت ميكالس يساوي 4.2×10^{-5} مولر لانزيم اليوريكيز المنتج من *Neurospora crassa* (Wang and Marzluf , 1979) ، بينما ذكر (Bomalaski *et al* , 2002) ان السرعة القصوى لانزيم اليوريكيز المنتج من فطر *A. flavus قد بلغت* 8 مايكرومول \دقيقة \ملغم ، وتكون هذه القيمة مساوية لقيمة السرعة القصوى لانزيم اليوريكيز المنتج من

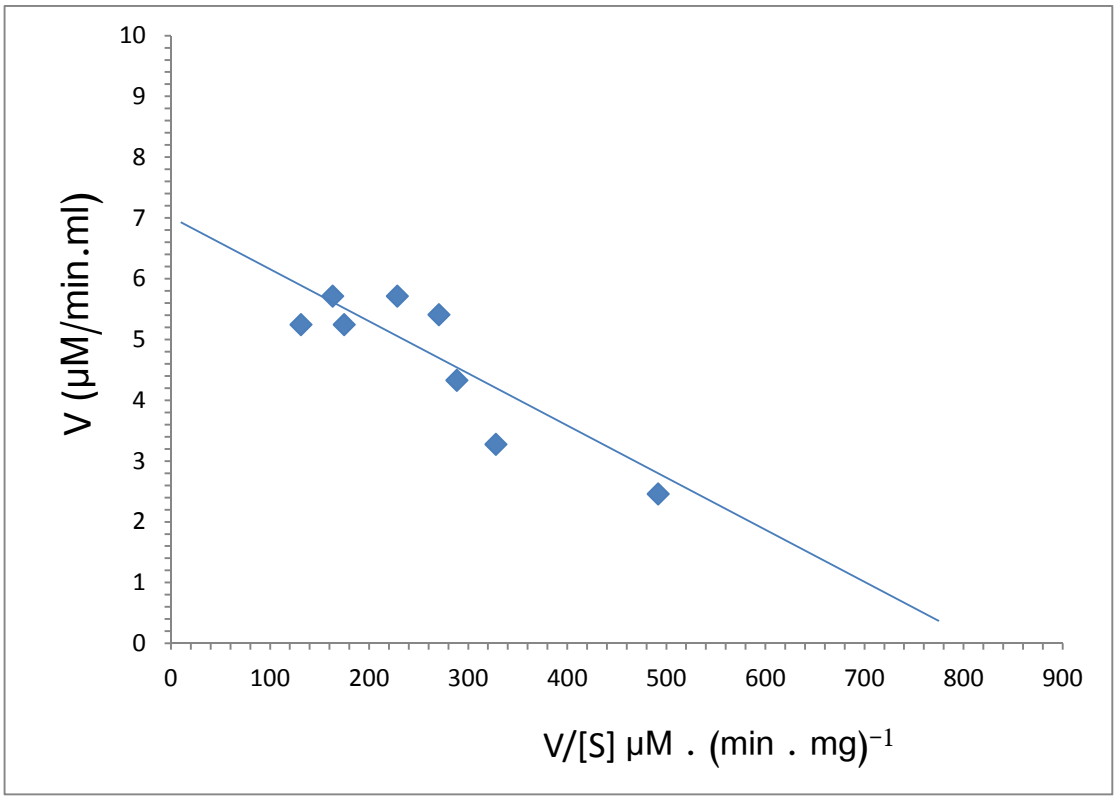
Arthrobacter protoformiae، اما بالنسبة للسرعة القصوى للأنزيم المنتج من *Candida utilis* قد بلغت 10 مايكرومول \ دقيقة \ملغم.

جدول (3-6) الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز المنتج من بكتريا *P.aeruginosa 7* .

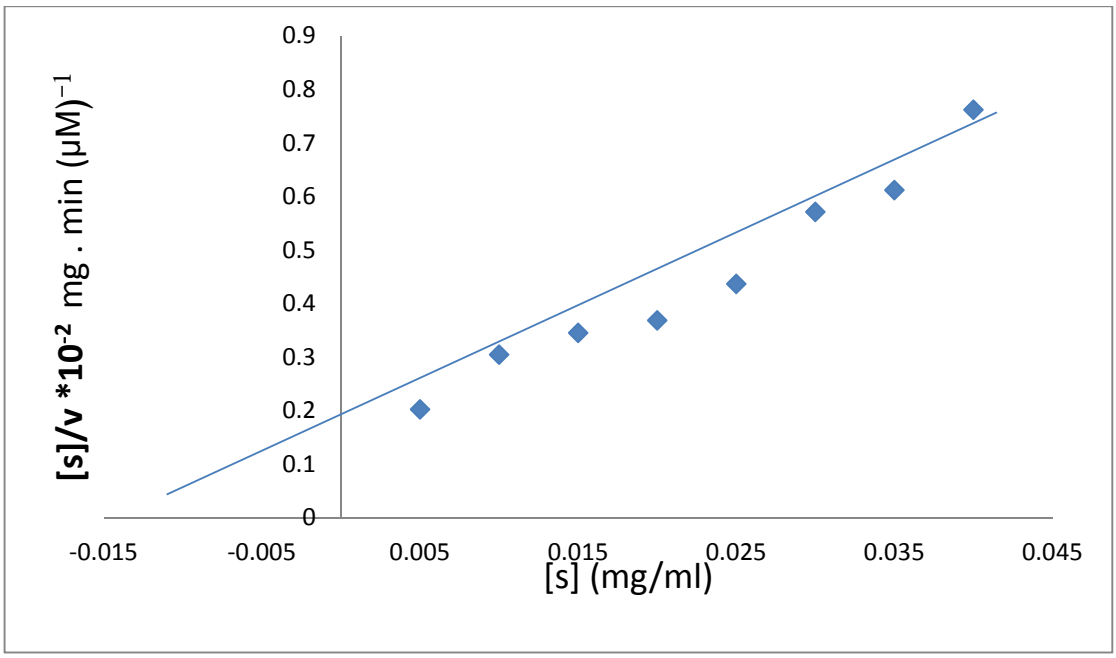
ت	الطريقة	*Km* (mg /ml)	Vmax (µM/ml.min)
1	لاين وفر بيرك Linwiever-Burk reciprocal plot	0.01	6.66
2	هانس – وولف Hanes-Woolf plot	0.009	6.6
3	أيدي – هوفستي Eadie –Hoffstee plot	0.0087	6.8



