

## خالص سازی و تعیین خصوصیات کیتیکی آنزیم آسپاراژیناز در باکتری

*Serratia marcescens*

لیلا آب خوبی، داریوش مینایی تهرانی\*، مینا کلاهدوز محمدی، فرشته افتخار، نیلوفر کرجی، فرزانه میر فخار و نازنین

وزیری تبار

تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۹

## چکیده

آسپاراژیناز یک آنزیم هیدرولاز می باشد که آسپاراژین را به آمونیم و آسپارتیت تبدیل می کند. این آنزیم کاربرد مؤثری در درمان لوسمی لنفوبلاستیک دارد. *Serratia marcescens* یک باکتری گرم منفی است که کلنیهای آن دارای رنگیزه قرمز می باشند که می تواند در صورت حضور آسپاراژین در محیط کشت خود، تولید آنزیم آسپاراژیناز نماید. در این تحقیق آنزیم آسپاراژیناز از محیط کشت *Serratia* خالص سازی و همچنین فاکتور های کیتیکی آن تعیین شد. باکتری *Serratia* در محیط مایع حاوی پپتون، عصاره مالت و آسپاراژین کشت شد و محیط بعد از ۴۴ ساعت سانتریفیوژ شد و محلول رویی که دارای آنزیم آسپاراژیناز بود برای مطالعات کیتیکی و خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت. مراحل تخلیص آنزیم با استفاده از رسوب دهی با آمونیم سولفات و به دنبال آن دیالیز و ستون کروماتوگرافی DEAE سلولز انجام شد. انجام الکتروفورز به روش SDS-PAGE باندی با وزن مولکولی تقریبی حدود ۵۴ kDa را بر روی ژل نشان داد که نشان دهنده خلوص آنزیم بود. مقایسه تأثیر تغییرات pH (۱۰-۴) بر فعالیت آنزیم نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم در pH ۷ است، و بررسی تغییرات دما بر فعالیت آنزیم نشان داد که بیشترین فعالیت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد می باشد. همچنین مقدار فاکتور های کیتیکی  $V_{max}$  و  $K_m$  در این آنزیم مشخص گردید.

واژه های کلیدی: آنزیم، آسپاراژیناز، *Serratia marcescens*، فاکتور های کیتیکی، خالص سازی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۹۹۰۳۱۴۴، پست الکترونیکی: D\_MTehrani@sbu.ac.ir

## مقدمه

مشخص شد که این سلولها به حضور آسپاراژین به عنوان یک اسید آمینه برای رشد در محیط کشت بافت نیاز دارند. در سال ۱۹۶۹، Campbell (۶) نشان داد که آسپاراژیناز به دست آمده از *E. coli* نیز دارای فعالیت ضد سرطانی می باشد. این یافته ها منجر به تشخیص آنزیم آسپاراژیناز برای درمان لوسمی شد و محققین را برای تولید بیشتر و تحقیقات بر روی آنزیم آسپاراژیناز تشویق نمود. امروزه آسپاراژیناز مورد استفاده در پزشکی شامل دو فرم دست نخورده و طبیعی می باشد که از دو باکتری *E. coli* و همچنین یک *Erwinia aroideae* خالص سازی شده است.

آسپاراژیناز (EC: 3.5.1.1) یک آنزیم هومو تترامر است که سبب شکستن آسپاراژین به آسپارتیک اسید و آمونیاک می شود. طبق مشاهدات Kidd در سال ۱۹۵۳ (۱۱)، قدرت درمانی آسپاراژیناز توسط فعالیت آن در سرم خوکچه هندی کشف شد که باعث بهبود سرطان لنفومای پیوند زده شده در موش و نیز موش صحرائی شد. مطالعات بعدی توسط Broome در سال ۱۹۶۱ نشان داد (۴) که فعالیت ضد سرطانی سرم خوکچه هندی به واسطه آنزیم آسپاراژیناز بوده است. در آزمایشات انجام شده در سلولهای کارسینومای Walker 256 و لوسمی L5178،

است. در آنزیم جدا شده از *E. coli* هیچ گونه اسید آمینه تریپتوفان و سیستئین و پیوند دی سولفید یافت نشد در حالی که در *Er. carotovora* حضور آنها مشخص شده است (۹). محیط رشد و کشت باکتری در مقدار تولید اسپاراژیناز و همچنین در ایجاد ایزوزیمهای اسپاراژیناز مؤثر است. در یک مطالعه، یک محیط حداقل و مناسب برای ردیابی و جستجوی باکتریهای *E. coli* جدا شده از رودخانه، پساب و نمونه های کلینیکی ساخته شد که توسط این محیط به خوبی باکتریهای تولید کننده آنزیم اسپاراژیناز از لحاظ کمی مشخص می شد (۷). همچنین یک محیط غنی طراحی شد که می توانست بهترین حالت را برای تولید اسپاراژیناز را در باکتری *Erwinia carotovora* ایجاد کند (۱۳).

