

Streptomyces lincolnensis M-20 균주로 부터 분리, 정제된 L-Asparaginase의 열안정성과 단백 가수 분해 효소에 대한 저항성

김경자*

순천향대 자연과학대학 생명공학과

(Received March 29, 2007; Revised April 13, 2007)

Thermostability and Resistance to Proteolysis of L-Asparaginase Purified from *Streptomyces lincolnensis* M-20

Kyoung-Ja Kim*

Department of Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

Abstract — Thermostable asparaginase was purified to homogeneity from mesophilic *Streptomyces lincolnensis* M-20 by 30~70% ammonium sulfate precipitation and asparagine-Sepharose CL 6B affinity column chromatography. The apparent molecular mass of L-asparaginase by SDS-PAGE was found to be 47 kDa, whereas by its mobility on Sephacryl S-300 column was around 180 kDa, indicating that the enzyme at the native stage acts as tetramer. The purified enzyme showed a single band on acrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature were pH 9.5 and 55°C, respectively. Chemical modification experiments of purified asparaginases implied the existence of a cysteine residue located at or near the active site. Purified asparaginase retained 85% of the initial activity after incubation at 90°C for 30 min. A correlation between thermostability and resistance to proteolysis of commercial asparaginase and purified asparaginase from *Streptomyces lincolnensis* M-20 was investigated. Purified thermostable asparaginase was resistant to trypsin and chymotrypsin treatment, while the commercial asparaginase was not thermostable and was susceptible to proteolytic treatment with trypsin and chymotrypsin.

Keywords □ thermostability, resistance to proteolysis, asparaginase, *Streptomyces lincolnensis* M-20

L-asparaginase(L-asparagine-amidohydrolase, EC 3.5.1.1)는 L-asparagine을 L-aspartic acid와 암모니아로 변화시키는 효소^{3,24,29,31}이다. 이 효소가 hydroxylamine 존재 하에서 L-asparagine을 aspartyl β-hydroxamate로 변화시키는 특성을 효소 활성 측정⁸에 이용한다. L-asparaginase는 Hodgkin's disease, acute lymphocytic leukemia, lymphosarcoma 그리고 melanosarcoma와 같은 질병 치료에 화학 요법제^{5,12,16}로 이용되고 있다. 많은 종류의 암세포가 L-asparagine을 성장에 필요한 요소로 요구하는 반면 일반 세포들은 L-asparagine을 스스로 합성하므로 L-asparaginase를 이용하여 L-asparagine을 고갈시켜서 선택적으로 암세포의 성장^{10,11,33}을 억제할 수 있다. *Pseudomonas* sp.,²⁰

Escherichia coli,^{1,2} *Erwinia* sp.,^{19,23,30} *Citrobacter* sp.,⁷ *Corynebacterium glutamicum*,²¹ *Enterobacter* sp.,^{24,25} *Bacillus* sp.,²² *Staphylococcus* sp.,²⁸ *Proteus vulgaris*³² 등의 미생물들에서 L-asparaginase가 생산되는 것으로 보고되었으며, 특히 *Escherichia coli*에서 분리된 효소는 임상적으로 사용되고 있다. 효소를 임상적으로 혹은 산업적으로 이용하기 위해서는 열안정성, pH 안정성등이 중요한 요소로 간주되고 있다. 본 실험실에서 분리된 중온균인 *Streptomyces lincolnensis* M-20로부터 L-asparaginase를 분리, 정제하여 90°C에서 30분간 둔 후 열안정성을 조사한 결과 85% 이상의 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 열에 안정한 단백질의 경우 단백질 가수 분해 효소에 저항성을 가지는 경우⁶가 많은 것으로 알려져 있어 본 연구에서는 *Streptomyces lincolnensis* M-20로부터 분리, 정제한 효소의 특성 및 열안정성과 단백질 가수분해 효소에 대한 저항성과의 연관 관계를 조사하였다.

