

تعيين الظروف المثلى لانتاج الاسباراجينيز من بكتريا S10-1 *Serratia marcescens*
 فاتن علي أحمد^١ عباس عبود فرحان^١ حميد مجيد جاسم^٢

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

فاتن علي أحمد^١ عباس عبود فرحان^١ حميد مجيد جاسم^٢

١: كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة ديالى

٢: كلية العلوم/جامعة النهرين

الخلاصة

درست الظروف المثلى لانتاج انزيم الاسباراجينيز بواسطة بكتريا S10-1 *Serratia marcescens* في وسط انتاج الاسباراجينيز. وقد اشارت النتائج الى ان اقصى انتاج للانزيم قد تم الوصول اليه بتدعيم وسط الانتاج بالمaltose مصدرا وحيدا للكربون والطاقة بتركيز ٣% ، والبيتون مصدرا نايتروجينيا بتركيز ٢% ، ومزيج فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وفوسفات الهيدروجين ثنائية البوتاسيوم بنسبة (١:١) 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 الحضان بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة. اذ بلغت قيمة الفعالية النوعية لانزيم الاسباراجينيز الخام المنتج في رائق المزرعة البكتيرية تحت هذه الظروف ٤٩,٢ وحدة/ملغرام بروتين.

الكلمات الدالة :- انزيم الاسباراجينيز , اقصى انتاج للانزيم , *Serratiamarceses*.

Optimum conditions for asparaginase production by *Serratia marcescens* S10-1

²Hameed Majeed Jasim ¹Abbas Abud Farhan Faten Ali Ahmad

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

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا S10-1 *Serratia marcescens*
فاتن علي أحمد^١ عباس عيود فرحان^٢ حميد مجيد جاسم^٣

المقدمة

ينتمي أنزيم الأسباراجينيز (L- asparaginase: E.C 3.5.1.1) الى مجموعة أنزيمات التحلل المائي الذي يعمل على التحلل المائي للحمض الأميني الأسباراجين الى حامض الأسباراتك والأمونيا (١). يوجد نوعان من أنزيم الأسباراجينيز هما الأسباراجينيز I و II، يفرز الأول الى خارج الخلية (Extracellular) بينما يفرز الثاني الى الفسحة البلازمية المحيطة (Periplasmic space) ويمتاز الأخير بأهميته الطبية اذ يستخدم بوصفه عقارا مضادا للسرطان (٢)، 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 (٤، ٥).

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 *Chlamydomona spp*) والنباتات كاليزاليا *Pisum sativum* و الترمس *Lupinus angustifolius* (8، 9).

تؤثر مكونات وسط المزارع المايكروبية وظروف التخمر بشكل كبير في انتاج انزيم الاسباراجينيز كالمصدر الكربوني والنايتروجيني وتركيزهما في الوسط (١٠، ١١)، كما لوحظ ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لوسط انتاج الأنزيم يتراوح بين ٧ و ٨ (12)، والدرجة الحرارية المثلى ٣٥ الى ٣٧ م (13). وفقا لما تقدم فقد هدفت الدراسة الى تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *Serratia marcescens* S10-1.

المواد وطرائق العمل

أوساط التنمية والإنتاج

تم تنمية وتنشيط العزلة البكتيرية *Serratia marcescens* S10-1 التي تم الحصول عليها من قسم التقانة الاحيائية/جامعة النهرين في وسط لوريا-ببتراني السائل المكون من (غم/لتر): ببتون، ١٠ غم؛ مستخلص الخميرة، ٥ غم؛ و كلوريد الصوديوم، ١٠ غم. في حين تم تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من العزلة البكتيرية بأستخدام وسط انتاج الاسباراجينيز المكون من (غم/لتر): أسباراجين 20 غم؛ فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين، ٢ غم؛ وكبريتات المغنيسيوم، ٥ غم، ثم الحضان بدرجة حرارة ٣٧ لمدة ٢٤ ساعة.

