الإنتاج الحيوي وتنقية وتوصيف إنزيم اسبرجينيز من الاكتينوميسيتات المعزولة من المملكة العربية السعودية

إعداد الطالبة
سامية بنت درويش بن صديق جستنيه

إشراف
د. ماجدة محمد علي محمد

د. محمد قربان عبد الهادي قشاري

المستخلص

تم عزل أنواع مختلفة من الاكتينوميسيتات من مصادر مختلفة مثل المياة العذبة والمياة البحرية والرمال والتربة وبعض الأسماك والروبيان والرواسب البحرية باستخدام بيئة اجار النشا و النترات الاساسية أو المضاف إليها bekanamycin أو amphotericin B. جمعت العينات المختبرة من مكة والمدينة و جدة ومزرعة هدي الشام. وكانت التربة من بين العينات، تضم أكبر عدد من الاكتينوميسيتات تليها الرمال والمياه ثم الحيوانات البحرية. وكانت بيئة أجار النشا والنترات هي الأكفاء من بين البيئات المستخدمة في عزل الاكتينوميسيتات من المصادر المختلفة. أدت إضافة bekanamycin إلى إنخفاض عدد الاكتينوميسيتات المعزولة لكنه سمح لمزيد من العزلات المقاومة بالظهور. أما إضافة amphotericin B فأدت الى تثبيط نمو الفطريات وتحسين عملية عزل الاكتينوميسيتات. تم عزل وتنقية ١٠٠ عزلة من الاكتينوميسيتات كان من بينها ١١ عزلة فقط لها قدرة جيدة على إنتاج كميات متفاوتة من L-asparaginase في البيئه الصلبة والسائلة. وكانت العزلة ATRM47 الأكثر نشاطاً من بينها في إنتاج أعلى كمية من إنزيم L-asparaginase معزولة من منطقة الريزوسفير حول جذور شجرة النخيل من المدينة المنورة. وقد أختيرت من أجل إجراء المزيد من الدراسات عليها. حيث تمت دراسة تأثير مجموعة من العوامل الفيزيائية والكيميائية مثل تأثير مصادر الكربون والنتروجين وبعض الأحماض الأمينية والعضوية ودرجة حرارة التحضين و درجة الحموضة الإبتدائية وسرعة الدوران وكمية اللقاح المضاف على نمو العزلة ATMR47 وإنتاج إنزيم L-asparaginase الداخلي والخارجي . أظهرت النتائج أن الظروف المثلى لإعطاء أفضل نمو وإنتاج للإنزيم تكون عند رقم هيدروجيني ٦,٥ ، ودرجة الحرارة ٣٠ درجة مئوية، مع سرعة دوران ١٠٠ لفة في الدقيقة والتحضين لمدة ٥ أيام، مع إضافة الدكستروز ٥ ٪ والاسبراجين ١,٥ ٪ كمصدر للكربون والنيتروجين على التوالي. وكان تركيز كمية اللقاح inoculums عند مستوى CFU/ml ٤ X١٠^{٥} ودون أية إضافة للأحماض الأمينية الأخرى. تمت تنقية الإنزيم باستخدام كروماتوجرافيا العمود وكان الوزن الجزيئي للإنزيم الخارجي ١٢٠ كيلو دالتون و للإنزيم الداخلي ١٤٠ كيلو دالتون. أظهر الانزيم النقي الداخلي Intracellular L-asparaginase نشاطا ضد خلايا الدم السرطانية EAC حيث كانت نصف الجرعة القاتلة LD_{50} ١٥٠ وحدة/ملل. واختص الإنزيم تحت الدراسة بالرقم الهيدروجيني الأمثل ٨,٥ و درجة الحرارة المثلى ٣٧ درجة مئوية ، وتركيز مادة التفاعل اسبرجين ٣٠ ملي مول. زاد نشاط الإنزيم في وجود مادة الجلسرول والمانيتول والسربتول و كلوريد الكالسيوم وكان لإضافة مادة EDTA وايزوبروبانول ومركبتوميثانول وكبريتات الحديد وكبريتات النيكل تأثير مثبط للإنزيم. كشف تحليل مكونات الخلية ان السلالة المعزولة لها جدار خلوي من النوع الأول كالموجود في جنس الاستربتوميسس. وبعد دراسة صفاتها المورفولوجية والفسيولوجية والبيوكيميائية والجينية عرفت العزله البكتيرية المنتجة لإنزيم L-asparaginase على أنها *Streptomyces filipinensis* .

Biosynthesis, purification and characterization of L-asparaginase from actinomycetes, isolated from Kingdom Saudi Arabia.

By

Samyah Darwish Saddig Jastaniah

Supervised by

Dr. Magda Mohamed Aly

Dr.Mohammed Gurban Kuchari

Abstract

Strains of actinomycetes were isolated from different sources viz. fresh water, marine water, using starch nitrate medium with either sand, soil, marine fishes, shrimps and sediments bekanamycin or amphotericin B. The samples were collected from Makkah, Al-Madinah and Jeddah. Among the samples, soil harbored highest number of actinomycetes population followed by sand, water and marine animals. Among the media used for isolation of actinomycetes, starch nitrate agar medium was found to be the most efficient for isolation. Addition of bechanamycin decreased the number of actinomycetes recovered and allowed to more resistance isolates to be developed. Amphertricin B suppressed the growth of fungi and enhanced actinomycetes isolation. Out of the 100 strains isolated, only eleven isolates produced varying quantities of L-asparaginase in solid and liquid media. The most active isolate ATRM47 that produced the highest quantities of intracellular L-asparaginase was from rhizosphere of palm tree, grown in Al-Madinah. It was taken up for further studies. Impact of various physical and chemical factors such as carbon sources, nitrogen source, amino and organic acids, incubation temperatures, initials pH, shaking rates and inoculums size on the growth of isolate ATRM47 and intracellular and extracellular L-asparaginase activity were also studied. Optimum growth and enzyme activity was noticed under initial pH 6.5, temperature 30°C and 100 rpm for 5 days, dextrose 0.5% and L-asparagine 1.5% as carbon and nitrogen sources respectively, inoculum size of $4x10^5$ CFU/ml and without any other amino acids addition. The enzyme was purified using column chromatography. The molecular weight for the extracellular enzyme was 120 kDa and it was140 kDa for intracellular enzyme. The purified intracellular L-asparaginase showed antitumor activity against Ehrlich Ascites Carcinoma with LD_{50} of 150U/ml. The optimum pH was 8.5; optimum temperature was 37°C, substrate specificity L-asparagine at 30 mmole. The enzyme activity was activated by the presence of glycerol, manitol sorbitol, and $CaCl_2$ and inhibited by ETDA, isopropanol , mercapoethanol, $FeSO_4$ and $NiSO_4$. Analysis of the cell components of the isolated strains has revealed the wall type-I (the wall type-I is typical for the genus *Streptomyces*) and the strains were micromorphologically similar to the genus *Streptomyces*. Hence, the morphological, physiological, biochemical and genetic results obtained for the L-asparaginase producing strain was compared, and the strain was tentatively identified as *Streptomyces filipinensis* ATRM47.