

Enterobacter cloacae kompleks sp. V1 suşu tarafından üretilen L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisi

Effect of media composition on the activity of L-asparaginase enzyme produced by *Enterobacter cloacae* complex sp. V1 strain

Erdal ÖĞÜN¹

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Van Gölü Havzasından toplanan toprak örneklerinden izole edilen bakteriyel izolatların, L-asparaginaz enzimini üretme kabiliyetleri ve L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, L-asparaginaz enzimi yönünden pozitif izolatların, fenotipik ve 16S rDNA diziliş analizine dayalı olarak bakteriyel taksonomideki yerlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: Toprak örneklerinden bakteriyel izolasyonunda ve kültüre alınmasında Luria-Bertani (LB) Agar besiyeri kullanılmıştır. L-asparaginaz üreten izolatların taranmasında %0.5 oranında L-asparagin ve %0,001 oranında fenol kırmızısı bulunan M9 minimal tuz ortamı kullanılmıştır. Pozitif izolatlar tarafından üretilen, enzimin aktivitesi 436 nm'de spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. L-asparaginaz üreten izolatın teşhisi, standart mikrobiyolojik yöntemler ve 16S rDNA diziliş analizine göre yapılmıştır.

Bulgular: Toplam 10 izolat arasında sadece birinin

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to investigate the effect of medium composition on the ability of producing L-asparaginase enzyme and the activity of L-asparaginase enzyme isolated from soil samples collected from Van Lake Basin. In addition, it was aimed to determine the location of L-asparaginase positive isolates in bacterial taxonomy based on phenotypic and 16S rDNA sequencing analysis.

Methods: Luria-Bertani (LB) Agar medium was used to isolate and cultivate bacteria from soil samples. L-asparaginase-producing isolates were screened for M9 minimal salt medium with 0.5% L-asparagine and 0.001% phenol red. The activity of the enzyme produced by positive isolates was determined by spectrophotometric method at 436 nm. The identification of the L-asparaginase producing isolate was performed according to standard microbiological methods and 16S rDNA sequencing analysis.

Results: Of the 10 isolates, only one was clearly positive for L-asparaginase in the M9 minimal salt

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van



İletişim / Corresponding Author : Erdal ÖĞÜN

Yüzüncü Yıl Üni. Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 65080 Tuşba Van - Türkiye

Tel : +90 505 723 83 46

E-posta / E-mail : eogun@yyu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 03.07.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 11.02.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.03206

Öğün E. *Enterobacter cloacae* kompleks sp. V1 suşu tarafından üretilen L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 59-68

L-asparagin ve fenol kırmızısı içeren M9 minimal tuz ortamında aşikar bir şekilde L-asparaginaz yönünden pozitif olduğu gözlenmiştir. Bu izolatın ürettiği L-asparaginaz enziminin 48 saatlik inkübasyon aralığında 16,02 IU/mL, 35 °C sıcaklıkta 16,02 IU/mL, pH 8,0 değerinde 15,25 IU/mL, karbon kaynağı olarak mannitol varlığında 15,69 IU/mL, organik azot kaynağı olarak yeast ekstre varlığında 14,55 IU/mL ve arginin amino asitinin varlığında 17,63 IU/mL aktivite oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. İlave olarak L-asparaginaz pozitif izolatın, 16S rDNA diziliş analizine göre *Enterobacter cloacae* kompleks suşuna mensup olduğu tespit edilerek bakteriyel taksonomideki durumu belirlenmiştir.

Sonuç: Bu araştırma; ülkemizde doğadan izole edilen ve L-asparaginaz üreten bakterilerin taranması ile ilgili ilk araştırmalar arasındadır. ALL tedavisinde kullanılan, L-asparaginaz enziminin *E. cloacae* kompleks sp. V1 suşunun, antineoplastik L-asparaginaz enzimi yönünden pozitif bulunması, milli gen kaynaklarımız açısından son derece önemlidir. Bu suşun, L-asparaginaz enziminin endüstriyel üretiminde potansiyel olarak kullanılacak bir aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Enterobacter cloacae* kompleks, L-asparaginaz, Van Gölü Havzası

medium containing L-asparagine and phenol red. The L-asparaginase enzyme produced by this isolate was incubated at a temperature of 35 °C 16.02 IU/mL at a pH of 8.0 15.25 IU/mL for a 48 hour incubation period 16.02 IU / mL, in the presence of mannitol as a carbon source 15.69 IU/mL, in the presence of yeast extract 14.55 IU/mL and arginine amino acid 17.63 IU/mL as a source of organic nitrogen. Morphological, physiological and biochemical properties of this isolate were determined. In addition, L-asparaginase positive isolate was found to belong to *E. cloacae* complex strain according to 16S rDNA sequencing analysis and its status in bacterial taxonomy was determined.

Conclusion: This research; In our country, it is one of the first studies about screening of L-asparaginase producing bacteria isolated from nature. In the treatment of ALL, L-asparaginase *E. cloacae* complex sp. V1 strain, positive for the antineoplastic L-asparaginase enzyme is extremely important for our national gene sources. This strain has been found to have an activity that could potentially be used in the industrial production of the enzyme L-asparaginase.

