تنقية أنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا Bacillus licheniformis

فيفيان ضيف الله* د. صباح اليازجي د. لينه الأمير*****

الملخص

أجريت عملية التنقية لأنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا Bacillu licheniformis باستخدام طريقة التخمير المغمور بتطبيق الظروف المثالية لإنتاجه . تضمنت مراحل التنقية الخطوات التالية; الترسيب بالأسيتون بتركيز 80% تلاه الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephadex G-100 ومن بعدها الفصل على عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Sepharose . بلغ عدد مرات التنقية 283.86 بفعالية نوعية 667.08 وحدة دولية/ مل.

الكلمات المفتاحية : الأسباجيناز _ تنقية _ Bacillus licheniformis_ تخمير مغمور .

* طالبة دكتوراه، مساعد باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، قسم التقانات الحيوية الغذائية والصناعية، دمشق، ،سورية.
** أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.
*** أستاذ مساعد، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، قسم التقانات الحيوية الغذائية والصناعية، دمشق، ،سورية.

purification asparaginase produced from Bacillus licheniformis

V. Daifallah [*] S. Yazaji[**] L. Al-Amir[***]

Abstract

Asparaginase produced by Bacillus licheniformis using submerged fermentation under optimized conditions was purified. The purification process included the following steps; precipitation of protein by 80% acetone followed by sephadex G-100 gel filtration column then separation on DEAE− Sepharose column chromatography .Folds of purification of asparaginase reached 283.86 fold with specific activity of 667.08 IU/ml.

Key words: asparaginase _ purification _ Bacillus licheniformis _ submerged fermentation.

[*] PhD student
[**] Professor., Food Science Department., Faculty of Damascus University, Syria.
[***] Assistant professor, National Commission for Biotechnology., Department of Food and Industry Biotechnology. Syria

المقدمة:

الإنزيمات عبارة عن محفزات للتفاعل ذات طبيعة بروتينية، وهي مسؤولة عن عدد من التحولات الكيميائية الضرورية، لها دور هام في مجالات الحياة كافة، فهي تستخدم في صناعة الأغذية والأدوية والمنظفات (Bruice and Benkovic, 2000)يمتلك أنزيم الأسبارجيناز الرقم الكيميائي (EC 3.5.1.1)(NC- IUBMB,2017). يتبع إلى أنزيمات الحلمهة فهو يعمل على حلمهة الحمض الأميني الأسبارجين إلى حمض الأسبارتك والأمونيا (Naryana et al.,2008) وفق التفاعل:

$$\text{L-asparagine} + H_2O \longrightarrow \text{L-aspartate} + NH3$$

يعتبر هذا الأنزيم عاملاً مساعداً في الصناعات الغذائية حيث يعمل على تقليل كمية الأكريلاميد المتشكلة خلال عملية قلي المواد الغذائية النشوية كالبطاطا والفلافل والخبز وغيرها من الأغذية النشوية نتيجة حدوث تفاعل ميلارد الذي يشكل اللون البني بسبب تفاعل الحمض الأميني الأسبارجين مع السكريات المرجعة الموجودة في هذه الأغذية النشوية، بالإضافة الى تحسين لون المنتج وطعمه وقوامه (Cachumba et al.,2016). أما في الصناعات الدوائية فيستخدم هذا الأنزيم كمادة معالجة لمرضى السرطان(Hatamzadeh et al.,2020).

ينتج أنزيم الأسبارجيناز من قبل أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة كالجراثيم والخمائر والأعفان(Amena et al.,2010). يعد أنزيم الأسبارجيناز من الأنزيمات الخارجية Extracellular enzyme، لذلك لا يحتاج إلى خطوات لتحطيم جدران الخلايا البكتيرية (Moorthy et al.,2010).

يمكن فصل وتنقية الأنزيمات بخطوات متعددة، تبدأ في معظم الأحيان بعملية الترسيب، ويستخدم لهذا الغرض كبريتات الأمونيوم أو الترسيب بالأسيتون بدرجات إشباع متباينة تتراوح بين 20−100% (Bajaj et al., 2009; Basha et al., 2009; Kumar and