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 041-530-1352 (팩스) 041-530-1350
(E-mail) kyoungjakim@hotmail.com

실험 방법

실험 재료 및 시약

L-asparaginase, asparagine, aspartyl β -hydroxamate, Sepharose CL 6B, phenol red 등은 Sigma(St. Louis, USA)에서, 그외 배지용 시약은 Difco Lab(Detroit, USA)에서, 그리고 일반 용매류는 Merck(Germany)에서 구입하였다.

L-asparaginase 생산 균주의 분리

L-asparaginase 생산 균주를 분리하기 위하여 실험실에 보관중인 여러 미생물들을 L-asparaginase detection 한천 배지²⁴⁾ ($g\ l^{-1}$): L-asparagine, 10; D-glucose, 2; KCl, 0.52; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, trace; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, trace; agar, 20, pH 6.2 에 도달한 후 30°C에서 7일간 배양하였다. 그 후 0.001% phenol red 용액을 균이 자란 배지위에 부어 생성된 암모니아에 의해 phenol red의 노란색이 붉은색으로 변화된 균주를 L-asparaginase 생산용 실험 균주로 선택하였다.

균주 배양 조건

Chitinase 생산 균주로 전보¹⁴⁾에 보고한 바 있는 *Streptomyces lincolnensis* M-20 균주가 asparaginase detection 한천 배지에서 강한 붉은색으로 변화되어 실험 균주로 선별하였다. L-asparaginase 생산 배지는 다음과 같은 조성을 가진 배지를 이용하였다. ASP 배지 : ($g\ l^{-1}$): D-glucose, 5; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 1.6; K_2HPO_4 , 1.0; yeast extract, 0.5; KCl, 0.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01, pH 7.0. 균주 배양액은 30°C에서 160 rpm으로 4일간 배양하였다.

Hydroxylamine을 이용한 L-asparaginase 활성 측정법

L-asparaginase 측정용 반응액⁸⁾은 40 mM L-asparagine, 100 mM hydroxylamine hydrochloride, 100 μ l 효소액과 50 mM sodium borate buffer, pH 9.5를 최종 부피 1.0 ml로 만든 후 55°C에서 한시간 반응시켰다. 그 후 125 μ l의 chromogenic iron chloride 시약 [$FeCl_3$, 100 g, trichloroacetic acid 33 g을 0.7 M HCl에 녹인 시약]을 첨가하여 반응을 멈추고 5,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상등액의 aspartyl β -hydroxamate를 분광광도계를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 바탕 실험으로 효소액 대신 완충액을 첨가하여 위와 같은 반응을 수행하여 흡광도를 측정한 후 시료의 흡광도에서 빼준 값으로 효소 활성을 계산하였다. 효소 활성 1 Unit는 1분당 생성된 1 μ mol의 aspartyl β -hydroxamate의 흡광도 값을 표준 곡선으로부터 구하여 정하였다.

효소액 준비

다음 과정들을 4°C에서 행하였다.

Streptomyces lincolnensis M-20 균주를 L-asparaginase 생산 배지에 4일간 배양한 다음 8,000 \times g에서 10 min 원심 분리하여 증류수로 3번 씻었다. 그 후 2.5 g의 세포를 50 mM sodium borate buffer, pH 9.5에 현탁하여 vibra-cell sonifier(Sonics and Material INC, model VC 130)를 이용하여 6 W에서 1분간 6번 씩 초음파로 처리하였다. 초음파 처리 후 다시 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 분리 과정에 이용하였다. 효소액의 단백질 양은 BIO-RAD protein assay reagent를 이용하여 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 표준 곡선을 작성하여 Bradford(1976) 법⁴⁾으로 정량하였다.

