تعيين الظروف المثلى لانتاج الاسباراجينيز من بكتريا S10-1 *Serratia marcescens*

فاتن علي أحمد[1] عباس عبود فرحان[1] حميد مجيد جاسم[2]

1: كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة ديالى

2: كلية العلوم/جامعة النهرين

الخلاصة

درست الظروف المثلى لانتاج انزيم الاسباراجينيز بوساطة بكتريا S10-1 *Serratia marcescens* في وسط انتاج الاسباراجينيز. وقد اشارت النتائج الى ان اقصى انتاج للانزيم قد تم الوصول اليه بتدعيم وسط الانتاج بالمالتوز مصدرا وحيدا للكاربون والطاقة بتركيز 3% , والببتون مصدرا نايتروجينيا بتركيز 2% , ومزيج فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وفوسفات الهيدروجين ثنائية البوتاسيوم بنسبة (1:1) وبرقم هيدروجيني أولي لوسط التخمر مقداره pH7.5 , وتلقيح وسط الانتاج بعدد حي من الخلايا البكتيرية النشطة مقداره 2.2×10^{8} خلية/مل , ثم الحضن بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة. اذ بلغت قيمة الفعالية النوعية لانزيم الاسباراجينيز الخام المنتج في رائق المزرعة البكتيرية تحت هذه الظروف 49.2 وحدة/ملغرام بروتين.

الكلمات الدالة:- انزيم الاسباراجينيز , اقصى انتاج للأنزيم , erratiamarceses.

Optimum conditions for asparaginase production by Serratia marcescens S10-1

Faten Ali Ahmad Abbas Abud Farhan [12]Hameed Majeed Jasim

Diyala University/ College of Euducation for Pure Science

College of Science / Al-Naharin University

Received 21 October 2012 ; Accepted 19 June 2013

Abstract

Optimum conditions for asparaginase production by *Serratia marcescens* S10-1 was studied. Results showed that there was an overproduction obtained includes supplimentation

of the production medium with 3% maltose (as a sole source for carbon and energy) , and 2% pepton (as a nitrogen source) , and a mixture of phosphate source 0f: K_2HPO_4 and KH_2PO_4 in a ratio of (1 : 1) in a concentration of 0.2 % , pH of the production medium was adjusted to pH 7.5 , inoculated with inoculum size of 2.2×10^8 CFU / ml and incubated at 37 °c for 24 hours in shaker incubater at 150 rpm . Under these conditions enzyme specific activity of asparaginase produced by *S. marcescens* S10-1 mutant was reached 57.34 U/ mg.

Key words: *Serratia marcescens ;* L-asparaginase ; Optimum conditions for asparaginase production

المقدمة

ينتمي انزيم الاسباراجينيز (L- asparaginase: E.C 3.5.1.1) الى مجموعة أنزيمات التحلل المائي الذي يعمل على التحلل المائي للحامض الأميني الأسباراجين الى حامض الاسباراتك والأمونيا (1). يوجد نوعان من أنزيم الاسباراجينيز هما الأسباراجينيز I و II, يفرز الأول الى خارج الخلية (Extracellular) بينما يفرز الثاني الى الفسحة البلازمية المحيطة (Periplasmic space) ويمتاز الاخير بأهميته الطبية اذ يستخدم بوصفه عقارا مضادا للسرطان (2, 3), فقد وجد أن معظم الخلايا السرطانية تحتاج الى الأسباراجين لبناء البروتينات الخلوية وبتأثير هذا الانزيم فان الخلايا السرطانية تصبح فاقدة لمتطلبات بناء التراكيب الخلوية البروتينية (4, 5).

ينتج أنزيم الأسباراجينيز من قبل العديد من الكائنات الحية بدائية وحقيقية النواة, ففي بدائية النواة ينتج الأنزيم من بكتريا *E.coli* و *Erwinia aroideae* و *Citrobacter* spp و *P. aeruginosa* و *Enterobacter aerogenes* و *S.marcescens* (6 , 7). أما في الكائنات حقيقية النواة فينتج الانزيم من العديد من الخمائر (مثل *S.cerevisiae*) والاعفان (مثل *Mucor* spp.) والطحالب (مثل *Chlamyedomona* spp) والنباتات كالبزاليا *Pisum sativum* و الترمس *Lupinus angustifolius* (8 , 9).

تؤثر مكونات وسط المزارع المايكروبية وظروف التخمر بشكل كبير في انتاج انزيم الاسباراجينيز كالمصدر الكاربوني والنايتروجيني وتركيزهما في الوسط (10 , 11) , كما لوحظ ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لوسط أنتاج الأنزيم يتراوح بين 7 و 8 (12) , والدرجة الحرارية المثلى 35 الى 37 م (13). وفقا لما تقدم فقد هدفت الدراسة الى تعيين الظروف المثلى لانتاج الأسباراجينيز من بكتريا *Serratia marcescens* S10-1 .