(Sobha.,2012; Husain et al.,2016; Hatamzadeh et al.,2020) ، وللحصول على الراسب يتبع ذلك عملية تثفيل بسرعة تتراوح بين 6000 دورة/ دقيقة و 9000 دورة/ دقيقة لمدة تتراوح بين 15 دقيقة إلى 20 دقيقة. أجرى Tiul وآخرون (1972) دراسة عن تنقية إنزيم الأسبارجيناز المنتج من Bacillus mesentricus 43A بطريقة مشابهة لطريقة التنقية التي ذكرت في أبحاث أخرى والتي عملت على تنقية إنزيم الأسبارجيناز من بكتريا Bacillus sp. حيث قام بعدة خطوات شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 80% ثم الديلزة وإمرار المحلول الأنزيمي على عمود كروماتوكرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose (4×60cm). أجرى Moorthy وآخرون (2010) تنقية إنزيم الأسبارجيناز المنتج من Bacillus sp. بعدة خطوات إذ تمّ ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم للوصول إلى نسبة إشباع 80% ثم جمع الراسب بإجراء عملية طرد مركزي بسرعة 6000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة وبعدها أذيب باستخدام المحلول الموقي Tris-HCl (pH 8.6) و تم إمرار المحلول الإنزيمي على عمود كروماتوكرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose باستخدام المحلول الموقي نفسه، وجمع الإنزيم بمعدل جريان (1 مل /دقيقة) .وتمكن Mahajan وآخرون (2014) من تنقية إنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا Bacillus licheniformis بعدة خطوات شملت الترشيح الفائقي لمستخلص الإنزيم الخام باستخدام مصيدة 30KDa للتخلص من البروتينات منخفضة الوزن الجزيئي ثم الترسيب بالمذيب العضوي الأسيتون بنسبة إشباع 80% ثم تم إمرار المحلول الإنزيمي على عمود كروماتوكرافيا التبادل الأيونيDEAE-Cellulose (4×60cm) بمعدل جريان (1مل/دقيقة) ثم الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G–100 (4×60 cm). ذكر Silpa وآخرون (2017) أن بعض الدراسات قامت بتنقية الإنزيم من بكتريا Bacillus pumilus من خلال ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسبة

إشباع تراوحت بين 70–100% وإمرار المحلول الإنزيمي على عمود كروماتوكرافيا التبادل الأيونيDEAE-Cellulose. كما تمت تنقية الإنزيم المنتج من أنواع مختلفة من البكتريا كبكتريا Erwinia carotovora حيث ذكر أن عملية تنقية هذا الإنزيم من هذه البكتريا شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 70% ثم الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G–200. أما تنقية الإنزيم من بكتريا Enterobacter aerogenes فكانت بشكل بسيط حيث تم فصل الإنزيم بالترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S–200 ثم تبعته عملية الترشيح الفائقي. تمكن Amena وآخرون (2010) من تنقية الإنزيم المنتج من بكتريا Streptomyces gulbargensis شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع 40–60% ثم الديلزة و الترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S–200(1×50 cm) ثم الترشيح على عمود CM Sephadex C-50 . . تمكن Meghavarnam و Janakiraman (2015) من تنقية إنزيم الأسبارجيناز المنتج من فطر Fusarium culmorum ASP-87 بعدة خطوات شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بتركيز 80% ثم إمرار المحلول الإنزيمي على عمود كروماتوكرافيا التبادل الأيونيDEAE-Cellulose (1.5×15 cm) ثم الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G– 100.

هدف البحث:

نظراً للأهمية التطبيقية الغذائية لإنزيم الأسبارجيناز تمّ إجراء عملية التنقية، لذلك فقد هدف البحث إلى تنقية إنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا Bacillus licheniformis بخطوات متعددة للحصول على إنزيم قابل للتطبيق على مستوى آمن في الأغذية.

المواد والطرائق:

1-عزلة بكتريا Bacillus licheniformis :

شخصت هذه العزلة في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية (ضيف الله وآخرون،2019). نشطت العزلة بطريقة التخطيط على وسط الآغار المغذي (Nutrient agar) وحضنت عند حرارة 30°م مدة 48 ساعة ، ثم نقلت مستعمرة من المستعمرات المتشكلة إلى 10مل من وسط المرق المغذي (Nutrient broth) وحضنت عند حرارة 30°م لمدة 48 ساعة. وقد تم تعيين الظروف المثلى للإنتاج في دراسة سابقة (ضيف الله وآخرون.،2020).

2- إنتاج إنزيم الأسبارجيناز:

من أجل إنتاج أنزيم الأسبارجيناز استعملت طريقة المزارع المغمورة (Submerged culture) المذكورة من قبل Moorthy وآخرون (2010) و ضيف الله وآخرون(2019).

