Journal of Agricultural, Environmental and Veterinary Sciences (JAEVS) • Vol 8, Issue 2 (2024) • P: 9 - 1
https://journals.ajsrp.com/index.php/jaevs
ISSN: 2522-3364 (Online) • ISSN: 2522-3364 (Print)

Molecular Weight Determination of L-asparaginase from Bacillus licheniformis

Dr. Vivian Ramzi Daifallah*[1], Dr. Sabah Nassib Yazji[2], Dr. Lina Abdulkarim Al-Amir[1]

[1] National Commission for Biotechnology (NCBT) | Syria

[2] Faculty of Agriculture | Damascus University | Syria

Received: 24/04/2024

Revised: 06/05/2024

Accepted: 04/06/2024

Published: 30/06/2024

* Corresponding author: vivian.daifallah@gmail.co

Citation: Daifallah, V. R., Yazji, S. N., & Al-Amir, L. A. (2024). Molecular Weight Determination of L-asparaginase from Bacillus licheniformis. *Journal of agricultural, environmental and veterinary sciences, 8*(2), 1 – 9 . https://doi.org/10.26389/AJSRP.V240424

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: Due to the nutritional and pharmaceutical application importance of the asparaginase enzyme and the lack of commercial availability of the enzyme in local markets, the study focused on producing the asparaginase enzyme from *Bacillus* bacteria and purifying it for the possibility of its application in the food industries.

,Purification steps of asparaginase produced by *Bacillus licheniformis* started by precipitation with 80% acetone, then separation by column chromatography using Sephadex G-100 and Sephacryl DEAE-sepharose. The molecular weight was 34.4 kDa determined using SDS PAGE.

Keywords *Bacillus licheniformis*- asparagine –asparaginase -enzyme activity - purification- molecular wight - Sephadex G100 - DEAE sepharose.

تحديد الوزن الجزيئي للأسبارجيناز المنتج من بكتريا Bacillus licheniformis

د. فيفيان رمزي ضيف الله*[1]، د. صباح نسيب يازجي[2]، د. لينه عبد الكريم الأمير[1]

[1] الهيئة العامة للتقانة الحيوية | سورية

[2] كلية الزراعة | جامعة دمشق | سورية

المستخلص: نظراً للأهمية التطبيقية الغذائية والدوائية لإنزيم الأسبارجيناز ولعدم توفر الإنزيم تجارياً في الأسواق المحلية، اتجهت الدراسة نحو إنتاج إنزيم الأسبارجيناز من بكتريا *Bacillus* وتنقيته لإمكانية تطبيقه في الصناعات الغذائية . أجريت عملية التنقية لإنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* بدءاً من الترسيب بالأسيتون بتركيز 80% ثم باستخدام عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 وعمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Sepharose. بلغ الوزن الجزيئي 34.4 كيلو دالتون عند استخدام هلام SDS-PAGE.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus licheniformis* ،أسبارجين، أسبارجيناز، فعالية إنزيمية ، تنقية، وزن جزيئي ، Sephadex G100.، DEAE Sepharose

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 إنزيم الأسبارجيناز الرقم الكيميائي (EC 3.5.1.1)IUBMB,2017) NC-). يتبع إلى أنزيمات الحلمهة فهو يعمل على حلمهة الحمض الأميني الأسبارجين إلى حمض الأسبارتك والأمونيا (Naryana *et al*.،2008) وفق التفاعل:

L−asparagine +H_2O ▼ L−aspartate+NH3

يعتبر هذا الإنزيم 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 الإنزيم كمادة معالجة لمرضى السرطان(Hatamzadeh *et al*.,2020).

ينتج إنزيم الأسبارجيناز من قبل أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة كالجراثيم والخمائر والأعفان(Amena *et al*.،2010). يعد إنزيم الأسبارجيناز من الأنزيمات الخارجية (Extracellular enzyme(Daifallah *et al*.,2023,1288)، لذلك لا يحتاج إلى خطوات لتحطيم جدران الخلايا البكتيرية (Moorthy *et al*.,2010).

تشير أغلب الدراسات إلى استخدام طريقة الترحيل الكهربائي SDS PAGE لتحديد الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجيناز وفقاً إلى طريقة Laemmli (1970) والموصوفة من قبل Garfin (425,1990)و*Rath* وآخرون (1760,2009) في اختبار نقاوة الإنزيم، حيث تعتبر هذه الطريقة من أهم طرائق الفصل للاستدلال على نقاوة البروتين ووزنه الجزيئي وبما أن جزيئات البروتين مختلفة في الشكل والوزن الجزيئي والشحنة يتم في البداية تغيير طبيعتها، حيث تقوم مادة الـ SDSبتوحيد شحنة البروتينات فتصبح ذات شحنة سالبة، وعند تحميل خليط البروتينات على هلام الـ Polyacrylamide تتعرض للتيار الكهربائي فتهاجر البروتينات باتجاه القطب الموجب أثناء ذلك تُفصل بواسطة الغربلة الجزيئية (molecular sieving) تبعاً للوزن الجزيئي من ثم يتم تظهير حزم البروتين باستخدام صبغة خاصة، ويمكن معرفة وزن البروتين الناتج بمقارنة المسافة التي يقطعها جزيء البروتين على هلام الفصل مع حزم من الجزيئات البروتينية معلومة الوزن الجزيئي.