در این تحقیق، تولید اسپاراژیناز در باکتری *Serratia* در یک محیط کشت جدید مورد مطالعه قرار گرفت و تفاوت وزن مولکولی آنزیم در محیط جدید با آنزیمهایی که در مطالعات قبلی گزارش شده بودند بررسی شد. همچنین فاکتورهای کینتیکی آنزیم مشخص شد.

### مواد و روشها

**سویه باکتری:** در این تحقیق از *Serratia Marcescens* سویه ATCC 60 که از آزمایشگاه باکتریولوژی دانشگاه شهید بهشتی فراهم آمد، جهت تولید آنزیم اسپاراژیناز استفاده گردید. ابتدا باکتری بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار حاوی ۰/۵ درصد گلوکز کشت و نگهداری شد. سپس برای تولید آنزیم باکتری در محیط کشت حاوی ۰/۵ g/L پپتون، ۰/۵ g/L عصاره مالت، ۰/۵ g/L اسپاراژین به مدت ۴۴-۴۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌گذاری شد.

**سنجش فعالیت آنزیم:** به هنگام کشت باکتری در محیط مایع حاوی اسپاراژین، آنزیم در محیط کشت آزاد می شود. جهت تعیین فعالیت آنزیم اسپاراژیناز، ۱ ml از سوپرناتانت

شکل تغییر یافته از آنزیم به نام PEG-L-asparaginase به دست آمده از *E. coli* تهیه شده است که شامل فرم طبیعی آنزیم است که به طور کووالانسی به monomethoxypolyethyleneglycol متصل شده است و در بیماری استفاده می شود که حساسیت بالا به فرم طبیعی آنزیم دارند (۶).

اسپاراژیناز در درمان بیماری لنفوبلاستیک لوسمی حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) و نیز در درمان لوسمی حاد میلوئوسیتیک و میلوئوسیتیک، لنفوماهای هوچکینی و غیرهوکینی و ملانوسارکوما به کار می رود (۳) سلولهای سرطانی در سنتز اسید آمینه غیر ضروری اسپاراژین ناتوان می باشند، در حالی که سلولهای طبیعی قادر به تولید اسپاراژین مورد نیاز خود هستند. حضور آنزیم اسپاراژیناز در خون سبب تجزیه اسپاراژین شده و سلولهای سرطانی را از دسترسی اسپاراژین موجود در خون محروم می نماید (۱۶). اسپاراژیناز در میان عوامل شیمی درمانی سرطان حداقل به دو دلیل منحصر به فرد است. اول اینکه آنزیم می تواند فعالیت سیتوتوکسیتی خود را در مکانهایی دور از تومور اعمال نماید و دوم اینکه اسپاراژیناز یک پروتئین کاتالیتیکی است و یک مولکول از آنزیم هزاران مولکول اسپاراژین را در عرض یک دقیقه کاهش می دهد (۱۴).

باکتریهای زیادی از جمله *Escherichia coli*، *Serratia*، *Erwinia aroideae marcescens*، *Proteus vulgaris* و *Mycobacterium tuberculosis* قادر به تولید آنزیم اسپاراژیناز می باشند (۱، ۶ و ۱۵). مقایسه اسپاراژیناز خالص شده از باکتریها نشان دهنده تنوع در ساختمان و فعالیت آنها است. مقایسه اسپاراژیناز به دست آمده از باکتریهای *E. coli* و *Erwinia carotovora* تفاوت زیادی را در رفتار آنها نشان داد به طوری که آنزیم جدا شده از *Er. carotovora* بسیار قلبایی تر، در طیف وسیعی از تغییرات pH (۳ تا ۱۲) فعال و در pH قلبایی بسیار مقاوم

به دست آمده از سانتریفیوژ کشت باکتری با ۱ ml بافر تریس (۸ pH، ۰/۱ M) و ۰/۵ ml آسپاراژین ۶ mg/ml مخلوط شد. پس از ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، به هر لوله ۳۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۵ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) اضافه شد و لوله‌ها سانتریفیوژ گردیدند. پس از افزودن محلول نسلر (معرف نسلر برای تولید رنگ و سنجش آمونیاک تولید شده استفاده می‌شود) به ۱ ml از سوپرناتانت نمونه‌های سانتریفیوژ شده، جذب نوری در ۴۱۰ nm خوانده شد.

**مطالعه کینتیک آنزیمی:** تعیین فعالیت آنزیم و پارامترهای کینتیکی شامل  $V_{max}$  و  $K_m$  آنزیم با استفاده از محلول کشت باکتری (بدون رسوب دهی با آمونیوم سولفات) انجام گرفت. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت حاوی آنزیم به همراه ۱ ml بافر تریس ۰/۱ M با pH ۷ و ۵۰۰ میکرولیتر سوسترای آسپاراژین با غلظت‌های ۰/۱ mM، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵ استفاده شد. لوله‌ها به مدت ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بقیه مراحل مطابق روش ذکر شده در سنجش کمی آنزیم انجام شد و جذب نوری محلولها در ۴۱۰ nm اندازه‌گیری گردید.