المواد وطرائق العمل

أوساط التنمية والأنتاج

تم تنمية وتنشيط العزلة البكتيرية *Serratia marcescens* S10-1 التي تم الحصول عليها من قسم التقانة الاحيائية/جامعة النهرين في وسط لوريا-بيرتاني السائل المكون من (غم/لتر): ببتون,10غم ; مستخلص الخميرة, 5غم ; و كلوريد الصوديوم, 10غم . في حين تم تعيين الظروف المثلى لأنتاج الأسباراجينيز من العزلة البكتيرية بأستخدم وسط انتاج الاسباراجينيز المكون من (غم/لتر): أسباراجين ,20 غم ; فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين , 2 غم ; وكبريتات المغنيسيوم ,5 غم ، ثم الحضن بدرجة حرارة 37 لمدة 24 ساعة.

تقدير فعالية أنزيم الاسباراجينيز

تم تقدير فعالية انزيم الأسباراجينيز وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Imada واخرون (14) وذلك بتنمية العزلة *Serratia marcescens* S10-1 في وسط مرق تربتكيز الصويا، وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة,ثم رسبت الخلايا بالنبذ المركزي المبرد (5000 دورة/دقيقة) لمدة 20 دقيقة ، أهمل الرائق وغسلت الخلايا مرتين بدارئ الترس ثم أضيف اليها 5 مل مــن محلول الأسباراجين (0.1 مولار). حضر المحلول الصفري (Blank) باضافة الخلايا بعد غسلها مرتين بدارئ الترس بـ 5 مل من محلول التفاعل ثم اضافة 1.5 مل من حامض الخليك ثلاثي الكلور (TCA) بتركيز 1.5 مولار . حضنت الخلايا بواقع مكررين في حمام مائي هزاز لمدة ساعتين بدرجة 37م . اوقف التفاعل باضافة 1.5 مل من حامض الخليك ثلاثي الكلور (TCA) بتركيز 1.5 مولار ، ثم رسبت الخلايا بالنبذ المركزي المبرد بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة. اخذ الرائق الى انابيب اختبار نظيفة، وقدر تركيز الامونيا المتحررة بفعل أنزيم الأسباراجينيز حسب طريقة النسلرة المباشرة الموصوفة من قبل Imada واخرون (14), وحسبت الفعالية الأنزيمية من خلال المعادلة:

$$\text{الفعالية (وحدة/مللتر)} = \frac{\text{تركيز الامونيا المتحررة}}{\text{زمن التفاعل (دقيقة)} \times 14} \times \text{حجم النموذج}$$

عرفت وحدة الفعالية على أنها كمية الانزيم التي تحرر 1 مايكرومول من الأمونيا خلال دقيقة واحدة من زمن التفاعل تحت ظروف التجربة.

تقدير تركيز البروتين

قدر تركيز البروتين وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Bradford (15) من خلال المنحنى القياسي لألبومين المصل البقري.

تعيين الظروف المثلى لانتاج انزيم الاسباراجينيز.

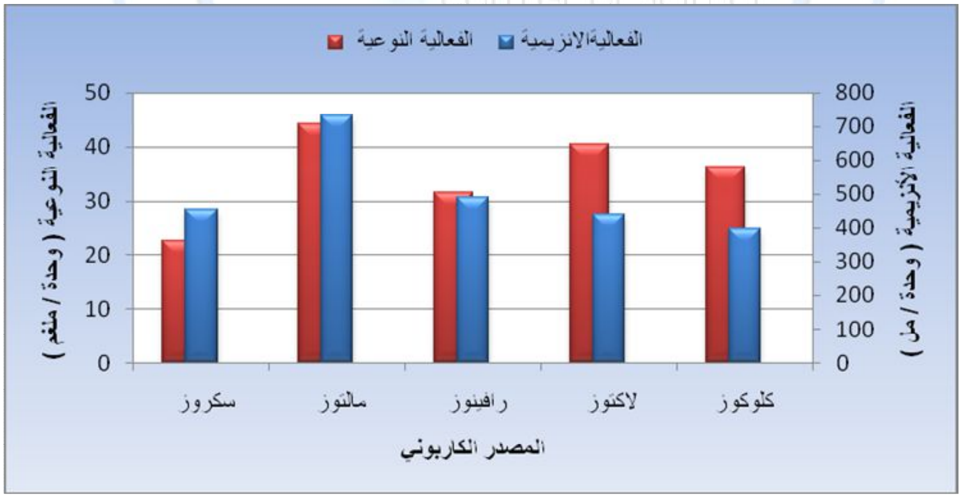
تم تعيين الظروف المثلى لانتاج الاسباراجينيز من العزلة *S.marcescens* S10-1 بدراسة تأثير العوامل المؤثرة في أنتاج الأنزيم والتي تضمنت نوع المصدر الكاربوني وتركيزه ، نوع المصدر النتروجيني وتركيزه ، مصدر الفوسفات ، الرقم الهيدروجيني لوسط الأنتاج ، مدة الحضن ، درجة الحرارة ، حجم اللقاح و التهوية .