تباينت الدراسات في تقدير الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجيناز وذلك تبعاً لاختلاف المصدر الميكروبي للإنزيم، إذ إن كفاءة الإنزيم ذاتها لاتختلف باختلاف وزنه الجزيئي ، فقد تراوح الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجيناز المنتج من جنس *Bacillus sp*. بين 33-48 كيلو دالتون (Silpa et al، 2017,561). كما أثبت Mahajan وآخرون (11,2014) أن الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجيناز المنتج من *Bacillus licheniformis* هو 33.7 كيلو دالتون، وأثبت Qeshmi وآخرون (12,2015) أن الوزن الجزيئي له بلغ 38 كيلو دالتون عند إنتاجه من بكتيريا Bacillus *sp* PG02وأثبت Moorthy وآخرون (2010،4)، أن الوزن الجزيئي لهذا الإنزيم من بكتريا *Bacillus sp.* هو kDa45.

وأثبت Alrumman (6,2019) أن الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* هو 37. KDa

مواد وطرائق البحث

مكان وزمان تنفيذ البحث:

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

طرائق البحث:

- Bacillus licheniformis:

شخصت العزلة البكتيريا في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وتم إنتاج إنزيم الأسبارجيناز من هذه العزلة وتنقية إنزيم الأسبارجيناز الناتج منها ودراسة صفاته الحركية وفقاً ل (Daifallah وآخرون ،2021، 35,38,43,50).

- تقدير البروتين:

من أجل تقدير كمية البروتين قبل وبعد كل مرحلة من مراحل التنقية، تم رسم منحني قياسي للبروتين، إذ جرى استخدام تراكيز متدرجة من محلول ألبومين المصل البقري (BSA) تراوحت من (0-100 ميكروغرام/ مل) وقيست الامتصاصية لشدة اللون

الأرجواني باستخدام كاشف Folin عند طول الموجة 750 نانومتر ومنها رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين تركيز BSA (ميكروغرام/مل) والامتصاصية (Lowry.,1951,265؛. (Daifallah.,2024,3

وقُدر البروتين في محلول العينة قبل التنقية و بعد كل مرحلة من مراحل التنقية بنفس خطوات الطريقة المذكورة في (Daifallah وآخرون،2021، 70).

- تنقية الإنزيم: (ضيف الله وآخرون 70,2021)

استخدام عمود **Sephadex G**-100:

أُخضع المستخلص الإنزيمي الخام لسلسلة من خطوات التنقية تمثلت الخطوة الأولى منها بفصل بروتين الإنزيم عن طريق ترسيبه بالمذيب العضوي الأسيتون بنسبة إشباع 80% وأذيب الراسب الناتج بـ 10مل من المحلول الموقي Tris –HCl بتركيزM 0.05 ورقم هيدروجيني 8.6.

أضيف مقدار 3 مل من راسب البروتين الناتج من عملية الترسيب بالأسيتون على سطح عمود Sephadex G-100، وجُمعت أجزاء البروتين في أنابيب بمعدل 0.5 مل للجزء الواحد في كل أنبوب، وقيست الامتصاصية لأجزاء بروتين محلول الاسترداد التي جُمعت عند طول موجة 280 نانومتر وحسبت فعالية الإنزيم عند القمة المتشكلة.

- استخدام عمود **DEAE- Sepharose** :

بعد ذلك أُخذ 3 مل من محلول الاسترداد الناتج من هلام Sephadex G-100وتم إمرارها على هلام DEAE-Sepharose بمعدل جريان 60 مل/ساعة باستخدام محلول Tris –HCL بتركيز M0.05 و pH 8.6 ثم قيست الامتصاصية لأجزاء محلول الاسترداد التي فصلت بمعدل 1 مل للجزء الواحد في كل أنبوب وقيست الامتصاصية عند طول موجة 280 نانومتر ثم قيست فعالية الإنزيم عند القمة المتشكلة.