Key Words: *Enterobacter cloacae* complex, L-asparaginase, Lake Van Basin

GİRİŞ

L-asparaginaz (EC3.5.1.1) enzimi, ekstraselüler ortamda L-asparagin amino asitini L-aspartat ve amonyağa hidrolize eden bir enzim olup, akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve diğer alakalı kan kanserlerinin uzun süreli tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir. L-asparaginaz enziminin lenfoblastik hücrelerde protein sentezini inhibe ederek akabinde apoptozis ile bu hücrelerin ortadan kaldırılmasına neden olduğu gösterilmiştir (1).

L-asparaginaz enzimi tıbbi tedaviye ilave olarak gıda endüstrisi uygulamalarında da kullanılmaktadır

(2). Kızartılmış veya ısı uygulanmış gıdalarda oluşan akrilamidin organizmalarda nörotoksik, genotoksik, kanserojen etkiye sebep olmakla beraber gelişme ve üreme sistemi üzerine olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir (3). Gıda endüstrisinde L-asparaginaz enziminin, L-asparaginin indirgen şekerlerle etkileşimine ket vurduğu ve böylece akrilamid oluşumunu engellediği belirlenmiştir (4).

Tıbbi tedavide L-asparaginazın, *Escherichia coli*'den izole edilmiş, doğal *E. coli* asparaginazı, polietilen glikol'a bağlanmış *E. coli* asparaginazı

ve *Erwinia chrysanthemi*'den izole edilen *Erwinia asparaginazı* olmak üzere, ticari olarak üretilen, üç farklı formu kullanıldığı bildirilmiştir (5).

Ekstraselüler ortamda, L-asparaginaz enzimi, L-asparagini L-aspartata ve amonyağa dönüştüren, hidroliz reaksiyonunu katalize eder. L-asparagin, hücre fonksiyonları ve DNA sentezi için esansiyel bir amino asittir. Sağlıklı hücrelerde, protein sentezi için gerekli olan asparagin, aspartattan, asparagin sentetaz enziminin katalizörlüğünde sentezlenir. Tümör hücreleri dışardan alınan veya sağlıklı hücreler tarafından sentezlenerek, kana verilen L-asparagine bağımlıdır. Bu hücreler, L-asparagin sentetaz enzimine sahip olmadığı için, dolaşımda serbest olarak bulunan bu amino asitin, enjekte edilen, L-asparaginaz ile yıkılması sonucu neoplastik hücrelerde, protein sentezi bloke edilmiş olur. Bu uygulama sonunda, hücrelerin belli bir süre sonra, normal apoptosis ile ortadan kalktıkları belirtilmiştir (6,7).

L-asparaginaz; bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan bir amidohidrolazdır. Mikroorganizmalar, L-asparaginaz enzimi üretimi için potansiyel kaynak olarak, kabul edilmektedir (2). *Gamma Proteobacteria* içerisindeki *Enterobacteriaceae* familyası içerisindeki *Enterobacter* cinsi içerisindeki türlerin, L-asparaginaz enzimi ürettiği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. *E. aerogenes* (8-12) ve *E. cloacae* (13) suşlarının L-asparaginaz enzimi ürettiği rapor edilmiştir.

Enterobacter cinsinin türleri, toprakta ve atık sularda saprofit olarak buldukları gibi, aynı zamanda insan gastrointestinal sistemin kommensal enterik biyotasının bir parçasıdır. *E. cloacae* kompleks türlerine, doğada yaygın olarak rastlanır, ancak bu suşlar, patojenler olarak da işlev görebilirler. Biyokimyasal ve moleküler çalışmalar *E. cloacae* complex grubu içerisinde, altı türden oluşan genomik heterojenite sergilendiğini ortaya koymuştur. Bu suşlar arasında yer alan; *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* ve *E.*

nimipressuralis suşları bulunmaktadır. *E. cloacae* suşu klinik örneklerde en sık rastlanan suşlar arasındadır (14).

Bu araştırmada, Van Gölü Havzasından toplanan toprak örneklerinden, izole edilen bakteri izolatlarının L-asparaginaz enzimini üretme kabiliyetleri ve L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, L-asparaginaz enzimi yönünden pozitif izolatların, fenotipik ve 16S rDNA diziliş analizine dayalı olarak, bakteriyel taksonomideki yerlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmada kullanılan kimyasallar

Araştırmada kullanılan ortamlar, ortam bileşenleri, şekerler, amino asitler ve moleküler çalışmalarda kullanılan kimyasallar yerel tedarikçiler aracılığı ile Sigma Firmasından sağlanmıştır.

Toprak örnekleri

Toprak örnekleri, Kuzey Doğu Anadolu Bölgesinden, Van Gölü havzasından 38°26'27K ve 042°19'04D koordinatlarına tekabül eden alandan sağlanmıştır. Bu örnekler, steril polietilen torbalar kullanılarak toplanmış ve soğuk zincir içerisinde mikrobiyoloji laboratuvara ulaştırılmıştır.