شكل (3-19) الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز الحركية بطريقة لاين وفر بيرك Lineweaver-Burk plot



شكل (3-20) الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز بطريقة أيدي – هوفست Eadie-Hoffstee plot



شكل (3-21) الثوابت الحركية لانزيم اليوريكيز بطريقة هانس Hanes plot .

3-7 التطبيقات الطبية لانزيم اليوريكيز :

ان احد اهداف هذه الدراسة هو استخدام الانزيم في عملية تطبيقية ، لذا فقد تركزت الجهود على الاستفادة من عناصر متوفرة محلياً في تحضير عدة وطنية المنشأ وبكفاءة عالية تضاهي العدد المستوردة والمستخدمة في مختبرات التحاليل الطبية للتقدير الكمي النوعي لحامض اليوريك في السوائل البايولوجية .

ولتحقيق هذا الهدف يتطلب البحث عن مصدر لانزيم البيروكسيديز ، استخدمت جذور الفجل كمصدر لاستخلاص وتنقية انزيم البيروكسيديز لكونها من المصادر المتوفرة و الغنية بالإنزيم وشملت خطوات التنقية الترسيب بالأسيتون بنسبة 65% حيث ساهمت هذه الخطوة في التخلص من كثير من المواد المرافقة للأنزيم المستخلص الخام وزيادة درجة النقاوة استخدم مادة التبادل الايوني من نوع DEAE-Cellulose التي ترتبط بها الإنزيمات الحاملة للشحنة السالبة في ظروف الفصل . تتركز أهمية هذه الخطوة في الحصول على المتناظرات لانزيم البيروكسيديز التي تكون نقطة تعادل الشحنة لها اعلى من 8 ولذلك تكون في أجزاء الغسل واستبعاد المتناظرات الانزيمية ذو الشحنة السالبة التي ارتبطت بالمبادل الايوني .

وقد استخدمت 7 عينات مصلية منها ما احضر من أشخاص مصابين لارتفاع حامض اليوريك في الدم (داء النقرس) ومنها لأشخاص غير مصابين للتحري عن كفاءة انزيم اليوريكيز المنتج من العزلة المحلية 7 *P. aeruginosa* في التقدير الكمي لحامض اليوريك في الدم أو في السوائل البايولوجية مقارنة بكفاءة أنزيم اليوريكيز المنتج تجارياً ضمن عدة (RANDOX) .

اذ تم تقدير كمية حامض اليوريك وتركيزهُ بالدم وذلك بدلالة انزيم البيروكسيديز المستخرج من جذور الفجل والمنقى جزئياً ، كما واستخدم كاشف الكواياكول كما في الفقرة (2-12-5) .

تم إجراء مقارنة بين العدة (RANDOX) وبين كفاءة انزيم اليوريكيز المنتج محلياً.

اذ جاءت النتائج متقاربة من بعضها وكما موضح بالجدول (3-7) .

جدول (3-7) تركيز حامض اليوريك باستخدام العدة التشخيصية RANDOX و الانزيم المنتج من العزلة المحلية *P. aeruginosa 7*

رمز العينة	تركيز حامض اليوريك باستخدام العدة التشخيصية RANDOX ملغم\ديسي لتر	تركيز حامض اليوريك باستخدام انزيم اليوريكيز المنتج من العزلة المحلية ملغم\ديسي لتر
1	5.26	5.05
2	6.45	5.94
3	2.023	3.205
4	4.714	4.4
5	9.35	8.87
6	6.33	5.49
7	7.82	7.619

الاستنتاجات

1) كفاءة العزلة البكتيرية المحلية 7 *P. aeruginosa* في انتاج و الحصول على انزيم اليوريكيز .
2) تم التوصل الى تحديد مكونات الوسط الغذائي الامثل في انتاج الانزيم وتحديد االظروف المثلى لانتاج الانزيم .
3) سهولة تنقية انزيم اليوريكيز بكميات مناسبة للاستفادة منه في التطبيقات الطبية .
4) تلبي التنقية المبسطة لانزيم اليوريكيز متطلبات تحضير عدة وطنية المنشأ ذات كفاءة وحساسية عاليين لتحديد كمية حامض اليوريك في الدم وتقدم بديلاً محلياً مناسباً عن العُدد المستوردة لهذا الغرض .