**تعیین دما و pH بهینه فعالیت آنزیم:** برای این منظور نیز از محلول رویی کشت سلول استفاده شد، فعالیت آنزیم در دماهای ۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. برای تعیین pH بهینه نیز فعالیت آنزیم در pH های مختلف شامل بافر گلیسین (۳ pH)، استات (۴-۵ pH)، فسفات (۶-۷ pH)، تریس (۸ pH)، بورات (۹-۱۰ pH) اندازه‌گیری شد.

**خالص سازی نسبی آنزیم:** برای خالص سازی آنزیم به محلول کشت حاوی آنزیم به صورت تدریجی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد آمونیوم سولفات جامد اضافه شد تا به میزان ۵۰ درصد اشباع برسد. محلول به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد سپس به مدت ۴۰

دقیقه در ۱۵۰۰xg سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب پروتئینی حاصل در بافر تریس (۸ pH، ۰/۱ M) حل شد. در مرحله بعد از روش دیالیز برای حذف نمک آمونیوم سولفات استفاده شد. عمل دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد همراه با همزدن در بافر تریس (۸ pH، ۰/۱ M) انجام شد. کیسه دیالیز به مدت یک شب غوطه‌ور در بافر و در یخچال نگهداری گردید در نهایت محلول دیالیز شده در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد برای انجام مراحل بعدی نگهداری شد. محلول به دست آمده از دیالیز از ستون حاوی DEAE سلولز عبور داده شد. برای خروج پروتئینها از ستون، از محلول NaCl با غلظت‌های ۰/۱ M تا ۱ استفاده شد و فرکشنهای به دست آمده برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم آسپاراژیناز مورد سنجش قرار گرفتند.

مقدار پروتئین در فراکشنهای حاصل از کروماتوگرافی، در طول موج ۲۸۰ nm و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible (Shimatzu 1040) مشخص شد.

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین در نمونه سوپ محیط کشت حاوی آنزیم و محلول دیالیز شده از روش Lowry استفاده گردید (۱۷).

**تعیین فعالیت آنزیم:** برای تعیین فعالیت آنزیم لازم بود ابتدا ضریب خاموشی (Extinction coefficient) محصول (یون آمونیوم) که از عملکرد آنزیم بر روی آسپاراژین ایجاد شده بود، محاسبه شود. برای این منظور غلظت‌های مختلف سولفات آمونیوم تهیه شد و محلول نسلر (معرف آمونیوم) به آنها اضافه و جذب رنگ زرد ایجاد شده در طول موج ۴۱۰ nm اندازه‌گیری شد. منحنی غلظت بر علیه جذب رسم شد و شیب خط برای تعیین ضریب خاموشی در نظر گرفته شد. پس از محاسبه ضریب خاموشی ( $1.6 \times 10^3 \text{ lit.mol}^{-1}$ ) ابتدا مقدار آمونیوم تولید شده در هر بار سنجش آنزیمی محاسبه شد و سپس از فرمول زیر فعالیت آنزیم محاسبه گشت.

فعالیت آنزیم به تدریج در فاز لگاریتمی افزایش یافت و حداکثر فعالیت بعد از وارد شدن باکتری به مرحله سکون، بین ۴۰-۴۴ ساعت ثبت گردید.

**تعیین pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم:** برای تعیین pH بهینه اسپاراژیناز، فعالیت آنزیم در محدوده pH ۴ تا ۱۰ اندازه‌گیری شد (شکل ۲). نتایج حاصل نشان داد که کمترین فعالیت آنزیم در pH های ۴ و ۱۰ و بیشترین فعالیت آنزیمی در pH ۷ دیده شد. برای تعیین دمای بهینه آنزیم، فعالیت آن در محدوده دمایی ۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گونه فعالیتی ثبت نشد و آنزیم غیرفعال شد.