L-Asn-Sepharose CL 6B affinity adsorbent 합성

L-asparaginase분리를 위하여 L-Asn-Sepharose CL 6B affinity adsorbent¹⁷⁾를 다음과 같은 방법으로 합성하였다. 먼저 증류수로 세척한 Sepharose CL 6B, 10 g을 NaOH(0.6 M, 10 ml)용액에 첨가하고 4시간 동안 상온에 두었다. 이 용액에 1,4-butanediol diglycidyl ether(10 ml)와 sodium borohydrite(20 mg)를 첨가하여 천천히 저으면서 상온에서 하룻밤 두었다. 활성화된 겔을 여과하여 모은 다음 200 ml의 증류수로 씻고 L-asparagine(1.2 g을 20 ml의 0.5 M Na_2CO_3 완충액, pH 10에 녹인 것)을 첨가하여 상온에서 72시간 동안 천천히 저어주면서 반응이 완결되도록 하였다. 반응이 완결된 겔을 400 ml의 증류수로 씻고 20% 에탄올에 넣어 4°C에 보관하였다.

L-asparaginase 분리, 정제

Streptomyces lincolnensis M-20의 조효소액으로부터 황산 암모니움 침전법(30~70%)과 L-Asn-Sepharose CL 6B affinity column chromatography법을 이용하여 L-asparaginase를 정제하였다. 황산 암모니움 30~70% 포화 용액에서 침전된 조효소액을 12,000 \times g에서 30분간 원심 분리하여 침전을 얻어 50 mM Tris buffer, pH 8.5에 현탁 후 같은 완충액으로 투석시켜 황산 암모니움을 제거하였다. 투석한 효소액을 같은 완충액으로 평형화시킨 L-Asn-Sepharose CL 6B affinity column에 첨가하고 0~0.7 M KCl을 함유한 완충액으로 용출시켰다. 활성 분획을 모아 농축시키고 완충액으로 투석하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동과 분자량 측정

분리, 정제한 효소액을 Laemmli(1970)방법¹⁸⁾에 따라 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 수행하였으며, 표준 단백질로는 BIO-RAD사의 표준 단백을 사용하였다. 효소의 분자량은 Sephacry S-300 column chromatography를 수행하여 bovine throglobulin(669 kDa), horse spleen apoferritin(443 kDa), sweet potato β -amylase(200 kDa), yeast alcohol dehydrogenase(150 kDa), bovine serum albumin(66 kDa)과 carbonic anhydrase(29

kDa)를 표준 단백질로 표준 곡선을 작성하여 조사하였다.

L-asparaginase에 대한 pH와 온도의 영향

효소에 대한 pH의 영향은 pH가 다른 다음과 같은 50 mM 농도의 완충액에서 효소 반응을 측정하여 조사하였다. Sodium acetate buffer(pH 4~6), phosphate buffer(pH 6.5~7.5), Tris-HCl buffer(pH 8~9), sodium borate buffer(pH 9.5~10.5), Glycine-NaOH buffer(pH 10.5~12). 온도의 영향은 20°C~80°C에서 효소 반응을 측정하여 조사하였다.

L-asparaginase의 화학적 변형 실험

분리된 효소의 활성 자리에 관여하는 아미노산 잔기의 종류를 조사하기 위하여 특정 잔기와특이적으로 결합하여 화학적 변형을 일으키는 시약²⁶⁾을 0~10 mM 농도로 효소 반응액에 첨가하여 효소 활성의 변화를 조사하였다. 사용한 시약들은 Diethyl pyrocarbonate(DEPC), phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), Phenylglyoxal, N-bromosuccinimide, Chloramine T, Woodward's reagent K, Iodine, 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)와 Picryl-sulfonic acid로 효소를 함유한 50 mM borate buffer(pH 9.5)에 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후 기질을 첨가하여 효소 반응을 측정하였다. 화학 변형 시약을 첨가하지 않은 효소의 활성을 같은 조건에서 측정하여 바탕 용액으로 비교하였다.

L-asparaginase의 열안정성 조사

Streptomyces lincolnensis M-20로부터 분리, 정제된 L-asparaginase와 시판되고 있는 *Escherichia coli*의 L-asparaginase의 열안정성을 비교 조사하기 위하여 50 mM sodium borate

buffer(pH 9.5)에 6 units/ml의 농도로 효소를 첨가하고 여러 가지 온도에서 30분간 둔 다음 얼음에서 온도를 낮추고 표준 방법에 의거하여 효소 활성을 측정하였다.