- طريقة الترحيل الكهربائي للبروتين باستخدام طريقة **SDS-PAGE: (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)**

اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكريلاميد تبعاً لطريقةLaemmli (1970) والموصوفة من قبل Garfin (425,1990)و*Rath* وآخرون (1760,2009) في اختبار نقاوة الإنزيم، حيث تعتبر هذه الطريقة من أهم طرائق الفصل للاستدلال على نقاوة البروتين ووزنه الجزيئي وبما أن جزيئات البروتين مختلفة في الشكل والوزن الجزيئي والشحنة يتم في البداية تغيير طبيعتها، حيث تقوم مادة الـ SDSبتوحيد شحنة البروتينات فتصبح ذات شحنة سالبة، وعند تحميل خليط البروتينات على هلام الـ Polyacrylamide تتعرض للتيار الكهربائي فتهاجر البروتينات باتجاه القطب الموجب أثناء ذلك تُفصل بواسطة الغربلة الجزيئية (molecular sieving) تبعاً للوزن الجزيئي من ثم يتم تظهير حزم البروتين باستخدام صبغة خاصة، ويمكن معرفة وزن البروتين الناتج بمقارنة المسافة التي يقطعها جزيء البروتين على هلام الفصل مع حزم من الجزيئات البروتينية معلومة الوزن الجزيئي.

أُستخدم لطريقة الترحيل الكهربائي المواد التالية (Garfin,1990,425)

المحلول الموقي لهلام الفصل :(pH 8.8) Separation gel buffer حضر بتركيز (N1.5)وذلك باذابة 18.2 غ من Trisفي 80 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 8.8 باستخدام (N 1) من حمض كلور الماء (N 0.1) وأكمل الحجم بعد ذلك إلى 100مل بالماء المقطر.

المحلول الموقي لهلام الرص :(pH 6.8) Stacking gel buffer حضر بتركيز (N 0.5) وذلك بإذابة 6غ منTris في 40 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6.8 باستخدام حمض كلور الماء (N 1) وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

محلول الترحيل :(pH 8.3) Electrode buffer ويتكون من 3.03غ من الـ Tris، 14.4غ غلايسين، و1غ SDS تحل جميعها بالماء المقطر ويعدل الرقم الهيدروجيني إلى 8.3 باستخدام حمض كلور الماء (N 1) وأكمل الحجم إلى ليتر بالماء المقطر.

محلول أكريلاميد : Acrylamide stock solution حضر بإذابة 30غ من أكريلاميد مع 0.8غ من Bis–أكريلاميد Bis-acryl amide في 60 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر، وحفظ في الثلاجة.

محلول :SDS 10%أذيب 10غ من (SDS)في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

محلول بيرسلفات الامونيوم :(APS) Ammonium Per Sulphate حضر آنياً بتركيز)%(1.5 وذلك بإذابة 0.15غ من (APS) في 10 مل من الماء المقطر.

تيميد TEMED) (N,N,N,N-tetra mmethyl ethylene diamine وهو جاهز للاستعمال.

محلول التثبيت :Fixing solution حضر بمزج 50 مل كحول الميثيل مع 10مل حمض الخل و40 مل ماء مقطر.

محلول التصبيغ Staining Solution : حضر باذابة 0.25 غ من صبغة كوماسي الزرقاء(G) في 250 مل من خليط مكون من حمض الخل: كحول المثيل: الماء المقطر بنسبة 5:4:1 على التوالي.

محلول إزالة الصبغة Destaining solution: يتكون من خليط من حمض الخل الثلجي: كحول المثيل: ماء مقطر بنسبة 5:4:1 على التوالي.

محلول صبغة بروموفينول الازرق Bromo phenol blue %0.25 وحضر بإذابة 0.25غ من صبغة بروموفينول الأزرق في 100مل من محلول (50%(من الغليسرول.

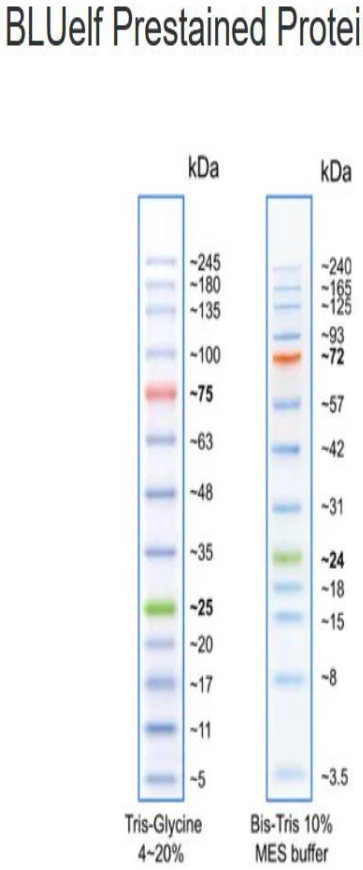
طريقة الترحيل الكهربائي لإنزيم الأسبارجيناز باستخدام SDS-PAGE:

تجمع الأجزاء الخاصة بالترحيل الكهربائي، وتثبت الشرائح داخل إطار الصب باستخدام الملاقط الجانبية، يتم تحضير الهلام بنوعيه: هلام الفصل بتركيز 12% بولي أكريلامايد، وهلام الرص بتركيز 4.5% بولي أكريلامايد حسب الجدول(1) وبدون إضافة المادتين (APS) و(TEMED) لحين صب الهلام في القالب بين الشريحتين مباشرة (Rath *et al.*, 2009,1760; Laemmli,1970,680; Moorthy *et al.*,2010,1862)

الجدول (1) يبين مكونات هلام الفصل وهلام الرص والأحجام المستخدمة.

المادة	الحجم المستخدم لتحضير هلام الفصل	الحجم المستخدم لتحضير هلام الرص
هلام الأكريلامايد	16.25 مل	3.25 مل
ماء مقطر	11.125 مل	8.5 مل
Tris	9.375 مل (1.5 N،pH 8.8)	1.5625مل(1 N،pH 6.8)
SDS 10%	0.375 مل	0.125 مل
APS 10%	0.375 مل	0.125 مل
TEMED	20 ميكروليتر	15 ميكروليتر

يتم صب محلول هلام الفصل حتى الخط الظاهر على الطبق الزجاجي (يحدد بوضع المشط قبل الصب ثم يرسم خط أسفله بمسافة 1 سم) ويكون بوضع عمودي. يتم التخلص من الفقاعات الهوائية بعد الانتهاء من الصب بإضافة كمية من الماء المقطر على سطح الهلام، ثم يترك الهلام ليتصلب. حضر هلام الرص وأضيف إلى القالب بعد أن جفف الماء المقطر باستخدام ورق الترشيح ويوضع المشط داخل الفراغ بين الشريحتين إذ يترك لمدة 20 دقيقة، من ثم يتم سحب المشط من الهلام بحرص حتى لا تتكسر الآبار المتشكلة. يفصل الإطار من قالب الصب وتثبت الشريحتان داخل جهاز الترحيل عن طريق حامل يوضع في خزان الفصل (Bio-Rad tank-California). يغمر الحامل بمحلول الترحيل ويجري تحميل العينات بمقدار 20 ميكروليتر ممزوجة بالصبغة الدالة على الترحيل في الآبار أعلى الهلام، يتم توصيل مزود الطاقة بعد إغلاق الخزان وتوصيل الأقطاب الموجبة والسالبة في أماكنها الصحيحة، ويضبط التيار على 160 فولت وتستمر عملية الترحيل لمدة 3 ساعات، وبعد وصول الصبغة إلى نهاية الهلام يتم رفع الحامل من خزان الفصل وإخراج الهلام من بين الشرائح. يوضع الهلام في حوض التلوين ويضاف محلول التثبيت. يغسل الهلام عدة مرات بالماء المقطر لإزالة آثار محلول التثبيت، ثم يوضع الهلام في محلول التصبيغ لمدة 60 دقيقة حتى ظهور الحزم بشكل واضح. يقدر الوزن الجزيئي للبروتينات المفصولة بالمقارنة مع بروتينات قياسية معروفة الوزن الجزيئي تتراوح أوزانها بين 5-245 كيلو دالتون، والشكل (1) يبين البروتينات القياسية المستخدمة (BlueElf prestained protien) من شركة Jena Bioscience.



الشكل(1) يوضح البروتينات القياسية المستخدمة في الترحيل الكهربائي (BlueElf prestained protien).

ولتحديد الوزن الجزيئي للبروتينات يتم رسم المنحني القياسي، حيث تجرى عملية الترحيل الكهربائي للبروتينات القياسية معروفة الوزن، ويتم فصلها وقياس مسافة الترحيل. يعتمد رسم المنحني القياسي على حركية البروتينات في الهلام، والتي تكون متناسبة طرداً مع لوغاريتم وزنها الجزيئي، ويمثل المنحني القياسي قيم لوغاريتم الوزن الجزيئي) المعروف(مقابل الحركة النسبية RF لتلك البروتينات.

حسبت الحركة النسبية Rf) Relative mobility) لحزم البروتينات القياسية وللإنزيم من المعادلة الاتية:

$$R_f = \frac{D_{protein}}{D_{dye}}$$

حيث تمثل $D_{Protein}$ مسافة ترحيل البروتين، وتمثل D_{dye} مسافة ترحيل الصبغة (Boguth *et al.*, 2000,1037).