النتائج والمناقشة

الظروف المثلى لانتاج الاسباراجينيز

تأثير مصدر الكاربون

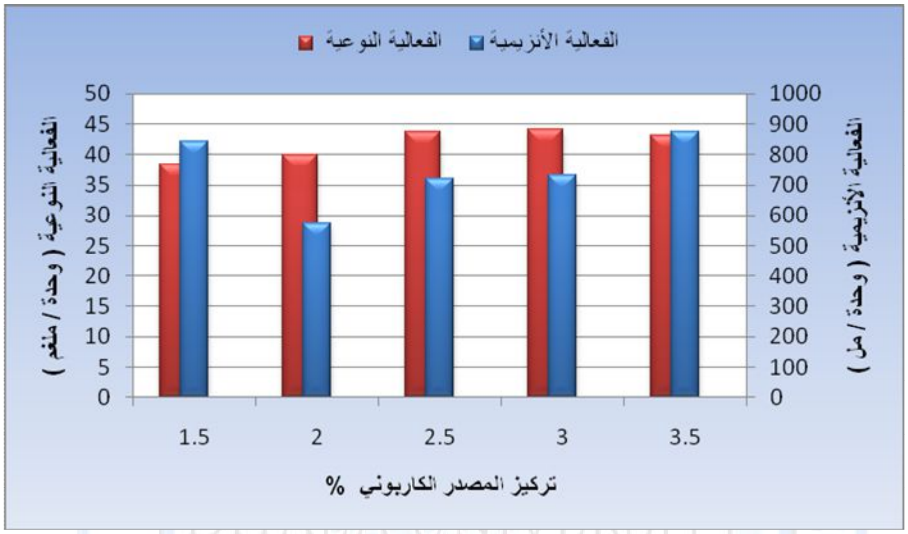
تشير النتائج المبينة في الشكل (1) الى أن سكر المالتوز هو المصدر الكاربوني الأمثل في حث أنتاج الأسباراجينيز من بكتيرية *S.marcescens* S10-1 ، أذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم المنتج منها 44.18 وحدة/ملغم بروتين مقارنة بالفعالية النوعية للانزيم المنتج بأستخدام المصادر الكاربونية الأخرى (اللاكتوز بفعالية نوعية مقدارها 40.53 وحدة/ملغم بروتين والكلوكوز 36.17 وحدة/ملغم بروتين والرافينوز 31.47 وحدة/ملغم بروتين ثم السكروز 22.55 وحدة/ملغم بروتين) . وتعد هذه النتائج موافقة لما أشار اليه Deokar واخرون (12) من ان المالتوز هو الوسط الكاربوني الأمثل لأنتاج الأسباراجينيز من بكتريا*Erwinia carotovora* مقارنة بالسكروز والكلوكوز والفركتوز.



شكل (1): تأثير مصدر الكاربون على قابلية بكتريا *S.marcescens* S10-1 في أنتاج أنزيم الأسباراجينيز بعد الحضن بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة

تأثير تركيز المالتوز

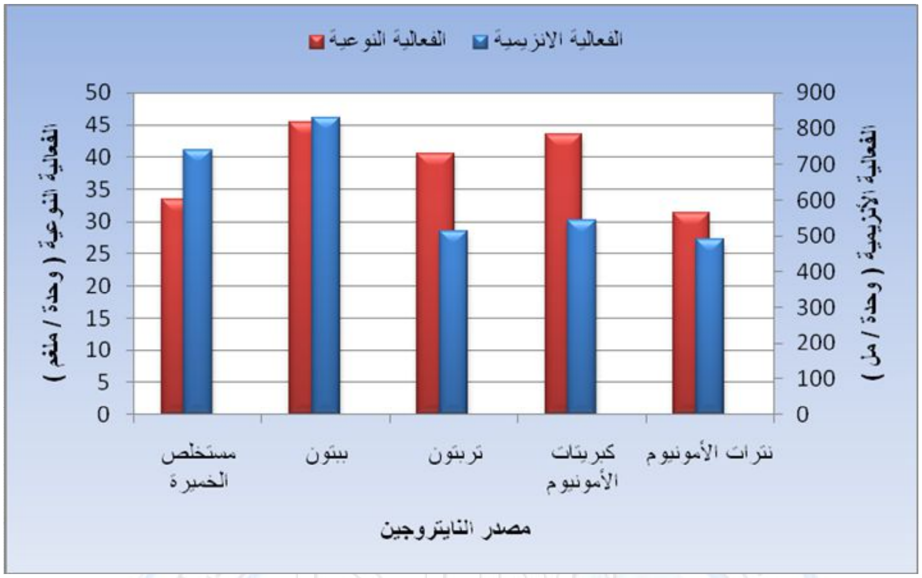
تشير النتائج المبينة في الشكل (2) الى أن أعلى أنتاجية للأسباراجينيز كانت باضافة المالتوز الى وسط الأنتاج بتركيز 3% ، إذ بلغت قيمة الفعالية النوعية 44.18 وحدة/ملغم بروتين للأسباراجينيز المنتج من بكتريا S10-1 *S.marcescens* .



شكل (2) : تأثير تركيز المالتوز على قابلية بكتريا S10-1 *S.marcescens* في أنتاج الأسباراجينيز بعد الحضن بدرجة 37م لمدة 24 ساعة

تأثير مصدر النايتروجين

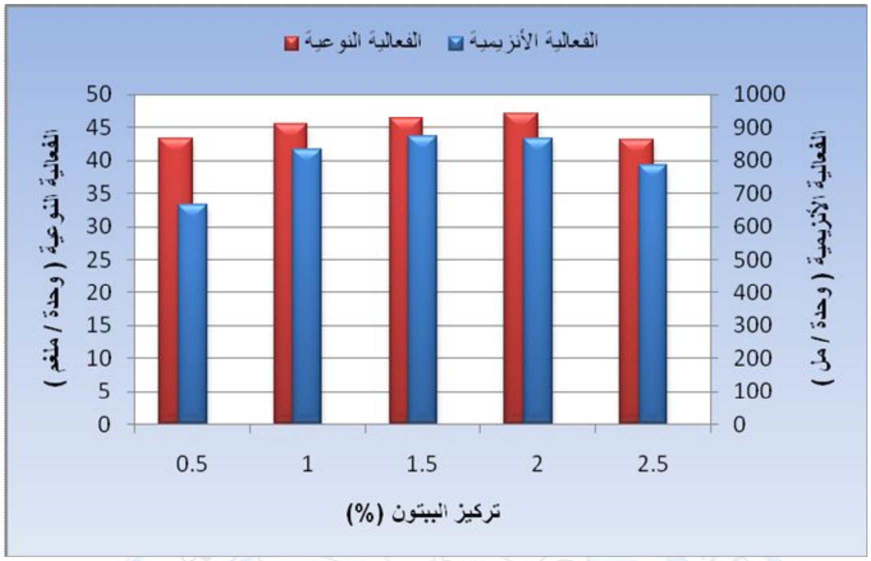
تشير النتائج المبينة في الشكل (3) الى أن أفضل مصدر نتروجيني لأنتاج الأسباراجينيز من S10-1 *S.marcescens* هو الببتون ، إذ أعطى اعلى فعالية نوعية مقدارها 45.45 وحدة/ملغم بروتين مقارنة ببقية مصادر النايتروجين (كبريتات الامونيوم التربتون ومستخلص الخميرة ونترات الأمونيوم على التوالي). وتعد هذه النتائج موافقة لما توصل اليه Venil وآخرون (16) من أن الببتون هو المصدر النايتروجيني الأمثل لكل من نمو الكتلة الحيوية وانتاج الاسباراجينيز من بكتيريا SBO8 *S.marcescens* من خلال توفيره للأحماض الامينية الضرورية لذلك.



شكل (3):تأثير المصدر النتروجيني في أنتاج الأسباراجينيز من *S.marcescens* S10-1 بعد الحضن بدرجة 37م لمدة 24ساعة