Toprak örneklerinden bakteri izolasyonu

Ringer çözeltisi içerisinde toprak örneklerinden, 1/10'luk toprak çözeltisi hazırlanmıştır. Bu ana solüsyondan, dilüsyon yöntemi ile seyreltmeler hazırlanmıştır. Bakterilerin izole edilmesi amacıyla, 1×10^{-4} lük seyreltmeden 100 µL, LB Agar besiyeri plakaların yüzeyine, yayma çubuğu yardımı ile yayılmıştır. Petri plakaları, 48 saat boyunca 30 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından elde edilen karışık kültürlerden saf kültürler elde edilmiştir. Saf kültürlerden stok kültürler hazırlanmış ve sonraki adımlarda %5 gliserol içeren kryo tüplerde -20 °C'de muhafaza edilmiştir (15).

Plaka deneyi ile L-asparaginaz pozitif izolatların taranması

L-asparaginaz enzimi açısından, izolatların primer taramasında, M9 minimal tuz ortamının 1 lt'lik bileşimi için 5 g L-asparagin, 64 g Na₂HPO₄·7H₂O, 15 g KH₂PO₄, 2.5g NaCl; 5 g NH₄Cl, 2 ml 1 M MgSO₄, 20 ml %20'lik glikoz çözeltisi ve 0,1 ml 1 M CaCl₂, % 0,001 fenol kırmızısı] kullanılmıştır (16). Ortamın pH'sı 6.5'e ayarlanmış ve ortamın katılaşması için %1.5 oranında bakteriyolojik agar ilave edilmiştir. Bakteriyel izolatlar, petri plakalarına steril eküvyon çubuğu yardımı ile yoğun bir şekilde ekilmiştir. Petri plakaları, 35 °C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petri plaklarında, biyomas etrafındaki rengin sarıdan kırmızıya dönmesi, L-asparaginaz enzimi üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (17).

L-asparaginaz enziminin üretimi

L-asparaginaz enziminin üretimi, batık kültür yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Üretim için 100 mL steril M9 minimal tuz ortamı içeren 250 mL'lik erlenler kullanılmıştır. Erlenlere, L-asparaginaz pozitif izolatın 24 saatlik kültüründen, 100 µL ile aşılanmıştır. Enzim aktivitesini belirlerken, sıcaklık ve pH değerleri ile zaman aralıkları arasındaki ilişkiyi ortaya koyan, çapraz denemeler parametre sayısını çok fazla artıracığından yapılamamıştır. Bu enzim, tedavi edici enzimler içerisinde sınıflandırıldığı için memelilerin fizyolojik pH'sına yakın olarak bütün ortamların pH'sı 7,0'ye ayarlanmıştır. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon zamanının etkisini belirlemek için, Erlenler sırasıyla 24, 48, 72, 96 ve 120 saat için pH 7,0'de 35°C'de çalkalayıcıda 150 rpm'de inkübe edilmiştir. pH'nın etkisini belirlemek için, erlenler sırasıyla pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0 için 48 saat 35°C'de çalkalayıcıda 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Sıcaklığın etkisini belirlemek için, erlenler sırasıyla 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C ve 50°C'de pH 7.0'de 48 saat çalkalayıcıda 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Tek bir karbon kaynağının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için, arabinoz, fruktoz, laktoz, maltoz,

mannitol ve trehaloz şekerleri son konsantrasyonları %1 olacak şekilde kullanılmıştır. Benzer şekilde, tek bir azot kaynağının, enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için arginin, asparagin, sistein, glutamin, metiyonin, ornitin ve triptofan amino asitleri ile kazein, et ekstratı, tripton, üre, ve maya ekstratının son konsantrasyonları %1 olacak şekilde ortama ilave edilmiştir. Hem azot kaynakları hem de karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için bütün ortamlar; pH 7,0'de, 48 saat 35°C'de çalkalayıcıda 150 rpm'de inkübe edilmiştir (18).

L-asparaginaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde neslerizasyon yöntemi kullanılmıştır (19). Bu amaçla, bakteriyel kültürler, +4 °C'de ve 8000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant, enzim aktivitesini belirlemek için, ekstraselüler ham L-asparaginaz enzimi kaynağı olarak kullanılmıştır. Test ve kör tüpleri için, 2 mL'lik hacimden oluşan reaksiyon karışımı; 1 mL 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,6), 189 mM 0,1 mL-asparagin, 0.9 mL distile sudan oluşturulmuştur. Test için, reaksiyon karışımının üzerine 0,1mL süpernatant ilave edilmiş ve 37°C'de 30 dk su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için 0,1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Kör tüplerine TCA ilavesinden sonra, enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşan amonyağın absorpsiyon değeri, spektrofotometrede (Schimadzu Bausch & Lomb) 436 nm'de belirlenmiştir. Standart eğriyi oluşturmak için 6 mM'lık amonyum sülfat çözeltisi kullanılmıştır. L-asparaginaz aktivitesinin, bir uluslararası birimi (IU); 37 °C'de, pH 8,6'da, dakikada 1,0 µmol amonyağı açığa çıkarmak için, gereken enzim miktarı olarak hesaplanmıştır.