3-تقدير الفعالية الأنزيمية لأنزيم الأسبارجيناز:

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل Patil و Jadhav (2017).إذ أضيف 0.5 مل من مستخلص الأنزيم الخام إلى محلول التفاعل المتكون من 0.5 مل من المحلول المؤقي Tris–HCl(M0.05) , pH 8.6 و 0.5 مل من محلول المادة الأساس الأسبارجين(0.04M) وحضن مزيج التفاعل في حمام مائي على درجة حرارة 30°م واستمر التفاعل الأنزيمي مدة 30 دقيقة. بعدها أوقف التفاعل بإضافة 0.5 مل من محلول ثلاثي كلور حمض الخل TCA(0.1N)،ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 9000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق. أخذ 0.1 مل من الرائق وأضيف له 3.7مل 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 بدرجة 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 ما عدا محلول الأنزيم. تعرف وحدة فعالية الأنزيم (Unit) بأنها كمية الأنزيم التي تحرر ميكرومولاً واحداً من الأمونيا في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة، لكن لتقدير فعالية أنزيم الأسبارجيناز الناتج يجب أولاً التوصل إلى معادلة المنحني القياسي لسلفات الأمونيوم، ومنها يستخرج تركيز الأمونيا المتحرر بفعل الأنزيم على المادة الأساس الاسبارجين بالاستعانة بذلك المنحنى القياسي لمحلول سلفات الأمونيوم.

4- المنحنى القياسي لمحلول الأمونيا: (Moorthy et al.,2010)

حضرت تراكيز متدرجة من سلفات الأمونيوم تراوحت بين(0- 5) ميلي مول بإجراء التخفيفات اللازمة لمحلول سلفات الأمونيوم (10ميلي مول) بالماء المقطر .

5- تقدير البروتين:

اتبعت طريقة Lowry وآخرون (1951) و Mahajan وآخرون (2014)

لتقدير تركيز البروتين كما يلي:

5-1-المواد والمحاليل المستخدمة:

محلول (A) كربونات الصوديوم 2%: حضر بإذابة 2 غ من Na_2CO_3 يكمل إلى 100 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH (0.1N)

محلول (B) كبريتات النحاس 1%: حضر بإذابة 1 غ من كبريتات النحاس $CuSO_4.5H_2O$ يكمل إلى 100 مل من الماء المقطر.

محلول (C) طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم 2%: حضر بإذابة 2 غ من طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم تكمل إلى 100 مل من الماء المقطر.

محلول العمل المكون من مزيج من المحاليل A وB وC محضرة آنياً بنسبة (1:1:98).

كاشف فولن Folin–Ciocalteu phenol المخفف بنسبة (1 كاشف: 1 ماء مقطر).

محلول ألبومين المصل البقري الخزين (BSA) المحضر بتركيز 200 مغ/مل ماء مقطر.

5-2- تحضير المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين:

حضرت تراكيز متدرجة من محلول BSA تراوحت بين (0 – 100 ميكروغرام/ مل) بإجراء التخافيف اللازمة لمحلول BSA (200 ميكروغرام/مل) بالماء المقطر.

5-3- تقدير تركيز البروتين في المستخلص الإنزيمي وبعد كل مرحلة من مراحل التنقية:

قُدر البروتين في محلول العينة قبل التنقية و بعد كل مرحلة من مراحل التنقية بنفس خطوات الطريقة المذكورة أعلاه (تحضير المنحني القياسي للبروتين)، ولكن بأخذ 1 مل من العينة الحاوية على البروتين بدلاً من 1 مل من تركيز محلول البروتين القياسي، وقيست الامتصاصية عند طول الموجة $\lambda = 750$ nm ، وبالتعويض بمعادلة المنحني القياسي للبروتين يتم الحصول على تركيز البروتين في العينة مقدراً بالميكروغرام/مل (Mahajan et al.,2014; Hatamzadeh et al.,2020).

6-مراحل تنقية الأسبارجيناز :

6-1-المعاملة بالأسيتون: (Mahajan et al.,2014)

في المرحلة الأولى من التنقية أضيف الأسيتون المركز بنسبة 80% إلى 50مل من المستخلص الخام، وترك في الثلاجة لمدة 16ساعة مع التحريك لإتاحة ترسيب بروتين الإنزيم، ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 6000 دورة/ دقيقة مدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4 مْ، فصل الرائق و أخذ الراسب الناتج وحل في 10

مل من المحلول الموقي Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) . قدر حجم المستخلص الإنزيمي والبروتين والفعالية الإنزيمية والنوعية لجميع مراحل التنقية.