L-asparaginase 단백질 가수 분해 효소에 대한 저항성 여부

시판되는 L-asparaginase와 분리, 정제된 L-asparaginase의 단백질 분해 효소에 대한 저항성 여부를 비교하기 위하여 각 L-asparaginase 5 units 를 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0에 첨가하고 단백질 분해 효소인 chymotrypsin과 trypsin을 각각 몇 가지 농도로 첨가하여 37°C에서 반응시키면서 일정량을 꺼내서 L-asparaginase 활성을 조사하였다. 바탕 용액으로는 단백질 분해 효소를 첨가하지 않은 상태에서 L-asparaginase를 같은 조건으로 실험하여 비교하였다.

결과 및 논의

L-asparaginase 생산 균주의 분리

L-asparaginase를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 L-asparagine을 함유한 아가 배지에 여러 균주들을 도말 후 배양하고 L-asparaginase에 의해 생성된 암모니아를 phenol red 용액을 부어 붉은색으로 주변이 가장 많이 변화된 균주를 실험 균주로 선별하였다. Chitinase 생산 균주로 전보¹⁴⁾에 보고되었던 *Streptomyces lincolnensis* M-20를 L-asparaginase 생산 균주로 선별하였으며 Fig. 1에서 보는 바와 같이 이 균주를 도말한 배지에 첨가한 phenol red의 색이 붉은색으로 변화되었음을 확인하였다.

L-asparaginase의 분리 및 정제

L-asparaginase 생산 배지에서 4일간 키운 *Streptomyces lincolnensis* M-20의 세포를 초음파 처리 후 얻은 세포내 분획을 30~70% 포화 황산 암모늄 침전법과 L-Asn-Sepharose CL 6B affinity column chromatography를 수행하여 Fig. 2에서 보는 바

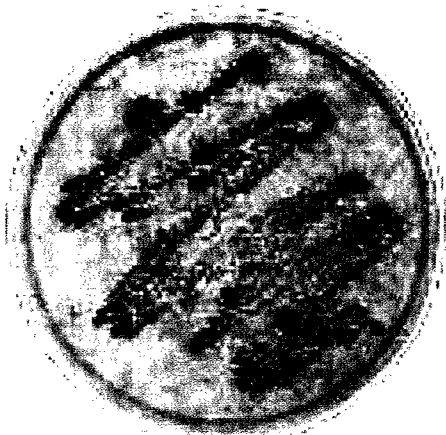


Fig. 1 - Detection of L-asparaginase production of *Streptomyces lincolnensis* M-20 grown on asparaginase detection medium by color change of phenol red solution.

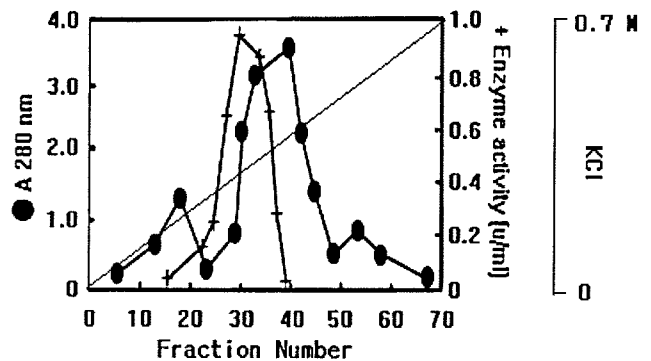


Fig. 2 - L-Asn-Sepharose CL 6B affinity column chromatogram of L-asparaginase from *Streptomyces lincolnensis* M-20. Enzyme activity, (●); Protein concentration, (†).