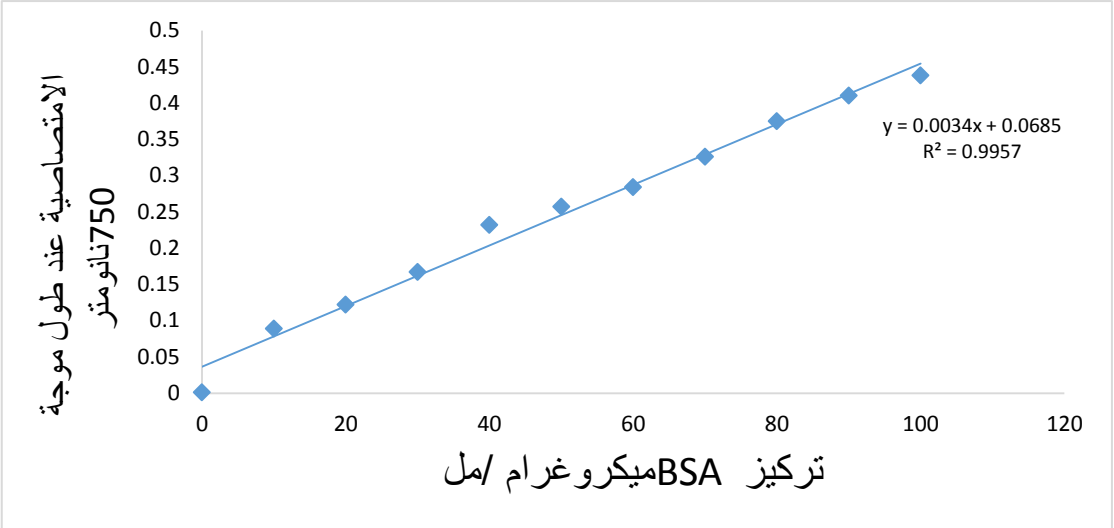
التحليل الإحصائي:

حسبت المتوسطات الحسابية وانحرافاتها المعيارية لتركيز البروتين بواقع مكررين لكل مرحلة من مراحل التنقية مع حساب فروقها المعنوية وذلك على مستوى ثقة 1% باستخدام تحليل التباين ANOVA باستخدام أقل فرق معنوي ضمن البرنامج الإحصائي SPSS الإصدار 17 (SPSS Statistics for Windows, Version 17.0).

النتائج:

المنحنى القياسي لتقدير البروتين:

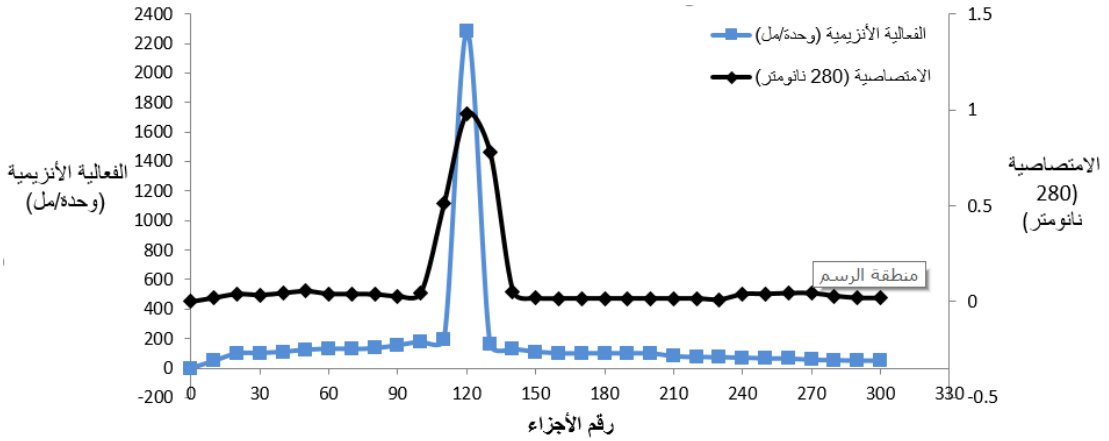
يوضح الشكل (2) العلاقة الخطية بين تراكيز المحلول القياسي (BSA) والامتصاصية وتم حساب تركيز البروتين الناتج بتعويض قيمة الامتصاصية المقاسة قبل وبعد كل مرحلة من مراحل التنقية في معادلة المنحني القياسي.