L-asparaginaz pozitif izolatın fenotipik özelliklerinin belirlenmesi

L-asparaginaz enzimi üreten izolatın; morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri,

standart mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye göre belirlenmiştir (20).

Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonunda, fenol: kloroform yöntemi kullanılmıştır (21). 16S rDNA bölgesi uygun üniversal primerler kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Bu amaçla; bakterial domaini için spesifik 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' ve 1492R 5'TACGGYTACCTGTTCAGACTT3' evrensel primerleri kullanılmıştır. PCR işlemi tamamlandıktan sonra, PCR karışımının bir kısmı, agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntülenmiştir (22).

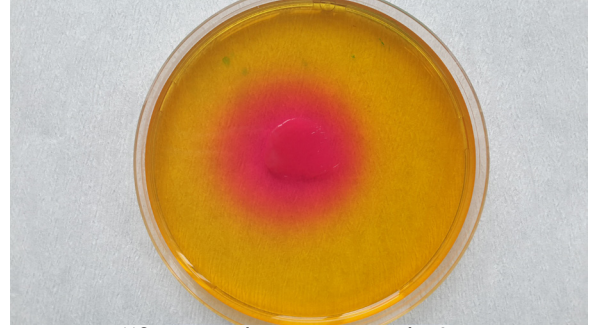
Polimeraz zincir reaksiyonu ve filogenetik ağacın oluşturulması

PCR ürünleri 27F ve 1492R primerleri kullanılarak nükleotid dizileri okunmuştur. Okunan dizi parçalarına (fragmentelerine) ait AB1 formatındaki dosyalar Codone Code Aligner V.6.02 programında açılarak kromatogramları kontrol edilmiş, hatalı okunan baş ve son kısımlar manuel olarak uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan nükleotid bölgelerinden, tek bir dizi (konsensüs dizisi) oluşturulmuştur. Nükleotid dizisi NCBI web sitesinden BLAST yapılmıştır. Yakın ilişkili organizmaların gen dizileri ile Mega 7.0 programında Clustal W algoritması kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanmış dizilerin nükleotid değişim modelleri JModel Test yöntemi ile test edilmiştir. Model testi sonucunda AIC kriterine göre TIM1+I+G modeli seçilmiştir (23). Bu modele göre Bayesian filogenetik analizi 3.000.000 jenerasyon ve her 100 jenerasyonda bir örnekleme şeklinde yapılmıştır (24).

BULGULAR

Van Gölü Havzasından toplanan toprak örneklerinden izole edilen bakteri izolatlarının, L-asparaginaz enzimini üretme kabiliyetleri ve

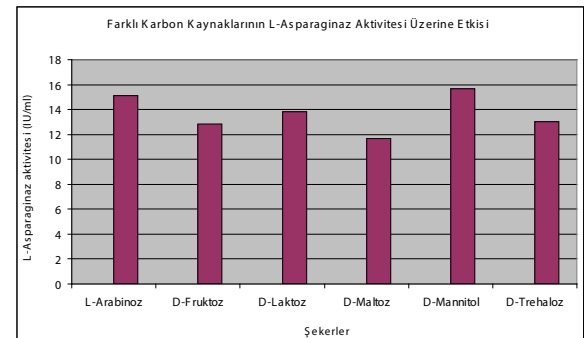
L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine ortam bileşiminin etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, toplam 10 izolat arasından, sadece birinin, L-asparaginaz enzimi yönünden pozitif olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. M9 minimal tuz ortamında L-asparaginaz üreten izolat

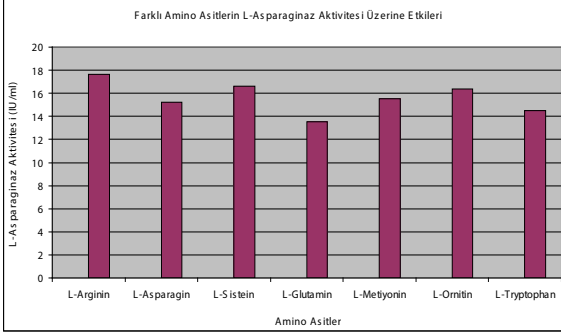
E. cloacae kompleks sp. V1 suşu tarafından üretilen L-asparaginaz enziminin, 48 saatlik sabit inkübasyon aralığında sırasıyla; 35 °C'de (16,02 IU/mL), pH 8,0 değerinde (15,25 IU/mL), mannitol (15,69 IU/mL) yeast ekstre (14,55 IU/mL) ve arginin amino asitinin varlığında (17,63 IU/mL) aktivite oluşturduğu tespit edilmiştir.