Table I - Purification steps of L-asparaginase from *Streptomyces lincolnensis* M-20

Step	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
Cell free extract	454.6	500	1.1	1
Ammonium sulfate Precipitation	230.7	450	1.95	1.72
L-Asn-Sepharose CL 6B Affinity column chromatography	5.6	172.5	30.8	28

와 같이 L-asparaginase를 0.3 M KCl에서 용출시켰다. Table I에서 보는 바와 같이 28배로 정제된 30.8 U/mg·protein의 활성을 가진 L-asparaginase를 정제하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동과 분자량 측정

분리, 정제된 L-asparaginase를 SDS-PAGE한 결과 47 kDa (Fig. 3)에서 단일 밴드를 보였으며, Sephacryl S-300 superfine column을 이용하여 표준 단백질과 용출 부피를 비교하여 분자량을 조사한 결과 180 kDa으로 계산되었다. 이러한 결과로 미루어 L-asparaginase는 4개의 소단위체로 되었음을 추정할 수 있다. 여러 원핵 생물과 진핵 생물에서 분리된 L-asparaginase가 2개, 4개 혹은 6개의 소단위체^{26,27,29)}로 구성되어 있다는 보고와 일치하는 것으로 나타났다.

최적 pH와 온도

정제된 L-asparaginase의 최적 pH를 pH 4.0에서 12.0 범위에서 조사한 결과 pH 9.5가 효소의 최적 pH인 것으로 나타났다 (결과 미제시). pH 9.5는 *Serratia marcescens*³⁴⁾(pH 8.5)와 *Saccharomyces cerevisiae*⁸⁾(pH 8.6)에서 분리된 효소들의 최적 pH 보다 약간 높은 것으로 대부분의 다른 보고에서도 알칼리성 범위의 pH에서 효소가 최적을 나타내는 것으로 일치하였다. 효소의 최적 온도를 20°C to 80°C에서 조사한 결과 55°C인 것

SDS-PAGE

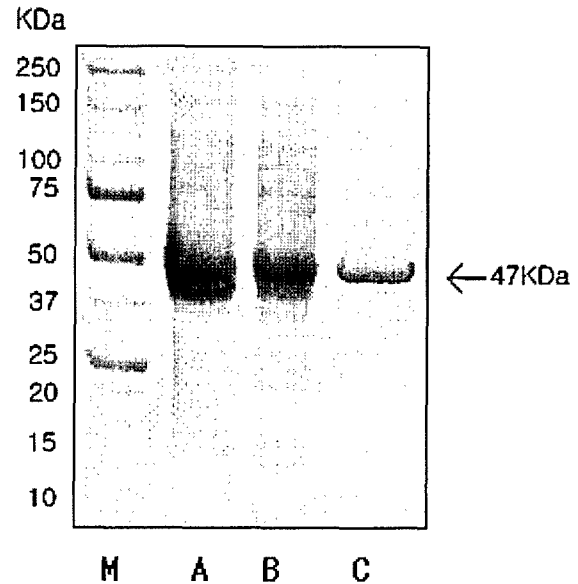


Fig. 3 - SDS-PAGE of purified L-asparaginase from *Streptomyces lincolnensis* M-20. M : protein standard marker from BIO-RAD, A : cell free extract, B : 30~70% ammonium sulfate precipitation fraction, C : L-Asn-Sepharose CL 6B affinity column fraction.

로 조사되었으며(자료 미제시) *Candida utilis*¹³⁾의 효소에서 보고된 온도와 일치하였다.

L-asparaginase의 화학적 변형

분리된 효소의 활성 자리에 관여하는 아미노산 잔기의 종류를 조사하기 위하여 특정 잔기와특이적으로 결합하여 화학적 변형을 일으키는 시약을 0~10 mM 농도로 효소 반응액에 첨가하여 효소 활성의 변화를 조사하였다. Table II에서 보는 바와 같이 정제된 L-asparaginase는 diethyl pyrocarbonate, phenylglyoxal와 iodine 용액에 의해서는 활성이 억제되지 않는 것으로 나타났다. 이 결과로 미루어 histidine, arginine과 tyrosine은 활성 자리에

Table II - Chemical modification of L-asparaginase from *Streptomyces lincolnensis* M-20