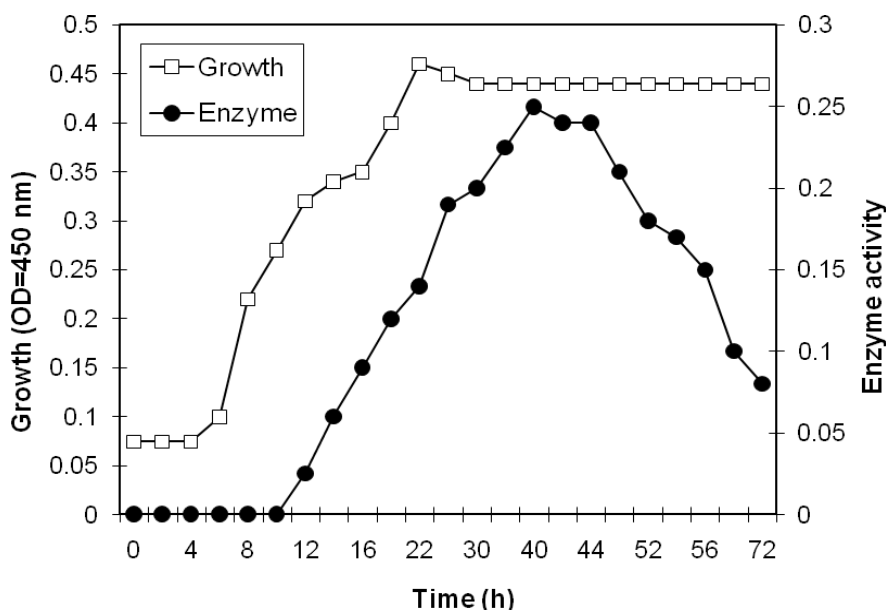
**اندازه‌گیری فاکتورهای کینتیکی آنزیم:** برای تعیین فاکتورهای کینتیکی آنزیم از منحنی Lineweaver-Burk با استفاده از عکس‌غظت بر علیه عکس سرعت استفاده شد و  $K_m$  و  $V_{max}$  محاسبه گردید (شکل ۴). از نتایج به دست آمده مقدار  $K_m$  آنزیم در حدود ۰/۱۸ mM و مقدار  $V_{max}$  آن در حدود ۱۲/۵ mM/min تعیین شد.

$U/ml = \text{زمان سنجش} \times \text{حجم آنزیم} / \text{مقدار میکرومول آنزیم}$   
 $\text{آمونوم آزاد شده توسط آنزیم} \times \text{مقدار محلول در سنجش}$

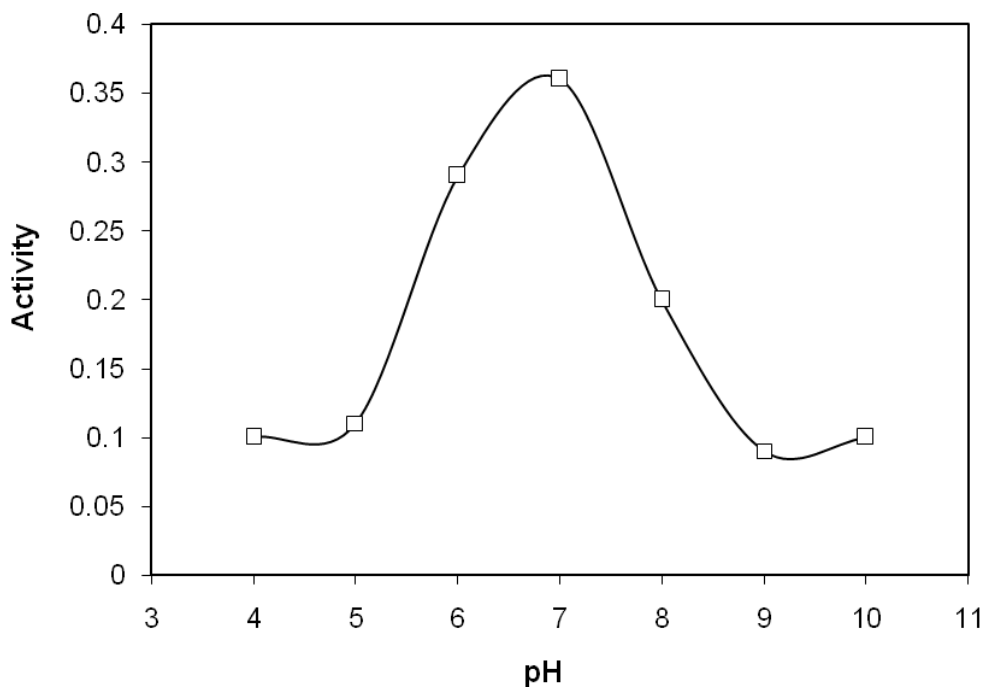
**الکتروفورز عمودی به روش SDS-PAGE:** به منظور مشخص کردن میزان خلوص و تعیین جرم مولکولی آنزیم از ژل آکریلامید با غلظت ۷/۵ درصد استفاده گردید و رنگ آمیزی ژل، با کوماسی بلو R-250 و نیترات نقره انجام شد. برای مشخص شدن وزن مولکولی از مارکر استاندارد پروتئینی استفاده شد.