التوصيات :

1) إجراء دراسات وبحوث أخرى تفصيلية حول طبيعة وتركيب انزيم اليوريكيز .
2) إجراء دراسات وبحوث على المستوى الجزيئي للجين المسؤول عن انزيم اليوريكيز ومحاولة كلونة الجين في الخميرة *Saccharomyces cervisiae* .
3) إجراء دراسات تعنى باستخلاص انزيم اليوريكيز وتنقيته وتحضير أضداد له في الحيوانات للاستفادة منها في إجراء فحوص بسيطة ونوعية به للتحري عن مستويات حامض اليوريك المرتفعة .
4) البحث عن مصادر أخرى اكثر انتاج لانزيم اليوريكيز .

المصادر باللغة العربية

الحيدري .، نظام كاظم عبد الامير و **المصلح ،** رشيد محجوب . (1989) . الاحياء المجهرية الصناعية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . بيت الحكمة .

الخفاجي ، زهرة محمود . (1990) . التقنية الحيوية . دار الحكمة للطباعة والنشر . الموصل .

الدليمي ، خلف صوفي داوود **.** (2002) . الإنزيمات الميكروبية والتقانات الحيوية . جامعة فيلادلفيا ، عمان الأردن . المكتبة الوطنية .

الربيعي ، شروق ريس كاظم .(1998) . دراسة بكتريولوجية وراثية بايوكيميائية على بكتريا *Staphylococcus aureus* المنتجة لبروتين A . رسالة دكتوراه كليه العلوم جامعة بغداد .

السعد ، مها رؤوف . (1991) . النمو في : علم الاحياء المجهرية (تأليف لجنة من تدريسي قسم علوم الحياة) . ص 333 – 368 . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الحكمة .

ساجدي ، عادل جورج و**الباقر ،** علاء يحيى . (1987) . المايكروبايولوجي الصناعي (الجزء الاول) . أساسيات التخمرات الصناعية . مطبعة جامعة البصرة .

سلمان ، رياض رشيد و **فضل الله ،** يوسف جورج . (1989) . الكيمياء الحياتية العملي ص 171 – 172 وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة بغداد ، كلية التربية الثانية ، ابن الهيثم .

صالح ، ضحى سعد . (1991) . تغذية الاحياء المجهرية في : علم الاحياء المجهرية (تأليف لجنة من تدريسي قسم علوم الحياة) . ص 297-332 . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الحكمة .

محمود ، وليد احمد . (1992) . عزل وتوصيف وتثبيت انزيم البيتا – كالاكتوسيديز من بكتريا *streptococcus thermophilus* أطروحة دكتوراه . كلية الزراعة والغابات . جامعة الموصل .

المصادر باللغة الانكليزية

- A -

Abd El Fattah, M. G. and Abo – Hamed, N.a. , (2002) . Bioconversion of poultry waste I – Factors influencing the assay and productivity of crude uricase by three uricolytic filamentous fungi . Acta Microbiologic and immuniligica Hungarica 49, p. 445-454 .

Abd El Fattah, Y. R. ; Saeed, H. M. ; Goher, Y.M. and El- Baz, M. A. (2005) . Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs . process Biochemistry 40, p. 1707- 1714 .

Alamillo, J. M. ; Cárdenas, J. and Pineda, M. ,(2003) . Purification and molecular properties of urate oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii .* Biochimica et biophusica Acta (BBA) – protein structure and Molecular Enzymology , vol. 1076, p. 203-208 .

Albat L. Lehninoyer , David L. Nelson and Michael M. Cox , (1993) . Principle of biochemistry , 2nd ed . worth poblishers – New york , p. 728 – 730 .

AL-Obaidi , Z.S.; Gh. M.Aziz ; Th.S. AL-Hakkak and M.A. AL-Hilli , (1989) . Optimization of propagation medium for baker's yeast using data axtraction and molasses . date palm J.5(1):164-178 .

Al Shehri, N. ; Pharm, B. Sc. ; Dr. Al Alwan, A. ; Ph. D. and Col. Dr. Al Rashed , S. ph. D. ,(2005) . Rasburicase . Pharmacy update, vol. 12, No. 3 .

Ames, B. N. ; Cathcart, R. ; Schwiers, E. and Hochstein, P. (1981) . Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical – caused aging and cancer : ahypothesis . proc.natl . Acad. Sci. USA . vol. 78, No.11, p. 6858 – 6862 .

Arslan, F. , (2008) . An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in poly aniline – polypyrrole film . sensore, 8, p. 5492-5500.