Arabinoz, fruktoz, laktoz, maltoz, mannitol ve trehaloz şekerlerinden, L-asparaginaz aktivitesi üzerine en yüksek etkiyi, mannitol (15,69 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de maltoz (11,69 IU/mL) göstermiştir (Şekil 2).



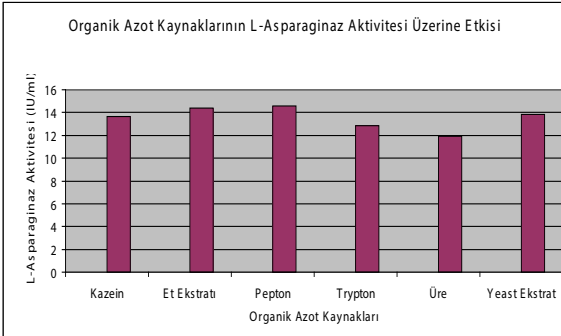
Şekil 2. Farklı karbon kaynaklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

Arginin, asparagin, sistein, glutamin, metiyonin, ornitin ve triptofan amino asitlerinden, L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi arginin amino asidi (17,63 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi glutamin amino asidi (13,56 IU/mL) göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı amino asitlerin L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

Kazein, et ekstraktı, pepton, tripton, üre ve maya ekstraktı gibi azot kaynaklarından, L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi pepton (14,55 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de üre (11,91 IU/mL) göstermiştir (Şekil 4).

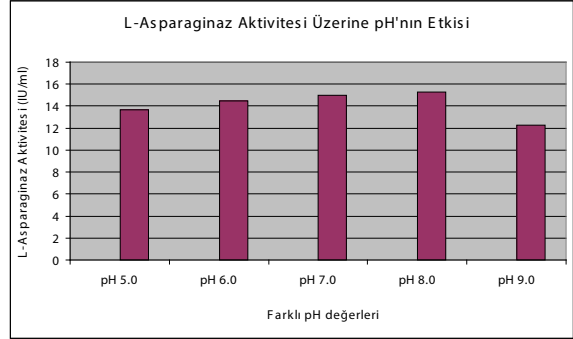


Şekil 4. Farklı organik azot kaynaklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

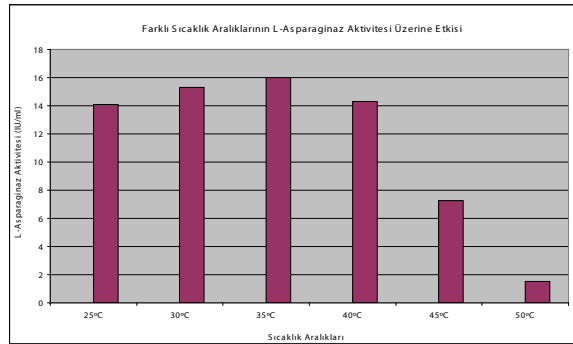
Beş farklı pH değerinden L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi pH 8.0 aralığı (15,25 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de pH 9.0 aralığı (12,24 IU/mL) göstermiştir (Şekil 5).

Altı farklı sıcaklık değerinden, L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi 35 °C (16,02 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de 50 °C

(1,54 IU/mL) göstermiştir (Şekil 6).

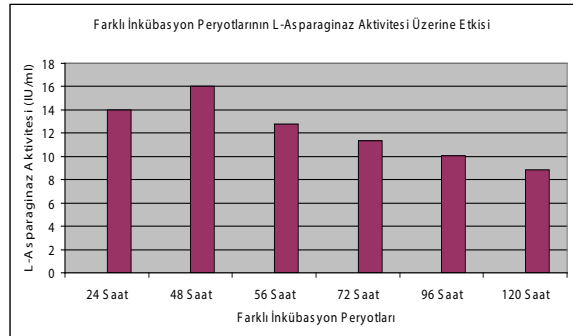


Şekil 5. Farklı pH aralıklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi



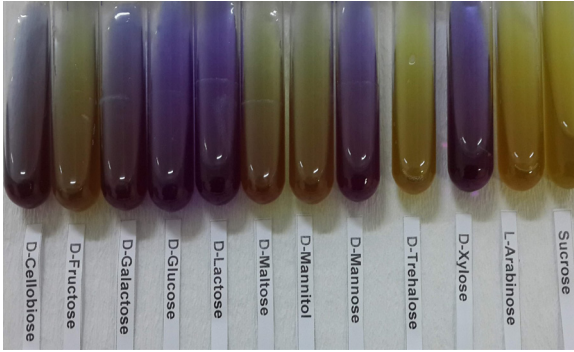
Şekil 6. Farklı sıcaklık değerlerinin L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

Altı farklı inkübasyon periyodundan, L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu yönde, en yüksek etkiyi 48 saatlik zaman aralığı (16,02 IU/mL) gösterirken, en düşük etkiyi de 120 saatlik zaman aralığı (8,87 IU/mL) göstermiştir (Şekil 7).