6-2- التنقية باستخدام أعمدة الكروماتوغرافيا:

6-2-1- عمود الـ Sephadex G-100 : (Mahajan et al.,2014)

وقد جرت هذه المرحلة من التنقية بعد مرحلة الترسيب بالأسيتون . تم تحضير هلامة الـSephadex G-100 كالتالي: حلت الهلامة بالمحلول الموقي – Tris HCl pH 8.6 (0.05M). بعدها علقت بـ 200 مل من نفس المحلول الموقي وأزيلت منها الغازات (Degassing) بمضخة تفريغ الهواء ثم سكبت الهلامة بلطف في عمود زجاجي بأبعاد (30×2.6 سم) مع ملاحظة عدم ظهور فقاعات، ثم غسل العمود بمحلول Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) مرتين، إذ بلغت سرعة الجريان 30 مل/ ساعة. أضيف لسطح عمود Sephadex G-100 3 مل من الأنزيم المعالج بالأسيتون، ومرر المحلول الموقي Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) على العمود مع المحافظة على سرعة جريان 30 مل/ساعة .جمعت الأجزاء الفعالة من الأنزيم مع المحافظة على سرعة جريان 30 مل/ساعة وبواقع 0.5 مل للجزء الواحد في الدقيقة. وتمت متابعة امتصاصية كل جزء عند طول موجة $\lambda = 280$ nm للأجزاء المفصولة، ورسم المنحني البياني للعلاقة بين الامتصاصية وأرقام الأجزاء، ثم جمعت محتويات الأنابيب التي تقع ضمن تشكيل القمة، وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها.

6-2- DEAE –Sepharose 2 : (Jimat et al.,2017):

أجريت عملية التنقية لهذه المرحلة وفق الخطوات التالية: جمعت الأجزاء التي أظهرت أعلى فعالية أنزيمية في المرحلة السابقة ، وأضيفت إلى سطح العمود الحاوي على

هلامة DEAE -Sepharose. تم تحضير هلامة DEAE- sepharose كالتالي: غسلت الهلامة بالمحلول الموقي Tris –HCl pH 8.6 (0.05M). بعدها علقت بـ 200 مل من نفس المحلول الموقي وأزيلت منها الغازات (Degassing) بمضخة تفريغ الهواء ثم سكبت الهلامة بلطف في عمود زجاجي بأبعاد (2.3×10 سم) مع ملاحظة عدم ظهور فقاعات، غسل العمود بمحلول Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) مرتين، إذ بلغت سرعة الجريان 60 مل/ ساعة. أضيف لسطح عمودDEAE- sepharose 3 مل من المحلول الأنزيمي الناتج من المرحلة السابقة، و مرر المحلول الموقي Tris –HCl pH 8.6 (M0.05) على العمود. جمعت الأجزاء المفصولة من العمود بجامع الأجزاء Fraction collecter مع المحافظة على سرعة الجريان 60 مل/ساعة وبواقع 1 مل للجزء الواحد في الدقيقة. وتمت متابعة امتصاصية كل جزء عند طول موجة $\lambda = 280$ nm للأجزاء المفصولة، ورسم المنحني البياني للعلاقة بين الامتصاصية وأرقام الأجزاء، ثم جمعت محتويات الأنابيب التي تقع ضمن تشكيل القمة، وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها .

النتائج:

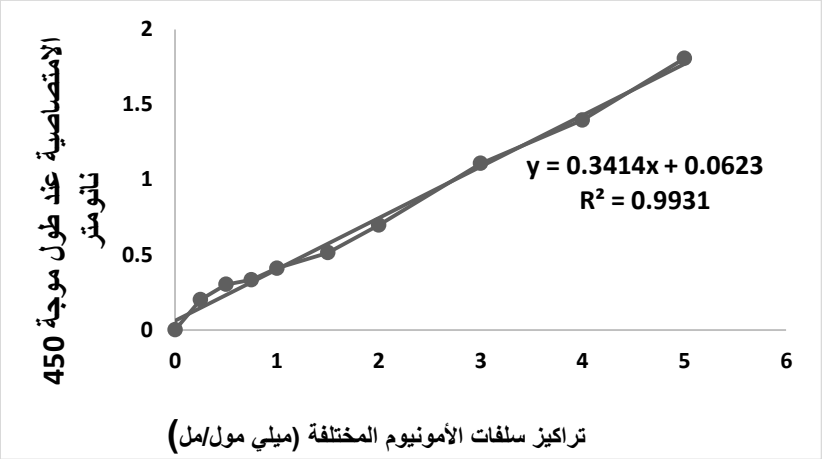
1- المنحني القياسي للأمونيا:

حضرت تراكيز متدرجة من سلفات الأمونيا وفقاً لـ Moorthy وآخرون (2010) بتراكيز بين (0-5) ميلي مول، نقل 1 مل من المحاليل المحضرة إلى أنابيب اختبار، وأضيف الى كل منها 0.2 مل من محلول نسلر ومزج الخليط جيداً باستعمال مازجة الأنابيب Vortex وحفظ المزيج بدرجة حرارة 20°م لمدة 20 دقيقة. قيست الامتصاصية عند طول موجة 450 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) الذي تم تصفيره باستعمال الشاهد المؤلف من المحاليل المستعملة عدا سلفات الأمونيا كما هو مبين في الجدول (1) .