Atalla, M.M ; M. M. Farag ; R. H. Eman ; M. S. Abd-El-lataif and E. A. Nehad , (2009) . Optimum condition for uricase enzyme production by *Gliomastix guog .* Malaysian J. of microbiology , vol. 5(1) 2009, p.45-50.

Azab E.A. , Ali M. Magda and Fareed M. F. , (2005) . Studies on uricase induction in certain bacteria . J. of biology , 2005 , Vol. 7, p. 44 – 54.

- B -

Barash, I. , (1972) . Acumulation of urea and allantoin during purine utilization by germinating spores of *Geotrichum candidum .* J. of general microbiology (1972) , 72 , p. 539 – 542 .

Baron, E. J. ; Peterson, L. R. and Finegold, S. M. (1995). Bailey & Scott's Diagnostic microbiology . 9thed. , the C. V. Mosby company, USA.

Bayer, A. S. ; Park, S. ; Ramos, M.C. ; Nast,C. C. ; Eftekhar, F. ; and Schiller, N. L. , (1992) . Effects of alginase on the natural history and antibiotic therapy of experimental endocarditis caused by mucoid *Pseudomonas aeruginosa.* Infection and immunity, 1992, p. 3979-3985 .

Bayol, A. ; Capdevielle, J. ; Malazzi, P. ; Buzy, A. ; Bonnet, M. C. ; Colloc'h, N. ; Mornon, J. ; Loyaux, D. and Ferrara, P. ,(2010) . Modification of a reactive cystene explains differences between Rasburicase and uricozyme , a natural *Aspergillus flavus* uricase . J. Biotechnology and Applied Biochemistry , vol. 36, pp. 21-31 (2002).

Bergmeyer, H. U. , Bergmeyer , JÜrgen and GraBI M. , (1985). Methods of enzymatic analysis . Third Edition , p. 139.

Bhargava, A. K. ; Lal, H. and Pundir, C. S. , (1999) . Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and

peroxidase . J. of Biochemical and Biophysical Methods , vol. 39, p. 125-136 .

Bomalaski, J. S. ; Holtsberg, F. W. ; Ensor, C. M. and Clark, M. A. , (2002) . Uricase formulated with polyethylene glycol (uricase PEG 20) : Biochemical rationale and preclinical studies . J. of Rheumatology , 2002, vol. 29, No. 9, p. 1924- 1949 .

Bongaerts G.P.A. and Vogels G.D. , (1975) . Uric acid degradation by *Bacillus fastidiosus* strains . J. of bacteriology , 1976, p. 689-687.

Bongaerts , G . P. ; Uitzetter , J. ; Brouns , R. and Vogels G. D. , (1978) , Uricase of *Bacillus fastidiosus* . properties of synthesis . J. Biochim. Biophys. Acta. 1978 , vol. 527(2): 348-358.

Bradford, M. M. (1976) . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein . dye binding Ana. Biochem . 72 : 248 -254

Budayova-Spano , M. ; Bonnete , F. ; Ferte , N. ; El Hajji , M. ; Meilleur , F. ; Blakeley , M. P. and Castro , B. (2006) . A preliminary neutron diffraction study of rasburicase , a recombinant urate oxidase enzyme , complexed with 8 – azaxanthin .J. Acta crystallogr sect. F struct. Biol. Cryst. Commun. vol. 62. P. 306-309 .

- C -

Cammalleri , L. and Malaguarnera ,M. , (2007) . Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout . J. Med . sci. 2007, 4 (2) : 83-93 .

Chen , Z. ; Wang , Z. **;** He , X. ; Guo , X. ; Li , W. ; and Zhang , B. ,(2008) . Uricase production by a recombinant *Hansenula polymorpha* strain harboring *Candida utilis* uricase gene . appl. Microbial biotechnol (2008) 79 ; p. 545- 554.

Clarke P.H. and Meadow P. M. (1965) . The effect of 8-Azaguanine on the inducible oxidation of guanine by *Pseudomonas aeruginosa .* J. gen. Microbiol (1966), 44, p.195-208 .

Claus, D. and Berkeley, R. C. W. (1984) . Genus *Bacillus* in Bergey manual of systematic bacteriology , vol. 11, pp. 1105-1139. Senath, P. H. A. Mair , N. S. sharpe. M. E. and Holt . J. G. (eds.) . The Williams and Willikins Co. Baltimore .

Colle, J. G. ; Fraser**,** A**.** G. ; Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996) . Mackie & Mccartney practical medical microbiology . 14th ed , the Churchill livinstone Inc. , USA .

Cooper, M. ; Tavankar, G. R. and Williams, H. D. (2003). "Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*". *Microbiology* 149 (Pt 5): p. 1275–1284.

Conley T. G., and Priest , D. G. , (1979) . Non – classical inhibition of uricase by cyanide . J. Biochem. 187, p. 733-738

- D -

Deboy II, J. M. ; Wachsmuth, I. K. and Davis, B. R. (1980) . Hemolytic activity in enterotoxigenic and non enterotoxigenic strains of *Esherichia coli .* j. clin. Microbiol. , 12(2): p. 193-198 .