Modifier	Modified amino acid	Relative activity (%)	
		Final concentration of modifier	
		10 mM	1 mM
No add	-	100	100
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	His	103	100
Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)	Ser	63.5	88
Phenylglyoxal	Arg	102	100
N-bromosuccinimide	Trp, Cys, Tyr	66	105
Chloramine T	Met	90	98
Woodward's reagent K	Asp, Glu	71	79
Iodine	Tyr	100	100
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)	Cys	11.5	56
Picrylsulfonic acid	Lys	88	99

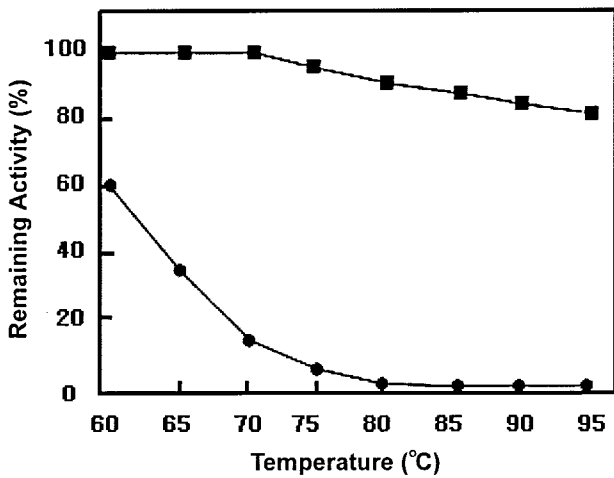


Fig. 4 – Thermostability of commercial- (●) and purified L-asparaginase (■) from *Streptomyces lincolnensis* M-20.

관여하지 않는 것으로 추정되었다. *E. coli*의 L-asparaginase II는 arginine²⁶이 활성 자리에 관여하는 것으로 보고되었다. 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)에 의해서는 정제된 효소 활성이 억제되어 12% 정도의 활성만을 나타낸 것으로 cystein 잔기가 활성 자리에 관여하는 것으로 생각되었다.

L-asparaginase의 열안정성

*E. coli*에서 분리된 시판용 L-asparaginase와 *Streptomyces lincolnensis* M-20에서 정제된 이 효소의 열안정성을 여러 온도에서 비교한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 시판용 효소는 75°C에서 완전히 활성이 억제되었으나, *Streptomyces lincolnensis* M-20에서 정제된 효소는 75°C까지 활성을 완전히 유지하였으며, 90°C에서도 85%의 활성을 유지하는 것으로 열에 안정한 효소로 추정되었다. 중온균에서 분리된 효소의 열안정성은 높은 열에 대한 단백질의 적응력에 대한 기작 연구에 중요한 것으로 여겨지고 있다. 열안정성에 관한 기작¹⁵으로는 전자기적 상호 작용, 이황화 결합, 소수성 결합과 지방족 아미노산간의 상호 작용등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 분리된 효소의 아미노산 배열과 구조를 조사하여 열안정성에 관여하는 기작을 연구하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

L-asparaginase의 단백 분해 효소에 대한 저항성 조사

*E. coli*에서 분리된 시판용 L-asparaginase와 *Streptomyces lincolnensis* M-20에서 정제된 이 효소의 열안정성과 단백 분해 효소인 chymotrypsin과 trypsin에 대한 저항성 여부를 조사하였다. Table III에서 보는 바와 같이 시판용 L-asparaginase는 열에 안정하지 않은 것으로 나타났으며, 단백 분해 효소에 저항성을 가지지 않았다. 반면에 열에 안정한 *Streptomyces lincolnensis* M-20에서 정제된 이 효소는 단백 분해 효소에 저항성을 가지는 것으로 조사되었다. 열안정성을 가진 것으로 보고된 glutamine

Table III – Comparison between proteolytic inactivation and thermal stability of commercial L-asparaginase and purified L-asparaginase from *Streptomyces lincolnensis* M-20

Proteinase used (incubation time)	Susceptibility to proteolysis (% of activity remaining after proteolysis of enzymes)	
	Commercial L-asparaginase	Purified L-asparaginase
Chymotrypsin (1 h)	25	100
(4 h)	0	87
Trypsin (1 h)	17	100
(4 h)	0	92

Proteinase concentrations were: chymotrypsin, 0.05 mg/ml; trypsin 0.05 mg/ml.

synthetase와 6-phosphogluconate dehydrogenase의 경우 단백 가수분해 효소에 저항성⁶을 가지는 것으로 알려져 있다. 단백질이 풀어짐으로 해서 단백 가수 분해 효소에 쉽게 반응하므로 열안정성을 가진 단백질의 경우에는 좀더 단단한 구조를 가졌거나 꼬인 구조를 가질 것으로 추정되고 있다.

