إنتاج إنزيم الأسبارجيناز من بكتريا *Bacillus* spp واستخدامه في الحد من الأكريلاميد المتشكل فيالأغذية المقلية

الملخص

حُصل على 23 عزلة من بكتيريا *Bacillus* spp. من الهيئة العامة للتقانة الحيوية مصنفة إلى مستوى الجنس وهي معزولة من ترب محلية مختلفة. غُربلت العزلات لتقييم مقدرتها على إنتاج أنزيم الأسبارجيناز باستخدام وسط M9 بوجود مشعر الفينول . بينت النتائج أن 17 عزلة من 23 أفرزت أنزيم الأسبارجيناز ثم قُدرت كفاءة التحليل لكل عزلة بقياس قطر المستعمرة المتشكل (مم) وقطر الهالة (مم) حيث تراوحت كفاءة التحليل للعزلات البكتيرية بين 0.7–1.6 ملم، كما استخدمت أوساط سائلة لتقييم الفعالية الإنزيمية حيث قدرت الفعالية الإنزيمية بطريقة لونية باستخدام كاشف نسلر باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 450 نانومتر فتراوحت الفعالية الإنزيمية للعزلاتمابين 698.92 وحدة/مل للعزلة رقم (6) و1064.51 وحدة /مل للعزلة رقم (3). أُختيرت العزلة(3) وهي الأكفأ وتمّ تحديد نوعها بالاعتماد على تصنيف Bergey من حيث الصفات الشكلية والحيوية. وتبين أنها تنتمي للنوع (*Bacillus licheniformis*).

أجريت أمثلة ظروف إنتاج إنزيم الأسبارجيناز المُنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* باستخدام مادة الأسبارجين كركيزة وفق طريقة التخمير المغمور ، حيث تم تحديد تأثير خمسة متغيرات (درجة حرارة الحضن، ودرجة الحموضة ، وسرعة الدوران ، وتركيز مصدر الكربون ،وتركيز مصدر النيتروجين) في نمو العزلةالمستخدمة وإنتاج الإنزيم وذلك باستخدام برنامج التحليل الاحصائي Minitab والتصميم الإحصائي Response Surface Methodology(RSM) وقد أعطت العزلة المدروسة أعلى فعالية للإنزيم عند حرارة الحضن 30°م، pH 9، وسرعة دوران 150 دورة/دقيقة، بتركيز 1.5% لمصدر الكربون (الغلوكوز) ، وتركيز2.5% لمصدر النيتروجين (مستخلص الخميرة) حيث بلغت الفعالية عند هذه الظروف 1481.92 وحدة/مل.

أجريت عملية التنقية لإنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* بدءاً من الترسيب بالأسيتون بتركيز 80% ثم باستخدام عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 ثم عمود كروماتوغرافياالتبادل الأيوني DEAE-Sepharose. بينت نتائج التنقية ارتفاع الفعالية النوعية إذ بلغت 667.08 وحدة دولية/مل وبعدد مرات تنقية بلغت 283.86 وبحصيلة إنزيمية مقدارها 3.83%، وباستخدام الرحلان الكهربائي هلامةSDS-PAGE أمكن حساب الوزن الجزيئي للإنزيم المدروس والذي بلغ 34.4 كيلو دالتون.

درس تأثير كل من درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وتركيز الركيزة (asparagine) وتركيز بعض الشوارد المعدنية(Zn^{+2}،Fe^{+3}،Co^{+2}،Ca^{+2}،Ag^{+}،Mn^{+2}،Mg^{+2}،Hg^{+2}،Na^{+} ،Cu^{+}) في فعالية إنزيم الأسبارجيناز النقي المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* المعزولة من تربة محلية. وجد أن الفعالية العظمى للإنزيم كانت عند درجة الحرارة 60°م والرقم الهيدروجيني 9 وتركيز1 مول/ميلي من الركيزة (الأسبارجين) وقد بقي الأنزيم مستقراً ضمنمجال درجة الحرارة 30–60 °م والرقم الهيدروجيني 8–9 لمدة 60 دقيقة. كما تبين أن الشوارد المعدنية (Mg^{+2}،Zn^{+2}،Mn^{+2}،Ag^{+}،Na^{+}،Fe^{+3}) بتركيز 1 ميلي مول /مل أدت إلى زيادة نشاط إنزيم الأسبارجيناز، بينما الشوارد المعدنية (Co^{+2}, Hg^{+2},Ca^{+2},Cu^{+2})بتركيز 1 ميلي مول/مل أدت إلى خفض نشاط إنزيم الأسبارجيناز.أعطى تركيز 1 ميلي مول/مل من مركب $MgCl_2$ أعلى نشاط إنزيمي، بينما مركب EDTA بتركيز 0.8 ميلي مول/ملأدت إلى خفض نشاط الإنزيم.