الجدول(1): جدول قيم الامتصاصية لتراكيز سلفات الأمونيوم المستخدمة في رسم المنحني القياسي.

تراكيز سلفات الأمونيوم (ميلي مول /مل)	المتوسط الحسابي للامتصاصية عند طول موجة 450 نانومتر ±الانحراف المعياري
0	0
0.25	0.2010.00120±
0.5	0.3030.00023±
0.75	0.3330.00247±
1	00.410.00061±
1.5	0.5130.00034±
2	0.6980.00257±
3	1.1080.00030±
4	1.3960.00042±
5	1.8060.00402±

رُسم المنحنى القياسي لقيم الامتصاصية مقابل تركيز سلفات الأمونيوم بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز حيث يلاحظ من الجدول وجود فرق معنوي بين تراكيز سلفات الأمونيوم على مستوى ثقة 1% بعد استخدام تحليل التباين ANOVA وباستخدام أقل فرق معنوي، حيث بلغت أدنى قيمة للامتصاصية0.201 للتركيز 0.25 ميلي مول، بينما بلغت أعلى قيمة 1.806 لتركيز 5 ميلي مول من سلفات الأمونيوم. كما موضح بالشكل(1).



الشكل(1): المنحني القياسي لسلفات الأمونيوم باستخدام طريقة نسلر.

2-المنحني القياسي للبروتين :

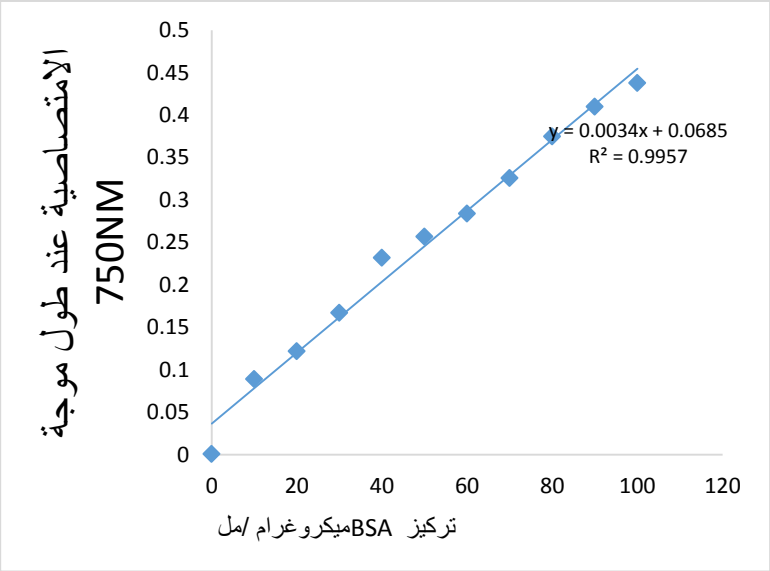
من أجل تقدير كمية البروتين قبل وبعد كل مرحلة من مراحل التنقية، حضرت تراكيز متدرجة من محلول BSA تراوحت بين (0 – 100 ميكروغرام/ مل) بإجراء التخافيف اللازمة لمحلول BSA الخزين (200 ميكروغرام/مل) بالماء المقطر ويبين الجدول (2) تراكيز محلول BSA القياسي.

الجدول (2): تراكيز محلول BSA القياسي.

رقم الأنبوب	محلول BSA الخزين بتركيز 200 ميكروغرام/مل (مل)	الماء المقطر (5مل)	تركيز محلول BSA (ميكروغرام/مل)
1	0.0	5	0.0
2	0.25	4.75	10
3	0.50	4.5	20
4	0.75	4.25	30
5	1	4	40
6	1.25	3.75	50
7	1.50	3.50	60 7
8	1.75	3.25	70
9	2	3	80
10	2.25	2.75	90
11	2.50	2.50	100
12	5	0	200

أضيف لكل 1 مل من هذه التراكيز 5 مل من محلول العمل المحضر آنياً مع المزج الجيد. تركت النماذج مدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة وأضيف 0.3 مل من محلول كاشف فولن المخفف بالتدريج مع التحريك السريع ليتجانس المحلول ويظهر اللون الأرجواني الناتج عن تفاعل الكاشف مع معقد النحاس ونتروجين البروتين عند ترك الخليط بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة. كما أجريت تجربة شاهد بأخذ 1 مل من الماء المقطر بدلاً من محلول البروتين القياسي. قيست الامتصاصية عند طول موجة 750 نانومتر ومنها رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين تركيز BSA (ميكروغرام/مل) والامتصاصية(Moorthy et al.,2010;Lowry et al.,1951). ويوضح الشكل (2) العلاقة الخطية بين تراكيز المحلول القياسي والامتصاصية .وبتعويض قيمة الامتصاصية

المقاسة قبل وبعد كل مرحلة من مراحل التنقية في معادلة المنحني القياسي يمكننا حساب تركيز البروتين الناتج.