Dubois M. ; Gilles K.A. ; Hamilton J.K. ; Rebers P.A. and Smith F. (1956) . Colorimetric method for determination of sugars and related substances . Anal. Bioch. ,28(3) : p. 350-356 .

- E –

Egarov , N. S. , (1985) **.** Antibiotics aSceintific approach . mir publishrs . Moscow .

Ertan, F. and AksÖz, E. , (2000) . *Aspergillus niger*'den Ürikaz enziminin Üretilmesi ve aktiviteye etkili bazi faktÖrlerin belirlenmesi . J. of biology , 24 (2000) EK .

- F -

Farley P. C. and Santosa S. , (2002) . Regulation of the *Rhizopus oryzae* uricase and urease enzymes . J. of Microbiology , vol. 48, NO. 12, p. 1104- 1108 .

Falkinham III ,J. O. ;George, K. L. ; Parker, B. C. and Gruft ,H. , (1983) . Uric acid utilization by *Mycobacterium intracellulare* and

Mycobacterium scrofulaceeum isolates . J. of bacteriology, vol. 155, No. 1 , P. 36-39 ..

Finegold, S. M. and Martin , W. J. (1982) . Bailey and Scott's Diagnostic microbial . 6thed. , The C. V. Mosby company , USA .

Fitzpatrick , D. A. ; Fitzgerald , O. and Mcgeeney , (1969) . Nicotinic acid inhibition of uricase . J. of Med. Sc. Vol. 2. No. 11 .

Fridovich , I. , (1965) . The competitive inhibition of uricase by oxonate and by related derivatives of s-triazines . J. of biological chemistry Vol. 240 , No. 6. Printed in U.S.A.

Fukumoto J. ; Takarazuka and YamamotoT. (1969) . Preparation of uricase . patented Mar. 4 , 1969, No. 609,746

- G -

Gabison , L. ; Prange , T. ; Colloc'h , N. ; El Hajii , M. ; Casto , B. ; and Chiadmi , M. , (2008) . Structural analysis of urate oxidase in complex with its natural substrate inhibited by cyanide : mechanistic implication . BMC structural biology 2008 , 8: 32 doi : 10.1186/ 1472-6807-8-32 .

Ganson, N. ; Kelly, S.J. ; Scarlett , E. ; Sundy , J. S. and Hershfield, M. S. , (2006) . Control of hyperuricemia in subjects

with refractory gout , and induction of antibody against poly (ethylene) glycol (PEG) , in a phase I trial of subcutaneous PEGylated urate oxidase . J. arthritis research & therapy 2006, 8:R12 doi: 10.1186/ar1861.

Gutman , Yu TF , AB . (1961) . Effcacy of colchicine prophylaxis in gout . Ann intem med 1961; 55: P. 179-192 .

- H -

Hassett, D. J. (1996). Anaerobic production of alginat by *Pseudomonas aeruginosa :* alginate restricts diffusion of oxygen . *J. Bacteriol.* 178 (24): 7322–5.

Helbig , F. ; Steighardt , J. and Roos, W. , (2002) . Uric acid is a genuine metabolite of *Penicillium cyclopium* and stimulates the expression of Alkaloid biosynthesis in this fungus . J. applied and environmental microbiology, vol. 68, No. 4, 2002 , p. 1524-1533 .

Huang , S. ; Shih Y. ; Wu C. ; Yuan C. ; Yang Y. ; Li Y. and Wu T. , (2003) .Detection of serum uric acid using the optical polymeric enzyme biochip system . Journal of biosensors and bioelectronics 19 . p. 1627 – 1633.

Huang, S. and Wu ,T. , (2004) . Modified colorimetric assay for uricase activity and a screen for mutant *Bacillus subtilis*

uricase gene following step mutagenesis . Eur. J. Biochem. 271 , p. 517-523 .

- I -

Iglewski, BH (1996). *Pseudomonas.* In: *Baron's Medical Microbiology (Baron S* et al*., eds.)* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1 .

Imhoff , R. D. ; Power , N. P. ; Borrok , M. J. ; and Tipton, P. A. , (2003) . General base catalysis in the urate oxidase reaction: evidence for a novel Thr –Lys catalysis diad . Biochemistry, 2003 , 42 , p. 4094 – 4100 .

- J -

Junnosuke , k. ; Setsuko , S. and Masahiro , K. , (1966) . Studies on bacterial uricase : (II) extraction of uricase from bacterial cells and some properties of crude enzyme [in Japanese] . J. for bioscience and bioengineering , japan.

- K -

Kai, L. ; Xiao-Hang, M. ; Zhou, X. ; Jia , X. ; Li, X. and Guo, K. , (2007) . Purification and characterization of a thermostable uricase from *Microbacterium* sp. strain ZZJ4-1 , J. microbiology and biotechnology, vol. 24, No. 3, p. 401-406 .

Kelly, S. J. ; Delnomdedieu, M. ; Oliverio, M. I. ; Williams, L.D. ; Saifer, M. G. P. ; Sherman, M. R. ; Coffman, T. M. , Johnson, G. A. and Hershfield, M. S. , (2001) . Diabetes insipidus in uricase – deficient mice : A model for evaluating therapy with poly (Ethylene Glycol) – modified uricase . J. of the Am. Soc. of nephrology 12: p. 1001- 1009 .