## نتایج

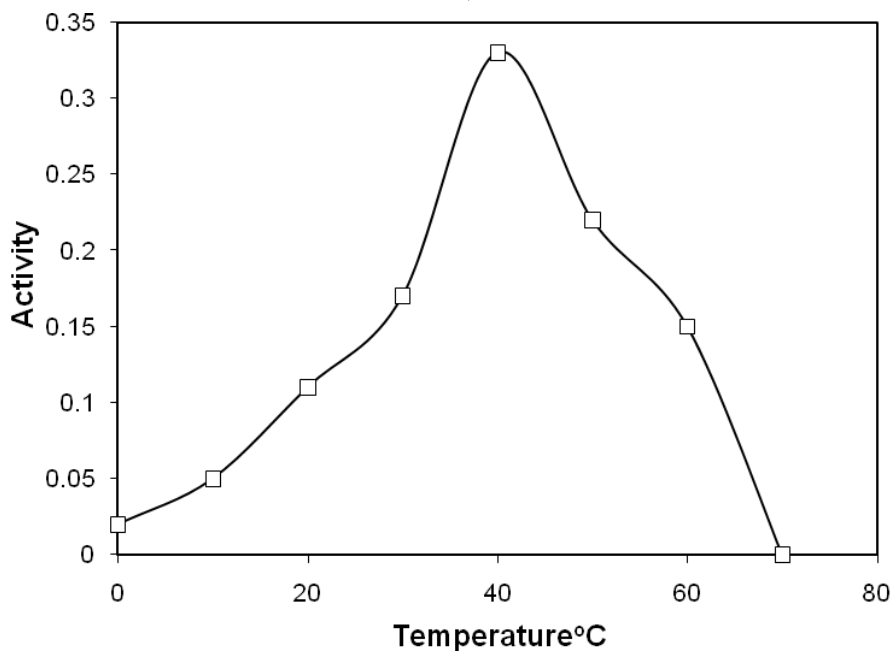
**تولید آنزیم و منحنی رشد:** برای رسم منحنی رشد باکتری و همچنین تولید آنزیم در محیط کشت، از محیط کشت هر دو ساعت یکبار نمونه‌گیری شد و منحنی رشد رسم گردید (شکل ۱). فاز تأخیر (lag phase) در این باکتری در حدود ۴ ساعت بود و فاز لگاریتمی در حدود ۱۸ ساعت طول کشید که بعد از آن وارد مرحله سکون گردید. مطالعه همزمان فعالیت آنزیم نشان داد که تا ۱۰ ساعت پس از شروع کشت هیچ‌گونه فعالیت آنزیمی دیده نشد، ولی



شکل ۱- منحنی رشد باکتری و تولید آنزیم در باکتری *Serratia marcescens* بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در ابتدای فاز ثابت رشد باکتری دیده شد.



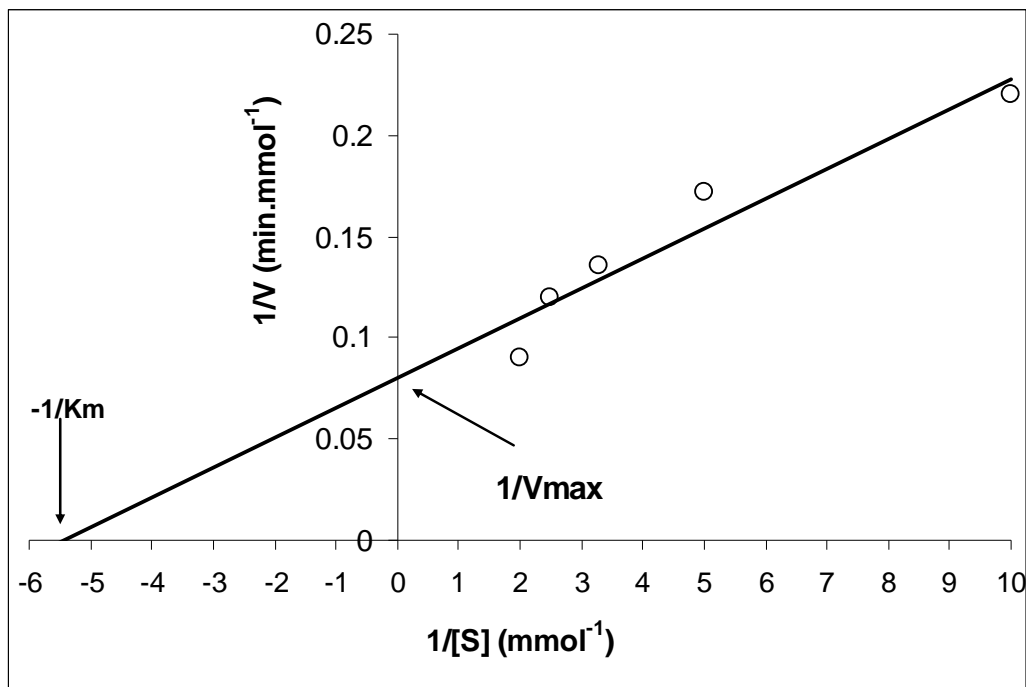
شکل ۲- منحنی فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در محدوده pH ۴-۱۰