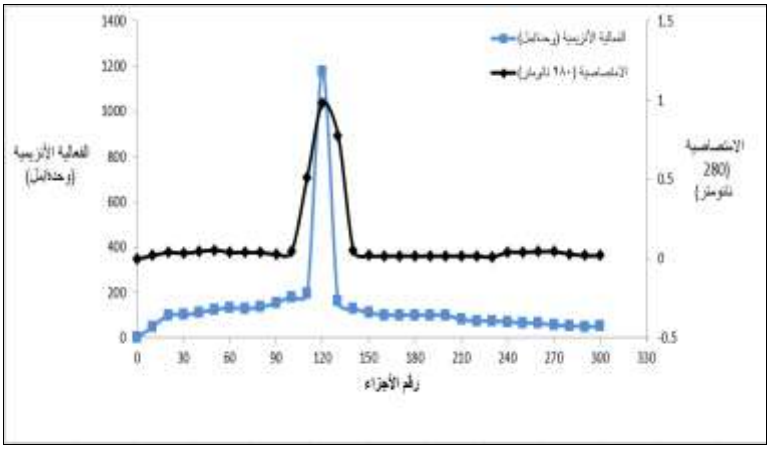
الشكل (2): المنحني القياسي للبروتين باستخدام ألبومين المصل البقري (BSA)

2-التنقية لإنزيم الأسبارجيناز:

أجريت عملية التنقية لإنزيم الأسبارجيناز وفق عدة خطوات شملت الترسيب بالأسيتون وبعدها أُستخدم عمود كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Sephadex G-100 ثم أُستخدم عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Sepharose إذ خضع المستخلص الإنزيمي الخام لسلسلة من خطوات التنقية تمثلت الخطوة الأولى منها بفصل بروتين الإنزيم عن طريق ترسيبه بالمذيب العضوي الأسيتون بنسبة 80% ،وتتلخص الفكرة الأساسية من ترسيب بروتينات الإنزيمات بالأسيتون من خلال معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين وإحداث الإخلال (disruption) بطبقة الماء المحيطة بالبروتين

وخفض درجة تميئها (degree of hydration) ومن ثم انخفاض ذائبية البروتين وترسيبه (Lide، 2006).

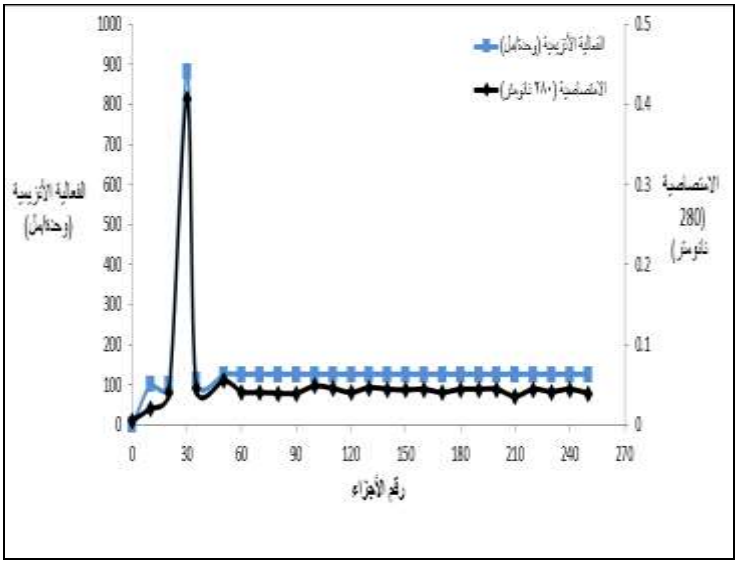
أخذ الراسب الناتج عن الترسيب بالأسيتون وحل ب 10 مل من محلول Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) ثم أخذ منها 3 مل ومررت على عمود Sephadex G-100 مع استخدام محلول Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) نفسه وبسرعة جريان30 مل/ساعة، جُمعت أجزاء بروتين الأنزيم في أنابيب بمعدل 0.5 مل للجزء الواحد في كل أنبوب ويبين الشكل (3) نتائج عملية التنقية باستخدام عمود Sephadex G-100



الشكل (3): تنقية الأسبارجيناز باستخدام عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 باستخدام محلول Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) بمعدل جريان 30 مل/ساعة.