تأثير تركيزالببتون

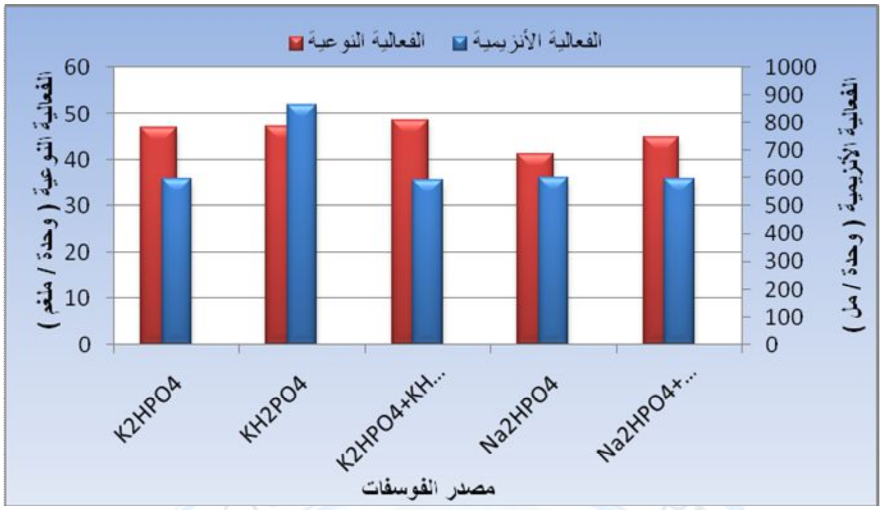
تشير النتائج المبينة في الشكل (4) الى أن أضافة الببتون بتركيز 2% ساعد في الحصول على أعلى فعالية نوعية لأنتاج الاسباراجينيز من بكتريا *S.marcescens* S10-1 ومقدارها 47.13 وحدة/ملغم بروتين ، ويلاحظ من هذه النتائج ان هناك زيادة تدريجية للفعالية النوعية بزيادة تركيز الببتون حتى الوصول الى 2% , ثم تنخفض بزيادة التركيز الى 2.5%. ويمكن أن يعزى هذا الأرتفاع التدريجي في الفعالية الى زيادة تركيز محتوى الحوامض الامينية في الوسط مما أدى بدوره الى زيادة الكتلة الحيوية وزيادة أنتاج الأسباراجينيز ، غير أن ذلك يبلغ حداً معيناً ليصبح فيه زيادة تركيز المصدر النتروجيني في الوسط ذو تأثير مثبط في أنتاج الأسباراجينيز.



شكل (4) : تأثير تركيز الببتون في أنتاج الأسباراجينيز من S10-1 *S.marcescens* بعد الحضن بدرجة 37م لمدة 24ساعة

تأثير مصدر الفوسفات

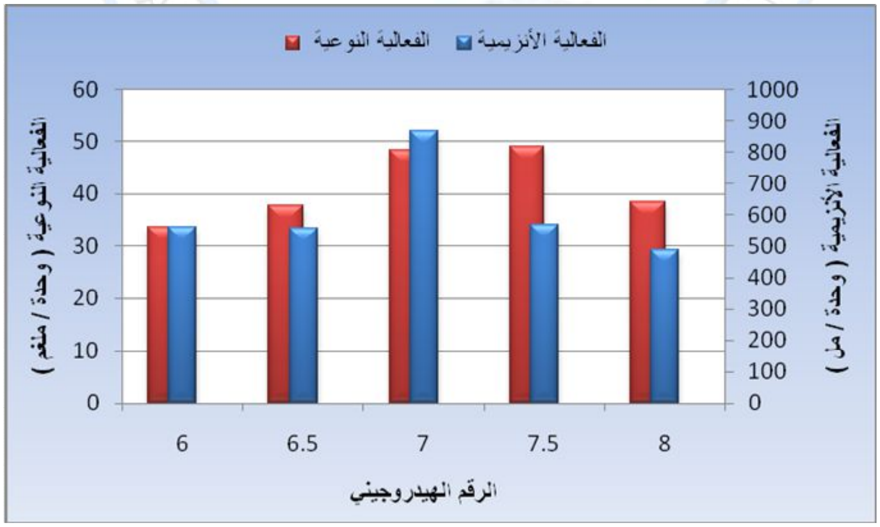
تشير النتائج المبينة في الشكل (5) الى أن الأنتاج الأمثل لأنزيم الأسباراجينيز من بكتريا S10-1 *S.marcescens* قد تحقق بأضافة مزيج مصدر الفوسفات (K_2HPO_4+ KH_2PO_4) بنسبة (1:1) إذ أعطت أعلى فعالية نوعية مقدارها 48.45 وحدة/ملغم بروتين، في حين كانت الفعالية النوعية لبقية المصادر K_2HPO_4، KH_2PO_4، Na_2HPO_4، NaH_2PO_4+Na_2HPO_4 أقل نسبياً (46.88 ، 47.13 ، 41.29 ، 44.85 وحدة/ملغم بروتين على التوالي).