Khucharoenphaisan, K. and Sinma K. , (2011) Production and partial characterization of uric acid degradation enzyme from new source *Saccharopolyspora* sp. PNR11. J. Biological Sciences , 14(3): p. 226-231.

Kinsella, J. E. ; German, B. and Shetty J. , (2002) . Uricase from fish liver : Isolation and some properties . J. Biochemistry and Molecular Biology, vol. 82, No. 4, p. 621-624 .

Klose S. ; Stoltz M. ;Munz E. and Portenhauser R. , (1978) . Determination of uric acid on continuous – flow (auto analyzer II and SMA) systems with a uricase /phenol/4- aminophenazone color test . J. clinical chemistry , vol. 24, p. 250-255.

- L -

Lee C.C. ; X. Wu ; R.A. Giggs ; R.G. Cook ; D.M. Muzny and T. Caskey , (1988) . Generation of c DNA probes direction by amino acid sequence : cloning of urate oxidase . J. science 293 : p. 1288 – 1291 .

Lee , Y. ; Park , B. C. ; Lee , D. H. ; Bae , K. H. ; Cho , S. ; Lee , C. H. ; Lee , J. S. ; Myung , P. K. and Park , S. G. , (2006) . Mouse tranthyretin – related protein is a hydrolase which degrades 5- hydroxyisourate , the end product o the uricase reaction . J. of Mol. Cells, vol . 22, No. 2, p. 141-145 .

Liu J. ; Li G. ; Lio H. and Zhou X. , (1993) . Purification and properties of uricase from *Candida* sp. and its application in uric acid analysis in serum. J. of biochemistry and biotechnology, p. 57- 63 .

Liu, **J. G.** and G.X. Li ,(1989) . Culture conditions for uricase formation of *Candida utilis* . PMID : [pubmed] 1989. Vol.29, (1): p. 45-50 .

- M -

Mabrouk , A. M. ; Hamed E.R. ; M.M.Farag and Ahmed N.E. , (2010) . Purification and characterization of uricase enzyme produced by *Gliomastix gueg .* Gate 2 biotech , (2010), 2 (11) : p. 1-13 .

Mahmoud, D. A. R. and Helmy, W. A. , (2009) . Potential application of immobilization technology in enzyme and biomass production (review articles) . J. of Applied Sciences Research , 5(12):p. 2466-2476 .

Mckee, T. and Mckee, J. R. (1996) . Biochemistry . Wm . C. Brown Publishers .

Montalbini , P. ; Redondo , J. ; Caballero , J. L. ; Cárdenas J. and Pineda , M. , (1997) . Uricase from leaves : its purification and characterization from three different higher plants . J. of planta 202 , p.277-283 .

Moolenburgh, J. D. ; Reinders, M. K. and Jansen, T. L. Th. A. , (2006) . Rasburicasr treatment in severe tophaceous gout ; a novel therapeutic option . Clin Rheum 2006 ; 25: P. 749 –7 52.

Moriwaki ,Y. ; Yamamoto, T. and Higashino, K. , (1999) . Enzyme involved in purine metabolism – a review of histochemical localization functional implications .pubmed, vol.14 , No.(4): P.1321-1340 .

Mtui, G. Y. S. , (2007) .Trends in industrial and environmental biotechnology research in Tanzania . J. of biotechnology vol. 6(25), p.2860-2867 .

- N -

Nahm B. H. and Marzluf G. A. (1987) . Induction and de nova synthesis of uricase , a nitrogen – regulated enzyme in *Neurospora crassa .* J. Bacteriology (1987) , vol. 169 , No. 5 , P. 1943- 1948 .

Neogi , T. (2011) . Gout . J. of medicine ,No. 364 , p. 443-452

Nishiya, Y. ; Hibi,T. and Oda, J. , (2002) . A purification method of the diagnostic enzyme *Bacillus* uricase using magnetic beads and non-specific protease . protein expression and purification 25(25) :p. 426- 429 .

Nygaard, P. ; Bested, S. M. ; Andersen, K. A. and Saxild, H. H. , (2000) . *Bacillus subtilis* guanine deaminase is encoded by the *yknA* gene and is induced during growth with purines as the nitrogen source J. of microbiology (2000) , 146 , p. 3061-3069 .

- O -

Oda M. ; Satta Y. ; Takenaka O. and Takahata N. , (2002) . Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications .J. Mol. Biol. Evol. 19(5) : 640-653 .

Ohe , T. and Watanabe , Y. , (1981) . Purification and properties of urate oxidase from *Streptomyces cyanogenus .* biochem , 1981, vol. 89, No.6 p. 1769-1779 .

Ortiz-Herrera, M. ; Gerónimo-gallego, A. ; Cuevas-Schacht, F. ; Perez-Fernández, L. ; Coria-Jimenez, R. Caracterizacion. (2004) . RAPD-PCR Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from cystic fibrosis patients . salud /vol. 46, no. 2, pp.149-157 .

