Journal of Agricultural, Environmental and Veterinary Sciences (JAEVS) • Vol 8, Issue 1 (2024) • P: 7 - 1
https://journals.ajsrp.com/index.php/jaevs
ISSN: 2522-3364 (Online) • ISSN: 2522-3364 (Print)

Production of asparaginase from *Bacillus licheniformis* using agro-industrial residues as carbon and nitrogen sources

Vivian Daifallah

General Authority for Biotechnology | Molecular Biology Laboratory | Damascus | Syria

Received:
19/11/2023

Revised:
30/11/2023

Accepted:
24/03/2024

Published:
30/03/2024

* Corresponding author:
vivian.daifallah@gmail.com

Citation: Daifallah, V. (2024). Production of asparaginase from Bacillus licheniformis using agro-industrial residues as carbon and nitrogen sources. *Journal of agricultural, environmental and veterinary sciences, 8*(1), 1 – 7 .
https://doi.org/10.26389/AJSRP.V191123

2024 © AISRP • Arab Institute of Sciences & Research Publishing (AISRP), Palestine, all rights reserved.

• **Open Access**

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license

Abstract: The feasibility of using a number of agro-industrial residues as substrates was studied for the production of the asparaginase from *Bacillus licheniformis* isolated from the local soil. Glucose-rich residues were used as carbon sources (grape peels, apple peels, carrot peels, potato peels, corn waste, sugarcane bagasse, banana peels), and were added to the fermentation medium at different concentrations (1, 1.5, 2, 2.5, 3%). Nitrogen-rich residues (soybean meal, bean peels, chickpea cooking water, and whey) were also used with the concentrations of 1, 2, 3, 4, and 5%. The enzyme was produced by submerged cultures, and the enzymatic activity of the produced enzyme was estimated to determine the optimal composition of the fermentation medium. The results showed the superiority of grape peels (3%) as a carbon source, and soybean meal (5%) as a nitrogen source compared to other residues. The activity of the enzyme produced by the aforementioned medium reached 2595.30 μmol/mL, and the specific activity reached 1089.1 units/mg.

Keywords: Asparaginase, Ammonia Determination, Agro-industrial Residues, Sugarcane bagasse, Banana peels , *Bacillus licheniformis*.

إنتاج الأسبارجيناز من بكتيريا *Bacillus licheniformis* باستخدام المخلفات الزراعية-الصناعية كمصدر للكربون والنتروجين

فيفيان ضيف الله

الهيئة العامة للتقانة الحيوية | مخبر البيولوجية الجزيئية | دمشق | سوريا

المستخلص: درست جدوى استخدام عدد من المخلفات الزراعية- الصناعية كركائز لإنتاج إنزيم الأسبارجيناز من بكتيريا *Bacillus licheniformis* المعزولة من التربة المحلية، حيث استخدمت المخلفات الغنية بالغلوكوز كمصدر للكربون (قشور العنب، قشور التفاح، قشور الجزر، قشور البطاطا، مخلفات الذرة، مخلفات عصر قصب السكر، قشور الموز)، وأضيفت إلى وسط التخمير بتراكيز مختلفة (1، 1.5، 2، 2.5، 3%). كما استخدمت المخلفات الغنية بالنيتروجين (كسبة فول الصويا، قشور الفول، ماء الحمص المسلوق، الشرش) وفق التراكيز 1، 2، 3، 4، 5%. استخدمت طريقة المزارع المغمورة لإنتاج الأنزيم، وقُدِّرت الفعالية الأنزيمية للأنزيم المُنتَج لتحديد التركيب الأمثل لوسط التخمير. وقد أظهرت النتائج تفوق قشور العنب (بنسبة إضافة 3%) كمصدر للكربون، وكسبة فول الصويا (بنسبة إضافة 5%) كمصدر للنيتروجين بالمقارنة مع المخلفات النباتية الأخرى. وقد بلغت فعالية الأنزيم المنتج بالتخمير باستخدام الوسط وفق التركيب آنف الذكر 2595.30 ميكرومول/مل كما بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 1089.1 وحدة/مغ.

الكلمات المفتاحية: أسبارجيناز، تقدير الأمونيا، مخلفات زراعية-صناعية، مخلفات عصر قصب السكر، قشور الموز ، *Bacillus licheniformis*.