결 론

열에 안정한 asparaginase를 중온균인 *Streptomyces lincolnensis* M-20의 세포내 분획에서 황산 암모니움 침전법(30~70% 포화 용액)과 L-Asn-Sepharose CL 6B affinity column chromatography를 이용하여 정제하였다. 효소의 분자량은 SDS-PAGE를 이용하여 조사한 결과 47 kDa으로 나타났으며, Sepharose S-300 column chromatography 결과 180 kDa으로 나타나 정제된 asparaginase는 4개의 소단위체로 구성된 것으로 추정되었다.

효소의 최적 pH와 최적 온도는 각각 pH 9.5와 55°C인 것으로 조사되었으며, 활성 자리에 대한 화학적 변형 실험을 한 결과 cystein잔기가 활성자리에 관여하는 것으로 나타났다.

분리한 효소를 90°C에서 30분간 둔 후 열 안정성을 조사한 결과 85%의 효소 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 이 효소의 열안정성과 단백 분해 효소에 대한 저항성과의 연관 관계를 조사하였다. *E. coli*에서 정제되어 시판되는 asparaginase와 *Streptomyces lincolnensis* M-20에서 분리, 정제한 asparaginase의 열안정성과 단백 분해 효소 trypsin과 chymotrypsin에 대한 저항성 여부를 비교한 결과, 전자는 열에 불안정하였으며 단백 분해 효소에 대한 저항성도 없는 것으로 나타났다. 반면에 열에 안정한 것으로 조사된 후자의 경우에는 trypsin과 chymotrypsin에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났다.