شكل (5): تأثير المصدر الفوسفاتي على أنتاج الأسباراجينيز من *S.marcescens* S10-1 بعد الحضن بدرجة 37م لمدة 24ساعة

تأثير الرقم الهيدروجيني للوسط

أن للرقم الهيدروجيني تأثيراً على أنتاجية الأنزيم لأن له دوراً في ذوبانية المواد التغذوية في الوسط ويؤثر على تأين المادة الأساس بالأضافة الى أنه يؤثر على أستقرارية الأنزيم المنتج (17) .تشير النتائج المبينة في الشكل (6) الى أزدياد الفعالية النوعية لأنزيم الأسباراجينيز المنتج من خلايا *S.marcescens* S10-1 بزيادة الرقم الهيدروجيني لوسط الأنتاج ، فقد تم الحصول على أعلى فعالية نوعية (49.16 وحدة/ملغم بروتين) عندما كان الرقم الهيدروجيني لوسط الانتاج 7.5 ثم تنخفض الفعالية النوعية بزيادة او انخفاض الرقم الهيدروجيني لوسط الانتاج .

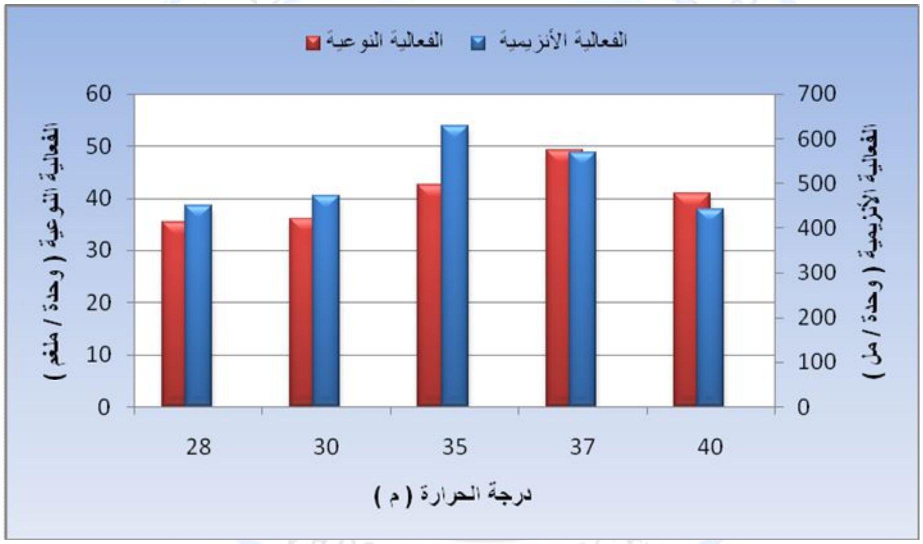


شكل(6): تأثير الرقم الهيدروجيني في أنتاج الأسباراجينيز من *S.marcescens* S10-1 بعد الحضن بدرجة 37م لمدة 24 ساعة

أشارت دراسة اخرى الى ان الانتاج الامثل لانزيم الاسباراجينيز المنتج من بكتريا *Erwinia carotovora* كان عند الرقم الهيدروجيني 8.6 (Kamble وآخرين (2006)) . أن الزيادة أو النقصان في تركيز أيونات الهيدروجين (H^+) يسبب تغير في الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي والذي يقود الى تغيير جذري في التركيب الثلاثي للبروتين يسبب تنافس H^+ او OH^- مع الروابط الهيدروجينية أو الروابط الأيونية في الأنزيم وبالتالي مسخ للأنزيم (18) .

تأثير درجة الحرارة

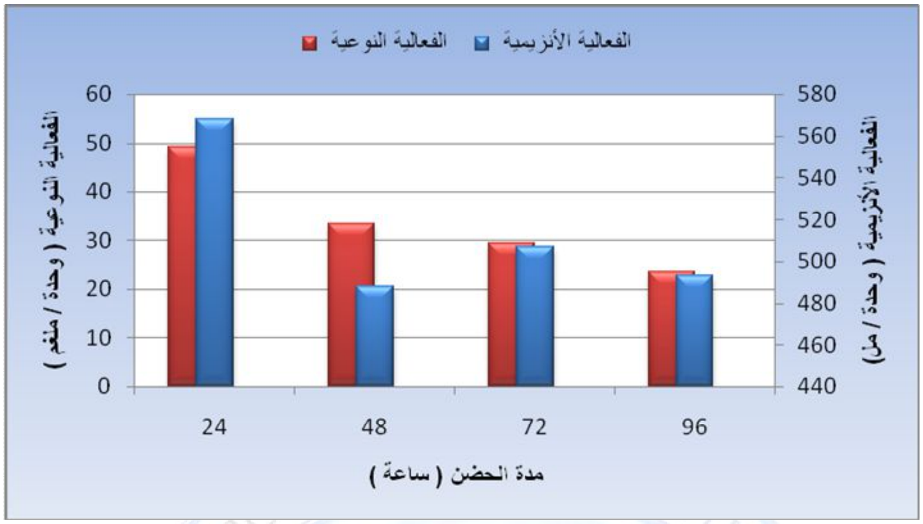
تشير النتائج المبينة في الشكل (7) الى ان الدرجة الحرارية المثلى لوسط التخمر الملائمة لانتاج الاسباراجينيز من بكتريا *S.marcescens* S10-1 هي 37 °م , اذ بلغت عندها الفعالية النوعية للانزيم 49.16 وحدة/ملغم بروتين. إن التغير في درجة الحرارية لوسط التخمر عن الدرجة المثلى لأنتاج الأنزيم قد يؤدي الى أنخفاض سرعة التفاعل بفعل عملية مسخ البروتين أو فقدان خصائص التركيب الثلاثي للبروتين (17).