المقدمة:

يعدّ أنزيم الأسبارجيناز أحد أهم الأنزيمات الصناعية ذات التطبيقات الواسعة في المجالات الصيدلانية والغذائية. وقد بلغت قيمة المبيعات السنوية لهذا الأنزيم 380 مليون دولار عام 2017، ويتوقع أن تصل هذه القيمة إلى 420 مليون دولار عام 2025[1] . ويتبع الأسبارجيناز(EC 3.5.1.1) إلى المجموعة الأنزيمية الثالثة المحلمهة للروابط الكيميائية [13]، ويختص بحلمهة الحمض الأميني L- asparagine إلى حمض الأسبارتيك، والأمونيا [12]. وينتج أنزيم الأسبارجيناز من قبل أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة كالجراثيم والخمائر والفطريات [2].

يُعدّ الأسبارجيناز عاملاً مساعداً في الصناعات الغذائية، إذ يعمل على تخفيض كمية الأكريلاميد المتشكلة في الأغذية النشوية المعاملة حرارياً نتيجةً لتفاعل ميلارد كالبطاطا، والفلافل، والخبز، حيث يتفاعل الحمض الأميني الأسبارجين مع السكريات المرجعة الموجودة في هذه الأغذية، ما يؤدِّي إلى تشكُّل الأكريلاميد وظهور اللون البني، كما يعمل الأسبارجيناز على تحسين لون المنتج وطعمه وقوامه[3]. ويستخدم هذا الأنزيم بنجاح في الصناعات الدوائية كعلاج للعديد من أنواع السرطان[17]. وبالرّغم من التطبيقات المتعددة للأسبارجيناز، يحد ارتفاع تكاليف الإنتاج من استخدام هذا الأنزيم بشكل واسع على المستوى الغذائي والصناعي. ويُشكِّل استخدام المخلفات الزراعية- الصناعية كركائز خياراً واعداً للإنتاج الحيوي التجاري للأنزيم، نظراً للمحتوى المرتفع من المُغذِّيات والتكلفة المنخفضة. وتشكِّل مركبات الكربون كالنشاء، والسيللوز، والليجنوسيللوز، والبكتين، المكونات الأساسية للبنية الجزيئية للمخلفات النباتية[9]، كما يمتاز العديد المخلفات الزراعية بالمحتوى العالي من النيتروجين مثل كسبة الصويا وقشور الفول ومخلفات تنظيف اللحوم وماء سلق الحمص والشرش [6]. ويمثل الكربون مصدراً هاماً للطاقة، وعنصراً رئيسياً في عمليات البناء الحيوي، وإنتاج المستقلبات الأولية والثانوية [15]، ويعد وجود النتروجين ضرورياً للنمو واستقلاب بعض المركبات، وتُحدِّد كمية النتروجين في أي وسط مقدار الكتلة الحيوية التي يمكن الوصول إليها عند توفر المقدار الكافي من الكربون والمغذيات الأخرى[11]. وقد أشارت العديد من الدراسات إلى تأثير الكربون والنيتروجين في زيادة إنتاجية الأسبارجيناز. فقد وجد[8] أن استخدام مستخلص الخميرة بتركيز (1.5%) أدى إلى زيادة الإنتاجية للإنزيم المنتج من بكتيريا *Bacillus firmus*. وأكد [3] و [7] أن مصدر الكربون المثالي لإنتاج الأسبارجيناز من بكتريا *Bacillus subtilis* هو سكر الجلوكوز (2%). نظراً للأهمية التطبيقية الغذائية والدوائية لإنزيم الأسبارجيناز ولعدم توفر الإنزيم تجارياً في الأسواق المحلية، اتجهت الدراسة نحو إنتاج هذا الإنزيم من المخلفات الغذائية وتطبيقه في الصناعات الغذائية والدوائية .

أجري هذا البحث لدراسة جدوى استخدام المخلفات الغنية بالغلوكوز كمصدر للكربون (قشور العنب، قشور التفاح، قشور الجزر، قشور البطاطا، مخلفات الذرة، مخلفات عصر قصب السكر، قشور الموز)، والمخلفات الغنية بالنيتروجين (كسبة فول الصويا، قشور الفول، ماء الحمص المسلوق، الشرش) كركائز لإنتاج إنزيم الأسبارجيناز من بكتيريا *Bacillus licheniformis*. هذا ولم نجد في أدبيات البحث العلمي أي دراسة حول استخدام المخلفات النباتية المذكورة في الدراسة الحالية لإنتاج إنزيم الأسبارجيناز من بكتيريا *Bacillus licheniformis*، لذلك تم التوجه إلى إنتاج هذا الإنزيم من المخلفات المذكورة في البحث.