Owen, O. G. , (2006) . Puricase , first new drug treatment approach for gout in 40 years, could potentially revolutionise treatment for some .

- P -

Pay S. ,MD and Terkeltaub R. , MD, (2002) . The case for uricase in gout . Current Rheumatology Reports, vol. 5, No. 3, p. 213-214 .

Pfrimer, P. ; Moraes, L. M. P. ; Galdino, A. S. ; Salles, L. P. ; Reis, V. C. B. ; Marco, J. L. D. ; Prates, M. V. ; Bloch, C. ; and **Torres, F. A. G**. , (2010) . Cloning , purification , and partial characterization of *Bacillus subtilis* urate oxidase expressed in *Escheichia coli .* J. of biomedicine and biotechnology . vol. 2010 (2010) , 6 pages .

Pool, R. A. ; Kielar, F. ; Richardson ,S. L. ; Stenson, P. A. and Parker, D. , (2006) . A ratiometric and non – enzyme luminescence assay for uric acid : differential quenching of lanthanide excited states by anti – oxidants . J. chem. Commun. , p. 4084-4086 .

Potrikus, C. J. and Breznak, J. A. (1980) . Anaerobic degradation of uric acid by gut bacteria of termites . Applied and environmental microbiology , 1980 , p. 125-132 .

- R -

Rajoka, M. I. ; Rehman, K. ; Tabish, T. and Zia, M. A. , (2006) **.** Purification and characterization of caprine kidney uricase , possessing noval kinetic and thermodynamic properties . J. of microbiology & biotechnology (2006) 22, P . 288-291 .

Reinders, M. K. Brouwers, J. R. B. J. and Jansen, T. L. Th. A. , (2006) **.** Rasburicase for refractory tophaceous gout – a case report and review of litrerature . Clin Rheum 2006 ; 25 : 749-52 .

Rouf, M. A.; F. Robert and J .R . Lomprey , (1968) . Degradation of uric acid by certain aerobic bacteria . J. bacteriology , p. 617-622 .

- S -

Saeed H.M. ; yousry Y.A. ; Gohar M. ; and Elbaz M. A. , (2004) . Purification and characterization of extracellular *pseudomonas aeruginosa* urate oxidase enzyme . journal of microbiology , vol. 53 , No 1, 45-52 .

Salleh, A. B. (1980) . Development of Bioaffinity chromatography for uricase purification . pertanika 3(2), p. 97-102 (1980) .

Sarkar, P. (2010) . Biosensor for uric acid estimation .

Schiavon, O. ; Caliceti P. ; Ferruti P. ; and Veronese F.M. , (2000) . Therapeutic proteins : a comparison of chemical and biological properties of uricase conjugated to linear or branched poly (ethylene glycol) and poly (N-acryloylmorpholine) .

Schumacher, H. R. and L. X. Chen , (2006) . Newer therapeutic approaches : gout , Rheumatic disease clinics of North America , vol. 32, No. 1, p. 235 - 244.

Song, Z. ; Johansen, H. K. ; Faber, V. ; Moser, C. ; Kharazmi, A. ; Rygaard, J. and Høiby, N. (1997) . Ginseng treatment reduceds bacterial load and lung pathology in chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rats .Antimicrobial agents and chemotherapy , 1997, p. 961-964 .

- T -

Takada, Y. and Tsukiji, N. , (1987) . Peroxisomal localization and activation by bivalent metal ions of ureidoglycolate lyase , the enzyme involvement in urate degradation in *Candida tropicalis* J. of bacteriology , May 1987, p. 2284 – 2286 .

Tanaka, A. ; Yamamura, M. ; Kawamoto, S.and Fukui, S. , (1977) . Production of uricase by *Candida tropicalis* using n-alkane as a substrate . J. applied and environmental microbiology , vol. 34, No. 4 , pp. 342-346 .

Terkeltaub, R. ; Bushinsky ,D. A. and Becker ,M. A. , (2006) . Recent development in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics .J. arthritis research & therapy 2006 , (suppl) : 10.1186/ar 1909 .

Terkeltaub , R. , (2007). Learning how and when to employ uricase as bridge therapy in refractory gout. J. of Rheumatology, 2007 , vol. 34, No. 10, p. 1955-1958

Todd , C.D. ; Tipton , P. A. ; Blevins , D. G. ; Piedras , P. ; Pineda , M. and Polacco , J. C. , (2005) . Update on ureide degradation in legumes . J.of experimental botany 2006 57 (1): p. 5-12.

- V -

Vogels , G. D. and Drift , C. V. D. , (1976) . Degradation of purines and pyrimidines by microorganism.ms . American society for microbiology, Vol. 40 , No. 2 , P. 403 – 468.

Vogt B. , (2004) . Urate oxidase (rasburicase) for treatment of severe tophaceous gout . J. of Nephrology dialysis transplantation , vol. 20, No. 2, p. 431-433 .

- W -

Wang, L. C. and Marzlf G. A. , (1979) . Purification and characterization of uricase , a nitrogen – regulation enzyme, from *Neurospora crassa .* Biochemistry and Biophysics , vol. 201, No. 1, p. 185-193 .