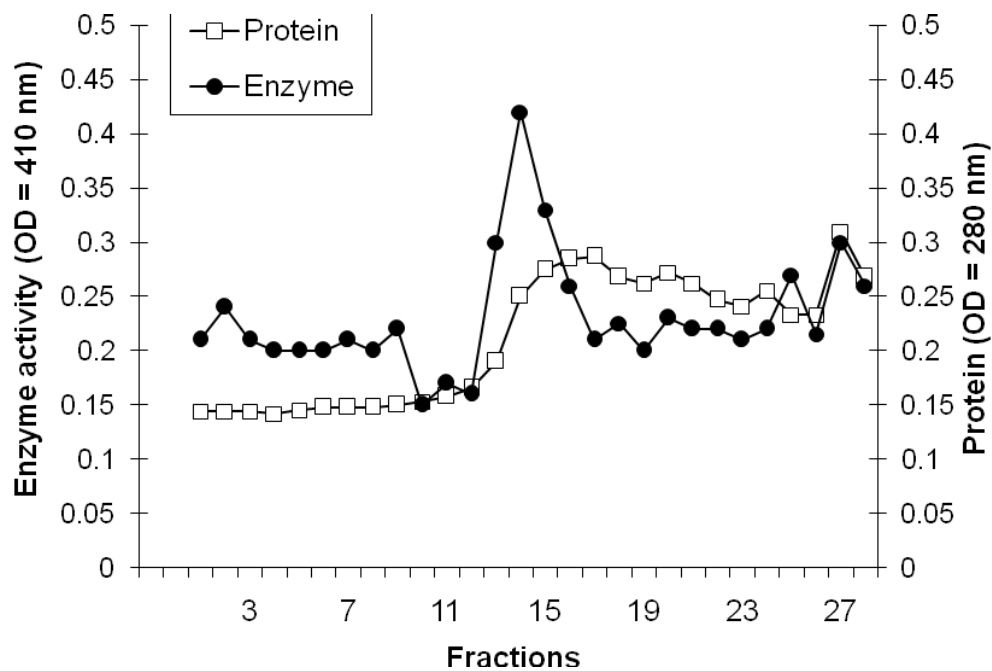
شکل ۳- منحنی فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در محدوده دمایی ۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد. در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت دیده شد و در دمای ۷۰ درجه آنزیم کاملاً غیر فعال شد.

تعویض یونی DEAE عبور داده شد (شکل ۵). طبق نتایج به دست آمده خروج پروتئینها از نمونه ۱۱ آغاز شد و فعالیت آنزیمی بین نمونه های ۱۳-۱۶ مشاهده شد.

**تخلیص آنزیم:** برای خالص سازی آنزیم ابتدا سوپ کشت سلول به وسیله غلظت ۵۰ درصد آمونیوم سولفات ته نشین سازی شد و پس از دیالیز، نمونه از ستون کروماتوگرافی



شکل ۴- منحنی Lineweaver-Burk جهت محاسبه  $V_{max}$  و  $K_m$ .



شکل ۵- کروماتوگرام فرآیند تخلیص آنزیم اسپاراژیناز با استفاده از ستون DEAE سلولز.

میکرومول سویترا را در ۱ دقیقه به محصول یا یون آمونیم تبدیل نماید.

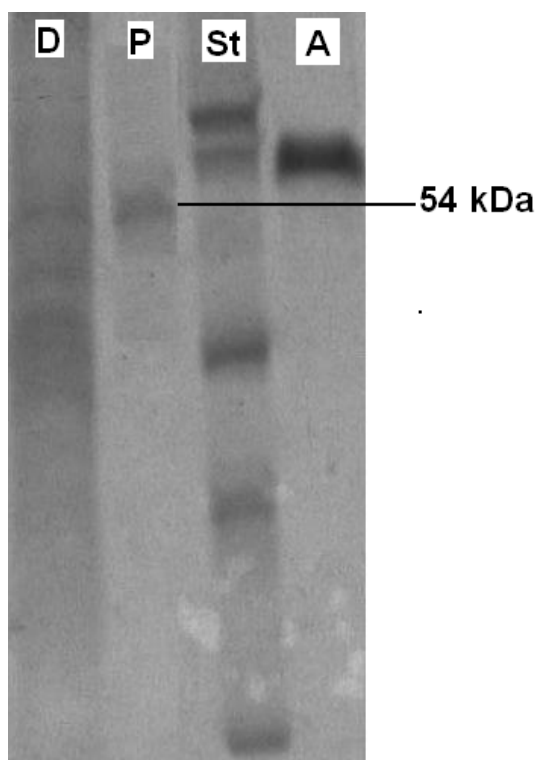
نتایج حاصل از مراحل مختلف تخلیص آنزیم با محاسبه فعالیت آنزیم در هر مرحله در جدول ۱ نشان داده شده است. هر واحد آنزیمی مقداری از آنزیم است که یک

جدول ۱- مراحل خالص‌سازی اسپاراژیناز

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Total activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)	Fold purification	% Yield
CE (1)	320	0.3	$1.6 \times 10^3$	0.53	13.88	1	100
AS (2)	4.5	0.36	$0.33 \times 10^2$	0.015	148.138	10.67	3
IEC (3)	1	0.027	$0.53 \times 10^3$	$0.53 \times 10^3$	316.05	22.77	0.1

Steps: (1) Crude extract; (2) ammonium sulfate fractionation; (3) ion exchange chromatography

تولید بهینه آنزیم بیشتر است. همچنین در این تحقیق pH بهینه آنزیم ۷ به دست آمد. بنابراین کلیه آزمایشات در pH ۷ انجام شد. برخی گزارشات نشان داده است که در باکتری *Erwinia carotovora* اسپاراژیناز دارای pH بهینه ای در حدود ۸/۶ می باشد (۱۰).