مواد وطرائق البحث

1- مكان وزمان تنفيذ البحث:

نُفِّذ البحث في مخبر البيولوجيا الجزيئية، التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية- دمشق، عام 2023.

2- تحضير المخلفات الزراعية النباتية:

جففت المخلفات النباتية هوائياً ثم بفرن التجفيف عند درجة حرارة 105°م حتى ثبات الوزن ثم طحنت جيداً بمطحنة كهربائية وحفظت لحين الاستخدام.

3- عزلة بكتيريا Bacillus licheniformis :

شخصت هذه العزلة في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وانتخبت من بين مجموعة من العزلات بناءً على قدرتها على إنتاج الأسبارجيناز[5] نشطت العزلة بطريقة التخطيط على وسط الآغار المغذي (Nutrient agar) وحضنت عند درجة حرارة 30°م لمدة 48 ساعة ، ثم نقلت مستعمرة من المستعمرات المتشكلة إلى 10مل من وسط المرق المغذي (Nutrient broth) وحضنت عند حرارة 30°م لمدة 48 ساعة قبل استخدامها لتلقيح وسط التخمير.

4- **إنتاج إنزيم الأسبارجيناز:**

استخدمت طريقة المزارع المغمورة (Submerged culture) لإنتاج أنزيم الأسبارجيناز، بناءً على نتائج دراسة سابقة [4]. إذ استخدم وسط تخمير قياسي لإنتاج الأنزيم والمقارنة بالأوساط الحاوية على المخلفات النباتية، وقد حُضِّر وفق التركيب الآتي (g / لتر ماء مقطر):

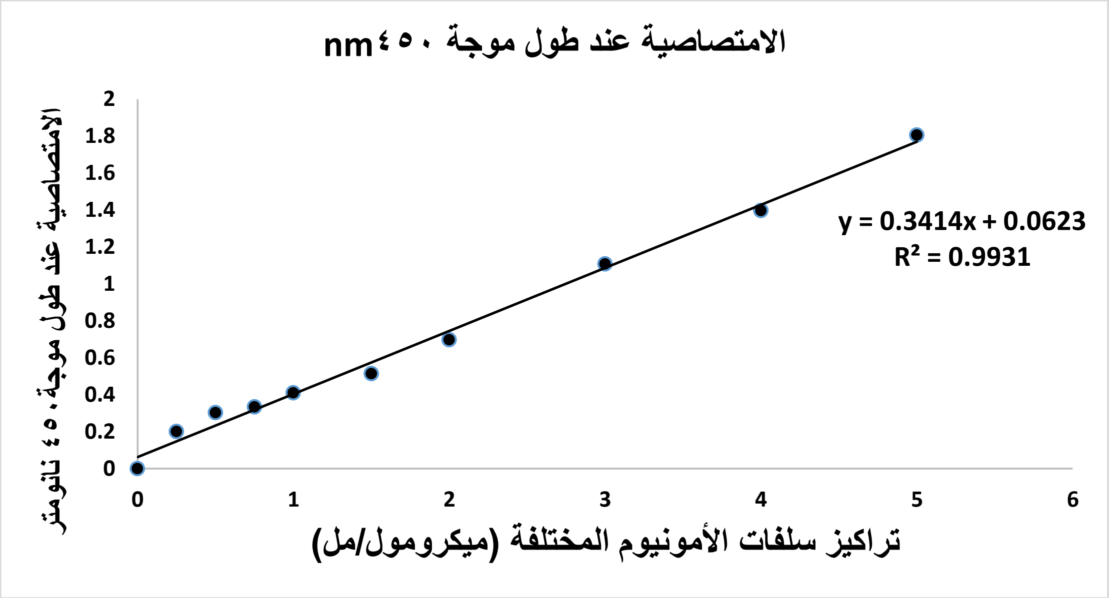
30 g Glucose.; 6 g $Na_2HPO_4.2H_2O$.; 3 g K_2HPO_4.; 5 g L-asparagine.; 0.5 g NaCl.; 0.5 g $MgSO_4.7H_2O$.; 0.015 g $CaCl_2.2H_2O$.; 50 g yeast extract

عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7، ثم عقم الوسط بالصاد الموصد. وعقم محلول الجلوكوز باستخدام مرشح ميكروبيولوجي بقطر ثقوب 0.22 µm، وأضيف إلى الوسط ليبلغ التركيز النهائي 30 g/L في وسط التخمر. وقد استبدل الغلوكوز بالمخلفات النباتية الغنية بالكربون حيث أضيفت إلى وسط التخمير بالنسب 1، 1.5، 2، 2.5، 3%. كما استبدل مستخلص الخميرة بالمخلفات الغنية بالنتروجين وأضيفت إلى وسط التخمير بالنسب 1، 2، 3، 4، 5%.

أجريت عملية التخمير عند درجة حرارة 30° م لمدة 48 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة تهوية 150 دورة/ دقيقة، وقدرت الفعالية الأنزيمية للأنزيم المنتج في وسط التخمير.

5- **تقدير الفعالية الأنزيمية لأنزيم الأسبارجيناز:**

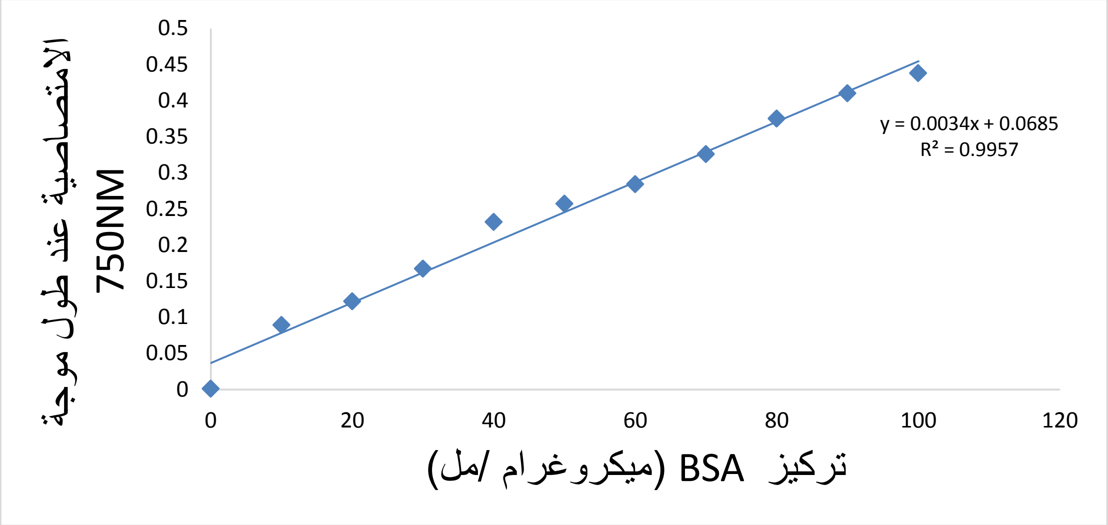
اتبعت الطريقة المذكورة من قبل [14]. إذ أضيف 0.5 مل من مستخلص الأنزيم الخام إلى محلول التفاعل المتكون من 0.5 مل من المحلول الموقي (Tris –HCl (pH 8.6; 0.05 M، و0.5 مل من محلول المادة الأساس الأسبارجين (0.04 M)، وحضن مزيج التفاعل في حمام مائي عند درجة حرارة 30°م لمدة 30 دقيقة، ثُمَّ أوقف التفاعل بإضافة 0.5 مل من محلول ثلاثي كلور حمض الخل TCA (0.1 N) ، ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 9000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق.أخذ 0.1 مل من الرائق وأضيف له 3.7 مل من الماء المقطر. تم الكشف عن الأمونيا الناتجة بفعل الأنزيم بإضافة 0.2 مل من محلول نسلر إلى محلول التفاعل ومزج الخليط جيداً باستعمال مازجة الأنابيب (Vortex) وحفظ المزيج عند درجة حرارة 20°م لمدة 20 دقيقة ثم قيست الامتصاصية عند طول موجة 450 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) مقابل محلول الشاهد (Blank) الحاوي على جميع المواد عدا محلول الأنزيم. وعُبِّر عن الفعالية الأنزيمية بوحدة أنزيمية (Unit) وهي كمية الأنزيم التي تحرر ميكرومولاً واحداً من الأمونيا في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة. وقُدِّرت الأمونيا المتحررة باعتماد سلفات الأمونيوم كمنحني قياسي [12]، إذ حضرت تراكيز متدرجة من سلفات الأمونيوم (0– 5 ميلي مول)، ورُسِم المنحنى القياسي لقيم الامتصاصية مقابل كل تركيز عند طول موجة 450 nm (الشكل 1).