قيست الامتصاصية لأجزاء البروتين عند طول موجة 280 نانومتر ثم قيست فعالية الأنزيم عند مجموعة الأجزاء التي شكلت القمة. يتضح من هذا الشكل أن الأجزاء التي تم جمعها في الأنابيب ذات الأرقام بين 115–135 (10 مل) أظهرت فعالية الإنزيم

لذلك جمعت هذه الأجزاء من ثم تم إمرارها على هلامة DEAE-Sepharose ويبين الشكل (4) نتائج عملية التنقية باستخدام عمود DEAE-Sepharose.



الشكل (4) فصل الأسبارجيناز باستخدام هلامة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Sepharose باستخدام محلول Tris –HCl pH 8.6 (0.05M) بمعدل جريان 60 مل/ساعة.

قيست الامتصاصية لأجزاء البروتين التي فصلت عند طول موجة 280نانومترو قيست فعالية الأنزيم لمجموع الأجزاء التي شكلت قمة واحدة ، ويبين الشكل (4) أن الأجزاء التي جمعت في الأنابيب بين 20–32 أظهرت أعلى فعالية للأنزيم حيث أعطت قمة واحدة ذات فعالية عالية. ويبين الجدول (3) ملخصاً لمراحل تنقية إنزيم الأسبارجيناز المنتج من البكتريا Bacillus licheniformis، حيث ظهر ارتفاع الفعالية الإنزيمية التي بلغت 880.54 وحدة/مل، كما بلغت الفعالية النوعية 667.08 وحدة/ مغ بعدد مرات تنقية بلغت 283.86 وبحصيلة إنزيمية مقدارها 10.21%.

الجدول (3): مراحل التنقية لإنزيم الأسبارجيناز المنتج من Bacillus licheniformis.

خطوات التنقية	الحجم المستخدم [ml]	الفعالية الإنزيمية [U/ml]	الفعالية الكلية [U]	تركيز البروتين [µg/ml]	الفعالية النوعية [U/mg]	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية %
المستخلص الخام	50	1379.23	68961.5	586.76	2.35	1	100
الترسيب بالأسيتون 80%	10	68.9242	689.242	13.120	18.818	80.08	35.80
هلامة Sephadex G-100	3	2281.49	6844.47	3.8	600.39	255.49	9.92
هلامة DEAE-Sepharose	3	880.54	2641.62	1.32	667.08	283.86	3.83

يبين الجدول(3) تفوق نتائج كافة مراحل التنقية بالمقارنة مع النتائج التي وجدها Mahajan وآخرون (2014) حيث أثبت أن الترسيب بالأسيتون بنسبة إشباع 80% للمستخلص الإنزيمي الخام لبكتريا Bacillus licheniformis أدى إلى زيادة الفعالية النوعية من 23.10 إلى 697.09 وحدة/ مغ ورفع عدد مرات التنقية إلى 30.17 مرة. كما تفوقت أيضاً على نتائج Moorthy وآخرون (2010) الذي وجد أن إضافة كبريتات الأمونيوم بتركيز 80% إلى مستخلص الإنزيم الخام المنتج من .Bacillus sp أدى إلى زيادة الفعالية النوعية من 0.10 إلى 1.12 وحدة/مغ ، حيث بلغت عدد مرات التنقية 11.2 مرة. كما تفوقت على نتائج Jimat وآخرون (2017) الذي تمكن من تنقية أنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا .Bacillus sp بمرحلتين عن طريق ترسيب بروتين الإنزيم باستخدام كبريتات الأمونيوم 90% ثم استخدام عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

DEAE-Sepharose حيث توصل إلى 10.11وحدة /مغ بحصيلة 50.07% وبعدد مرات تنقية بلغ 2.21. تمكن Qeshmi وآخرون (2015) بتنقية إنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا Bacillus sp GP02 بعدة خطوات شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم وبنسبة إشباع 70–80% ثم إمرار المحلول الأنزيمي على عمود كروماتوكرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose (4× 60 cm) وبلغت عدد مرات التنقية 9.4 مرة وبحصيلة 45%. وذكر Silpa وآخرون (2017) أن بعض الدراسات قامت بتنقية الإنزيم من بكتريا Bacillus pumilus بعدة خطوات شملت ترسيب مستخلص الإنزيم الخام بكبريتات الأمونيوم بنسب إشباع 70–100% وإمرار المحلول الأنزيمي على عمود كروماتوكرافيا التبادل الأيونيDEAE-Cellulose وأمكن استرداد 11.2% من الإنزيم بعدد مرات تنقية بلغت 9 مرات.

الاستنتاجات:

أمكن تنقية الإنزيم بثلاث مراحل من خلال استخدام الترسيب بالأسيتون ثم استخدام عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 حيث تمَ الحصول على قمة واحدة و عند إجراء المرحلة الثالثة وهي التمرير على عمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Sepharose تمَ التأكد من نقاوة البروتين إذ ظهرت على قمة واحدة بنقاوة أعلى والدليل هو زيادة الفعالية النوعية.