문 헌

- 1) Barnes, W. R., Dorn, G. L. and Vela, G. R. : Effect of culture

- conditions on synthesis of L-asparaginase by *Escherichia coli* A-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 257 (1977).
- 2) Barnes, W. R., Vela, G. R. and Dorn, G. L. : Physiology of L-asparaginase synthesis in recombinants of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 766 (1978).
 - 3) Borek, D. and Jaskólski, M. : Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica.* **48**, 893 (2001).
 - 4) Bradford, M. M. A. : Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
 - 5) Capizzi, R. L. : Asparaginase revisited. *Leuk Lymphoma.* **10**, 147 (1993).
 - 6) Daniel, R. M., Cowan, D. A., Morgan, H. W. and Curran, M. P. : A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis. *Biochem. J.* **207**, 641 (1982).
 - 7) Davidson, L., Burkom, M., Ahn, S., Chang, L. C. and Kitto, B. : A specific L-asparaginase form *Citrobacter Freundii*. *Biochem. Biophys. Acta.* **480**, 282 (1977).
 - 8) Dunlop, P. C., Meyer, G. M. and Roon, R. J. : Reactions of asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. A mechanistic analysis of hydrolysis and hydroxylaminolysis. *J. Biol. Chem.* **255**, 1542 (1980).
 - 9) El-Shora, H. M. and Ashour, S. A. : Biochemical characterization of asparaginase from some *Bacillus* sp. *J. Environ. Sci.* **6**, 105 (1993).
 - 10) Goldberg, D. M. : Enzymes as agents for the treatment of disease. *Clin. Chim. Acta.* **206**, 45 (1992).
 - 11) Hannun, Y. A. : Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* **89**, 1845 (1997).
 - 12) Keating, M. J., Holmes, R., Lerner, S. and Ho, D. H. : L-asparaginase and PEG asparaginase-past, present and future. *Leuk. Lymphoma.* **10**, 153 (1993).
 - 13) Kil, J. O., Kim, G. N. and Park, I. : Production and characterization of extracellular L-asparaginase from microorganism: Purification and characterization of L-asparaginase from *Candida utilis*. *Food and Biotechnology* **3**, 249 (1994).
 - 14) Kim, K. J., Yang, Y. J. and Kim, J. G. : Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 185 (2003).
 - 15) Kim, N. S. and Kim, S. I. : Some molecular characteristics and improving methods for thermal stability of enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 100 (1991).
 - 16) Kitto, G. B., Smith, G., Thiet, T. Q., Manson, M. and Davidson, L. : Tumor inhibitory and non-tumor inhibitory L-asparaginases from *Pseudomonas geniculata*. *J. Bacteriol.* **137**, 204 (1979).
 - 17) Kotzia, G. A. and Labrou, N. E. : Cloning, expression and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *J. Biotechnology* **119**, 309 (2005).
 - 18) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
 - 19) Maladkar, N. K., Singh, V. K. and Naik, S. R. : Fermentative production and isolation of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Hindustan Antibiot Bull* **35**, 77 (1993).
 - 20) Manna, S., Shinha, A., Sadhukhan, R. and Chakrabraty, S. L. : Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. *Curr. Microbiol.* **30**, 291 (1995).
 - 21) Mesas, J. M., Gil, J. A. and Martin, J. F. : Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen Microbiol.* **136**, 515 (1990).
 - 22) Mohapatra, B. R., Sani, R. K. and Banerjee, U. C. : Characterization of L-asparaginase from *Bacillus* sp. Isolated from an intertidal marine alga (*Sargassum* sp.). *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 380 (1995).
 - 23) Moola, Z. B., Scawen, M. D., Atkinson, T. and Nicholls, D. J. : *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochem. J.* **302**, 921 (1994).
 - 24) Mukherjee, J., Majumdar, S. and Scheper, T. : Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 180 (2000).
 - 25) Nawaz, M. S., Zhang, D., Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. : Isolation and characterization of *Enterobacter cloacae* capable of metabolizing asparagines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 568 (1998).
 - 26) Prista, A. A. and Kyriakidis, D. A. : L-Asparaginase of *Thermus thermophilus*: purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity. *Mol. Cell. Biochem.* **216**, 93 (2001).
 - 27) Ramakrishnan, M. S. and Joseph, R. : Characterization of an extracellular asparaginase of *Rhodospirium toruloides* CBS14 exhibiting unique physicochemical properties. *Can. J. Microbiol.* **42**, 316 (1996).
 - 28) Rozalska, M. and Mikucki, J. : Staphylococcal L-asparaginase: catabolic repression of synthesis. *Acta. Microbiol. Polon.* **41**, 145 (1992).
 - 29) Sarquis, M., Oliveira, E., Santos, A. S. and Costa, G. L. : Production of L-asparaginase by Filamentous fungi. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **99**, 489 (2004).
 - 30) Shifrin, S., Solis, B. G. and Chaiken, I. M. : L-Asparaginase from *Erwinia carotovora*. Physicochemical properties of the native and succinylated enzyme. *J. Biol. Chem.* **248**, 3464 (1973).

- 31) Soares, A. L., Guimarães, G. M., Polakiev, B., Pitombo, R. N. M. and Neto, J. A. : Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. *Intern. J. Pharm.* **237**, 163 (2002).
- 32) Tosa, T., Sano, R., Yamamoto, K., Nakamura, M. and Chibata, I. : L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. Purification, crystallization, and enzymic properties. *Biochemistry* **11**, 217 (1972).
- 33) Wada, H., Imamura, I. and Sako, M. : Antitumor enzyme: Polyethylene glycol-modified asparaginase. *Ann. NY Acad. Sci.* **613**, 95 (1990).
- 34) Whelan, H. A. and Wriston, J. C. : Purification and properties of L-asparaginase from *Serratia marcescens*. *Biochim. Biophys. Acta.* **365**, 212 (1974).