الشكل 1: المنحني القياسي لسلفات الأمونيوم.

6- **تقدير المحتوى البروتيني:**

قُدِّر المحتوى البروتيني في المستخلص الأنزيمي الناتج باستخدام طريقة [10]، وباعتماد ألبومين المصل البقري كمنحني قياسي عند طول موجة 750 nm.



الشكل 2: المنحني القياسي للألبومين.

7- التصميم والتحليل الإحصائي:

نُفِّذَت التجارب بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة وعُبِّرَ عنها بمتوسطات (±الانحراف المعياري)، وتمَّ تحليل النتائج اعتماداً على تحليل التباين (ANOVA)، واختبار أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 0.01 باستخدام برنامج IBM SPSS Statistics 21.

النتائج والمناقشة

1- غربلة المصادر الكربونية:

يبين الجدول (1) المحتوى الأنزيمي والفعالية الإنزيمية للأسبارجيناز المنتج في الأوساط الحاوية على المخلفات النباتية الغنية بالغلوكوز. إذ لم تظهر فروق معنوية في المحتوى البروتيني للمستخلص الأنزيمي الناتج لجميع التراكيب. بينما ظهرت الفروق المعنوية واضحة بين قيم الفعالية الأنزيمية للمستخلص الأنزيمي المنتج في الأوساط ذات التراكيب المختلفة. وقد تفوقت إضافة قشور العنب بتركيز 3% معنوياً بالمقارنة مع باقي المخلفات النباتية الأخرى، وقد تلتها إضافة مخلفات قصب السكر، ثُمَّ قشور التفاح، وقشور الموز، وقشور الجزر، ومخلفات الذرة، وقشور البطاطا، على التوالي. حيث بلغت الفعالية الإنزيمية في الوسط الحاوي على قشور العنب أعلى قيمة لها وهي 2890.51 ميكرومول/مل في حين أعطى الوسط الحاوي على قشور البطاطا أقل فعالية إنزيمية، إذ بلغت 187.68 ميكرومول/مل. وبناءً على هذه النتائج فقد استخدمت قشور العنب بتركيز 3% في وسط التخمير كمصدر للكربون في المرحلة اللاحقة من الدراسة.

الجدول 1: الفعالية الإنزيمية لإنزيم الأسبارجيناز المنتج باستخدام المخلفات النباتية الغنية بالغلوكوز.

المصدر الكربوني	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	الفعالية الأنزيمية (U/mL)	الفعالية النَّوعيّة (U/mg)
جلوكوز 3% (شاهد)	$2.35±0.01_a$	$3269.79±6.91_a$	$1391.05±7.03_a$
عنب			
%1	$2.36±0.01_a$	$2218.96±11.05_b$	$940.00±6.23_{bk}$
%1.5	$2.35±0.01_a$	$2356.79±15.20_{ck}$	$999.63±4.25_c$
%2	$2.36±0.02_a$	$2478.98±19.35_d$	$1046.62±3.21_d$
%2.5	$2.37±0.01_a$	$2759.53±17.97_e$	$1162.97±3.14_e$
%3	$2.38±0.003_a$	$2890.51±4.14_f$	$1211.69±2.84_f$
موز			
%1	$2.37±0.01_a$	$1775.17±5.52_{gt}$	$748.20±5.23_g$
%1.5	$2.38±0.01_a$	$1997.06±1.38_h$	$835.60±3.24_h$
%2	$2.38±0.0008_a$	$2059.62±9.67_{hi}$	$862.21±4.25_{il}$
%2.5	$2.39±0.06_a$	$2191.59±47.00_{bj}$	$915.35±2.49_{jn}$