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

- التنقية على عمود Sephadex G-100

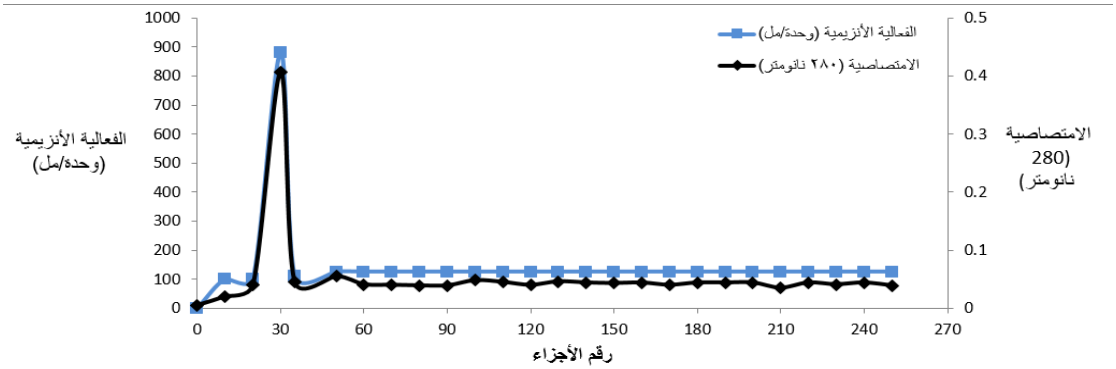
يتضح من الشكل (3) عملية فصل الأسبارجيناز باستخدام هلام , Sephadex G-100 إذ إن الأجزاء التي تم جمعها في الأنابيب ذات الأرقام بين 115-135 (10 مل) أظهرت أعلى امتصاصية عند طول موجة 280 نانومتر، لذلك تم جُمعها حيث أظهرت فعالية عالية لإنزيم الأسبارجيناز .



الشكل (3) يوضح عملية فصل الأسبارجيناز باستخدام هلام Sephadex G-100 .

- التنقية على عمود DEAE-Sepharose :

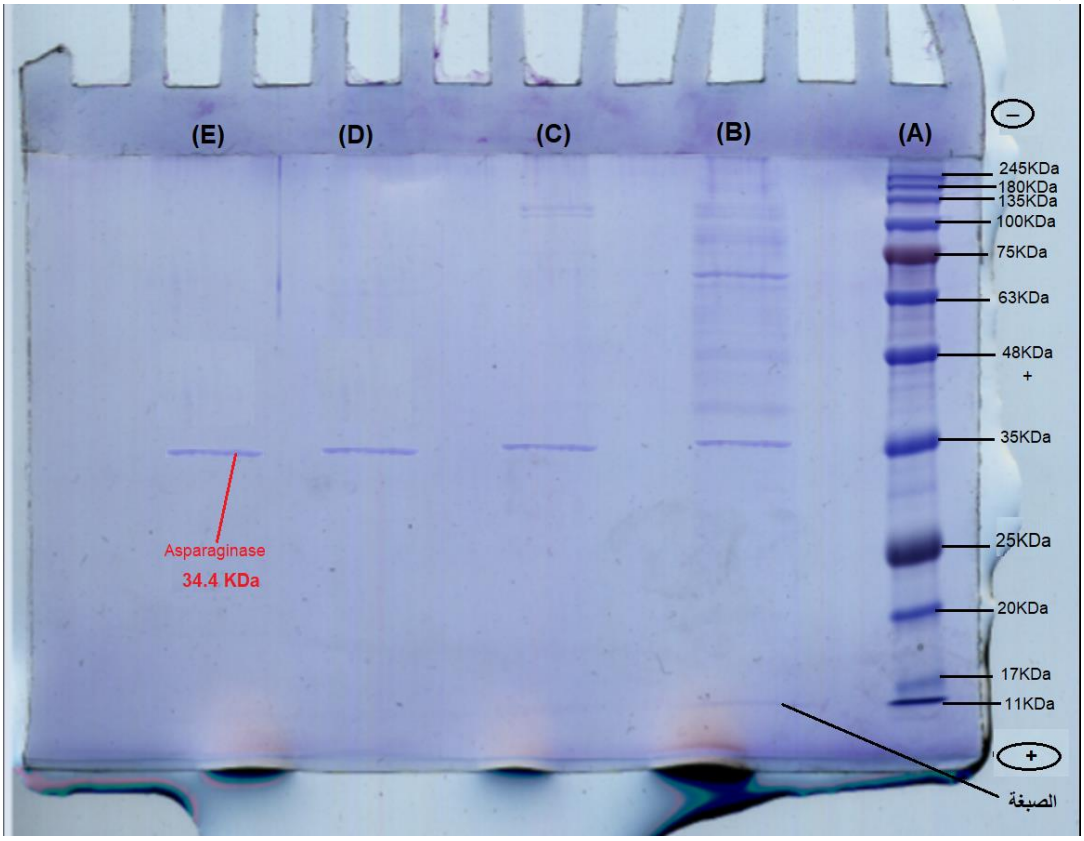
يبين الشكل (4) عملية فصل الأسبارجيناز باستخدام هلام DEAE-Sepharose، إذ إن الأجزاء التي جمعت في الأنابيب بين 20-32 أظهرت أعلى فعالية لإنزيم الأسبارجيناز.