شکل ۶- ژل SDS-PAGE در نمونه خالص شده و دیالیز. نمونه

دیالیز (D)، نمونه آنزیم خالص شده در فراکسیون ۱۴ ستون کروماتوگرافی (P)، مارکر آلبومین سرم گاوی خالص با وزن ۶۶۲۵۰ (A)، مارکر پروتئینی (St) با وزن مولکولی سیتوکروم C ۱۳/۲، میوگلوبین با وزن ۱۷،۲، اوالبومین ۴۵، آلبومین ۶۶،۲، اووترانسفرین ۷۶ کیلو دالتون.

طبق نتایج به دست آمده، خلوص نسبی آنزیم در مرحله رسوب دادن پروتئینها با آمونیوم سولفات به میزان حدود ۱۱ برابر و در مرحله ستون DEAE به میزان حدود ۲۳ برابر می باشد.

**الکتروفورز عمودی:** نتایج الگوی پروتئینی به دست آمده از خلوص آنزیم اسپاراژیناز با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE در شکل ۶ نشان داده شده است. یک باند مشخص در ناحیه ۵۴ کیلو دالتون مشاهده شد. حضور این باند در نمونه دیالیز شده نیز به چشم خورد. محاسبه جرم مولکولی تقریبی آنزیم خالص شده بر اساس فاصله حرکت پروتئینها در ژل انجام شد.

### بحث

سراسیمیا یک باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، متحرک، اکسیداز مثبت است و جزء خانواده *Enterobacteriaceae* طبقه بندی می‌شود (۸) که در این تحقیق برای تولید آنزیم در نظر گرفته شد. اگرچه مطالعات گسترده‌ای بر روی جداسازی آنزیم اسپاراژیناز انجام شده است اما اطلاعات اندکی از تحقیقات بر روی این آنزیم که توسط سراسیمیا تولید می‌شود در دست می‌باشد.

برای رشد بهینه سراسیمیا، هوادهی ملایم محیط کشت مورد نیاز است و اسپاراژیناز به مقدار بیشتری در سطوح خیلی پایین اکسیژن تولید می‌شود (۱۵). در مطالعه حاضر نیز از هوادهی کم برای تولید آنزیم استفاده شد که مقایسه تولید آن با حالت هوادهی زیاد نشان داد که حالت هوادهی ملایم

اولین بار، از محیط کشت حاوی عصاره مالت و پپتون برای تولید آنزیم استفاده شد، پیشنهاد می‌شود که در این محیط باکتری یک ایزوآنزیمی تولید نموده است که از لحاظ وزن مولکولی با آنچه تاکنون گزارش شده است متفاوت است. بعضی از مطالعات اخیر وزن مولکولی آنزیم را در نوعی باسیلوس استخراج شده از خاک حدود ۴۵ kDa (۱۲) و در *Streptomyces gulbargensis* ۸۲ kDa نیز گزارش کرده‌اند (۲).

میزان فعالیت ویژه آنزیم در سوپرناتانت (mg protein / units) ۱۳/۸۸ و در آنزیم با خلوص نسبی حدود mg (units/protein) ۳۱۶/۰۵ محاسبه شد. همچنین فاکتورهای کیتیکی در این آنزیم برای اولین بار در این پژوهش محاسبه شد، به طوری که  $K_m$  آنزیم در حدود ۰/۱۸ mM و مقدار  $V_{max}$  آن در حدود ۱۲/۵ mM/min محاسبه شد.

با توجه به اینکه این آنزیم در درمان برخی از سرطانها به ویژه لوسمی مورد استفاده می‌باشد، خلص سازی این آنزیم و مشخص کردن فاکتورهای کیتیکی در استفاده از آن برای درمان بیماریها دارای اهمیت است که در این تحقیق به خوبی مشخص گردید.

تخلیص آنزیم آسپاراژیناز از میکروارگانیسمهای مختلف انجام شده است. از جمله آنها می‌توان *Escherichia coli*, *glutaminasificans*, *Erwinia carotovora*, *Acinetobacter* را نام برد (۱، ۶ و ۱۵). تقریباً در تمامی گزارشات اندازه آنزیم مشابه اعلام شده است. به طوری که با استفاده از روشهای الکتروفورز روی ژل آکرلامید و نیز توسط روش ته نشین سازی تعادلی جرم مولکولی آنزیم در حدود ۱۸۰ kDa- تعیین شد و در باکتری *Erwinia carotovora* وزن آن در حدود ۱۳۵ kDa تخمین زده شد (۵). این آنزیم بعد از تیمار با سدیم دودسیل سولفات و اوره در الکتروفورز زیر واحد هایی جرم مولکولی kDa ۳۲/۵ را نشان داد (۵). طبق این داده‌ها، در بعضی از باکتریها آنزیم دارای پنج یا شش زیرواحد ۳۲ kDa و در برخی دیگر مثل *E. coli* دارای ۴ زیر واحد ۳۲ kDa است (۶).