تمَّ اختبار كفاءة الأسبارجيناز المنقى والمنتج من بكتيريا *Bacillus licheniformis* في تخفيض كمية الأكريلاميد الناتج عن تفاعل ميلارد نتيجة عملية القلي لمجموعة من الأغذية تضمَّنت البطاطا المقلية، والشيبس، والدونات. حيث عوملت هذه الأغذية بالإنزيم قبل عملية القلي بكمية 30 وحدة دولية /ملغ لمدة 15 دقيقة، و 500 وحدة دولية /كغ (عجينة) لمدة 12 دقيقة لكل من البطاطا المقلية والدونات على التوالي، كما نُقعت شرائح البطاطا في محلول الأسبارجيناز (10000 وحدة دولية /لتر) لمدة 20 دقيقة قبل إعداد الشيبس. وقيست كمية الأكريلاميد المتشكلة بعد عملية القلي في العينات المعاملة بالأسبارجيناز وقورنت بالكمية المتشكلة في عينات الشاهد غير المعاملة بالأنزيم. وقد أظهرت النتائج انخفاض كمية الأكريلاميد المتشكل في العينات المعاملة بالأسبارجيناز بنسب 50.17% و46.76% و 40.63% في كل من البطاطا المقلية والشيبس والدونات على التوالي بالمقارنة مع عينات الشاهد غير المعاملة.

الكلمات المفتاحية: تشخيص، Bacillus licheniformisأسبارجين، أسبارجيناز، فعالية أنزيمية، ظروف مثلى، تخمير مغمور، تنقية، وزن جزيئي، ثباتية أنزيمية، أكريلاميد، تفاعل ميلارد.

Asparaginase production by *Bacillus* spp and its application in reducing acrylamide formation in fried food

ABSTRACT

–three isolates of *Bacillus*spp were obtained from the National Commission for Biotechnology (NCBT), they were classified to the genus level, they were isolated from different local soils .Isolates were grown on M9 solid medium supplied with phenol red indicator, they were screened for their production of asparaginase. The lytic efficiency for each isolate was estimated by measuring the diameter of the formed colony (mm) and the diameter of the formed zones (mm).The lytic efficiency of the bacterial isolates ranged between 0.7-1.6 mm. Liquid media were also used to determine asparaginase activity. Enzymatic activity was measured by colorimetric method using Nesslers reagent spectrophotometerically at a wave length of 450nm.The asparaginase activity of the bacterial isolates ranged between 698.92 unit /ml for isolate number 6 and 1064.51unit /ml for isolate number 3. The most efficient isolate number 3 was selected and its' species was classified according to Bergeys manual of classification in terms of morphological and biological characteristics. The isolate (3) was found to be *Bacillus licheniforms*.

The conditions for producing asparaginase enzyme from *Bacillus licheniformis*were optimized using Asparagine as substrate in submerged fermentation. The effects of five parameters (incubation temperature, pH, aeration,carbon source concentration ,and nitrogen source concentration) on selected isolate growth and enzyme production were determined. The statistical program Minitab and the statistical design Response Surface Methodology (RSM) were applied. The highest enzyme activity was obtained at an incubation temperature of 30ºC, pH value of 9, aeration 150 rpm per minute , carbon source concentration (glucose) of 1.5% and

nitrogen source concentration(yeast axtract) of 2.5%. Total enzyme activity was deduced through the amount of ammonia produced by extracellular asparagine degrading enzyme, where their concentration is proportional to total activity of asparaginase enzymes. Enzyme activity obtained under the above mentioned conditions was 1481.92 U/ml.

Purification steps of enzyme started by precipitation with 80% acetone, then separation by column chromatography using Sephadex G-100 and Sephacryl DEAE-sepharose. The separated enzymatic protein had a specific activity of 667.08 U/ml, protein purification was 283.86 fold with a yield of 3.83%, it's molecular weight was 34.4 kDa determined using SDS PAGE.

The effects of temperature, pH, substrate concentration (asparagine), and some metallic ions (Cu^{+2}, Na^{+}, Hg^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Ag^{+}, Ca^{+2}, Co^{+2}, Fe^{+3}, Zn^{+2})on purified asparaginase were determined. The enzyme was produced by submerged fermentation of *Bacillus licheniformis* isolated from local soils. Maximum enzyme activity was found at pH 9, temperature 60°C and 1 mole/ml of asparagine as a substrate. The enzyme remained stable at pH 8-9 and temperature at 30-60°C for 60 minutes. Asparaginase was activated by Mg^{+2} ion at a concentration of 1mM/ml while other ions such as (Co^{+2}, Hg^{+2},Ca^{+2},Cu^{+2}) reduced asparaginase activity at a concentration of 1mM/ml. The highest enzyme activity was observed with $MgCl_2$ at a concentration of 1mM/ml , while EDTA at a concentration of 0.8mM/ml reduced the activity of the enzyme .

The efficacy of purified asparaginase produced by *Bacillus licheniformis* in reducing the amount of acrylamide formed by Maillard reaction was tested in the frying of some food products including potatoes, chips, and donuts. Where Raw potatoes slices was immersed in an asparaginase solution at the concentrations of (10000U/L) for 15 minutes, and (30 U/mg of potatoes) for 20 minutes before frying chips and potatoes, respectively. Asparaginasewas added to the ingredients of the donut dough before frying at a ratio of (500 units /Kg dough) for 12 minutes. The amount of acrylamide formed after frying was measured in the enzymatically treated samples and compared with those in the control (untreated samples). The results showed a reduction in the amount of acrylamide formed in the treated samples by 50.17%, 46.76%, and 40.63% in fried potatoes, chips and donuts, respectively, compared to the untreated control samples.

Key wors: Identification- Bacillus licheniformis- asparagine –asparaginase -enzyme activity-

optimum conditions -submerged fermentation- purificationmolecular wight- enzyme stability- acrylamide- millard reaction