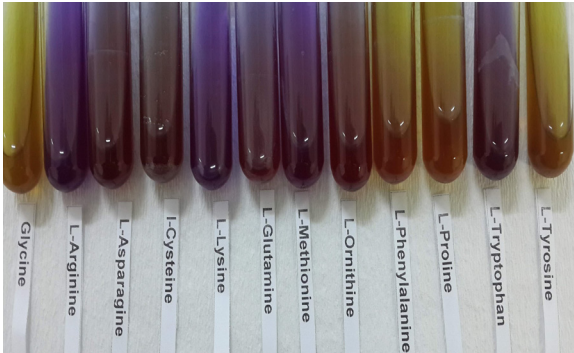


Şekil 7. Farklı zaman aralıklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

L-asparaginaz enzimi üreten izolata; Gram negatif, fakültatif anaerobik, hareketli, Voges-Proskauer, nitrat ve H₂S testleri açısından negatif ve asetat, sitrat ve üreaz testleri açısından pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu izolata fruktoz, maltoz, manitol, trehaloz, arabinoz ve sükröz şekerlerini okside ettiği ancak sellobiyoz, galaktoz, glukoz, laktöz, mannoz ve ksiloz şekerlerini tek karbon kaynağı olarak kullanmadığı belirlenmiştir. İlave olarak; arginin, asparagin, sistein, lizin, glutamin, metiyonin, ornitin ve triptofan amino asitlerini dekarboksilasyona uğrattığı fakat glisin, fenilalanin, prolin ve tirozin amino asitlerini tek azot kaynağı olarak kullanmadığı belirlenmiştir (Şekil 8, 9).



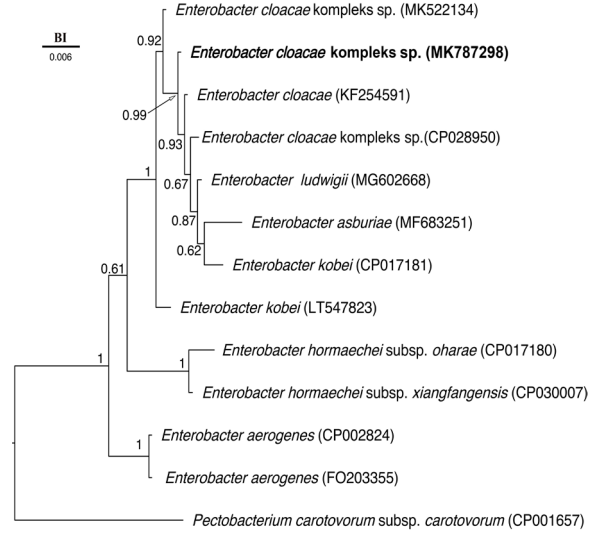
Şekil 8. Karbonhidrat oksidasyon testleri



Şekil 9. Amino asit dekarboksilasyon testleri

L-asparaginaz pozitif izolata ait, 16S rDNA gen bölgesi (1.411 nt) MK787298 erişim numarası ile GenBank'a kaydedilmiştir. BLAST analizi sonucunda *E. cloacae* Kompleks V1 şuşunun *E. cloacae* kompleks sp. (MK522134) şuşu ile %99.57 oranında benzerlik

oluşturduğu belirlenmiştir. Bayesian yaklaşımı ile oluşturulan filogenetik ağaç modellemesinde bu şuşun *E. cloacae* kompleks içerisinde yer alan türler ile birlikte kümelendikleri görülmüştür ve Bayesian filogenetik ağacında görüldüğü gibi *Enterobacter* genusu içerisinde küme oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. *Enterobacter cloacae* kompleks sp. V1 şuşu ve *Enterobacter* cinsinin üyeleri arasındaki ilişkiyi gösteren 16S rDNA gen sekanslarına dayanan Bayesian filogenetik ağacı

TARTIŞMA

Toprak örneklerinden izole edilen bakteri türlerinin L-asparaginaz enzimi üretme kabiliyetleri ve bu enzimin aktivite değerleri çeşitli araştırmalarda ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalarda *Pseudomonas proteolytica* S13D şuşunun maksimum aktivite değerinin 1.6 IU/ml olduğu ortaya konulmuştur (25). *Myroides gitamensis* türünün 24 saatlik inkübasyon aralığında ve 37 °C'de 85.7 IU/gds aktivite gösterdiği belirtilmiştir (26). *Bacillus aryabhatai* ITBHU02 şuşunun maksimum aktivite değerinin 6.35 mg-1 olduğu gösterilmiştir (27). *Streptococcus* spp. D1, *Bacillus polymyxa* ve *Streptococcus* spp. D2 türlerinin

sırasıyla, 11,6 U/mL, 8,8 U/mL ve 7,9 U/mL aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca bu türlerin enzim aktivitesi açısından optimum pH tercihlerinin pH 8.0 olduğu belirtilmiştir (28). *E. aerogenes* suşları ile yapılan çalışmalarda, araştırmacılar L-asparaginaz aktivitesini sırasıyla; 55 IU/mg (9), 20,17 IU/mL (11), 18,35 IU/mL (12) 0,11-0,50 IU/mL (19) ve 20,15 IU/mL (29) olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.