تقدير فعالية أنزيم الاسباراجينيز

تم تقدير فعالية أنزيم الأسباراجينيز وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Imada وآخرون (١٤) وذلك بتنمية العزلة *Serratia marcescens* S10-1 في وسط مرق تربتكيز الصويا، وحضنت بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة، ثم رسبت الخلايا بالنبذ المركزي المبرد (٥٠٠٠ دورة/دقيقة) لمدة ٢٠ دقيقة، أهمل الرائق وغسلت الخلايا مرتين بدارئ الترست ثم أضيف إليها ٥ مل من محلول الأسباراجين (٠,١ مولار). حضر المحلول الصفري (Blank) باضافة الخلايا بعد غسلها مرتين بدارئ الترست ب ٥ مل من محلول التفاعل ثم اضافة ١,٥ مل من حامض الخليك ثلاثي الكلور (TCA) بتركيز 1.5 مولار. حضنت الخلايا بواقع مكررين في حمام مائي هزاز لمدة ساعتين بدرجة ٣٧ م. اوقف التفاعل باضافة ١,٥ مل من حامض الخليك ثلاثي الكلور (TCA) بتركيز 1.5 مولار، ثم رسبت الخلايا بالنبذ المركزي المبرد بسرعة ٥٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة. اخذ الرائق الى انابيب اختبار نظيفة، وقدر تركيز الامونيا المتحررة بفعل أنزيم الأسباراجينيز حسب طريقة النسلة المباشرة الموصوفة من قبل Imada وآخرون (١٤)، وحسبت الفعالية الأنزيمية من خلال المعادلة:

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا S10-1 *Serratia marcescens*
فاتن علي أحمد^١ عباس عيود فرحان^٢ حميد مجيد جاسم^٣

تركيز الامونيا المتحررة

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

زمن التفاعل (دقيقة) $\times 14$

عرفت وحدة الفعالية على أنها كمية الانزيم التي تحرر ١ مايكرومول من الأمونيا خلال دقيقة واحدة من زمن التفاعل تحت ظروف التجربة.

تقدير تركيز البروتين

قدر تركيز البروتين وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Bradford (١٥) من خلال المنحنى القياسي لألبومين المصل البقري.

تعيين الظروف المثلى لإنتاج انزيم الأسباراجينيز.

تم تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من العزلة *S.marcescens* S10-1 بدراسة تأثير العوامل المؤثرة في إنتاج الأنزيم والتي تضمنت نوع المصدر الكربوني وتركيزه ، نوع المصدر النتروجيني وتركيزه ، مصدر الفوسفات ، الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج ، مدة الحضانة ، درجة الحرارة ، حجم اللقاح و التهوية .