در مطالعه حاضر آنزیم خلص شده تنها یک باند در ژل الکتروفورز SDS-PAGE تولید نمود که این باند در ناحیه حدود ۵۴ kDa است. این نتیجه با گزارشات قبلی که اندازه آنزیم را در *Serratia* حدود ۳۱/۵ kDa اعلام کرده، مطابقتی ندارد (۱۸). با توجه به اینکه در این پژوهش برای

## منابع

- 1- Pieters R, Carroll WL. (2008) Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Clin. North. Am.* 55:1-20
- 2- Agarwal A, Kumar S, Veeranki V, (2011) Effect of chemical and physical parameters on the production of L-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. *Lett. Appl. Microbiol* 10: 1111
- 3- Amena S., Vishalakshi N., Prabhakar M., Dayanand A., Lingappa K., (2010) Production, purification and characterisation of L-asparaginase *Streptomyces gulbargensis*. *Braz. J. Microbiol.* 41, 173-178
- 4- Avramis VI, Tiwari PN. (2006) Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Nanomedicine.* 1:241-254.
- 5- Broome J. (1961) Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature.* 191, 1114-1115.
- 6- Cammack KA., Marlborough DI., Miller DS., (1972) Physical Properties and Subunit Structure of L-Asparaginase Isolated from *Erwinia carotovora*. *Biochem. J.* 126, 361-379
- 7- Campbell H, Mashburn L. (1969) L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. *Biochemistry.* 9, 3768-3775.
- 8- Ghasemi Y, Ebrahiminezhad A, rasoul-Amini S, et al (2008) An Optimized Medium for Screening of L-Asparaginase production by *Escherichia coli*. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 4, 422-424.



- 9- Hejazi A., Falkiner FR., (1997) *Serratia marcescens*. J Med Microbiol. 46, 903-912
- 10- Jha SK, Pasrija D, Sinha RT, Singh HR, Nigam VK, Vidyarthi AS, (2012) Microbial L-Asparaginase: A review on current scenario and future prospects. Int. J. Pharmaceut. Sci. Res, 3: 3076-3090
- 11- Kamble VP., Rao RS., Borkar PS., Khobragade CN., Dawane BS. (2006) Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of a dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters. Ind. J. Biochem. Biophys. 43, 391-394
- 12- Kidd J. (1953) Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. J. Exp. Med. 98, 565-582.
- 13- Moorthy V., Ramalingam A., Sumantha A., Shankaranaya R.T., (2010) Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. Afri. J. Microbiol. Res. 4, 1862-1867.
- 14- Peterson RE, Ciegler A, (1969) L-Asparaginase Production by Various Bacteria. Appl. Microbiol, 17., 929-930
- 15- Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, et al, (2011) L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. Cancer. 117, 238-249.
- 16- Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. (2009) Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. N. Engl. J. Med. 360:2730-2741
- 17- Robyt JF., White BJ. (1987) Biochemical techniques theory and practice. Brooks/Cole Pub Company USA p. 391.
- 18- Stern ML., Phillips AW., Gottlieb AJ., (1976) Physical properties of L-asparaginase from *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 125, 719-727.

## Purification and determination of kinetics parameters of asparaginase from *Serratia marcescens*

Abkhoei L., Minai-Tehrani D., Eftekhari F., Karaji N., Mirfakhari F. and Vaziritabar N.

Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

Asparaginase is a hydrolytic enzyme that catalyses asparagine to aspartic acid and ammonia. The enzyme is used for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), lymphoma and melanolympoma. *S. marcescens* is a Gram-negative bacterium with red pigment that can produce asparaginase in culture medium culture in the presence of asparagine. In this study asparaginase was purified and kinetic parameters of enzyme were determined. A modified culture medium was used for enzyme production containing malt extract, soy peptone and asparagine. Enzyme activity was detected after 8 hours and maximum enzyme activity was reached after 40-44 hours of incubation. Purification of the enzyme was carried out using ammonium sulfate precipitation. The concentrated enzyme preparation was loaded onto DEAE cellulose chromatography column. The SDS-PAGE was determined a single band with about 54 kDa protein. The optimum pH and temperature of enzyme activity were determined to be about 7 and 40°C respectively, and the kinetic parameters such as  $K_m$  and  $V_{max}$  were measured for the first time in this study.

**Key words:** Enzyme, Asparaginase, *Serratia marcescens*, Purification, Kinetic parameters.