Whitaker, J. R. and Benhard , R. A. (1972) . Experiments for : An introduction to enzymology . The Whiber press . Davis .

Williams, H. D. ; Zlosnik, J. E. and Ryall, B. (2007). "Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*". *Adv. Microb. Physiol.* 52: 1–71.

Wisteriech, G. A. and Iechtman, M. D. (1980) . Laboratory exercises in microbiology . 4thed. , Glencoe publishing Co. USA .

Worlitzsch, D. ; Tarran, R. and Ulrich, M. et al. (2002).Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway airway *Pseudomonas infections* of cystic fibrosis patients". *J. Clin. Invest.* 109 (3): P. 317–25.

Wortmann , R.I. , (2005) . Recent advances in the management of gout and hyperuricemia . curr opin Rheumatol . 17 : P. 319-324 .

- X -

Xiangwei, Wu ; Lee, C.C. ; Muzny, D. M. and Caskey, C. T. , (1989) . Urate oxidase : primary structure and evolutionary implications . proc . Natl. acad. Sci . USA . Vol. 86, p. 9412-9416.

Xiangwei Wu ; Muny D.M. ; Lee C.C. and Caskey C.T. , (1992) . Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution . J. of Mol. Evol. (1992), 34:p. 78-84.

- Y -

Yazdi , M. T. ; Zarrini G. ; Mohit E. ; Faramarzi M. A. ; Setayesh N. ; Sedighi N. and Mohseni F.A. , (2005) . *Mucor hiemalis :* a new sourc*e* for uricase production . J. of microbiology and biotechnology . p. 325-330 .

Yunsheng, Z. ; Lina, Z. ; Gengqing, Y. ; Jia, T. ; Youquan, B. and Fei, L. , (2007) . Characterization of a uricase from *Bacillus fastidious* A.T.C.C. 26904 and its application to serum uric acid assay by patented kinetic uricase method . J.of biotechnology and applied biochemistry . vol. 45 , p. 75-80.

- Z -

Zare, F. ; Magnusson ,M. ; BergstrÖm, T. ; Brisslert, M. ; Josefsson, E. ; Karlsson, A. and Tarkowski, A. , (2005). Uric acid , a nuclic acid degradation product , down –regulation dsRNA - triggered arthritis . J. Leukocyt Biology .

Zhou, X. ; Ma, X. ; Sun, G. ; Li, X. and Guo, K. , (2005) . Isolation of a thermostable uricase-producing bacterium and study on its enzyme production condition . J. Biochemistry, vol. 40, No.12, p. 3749-3753 .

Zilva , J. F. ; Pannall, P. R. and Mayne , P. D. , (1988) . Clinical chemistry in diagnosis and treatment .5 th, edition. 2nd printing (asian economy edition)1989. P. 379-387 .

SUMMARY :

Uricase enzyme [E. C. 1.7.3.3] from oxidoreductase enzymes , that catalyses the oxidation of uric acid , which act on open the pyrimidines ring of uric acid .

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 . uricase enzyme was purified from culture filtrate of *P. aeruginosa 7* by two steps of purification techniques :

First steps : ammonium sulfate 70 % saturation

The second step : include ion exchange chromatograpHy on DEAE – Cellulose . uricase was purified by 7.2 fold with yield 43.79 % .

SUMMARY

Uricase showed optimum pH $(8.5 - 9)$ and pH stability was in the range of $(8 - 9.5)$. the temperature optimum of uricase enzyme was 35 C^o . and the thermostable for uricase enzyme to observe that the enzyme was retain reserved by perfect activity at $(25 - 40)$ C^o and for 20 min.

The kinetic of uricase enzyme that representation by K_m and V_{max} was investigation and to be whole estimation by followed by three method , the rang value of K_m was reached to 0.0091 mg / ml . However the V_{max} was reached to 6.68 µM / ml . min. , by using the uric acid as a substrate .

The effective of some metal ion was studied and the result showed that the NiCl , $AgCl_2$ and HgCl inhibiters , and added to this using 1 mM from $FeCl_2$ was to lose 88.93 % from enzyme activity . Whereas NaCl enhance the enzyme activity that reached to 216.448 % if using 1 mM from it , $Mgcl_2$, $CaCl_2$ were consider enhancer to the enzyme activity if using at concentration 5 mM and the residue activity was reached to $(170.35$ and $129.62)$ % respectively .

The medical application for uricase enzyme that product from local isolate *P. aeruginosa 7* was studied to diagnosis the concentration of uric acid on the blood . Through using peroxidase enzyme that extract from horseradish , and the result showed the qualification of enzyme to detect the uric acid in the blood through comparative it with the stander result measuring by (RANDOX) Kit .

Biochemical Study of Uricase Enzyme Produced From *Pseudomonas aeruginosa Local Isolate*

A thesis Submitted to the college of Science

University of karbala'a

As a partial fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science \ Biology

By

Etab Abdul – Ameer Ibrahim Al-Mosawe

Supervision

Pr. Dr. Sahib Ali Mahdi Al – Atraqchi

1432 2011