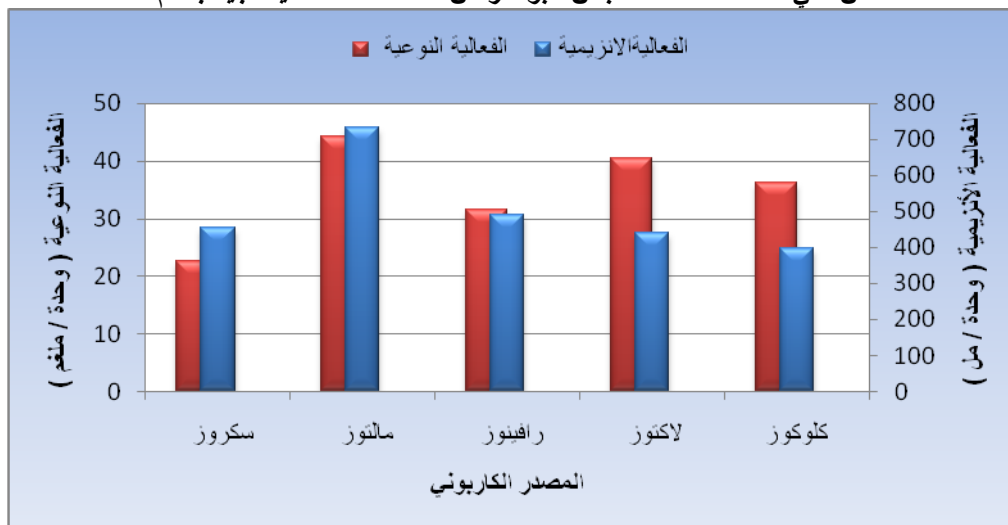
النتائج والمناقشة

الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز

تأثير مصدر الكربون

تشير النتائج المبينة في الشكل (١) الى أن سكر المالتوز هو المصدر الكربوني الأمثل في حث إنتاج الأسباراجينيز من بكتيرية *S.marcescens* S10-1 ، أذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم المنتج منها ٤٤,١٨ وحدة/ملغم بروتين مقارنة بالفعالية النوعية للأنزيم المنتج باستخدام المصادر الكربونية الأخرى (اللاكتوز بفعالية نوعية مقدارها ٤٠.٥٣ وحدة/ملغم بروتين والكلوكوز ٣٦.١٧ وحدة/ملغم بروتين والرافينوز ٣١,٤٧ وحدة/ملغم بروتين ثم السكروز ٢٢.٥٥ وحدة/ملغم بروتين) . وتعد هذه النتائج موافقة لما أشار اليه Deokar وآخرون (12) من أن المالتوز هو الوسط الكربوني الأمثل لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *Erwinia carotovora* مقارنة بالسكروز والكلوكوز والفركتوز.

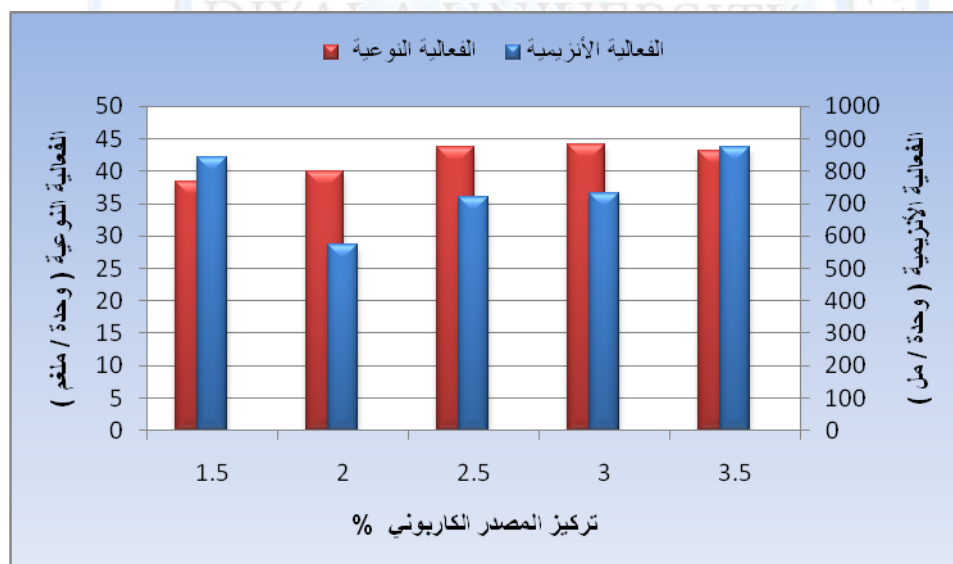
تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *S10-1* *Serratia marcescens*
 فائق علي أحمد^١ عباس عيود فرحان^٢ حميد مجيد جاسم^٣



شكل (١): تأثير مصدر الكربون على قابلية بكتريا *S10-1* *S. marcescens* في إنتاج أنزيم الأسباراجينيز بعد الحضانة بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة

تأثير تركيز المالتوز

تشير النتائج المبينة في الشكل (٢) إلى أن أعلى إنتاجية للأسباراجينيز كانت بإضافة المالتوز إلى وسط الإنتاج بتركيز ٣%، إذ بلغت قيمة الفعالية النوعية ٤٤,١٨ وحدة/ملغم بروتين للأسباراجينيز المنتج من بكتريا *S10-1* *S. marcescens*.