شكل (7): تأثير درجة الحرارة في أنتاج الأسباراجينيز من *S.marcescens* S10-1 عند التنمية في وسط الأنتاج برقم هيدروجيني 7.5 لمدة 24 ساعة

تأثير مدة الحضن

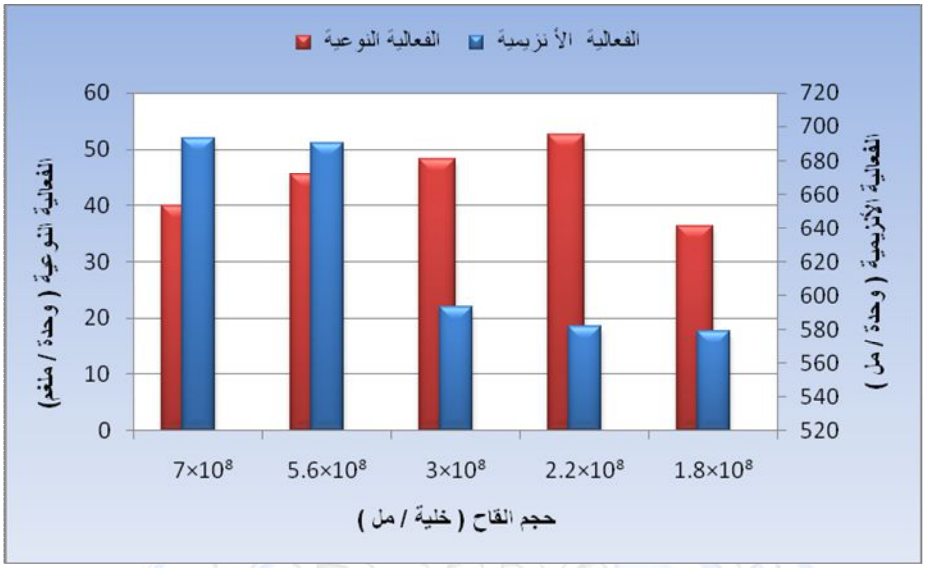
تشير النتائج المبينة في الشكل (8) الى ان المدة الزمنية المثلى لانتاج الأسباراجينيز من بكتريا S10-1 *S.marcescens* هي 24 ساعة . اذ بلغت عندها الفعالية النوعية للانزيم 49.2 وحدة/ملغم بروتين ثم تنخفض تدريجيا بزيادة مدة الحضن. تعد هذه النتائج مماثلة لتلك التي توصل اليها Navak و Phillip (20) الذي توصل الى أن أعلى أنتاج للاسباراجينيز II من *S.marcescens* ATCC60 بعد 24 ساعة من الحضن.



شكل (8): تأثير مدة الحضن في أنتاجية الأسباراجينيز من *S.marcescens* S10-1 عند زرعها في وسط الأنتاج برقم هيدروجيني7.5 وحضنها في درجة 37م .

تاثير حجم اللقاح

تشير النتائج المبينة في الشكل (9)) الى ان العدد الامثل لخلايا البكتريا *S.marcescens* S10-1 الملائم لأنتاج الاسباراجينيز هو 2.2×10^{8} خلية/مل أذ بلغت الفعالية النوعية للاسباراجينيز المنتج منها 52.53 وحدة/ملغم بروتين ، في حين تنخفض الفعالية النوعية بزيادة او انخفاض عدد الخلايا عن هذا العدد. يستدل من هذه النتائج أن الأعداد الكبيرة للخلايا يؤدي الى أنخفاض انتاج الانزيم بسبب التنافس الشديد على المواد الغذائية الاساسية للوسط الزرعي فضلاً عن تجمع نواتج الايض الثانوي مما يؤدي الى تثبيط نمو الخلايا وأنخفاض الانتاج، وان الأعداد القليلة للخلايا في الوسط يؤدي الى عدم الأستغلال الامثل للمواد الغذائية مما يؤثر سلبياً في أنتاج الأنزيم (19) .