المصدر الكربوني	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	الفعالية الأنزيمية (U/mL)	الفعالية النَّوعيّة (U/mg)
%3	$2.41\pm0.01_{a}$	$2298.14\pm1.38_{cm}$	$950.68\pm3.72_{b}$
تفاح			
%1	$2.38\pm0.01_{a}$	$1627.56\pm20.73_{n}$	$682.40\pm6.27_{o}$
%1.5	$2.38\pm0.02_{a}$	$2031.28\pm2.76_{h}$	$852.15\pm7.28_{hi}$
%2	$2.37\pm0.01_{a}$	$2100.68\pm4.14_{i}$	$884.68\pm5.62_{lm}$
%2.5	$2.39\pm0.03_{a}$	$2232.64\pm24.88_{bm}$	$932.82\pm3.48_{kbj}$
%3	$2.38\pm0.02_{a}$	$2390.02\pm1.38_{k}$	$1002.77\pm7.43_{c}$
قصب السكر			
%1	$2.37\pm0.02_{a}$	$1816.22\pm2.76_{g}$	$763.66\pm6.71_{g}$
%1.5	$2.37\pm0.04_{a}$	$2125.12\pm47.00_{ijp}$	$894.08\pm8.61_{mn}$
%2	$2.37\pm0.03_{a}$	$2188.66\pm4.14_{bp}$	$922.11\pm9.10_{kj}$
%2.5	$2.38\pm0.01_{a}$	$2344.08\pm8.29_{ck}$	$982.23\pm7.30_{c}$
%3	$2.37\pm0.00_{a}$	$2483.87\pm6.91_{d}$	$1046.71\pm3.12_{d}$
جزر			
%1	$2.36\pm0.04_{a}$	$1053.76\pm24.88_{q}$	$445.29\pm4.74_{p}$
%1.5	$2.41\pm0.03_{a}$	$1355.81\pm26.26_{r}$	$560.79\pm5.67_{q}$
%2	$2.37\pm0.02_{a}$	$1455.52\pm9.67_{s}$	$612.21\pm7.11_{r}$
%2.5	$2.42\pm0.004_{a}$	$1599.21\pm16.58_{n}$	660.34±6.05o
%3	$2.41\pm0.03_{a}$	$1708.69\pm5.52_{t}$	$706.92\pm7.46_{s}$
ذرة			
%1	$2.45\pm0.02_{a}$	$639.29\pm8.29_{u}$	$259.97\pm5.05_{t}$
%1.5	$2.36\pm0.02_{a}$	$757.57\pm6.91_{v}$	$320.28\pm5.21_{u}$
%2	$2.43\pm0.04_{a}$	$879.76\pm8.29_{w}$	$361.27\pm7.11_{v}$
%2.5	$2.41\pm0.01_{a}$	$1114.36\pm5.52_{q}$	$462.07\pm3.08_{p}$
%3	$2.43\pm0.03_{a}$	$1223.85\pm11.05_{x}$	$502.65\pm9.03_{w}$
بطاطا			
%1	$2.57\pm0.10_{a}$	$187.68\pm13.82_{o}$	$72.84\pm3.33_{x}$
%1.5	$2.46\pm0.54_{a}$	$250.24\pm44.23_{o}$	$101.45\pm2.10_{y}$
%2	$2.48\pm0.09_{a}$	$379.27\pm5.52_{y}$	$152.35\pm6.12_{z}$
%2.5	$2.45\pm0.02_{a}$	$563.049\pm5.52_{l}$	$229.53\pm3.41_{\beta}$
%3	$2.53\pm0.07_{a}$	$655.91\pm15.20_{u}$	$259.04\pm11.09_{t}$

*الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تدل على عدم وجود اختلاف عند مستوى معنوية 1%.

2- اختبار المصادر النيتروجينة:

يبين الجدول (2) المحتوى والفعالية الإنزيمية للمستخلص الأنزيمي المنتج في الأوساط الحاوية على المخلفات النباتية الغنية بالنتروجين، حيث لم يظهر اختلاف معنوي في المحتوى الأنزيمي للمستخلص الأنزيمي المنتج وفق جميع التراكيب. واختلفت قيم الفعالية للأنزيم المنتج في الأوساط ذات التراكيب المختلفة. وقد تفوقت إضافة كسبة فول الصويا بتركيز 5% معنوياً بالمقارنة بباقي المخلفات النباتية الأخرى، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية في الوسط الحاوي على كسبة الصويا أعلى قيمة لها وهي 2595.30 ميكرومول/مل، بينما أعطى الوسط الحاوي على الشرش أقل فعالية إنزيمية، إذ بلغت 212.13 ميكرومول/مل. ويعود ذلك إلى الأثر السلبي لسكر اللاكتوز ، إذ ينخفض إنتاج الإنزيم بوجود سكر اللاكتوز [5] وقد تقاربت الفعالية الأنزيمية للأسبارجيناز المنتج في الوسط الحاوي على كسبة الصويا بتركيز 5% مع تلك الظاهرة في الوسط الحاوي على مستخلص الخميرة، رغم تفوّق الوسط الأخير. إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم

U/mg 1089.10 و1221.63 U/mg على التوالي. تصل نسبة الجلوكوز في قشور العنب إلى 8.67% من كمية الغلوكوز الموجود في الحبة ، كما تصل نسبة النيتروجين في كسبة الصويا إلى 7% ، كما تحتوي قشور العنب وكسبة الصويا على العديد من المغذيات إضافة إلى كونهما مصدرين للكربون والنتروجين، إذ تحتوي على الكالسيوم والحديد والمغنزيوم والفوسفور والصوديوم والبوتاسيوم والزنك والنحاس والمنغنيز، كما تحتوي على الفيتامينات B1,B2, B3, B5, B6, A, C, E, K [16].

الجدول 2 الفعالية الإنزيمية لإنزيم الأسبارجيناز المنتج باستخدام المخلفات النباتية الغنية بالنتروجين.

المصدر النتروجيني	المحتوى الأنزيمي (mg/mL)	الفعالية الأنزيمية (U/mL)	الفعالية النَّوعيّة (U/mg)
مستخلص الخميرة 5% (شاهد)	$2.36\pm0.01_{a}$	$2883.04\pm13.82_{a}$	$1221.63\pm4.11_{a}$
كسبة الصويا			
1%	$2.30\pm0.01_{a}$	$1700.87\pm5.52_{b}$	$729.59\pm3.73_{b}$
2%	$2.39\pm0.04_{a}$	$1828.93\pm29.03_{c}$	$763.07\pm4.12_{c}$
3%	$2.38\pm0.01_{a}$	$2152.49\pm2.76_{d}$	$903.72\pm3.10_{d}$
4%	$2.37\pm0.001_{a}$	$2377.32\pm11.05_{e}$	$1001.37\pm5.03_{e}$
5%	$2.38\pm0.01_{a}$	$2595.30\pm12.44_{f}$	$1089.1\pm1.18_{f}$
ماء سلق الحمص			
1%	$2.38\pm0.01_{a}$	$1467.25\pm6.91_{g}$	$615.2\pm5.20_{g}$
2%	$2.42\pm0.004_{a}$	$1714.56\pm5.52_{b}$	$706.41\pm3.14_{h}$
3%	$2.39\pm0.01_{a}$	$2030.30\pm6.91_{h}$	$847.74\pm4.23_{i}$
4%	$2.39\pm0.01_{a}$	$2217.98\pm12.44_{i}$	$925.58\pm2.92_{j}$
5%	$2.36\pm0.005_{a}$	$2352.88\pm4.14_{e}$	$995.97\pm3.19_{e}$
قشور الفول			
1%	$2.38\pm0.01_{a}$	$1301.07\pm6.90_{j}$	$546.5\pm1.10_{k}$
2%	$2.40\pm0.01_{a}$	$1445.74\pm9.67_{g}$	$602.05\pm2.17_{l}$
3%	$2.38\pm0.001_{a}$	$1696.96\pm5.52_{b}$	$711.93\pm2.03_{h}$
4%	$2.39\pm0.01_{a}$	$1856.30\pm4.14_{c}$	$774.71\pm3.52_{c}$
5%	$2.37\pm0.01_{a}$	$2073.31\pm4.14_{h}$	$873.03\pm2.14_{m}$
الشرش			
1%	$2.50\pm0.53_{a}$	$78.20\pm19.35_{k}$	$31.26\pm3.12_{n}$
2%	$2.53\pm0.12_{a}$	$98.72\pm6.91_{kl}$	$38.99\pm1.38_{n}$
3%	$2.70\pm0.03_{a}$	$143.69\pm9.67_{lm}$	$53.12\pm3.14_{o}$
4%	$2.76\pm0.13_{a}$	$187.68\pm16.58_{mn}$	$67.84\pm3.74_{p}$
5%	$2.64\pm0.03_{a}$	$212.13\pm6.91_{n}$	$80.24\pm1.94_{p}$

الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تدل على عدم وجود اختلاف عند مستوى معنوية 1%.