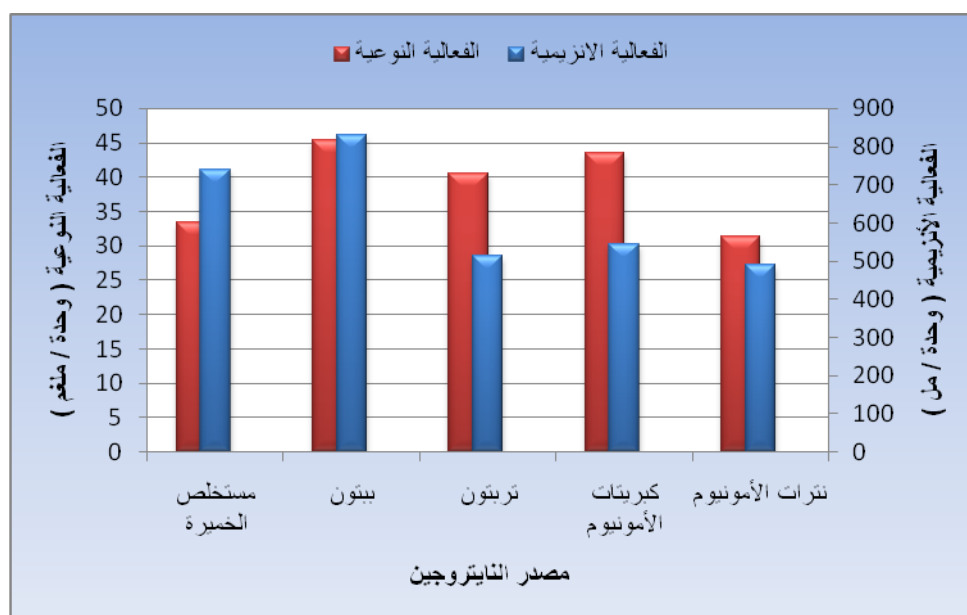


شكل (٢): تأثير تركيز المالتوز على قابلية بكتريا *S10-1* *S. marcescens* في إنتاج الأسباراجينيز بعد الحضانة بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *Serratia marcescens* S10-1
فاتن علي أحمد^١ عباس عيود فرحان^٢ حميد مجيد جاسم^٣

تأثير مصدر النايتروجين

تشير النتائج المبينة في الشكل (٣) الى أن أفضل مصدر نتروجيني لإنتاج الأسباراجينيز من *S. marcescens* S10-1 هو الببتون ، إذ أعطى أعلى فعالية نوعية مقدارها ٤٥,٤٥ وحدة/ملغم بروتين مقارنة ببقية مصادر النايتروجين (كبريتات الأمونيوم التربتون ومستخلص الخميرة و نترات 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 وإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *S. marcescens* SBO8 من خلال توفيره للأحماض الامينية الضرورية لذلك.

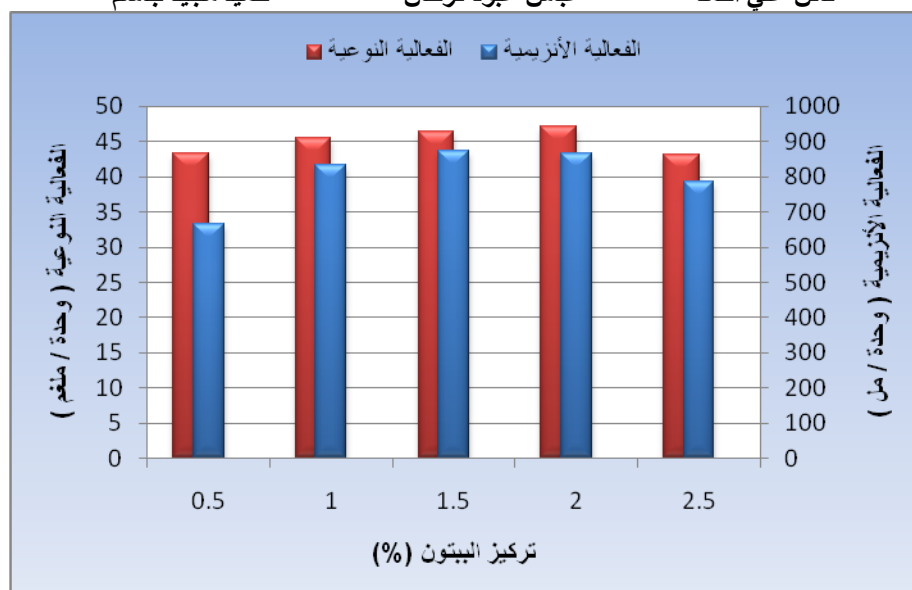


شكل (3): تأثير المصدر النتروجيني في إنتاج الأسباراجينيز من *S. marcescens* S10-1 بعد الحضانة بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة

تأثير تركيز الببتون

تشير النتائج المبينة في الشكل (٤) الى أن إضافة الببتون بتركيز ٢% ساعد في الحصول على أعلى فعالية نوعية لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *S. marcescens* S10-1 ومقدارها ٤٧,١٣ وحدة/ملغم بروتين ، ويلاحظ من هذه النتائج ان هناك زيادة تدريجية للفعالية النوعية بزيادة تركيز الببتون حتى الوصول الى ٢% ، ثم تنخفض بزيادة التركيز الى ٢,٥%. ويمكن أن يعزى هذا الارتفاع التدريجي في الفعالية الى زيادة تركيز محتويات الحوامض الامينية في الوسط مما أدى بدوره الى زيادة الكتلة الحيوية وزيادة إنتاج الأسباراجينيز ، غير أن ذلك يبلغ حداً معيناً ليصبح فيه زيادة تركيز المصدر النتروجيني في الوسط ذو تأثير مثبط في إنتاج الأسباراجينيز.

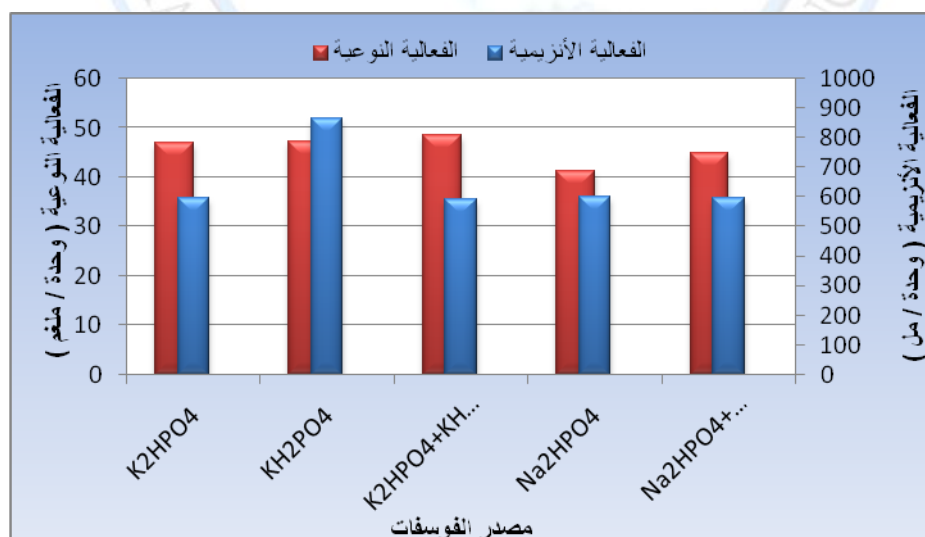
تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *S10-1 marcescens*
فاتن علي أحمد^١ عباس عيود فرحان^٢ حميد مجيد جاسم^٣



شكل (٤) : تأثير تركيز الببتون في إنتاج الأسباراجينيز من *S. marcescens* S10-1 بعد الحضانة بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة

تأثير مصدر الفوسفات

تشير النتائج المبينة في الشكل (٥) الى أن الإنتاج الأمثل لأنزيم الأسباراجينيز من بكتريا S10-1 *S. marcescens* قد تحقق بإضافة مزيج مصدر الفوسفات ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$) بنسبة (١:١) إذ أعطت أعلى فعالية نوعية مقدارها ٤٨,٤٥ وحدة/ملغم بروتين، في حين كانت الفعالية النوعية لبقية المصادر KH_2PO_4 ، K_2HPO_4 ، Na_2HPO_4 ، $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$ أقل نسبياً (٤٦,٨٨ ، ٤٧.١٣ ، ٤١.٢٩ ، ٤٤.٨٥ وحدة/ملغم بروتين على التوالي).