Bu araştırmaya benzer bir araştırmada, *E. cloacae* BGCC 2389 suşunu kullanarak, ortam bileşiminin, L-asparaginaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir (13). Bu suşun pH 7,0'da ($3,7 \pm 0,12$ IU mL⁻¹), 40 °C'de sıcaklıkta ($4,31 \pm 0,15$ IU/mL⁻¹), 21 saatlik inkübasyon periyodunda ($1,3 \pm 0,04$ IU/mL⁻¹) ve 15 saatlik kültürden %2 oranında aşılama yapıldığında ($1,43 \pm 0,06$ IU/mL⁻¹) maksimum aktivite gösterdiğini ifade edilmiştir. Ayrıca aynı araştırmada, L-asparaginaz enzimi üretimi üzerine karbon kaynağı olarak Piruvatın ($7,01 \pm 0,15$ IU/mL⁻¹), azot kaynağı olarak yeast ekstratın ($9,80 \pm 0,32$ IU IU/mL⁻¹), mineral iyon olarak magnezyum ($11,76 \pm 0,39$ IU mL⁻¹) ve indükleyici olarak asparagin amino asitinin ($13,06 \pm 0,37$ IU/mL⁻¹), L-asparaginaz aktivitesi üzerine olumlu etki gösterilmiştir.

Bu araştırmada *E. cloacae* kompleks V1 suşunun tarafından üretilen, L-asparaginaz enziminin, 48 saatlik inkübasyon aralığında (16,02 IU/mL), 35°C sıcaklıkta (16,02 IU/mL), pH 8,0 değerinde (15,25 IU/mL), karbon kaynağı olarak mannitol varlığında (15,69 IU/mL), organik azot kaynağı olarak yeast ekstrat varlığında (14,55 IU/mL) ve arginin amino asitinin varlığında (17,63 IU/mL) aktivite oluşturduğu tespit edilmiştir. Organik azot kaynağı olarak yeast ekstrat varlığında, maksimum aktivitenin görülmesi, *E. cloacae* BGCC 2389 suşu ile yapılan çalışma ile, bu araştırma arasında ortak noktayı oluşturmuştur.

L-asparaginaz pozitif V1 suşunun, Gram negatif çomak morfolojiye sahip olması, oksidaz testi açısından negatif olması ve hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda çoğalabilme özelliklerinden dolayı *Enterobacteriaceae* familyasına mensup

olduğuna tespit edilmiştir (20). Bu suşun pH 5,0 ile pH 9,0 arasında geniş bir pH aralığına tolerans gösterdiği belirlenmiştir. İlave olarak V1 suşunun 45 °C'de büyüme göstermesi termotolerant koliform grup içerisinde olduğunu da göstermiştir (30). Bu suşun, indol ve hidrojen sülfid üretimi yönünden negatif ve Sitrat testi açısından pozitif olması *Enterobacter* genusuna ait bir tür olduğu belirlenmiştir (31). Bu suşun; Voges-Proskauer testi, hareket testi açısından pozitif ve sukrozu karbon kaynağı olarak kullanması gibi fenotipik özelliklerinden dolayı *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei* ve *E. ludwigii* türlerinden birine ait olabileceği tespit edilmiştir (14).

Enterobacter cinsi içerisinde yer alan bu suşun, kesin tanısının yapılabilmesi için, 16S rDNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA gen dizilerine dayalı olarak, filogenetik analizlerde V1 suşu filogenetik ağaçta *E. cloacae* kompleks içerisinde konumlanmıştır. Bununla birlikte bu kompleks içerisinde değerlendirilen (32). *E. hormaechei* kompleks subsp. *oharae* (CP017180) ve *E. hormaechei* kompleks subsp. *xiangfangensis* (CP030007) suşlarının ağaç üzerinde *E. cloacae* kompleks içerisinde yer alan diğer üyelere daha uzak konumlanmıştır (Şekil 10). Bu durum *E. cloacae* kompleks içerisinde gruplandırılan suşların taksonomik pozisyonlarının yeniden değerlendirilmesi gereğini ortaya çıkarmıştır.