المراجع References :

1. ضيف الله ، فيفيان .اليازجي ، صباح والأمير، لينه(2019). الكشف عن إنتاج أنزيم الأسبارجيناز من عزلات محلية لبكتريا .Bacillus spp . كلية الزراعة، جامعة دمشق.
2. ضيف الله ، فيفيان .اليازجي ، صباح والأمير، لينه(2020). أمثلة ظروف إنتاج أنزيم الأسبارجيناز من بكتريا Bacillus licheniformis باستخدام التصميم الإحصائي Response surface methodology. المجلة العلمية لجامعة الملك فيصل(العلوم الأساسية والتطبيقية).

3. Bajaj , B.K.; Pangotra , H.; Wani , M.A.; Sharma , P.; and Sharma , A. (2009). Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated Bacillus strain M-9. Indian Journal of Chemical Technology. 16, 382-387.
4. Basha , S.N.; Rekha, R.; Komala, M.; and Ruby, S.(2009). Production of extracellular anti-leukemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by soild state and submerged fermentation ,purification and characterization. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 8: 353-60.
5. Bruice, T.C. and Benkovic, S.J. (2000). Chemical basis for enzyme catalysis. Biochemistry. 39: 6267-6274.
6. Cachumba, J.J, Antunes, F.A., Peres ,G.F., Brumano ,L.P., Santos, J.C and Silva ,S.S. (2016). Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. Brazilian Journal of Microbiology. 47 (1): 77-85.
7. Feng, Y., Liu, S., Jiao ,Y., Gao, H., Wang, M., Du, G., and Chen, J. (2017). Enhanced extracellular production of L-asparaginase from

Bacillus subtilis 168 by B. subtilis WB600 through a combined strategy. Application Microbiol Biotechnology. 101(4): 1509-1520.

8. Jimat, D.N; Jamal, P; Azmi, A.(2017). Purification and partial characterization of L-asparaginase enzyme produced by newly isolated Bacillus Sp. International Islamic University Malaysia Engineering Journal. 18(2).
9. Hatamzadeh.,S. Rahnama., K. , Nasrollahnejad.,S. Fotouhifar., KB., , Hemmati.,KH. White., JF4 and Taliei.,F.(2020). Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from the Asteraceae family plant species of Iran. Department of plant protection, Faculty of plant production, Gorgan University Of Agricultural Sciences And Natural Resources, Gorgan, Iran.
10. Husain, I., Sharma, A., Kumar, S., and Malik, F. (2016). Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparaginase from Enterobacter cloacae: In-Vitro Evaluation of Cytotoxic Potential against Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. PLOS ONE, 11(2).
11. Kumar, D., and Sobha, K. (2012). L-Asparaginase from microbes: a comprehensive review. Advances in Bioresearch 939)4(P:137–157.
12. Lide D, R. (2006). CRC Handbook of Chemistry and Physics (87th ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 0-8493-0487-3.
13. 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.
14. Mahajan, R.V.; Saran, S.; Kameswaran, K.; Kumar ,V.; and Saxena ،R.K. (2014) .Efficient production of L-asparaginase from Bacillus licheniformis with low-glutaminase activity: optimization, scale up and acrylamide degradation studies. Bioresources Technology. 125(1):11-6.
15. Moorthy, V., Aishwarya, R., Alagarsamy, S., and Rajesh , T. (2010). Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of Bacillus sp. African Journal of Microbiology Research . 4(18): 1862-1867.

16. Narayana, K.J.P., Kumar, K.G., and Vijayalakshmi , M. (2008). L-Asparaginase production by Streptomyces albidoflavus. Indian Journal of Microbiol. 48(3): 331 – 336.
17. Nomeclature International Union of Biochemistry and Molecular Biology. IUBMB, (2017).
18. Patil, R.C., and Jadhav, B.L. (2017). Screening and optimization of L-Asparaginase production from Bacillus species. IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry. (3)3: 32-36.
19. Qeshmi, F.I.; Rahimzadeh, M.; Javadpour, S.; and Poodat, M. (2015). Intracellular L-Asparaginase from Bacillus sp. PG02: Purification, Biochemical Characterization and Evaluation of Optimum pH and Temperature. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Iran.
20. Silpa, S.; Bhattacharya, S .; and Venkatanagaraju, E. (2017). Overview on L-asparaginase . World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. 6(5): 561-601.
21. Tiul, E.S.; Ermenko, V.V.; and Mardashev, S.R. (1972). Activity and Properties of L-asparaginase from Bacillus mesentricus 43A. Microbiologia.(41): 423-429.