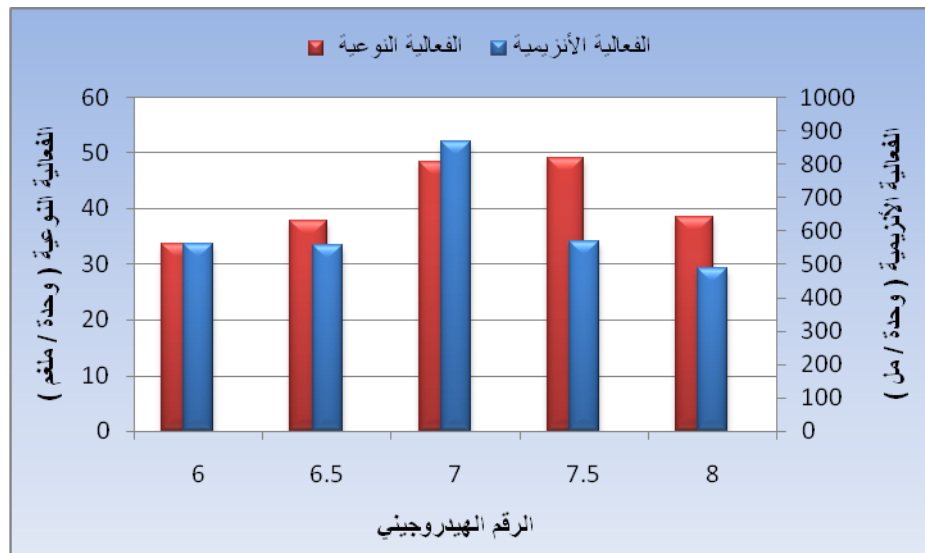


شكل (٥): تأثير المصدر الفوسفاتي على إنتاج الأسباراجينيز من *S. marcescens* S10-1 بعد الحضانة بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *S10-1 Serratia marcescens*
فاتن علي أحمد^١ عباس عيود فرحان^٢ حميد مجيد جاسم^٣

تأثير الرقم الهيدروجيني للوسط

أن للرقم الهيدروجيني تأثيراً على إنتاجية الأنزيم لأن له دوراً في ذوبانية المواد التغذوية في الوسط ويؤثر على تأين المادة الأساس بالإضافة إلى أنه يؤثر على استقرارية الأنزيم المنتج (17). تشير النتائج المبينة في الشكل (٦) إلى أن زيادة الفعالية النوعية للأنزيم الأسباراجينيز المنتج من خلايا *S.marcescens* S10-1 بزيادة الرقم الهيدروجيني للوسط الإنتاج، فقد تم الحصول على أعلى فعالية نوعية (٤٩,١٦ وحدة/ملغم بروتين) عندما كان الرقم الهيدروجيني للوسط الإنتاج ٧,٥ ثم تنخفض الفعالية النوعية بزيادة أو انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط الإنتاج.



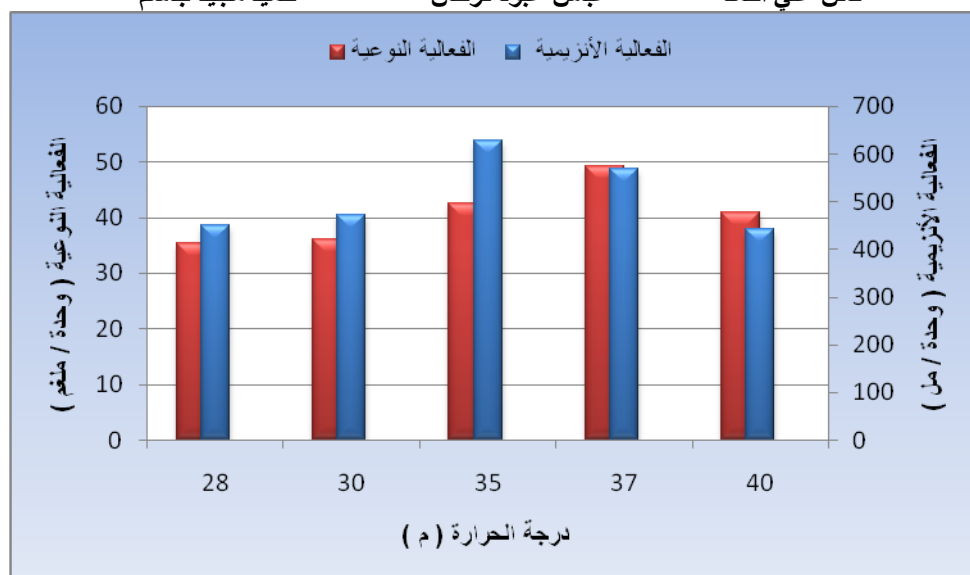
شكل (٦): تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج الأسباراجينيز من *S.marcescens* S10-1 بعد الحضانة بدرجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة

أشارت دراسة أخرى إلى أن الإنتاج الأمثل للأنزيم الأسباراجينيز المنتج من بكتريا *Erwinia carotovora* كان عند الرقم الهيدروجيني ٨,٦ (Kamble وآخرون 2006). أن الزيادة أو النقصان في تركيز أيونات الهيدروجين (H^+) يسبب تغير في الرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي والذي يقود إلى تغيير جذري في التركيب الثلاثي للبروتين يسبب تنافس H^+ أو OH^- مع الروابط الهيدروجينية أو الروابط الأيونية في الأنزيم وبالتالي مسخ للأنزيم (18).

تأثير درجة الحرارة

تشير النتائج المبينة في الشكل (٧) إلى أن الدرجة الحرارية المثلى لوسط التخمر الملائمة لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *S.marcescens* S10-1 هي ٣٧°م، إذ بلغت عندها الفعالية النوعية للأنزيم ٤٩,١٦ وحدة/ملغم بروتين. إن التغير في درجة الحرارة لوسط التخمر عن الدرجة المثلى لإنتاج الأنزيم قد يؤدي إلى انخفاض سرعة التفاعل بفعل عملية مسخ البروتين أو فقدان خصائص التركيب الثلاثي للبروتين (١٧).

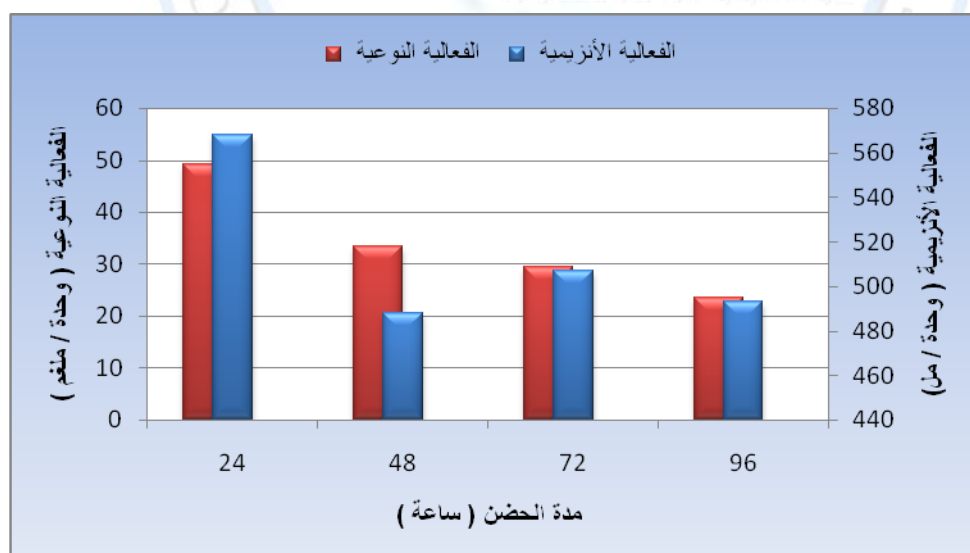
تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *Serratia marcescens* S10-1
فاتن علي أحمد^١ عباس عيود فرحان^٢ حميد مجيد جاسم^٣



شكل (٧): تأثير درجة الحرارة في إنتاج الأسباراجينيز من *S.marcescens* S10-1 عند التنمية في وسط الإنتاج برقم هيدروجيني 7.5 لمدة ٢٤ ساعة

تأثير مدة الحضانة

تشير النتائج المبينة في الشكل (٨) إلى أن المدة الزمنية المثلى لإنتاج الأسباراجينيز من بكتريا *S10-1* هي ٢٤ ساعة. إذ بلغت عندها الفعالية النوعية للأنزيم ٤٩,٢ وحدة/مليغ بروتين ثم تنخفض تدريجياً بزيادة مدة الحضانة. تعد هذه النتائج مماثلة لتلك التي توصل إليها Navak و Phillip (٢٠) الذي توصل إلى أن أعلى إنتاج للأسباراجينيز II من *S.marcescens* ATCC60 بعد ٢٤ ساعة من الحضانة.