الشكل (4) يوضح عملية فصل الأسبارجيناز باستخدام هلام DEAE-Sepharose

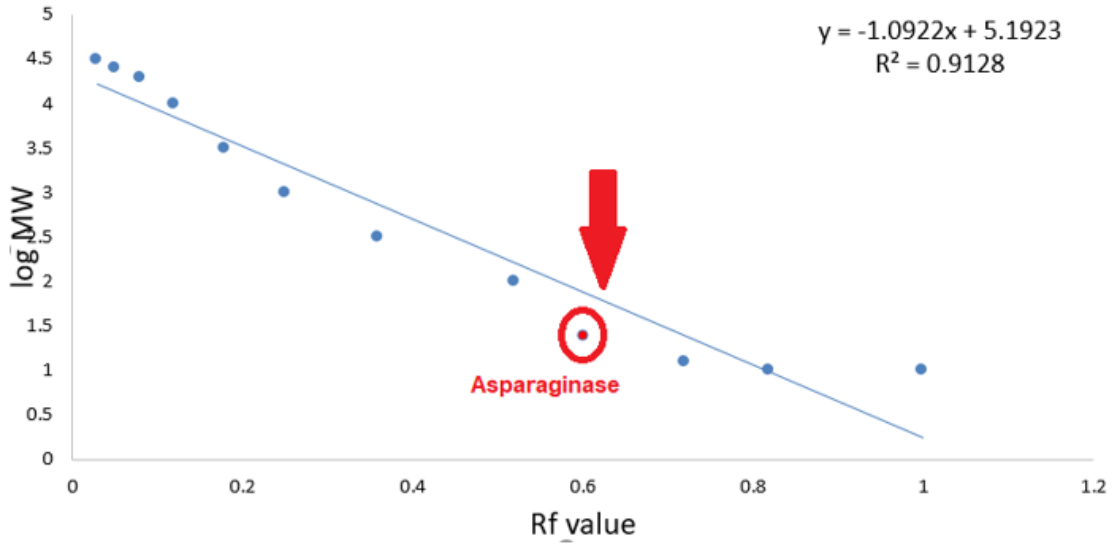
- تعيين الوزن الجزيئي لبروتين الأسبارجيناز باستخدام :SDS-PAGE

بعد إجراء عملية التنقية لإنزيم الأسبارجيناز، تم الاحتفاظ بحجم 50 ميكروليتر من الأجزاء الناتجة عن كل مرحلة من مراحل التنقية في المجمدة عند درجة حرارة 20-°م. يبين (الشكل 5) نتائج عملية الترحيل باستخدام SDS-PAGE حيث يبين المسار (A) نتائج الترحيل الكهربائي لبروتينات معروفة الوزن الجزيئي، يبين المسار (B) نتيجة الترحيل الكهربائي لعينة الإنزيم الخام، يبين المسار (C) نتيجة الترحيل الكهربائي لعينة الإنزيم المرسب بالأسيتون بينما يبين المسار (D) نتيجة الترحيل الكهربائي لعينة البروتين بعد التنقية باستخدام هلام 100-Sephadex G حيث ظهرت حزمة واحدة فقط، أما المسار (E) فيبين نتيجة الترحيل الكهربائي لعينة البروتين بعد تنقيتها باستخدام هلام DEAE-Sepharose وقد ظهرت حزمة واحدة أيضاً .



الشكل (5) يوضح الترحيل الكهربائي لعينات البروتين الناتجة عن مراحل التنقية باستخدام SDS-PAGE. المسار (A) مؤشر لبروتينات معروفة الوزن الجزيئي، المسار(B) عينة الإنزيم الخام، المسار (C) عينة الإنزيم المرسب بالأسيتون، المسار (D) عينة البروتين بعد التنقية باستخدام هلام 100-Sephadex G ، أما المسار (E) عينة البروتين بعد تنقيتها باستخدام هلام DEAE-Sepharose .

وتظهر في هذا الشكل في المسار A الأوزان الجزيئية للبروتينات الناتجة التي حسبت كما يلي: في البداية رسم المنحني القياسي لبروتينات معروفة الوزن الجزيئي (مؤشرات الوزن الجزيئي للبروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض Low molecular weight protein markers) وتم الربط بين قيمة الحركة النسبية RF وقيمة Log(MW)، حيث RF يمثل نسبة المسافة التي قطعها البروتين إلى المسافة التي قطعتها الصبغة الدالة، بينما Log(MW) هو لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات معروفة الوزن الجزيئي 5-245 كيلو دالتون. يبين الشكل(6) المنحني القياسي الناتج. أجريت المواءمة الخطية وفقاً للمعادلة المبينة في هذا الشكل.