شكل (9):تأثير حجم اللقاح في أنتاج الأسباراجينيز من ابكتريا *S.marcescens* S10-1 عند زرعها في وسط الأنتاج برقم هيدروجيني 7.5 بدرجة 37م لمدة 24 ساعة

Reference

1. Swain , A.L. ; Jaskoliski, M.; Houssert, D.; Rao, J. K. and Woldawer, A. (1993). Crystal structure of *E.coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90 (4): 1474-1478.
2. Krogh, C.M.E. (1992). Ed. Compendium of pharmaceuticals and specialties. (27th ed). Ottawa: *Canadian* pharmaceutical Association. P.590.
3. Obama, K. ; Tara, M. and Nina, K. (1999). L-asparaginase induced complete remession in Epstein- Barr virus, positive, multidrug resistant cutaneaus T-cell lymphoma. Int.J. Hematol., 69: 260-262.
4. Savitri, N.A. ; Wamik, A. (2003). Microbiol L-asparaginase: A potent Antitumor Enzyme.J. Biotech., 2:184-194.
5. Dhevagi, P.; Poorani, E. (2006). Isolation and characterization of L-asparaginase from marine *actinomycetes*. J. Biotech., 5: 514-520.

6. Geckil,H.; Ates, B.; Gencer, S. ; Uckun,M. and Yilmaz, I. (2005). Membrane permeabilization of gram negative bacteria with apotassium phosphate/ hexane aqueous phase system for the release of L- asparaginase an enzyme used in Cancer therapy. P. Biochem., 40: 573-9.
7. Abdel Fattah, Y.R; Olama, Z.A. (2002). L- asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid state culture evaluation and optimization of culture conditions using facterial designs. Process Biochem., 38(1): 115-122.
8. Ferrara, M.A. ; Mattoso, J.M. ; bon, E.P. and Pereira, Jr.C. (2000). Kintetics of asparaginase II fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. Uve2da 180 mutant: effect of nitrogen. Appl. Biochem. Biotechnol., 116: 299- 305.
9. Vincze, E.; Reeves, J.M. ; Lamping, E.; Farnden, K.J. and Reynolds, P.H. (1999). Repression of the L- asparaginase gene during nodule develop in lupines anagustifolius . plant Mol. Biol., 26 (1): 303-311.
10. Shah, A.J. ; Karadi, R.V. ; Parekh, P.P. (2010). Isolation Optimization and production of L-asparaginase from Coliform Bacteria. Asian J. Biot., ISSN 1996-0700.
11. Nawaz, M. S. ; Zhang, D. ; Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. (1998). Isolation and characterization of *Enterobacter cloacae* capable of metabolizing asparaginase . Appl. Microbiol . Biotech ., 50(5): 568-572.
12. Deokar, V.D. ; Vetal, M. D. Rodrigues,L. (2010). Production of intracellular asparaginase from *Erwinia coratovora* and its statistical optimization using response surface methodology (RES). Int.J. Chem., 1(1): 25-36.
13. Moorthy, V.; Ramalingam, A.; Sumantha, A.;Shankaranaya, R.T.(2010). Production, Purification and characterization of extracellular L-asparaginase from soil isolate of *Bacillus* sp. J. Micro.,4(18): 1862-1867.
14. Imada, A.; Igarasi, S.; Nakahama, K. and Isono, M. (1973). Asparaginase and glutaminase activities of micro- organisms. J. Gen. Microbial., 76: 85-99.
15. Bradford , M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein using the principle of protein- dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.

16. Venil, Ch.K.; Nanthakumar, K.; Karthikeyyan, K.; Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). Production of L-asparaginase by *Serratia marcescens* SB08: Optimization by response surface methodology. J. of Biotech., 7 (1) : 10-18.
17. Hammami, R.; Zouhir, A.; Ban Hamida, J. and Fliss, I. (2007). Bacteriocin characterization. BMC Microbiol. 17: 89-99.
18. Tortora, G.J. ; Funke, B.R. and Case, C.L. (2004). Microbiology. (8^{th} ed) pearson Education, Inc. San Francisco- NewYork.
19. Rose, A.H. (1976). Chemical Microbiology: An introduction to microbial physiology. (3^{rd} ed). Butter worths, London. Boston.
20. Navak, E.K. and Phillips, A.W (1974). L-glutamine as a substructure for L- asparaginase from *Serratia marcescens*. J. Bact., 117 (5): 593-600.