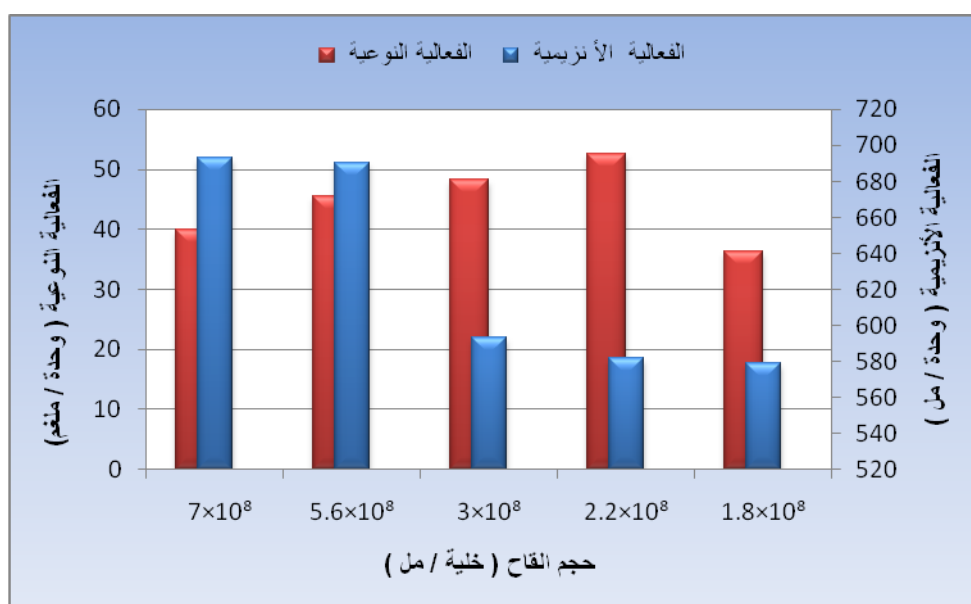


شكل (٨): تأثير مدة الحضانة في إنتاجية الأسباراجينيز من *S.marcescens* S10-1 عند زرعها في وسط الإنتاج برقم هيدروجيني 7.5 وحضانها في درجة ٣٧ م.

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأسباراجيناز من بكتريا *S10-1 Serratia marcescens*
 فاتن علي أحمد^١ عباس عيود فرحان^٢ حميد مجيد جاسم^٣

تأثير حجم اللقاح

تشير النتائج المبينة في الشكل (٩) إلى أن العدد الأمثل لخلايا البكتريا *S10-1 S.marcescens* الملائم لإنتاج الأسباراجيناز هو 10×2.2 خلية/مل أذ بلغت الفعالية النوعية للأسباراجيناز المنتج منها ٥٢,٥٣ وحدة/ملغم بروتين، في حين تنخفض الفعالية النوعية بزيادة أو انخفاض عدد الخلايا عن هذا العدد. يستدل من هذه النتائج أن الأعداد الكبيرة للخلايا يؤدي إلى انخفاض إنتاج الأنزيم بسبب التنافس الشديد على المواد الغذائية الأساسية للوسط الزراعي فضلاً عن تجمع نواتج الأيض الثانوي مما يؤدي إلى تثبيط نمو الخلايا وانخفاض الإنتاج، وأن الأعداد القليلة للخلايا في الوسط يؤدي إلى عدم الاستغلال الأمثل للمواد الغذائية مما يؤثر سلباً في إنتاج الأنزيم (٩).



شكل (٩): تأثير حجم اللقاح في إنتاج الأسباراجيناز من بكتريا *S10-1 S.marcescens* عند زرعها في وسط الإنتاج برقم هيدروجيني 7.5 بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ 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 remission in Epstein- Barr virus, positive, multidrug resistant cutaneous 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

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الاسباراجيناز من بكتريا *Serratia marcescens* S١٠-١
 فاتن علي أحمد^١ عباس عبود فرحان^٢ حميد مجيد جاسم^٣

aqueous phase system for the release of L- asparaginase an enzyme used in Cancer therapy. P. Biochem., 40: 573-9.

٧- 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 factorial designs. Process Biochem., 38(1): 115-122.

٨- 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.

٩- 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. ; Vetel, 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. (8th ed) pearson Education, Inc. San Francisco- NewYork.

19- Rose, A.H. (1976). Chemical Microbiology: An introduction to microbial physiology. (3rd 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.