الشكل (6)يبين المنحني القياسي الناتج عن الترحيل الكهربائي للبروتينات المعروفة الوزن الجزيئي على هلام SDS-PAGE

ثم حُسب الوزن الجزيئي لكل حزمة في الشكل (الهلام) من خلال قياس نسبة المسافة التي قطعتها الحزمة لكل بروتين معروف الوزن الجزيئي إلى المسافة التي قطعتها الصبغة وتعويضها في معادلة المستقيم المبين في الشكل (6) وبالنتيجة أمكن حساب الوزن الجزيئي للإنزيم المدروس والذي بلغ 34.4 كيلو دالتون.

تباينت الدراسات في تقدير الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجيناز وذلك تبعاً لاختلاف المصدر الميكروبي للإنزيم، فقد تراوح الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجيناز المنتج من جنس *Bacillus* sp. بين 33-48 كيلو دالتون (Silpa *et al*.، 2017,561). كانت النتائج متوافقة مع ما توصل إليه Mahajan وآخرون (11,2014) حيث وجد أن الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجيناز المنتج من *Bacillus licheniformis* هو 33.7 كيلو دالتون، تقاربت النتائج مع ماوجده Qeshmi وآخرون (12,2015) أن الوزن الجزيئي له بلغ 38 كيلو دالتون عند إنتاجه من بكتيريا *Bacillus* sp PG 02 وتقاربت أيضاً مع Alrumman (6,2019) أن الوزن الجزيئي لإنزيم الأسبارجيناز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* هو 37 KDa، بينما اختلف النتائج مع ماتوصل إليهMoorthy وآخرون (20101862،) إلى أن الوزن الجزيئي لبروتين إنزيم الأسبارجيناز هو 45 كيلو دالتون عند إنتاجه من جنس *Bacillus*.

الاستنتاجات

بلغ الوزن الجزيئي لبروتين إنزيم الأسبارجيناز باستخدام هلام SDS-PAGE 34.4 كيلو دالتون. بعد إجراء عملية التنقية باستخدام هلام 100-Sephadex G و هلام DEAE-sepharose تم الحصول على إنزيم نقي وبالتالي أمكن استخدامه بشكل آمن في التطبيقات الغذائية .

المراجع:

- Alrumman., S.A ,Mostafa., Y.S, Al-izran., kh, Alfaifi., M.Y, Taha., T.H, Elbehairi., S.E.(2019). Production and Anticancer Activivty of an L-Asparaginase from Bacillus licheniformis Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. Scientific reports.9, 3756.
- Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A., and Lingappa, K.)2010(. Production, purification and characterization of L-asparaginase from Streptomyces gulbargensis. Brazilian Journal of Microbiol, 41(1),173-178.
- Boguth, G. N., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 21, 1037-1053.
- Bruice, T. C. and Benkovic, S. J. (2000). Chemical basis for enzyme catalysis. Biochemistry, 39, 6267-6274.
- 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.
- 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 (JAEVS) • Vol 8, Issue 1 • P:1- 7.

- Daifallah, V.,yazji, S., Al-Amir,L.(2023). Effects of temperature and storage period on the activity of L-asparaginase produced by a local isolate of Bacillus licheniformis. Revista Brasileria de Gestao Ambintal e sutentablidade . Vol 10 , Issue 26 • P:1287-1292.
- Daifallah, V.,yazji, S., Al-Amir,L.(2021). Asparaginase production by Bacillus spp and its application in reducing acrylamide formation in fried food.PHD thesis.Damascus university. (P:50-70).
- Garfin, D. E. (1990). Purification Procedures. electrophoretic methods. In Murray, E. D. and Deutscher, P (Eds.). Methods in Enzymology. Vol. 185. Academic Press, New York. (pp 425-441).
- Hatamzadeh, S., Rahnama, K., Nasrollahnejad, S., Fotouhifar, K. B., Hemmati, K. H., White, J. F and Taliei, F. (2020). Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from the Asteraceae family plant species of Iran. Peer J, 8(5), 8309-8321.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- 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.
- 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),11-16.
- Moorthy, V., Aishwarya, R., Alagarsamy, S., and Rajesh, T. (2010). Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of Bacillus sp. African Journal of Microbiology Research, 4(18), 1862-1867.
- Narayana, K. J. P., Kumar, K. G., and Vijayalakshmi, M. (2008). L-Asparaginase production by Streptomyces albidoflavus. Indian Journal of Microbiology. 48(3), 331 – 336.
- Nomenclature International Union of Biochemistry and Molecular Biology. IUBMB, (2017).86-94.
- 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, 1(12), 12-19
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G., and Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106 (6), 1760–1765.
- Silpa, S., Bhattacharya, S ., and Venkatanagaraju, E. (2017). Overview on L-asparaginase. World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 6(5), 561-601.