الاستنتاجات (خلاصة البحث) :

نجاعة استخدام المخلفات الزراعية-الصناعة كركائز لإنتاج إنزيم الأسبارجيناز من بكتيريا *Bacillus licheniformis* ، إذ أعطى الوسط الحاوي على قشور العنب كمصدر للكربون بنسبة 3%، وكسبة فول الصويا كمصدر للنيتروجين بنسبة 5% مستخلصاً أنزيمياً بفعالية 2595.30 ميكرومول/مل و1089.1 وحدة/مغ. وتقارب هذه المؤشرات تلك الظاهرة في الأنزيم المنتج في الوسط الصناعي، ما يظهر الجدوى الاقتصادية لهذه الدراسة.

المراجع:

- Alam, S., Pranaw K., Tiwari, R.. Recent development in the uses of asparaginase as food enzyme. In Parameswaran B (ed.) Green bio-processes, energy, environment, and sustainability. Springer, Singapore..(2019) (p 56).

- Amena,S.,Vishalakshi, N.,Prabhakar, M., Dayanand,A., and Lingappa,K.Production, purification and characterization of L-asparaginase from Streptomyces gulbargensis. **Brazilian Journal of Microbiol**,. (2010). 41(1),173-178.
- Cachumba, J.J., Antunes, F. A., Peres,G. F., Brumano, L.P., Santos, J.C., and Silva,S.S. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**,(2016). 47 (1), 77-85.
- Daifallah, V., Yazji, S., Al-Amir., L. Optimization of L-asparaginase production from Bacilluslicheniformis using response surface methodology.**King Faisal university.** (2020) .
- Daifallah, V., Yazji, S., Al-Amir., L. OptimizationDetection of Asparaginase production by local isolates of Bacillus spp.**Damascus university.**(2019)
- Dias, F.F.G., De Castro, R.J.S., Ohara, A., Nishide, T.G., Bagagli, M.P., Sato, H.H.Simplex centroid mixture design to improve l-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. **BiocatalAgriculture Biotechnology.**(2015)..
- Feng, Y.,Liu, S.,Jiao ,Y.,Gao, H.,Wang, M.,Du, G., and Chen, J.Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillussubtilis* 168 by B. subtilis WB600 through a combined strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**,(2017). 101(4), 1509-1520.
- Hymavathi, M., Sathish, T., Subbah, C. H. R., and Prakasham, R. S.(2008). Enhancement of L-aspraginase production by isolated Bacillus circulans MTCC8574 using response surface methodology. Application Biochemistry Biotechnology, 159(1), 8-191.
- Krishna, C. (2005) Solid-State Fermentation Systems—An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, 25, 1-30.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 193, 265-275.
- McNeil, B., and Harvey, L. (Eds.). (2008). *Practical fermentation technology*. John Wiley & Sons.(pp 103-104).
- Moorthy,V.,Aishwarya, R.,Alagarsamy, S., and Rajesh, T. Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of Bacillus sp. **African Journal of Microbiology Research**,(2010) 4(18), 1862-1867.
- Narayana, K.J.P., Kumar, K. G., and Vijayalakshmi,M. L-Asparaginase production by Streptomyces albidoflavus. **Indian Journal of Microbiology**. (2008) .48(3), 331 – 336.
- Patil, R.C., and Jadhav, B. L. Screening and Optimization of L-Asparaginase Production From Bacillus Species. **IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry**,(2017). (3) 3, 32-36.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P.W., and Mishra , P.K.Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview(Chapter 23).**New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering . Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications**(.2019). P: 345-354
- **United state department of Agriculture National. (2023).** Nutrient Database for standard Reference; https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/174682/nutrients;
- Van Trimpont, M., Peeters, E., De Visser, Y., Schalk, A. M., Mondelaers, V., De Moerloose, B., & Van Vlierberghe, P. (2022). Novel insights on the use of L-asparaginase as an efficient and safe anti-cancer therapy. **Cancers,** 14(4), 902.