SONUÇ

Van Gölü Havzasından toplanan toprak örneklerinden, izole edilen bakteri izolatlarının, L-asparaginaz enzimini üretme kabiliyetlerinin araştırılmasıyla ilgili, gerçekleştirilen bu araştırma, ülkemizde konu ile ilgili ilk araştırmalar arasındadır. Bu araştırmada, *E. cloacae* kompleks sp. V1 suşunun, antineoplastik L-asparaginaz enziminin yönünden pozitif bulunması, mikrobiyal biyoteknoloji açısından son derece önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Shrivastava A, Khan AA, Khurshid M, Kalam, MA, Jain SK, Singhal PK. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016; 100(4): 1-10.
2. Sanawer S, Ali S, Mohsin T, Nasir A. Production, purification and advance applications of L-asparaginase. *IJSRST*, 2017; 3 (4): 351.
3. Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 1988; 195(1): 45-77.
4. Mahajan RV, Mihooliya KN, Saran S, Saxena RK. L-asparaginase from *Bacillus* sp. RKS-20: process optimization and application in the inhibition of acrylamide formation in fried foods. *Proteins and Proteomics*, 2014; 5(2): 15-132.
5. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 2011; 117(2), 238-49.
6. Aydın S, Geçkil H, Çaylak E, Kılıç N. Mikroorganizmaların kanser tedavisinde kullanımı. *Firat Tıp Derg*, 2004; 9(2): 30-4.
7. Yadav S, Verma SK, Singh J, Kumar A. Industrial production and clinical application of L-asparaginase: a chemotherapeutic agent. *IJMRPS*, 2014; 8(1): 54-60.
8. Resnick AD, Magasanik B. L-asparaginase of *Klebsiella aerogenes*. Activation of its synthesis by glutamine synthetase. *J Biol Chem*, 1976; 251(9): 2722-8.
9. Mukherjee J, Joeris K, Riechel P, Scheper T. A simple method for the isolation and purification of L-asparaginase from *Enterobacter aerogenes*. *Folia Microbiol*, 1999; 44(1): 15-8.
10. Geckil H, Gencer S. Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004; 63(6): 691-7.
11. Baskar G, Muthukumaran C, Viruthagiri T, Reganathan S. Optimization of operating conditions for the production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes* MTCC 2823 using central composite design. *IJBST*, 2009; 2(2): 32-6.
12. Erva RR, Goswami AN, Suman P, Vedanabhatla R, Rajulapati SB. Optimization of L-asparaginase production from novel *Enterobacter* sp., by submerged fermentation using response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*, 2017; 47(3): 219-28.
13. Sharma A, Husain I. Optimization of medium components for extracellular glutaminase free asparaginase from *Enterobacter cloacae*. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2015; 4(1): 296-309.
14. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*, 2012; 7(7): 887-902.
15. Goldman E, Green, LH. Practical handbook of microbiology. In *Practical Handbook of Microbiology*, Third Ed. CRC Pres, 2015.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
17. Gulati R, Saxena RK, Gupta R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganisms. *J Appl Microbiol*, 1997; 24(1), 23-6.
18. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 2014; 1(1-6): 41-55.
19. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. *Microbiology*, 1973; 76(1), 85-99.
20. Brenner DJ, Farmer III JJ. Family I. Enterobacteriaceae. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, Bone DR, Vos P, et al, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, New York, NY: Springer, 2005: 587-607.

21. Green MR, Sambrook J. Isolating DNA from Gram-negative bacteria. 2017 Cold Spring Harb Protoc; 2017; (3) : 2017(1).
22. Nikiforov YE, Howles PN. Polymerase chain reaction. In Ricardo VL, eds. Morphology Methods: Cell and Molecular Biology Techniques. New York: Humana Press, 2001:181-207.
23. Posada, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular biology and evolution, 2008; 25(7): 1253-56.
24. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Hohna S. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol, 2012; 61(3): 539-42.
25. Shukla D, Shrivastav, VK, Jana AM, Shrivastav A. Exploration of the potential L-asparaginase producing bacteria from the soil of Gwalior (India). Int J Curr Microbiol Appl Sci, 2014; 3(5): 665-72.
26. Prasad Talluri VSSL, Bhavana M, Siva Kumar K, Anil Kumar P, Rajagopal, SV. Myroides gitamensis sp. nov., L-asparaginase producing bacteria isolated from slaughter house soil sample in Visakhapatnam India. J Microb Biochem Technol, 2014; 6(3): 144-7.
27. Singh Y, Gundampati RK, Jagannadham MV, Srivastava SK. Extracellular L-asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity in vitro. Appl Biochem Biotechnol, 2013; 171(7): 1759-74.
28. Wakil SS, Adelegan AA. Screening, production and optimization of L-asparaginase from soil bacteria isolated in Ibadan, South-western Nigeria. Aust. J. Basic Appl Sci, 2015; 11: 39-51.
29. Reddy ER, Babu RS, Chandrasai PD, Madhuri P. Neural network modeling and genetic algorithm optimization strategy for the production of L-asparaginase from Novel *Enterobacter* sp. Int J Pharm Sci Res, 2017; 9(2): 124-130.
30. Shaheduzzaman M, Rahman MS, Nur IT. (2016). Influence of temperature on the growth of fecal coliform. SJ Microbiol, 2016; 6(1): 20-3.
31. Grimont PA, Grimont F. Enterobacter, In: Brenner LDJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edn, vol. 2, Springer, USA, 2005: 661-670.
32. Paauw A, Caspers MP, Schuren FH, Leverstein-van Hall MA, Delétoile A, Montijn RC. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. PLoS one, 2008; 3(8): e3018.