Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Isolation and identification of extremophile bacteria producing anti-cancer enzyme L-asparaginase from Yale Gonbad hot spring

Shaghayegh Kashef Haghighat Master's degree, Department of Biology, Tehran East Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. sh.millenium@icloud.com

Elaheh Ali-Asgari Assistant Professor, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran **(Corresponding author).** elahe.aliasgari@iau.ir

Abstract

Purpose: The most abundant sources used to obtain enzymes with greater stability are thermophilic bacteria. In recent years, microbial L-asparaginase has been widely used as a therapeutic agent in the treatment of human cancers. It is also recently used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. In this regard, the aim of this study is to screen new thermophilic strains capable of producing L-asparaginase enzymes.

Materials and methods: Yale Gonbad hot spring was chosen as the isolation site for thermophilic bacteria. Cultivation and morphological and biochemical tests were done to identify the strain. The bacterial strain was screened in order to investigate L-asparaginase enzyme activity by (RPA) method. Modified M9 medium containing L-asparagine and phenol red was used as reagent. Finally, a bacterial strain was identified by determining the 16RrRNA gene sequence after PCR.

Findings: Finally, a thermophilic strain was isolated from Yale Gonbad hot spring, which belonged to Bacillus licheniformis. L-asparaginase activity was observed in YT strain and Bacillus licheniformis was produced.

Conclusion: Yale Gonbad hot spring is one of the sources with high potential of useful microbial products that can be used as a useful source of many biological products such as enzymes.

Keywords: Extremophile bacteria, L-asparaginase, Anti-cancer enzyme, Yale Gonbad hot spring.

Received: 2023/06/21 ; **Revised:** 2023/08/18 ; **Accepted:** 2023/09/03 ; **Published online:** 2023/09/20

Cite: Kashef Haghighat, S. & Ali-Asgari, E. (2023). Isolation and identification of extremophile bacteria producing anti-cancer enzyme L-asparaginase from Yale Gonbad hot spring. *Applied Biology*, 13(3), p. 75-86.

Article type: Research Article

© the authors

Publisher: Qom Islamic Azad University

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اکسترموفیل تولیدکننده آنزیم ضد سرطان ال–آسپاراژیناز از چشمه آبگرم یله گنبد

شقایق کاشف‌حقیقت | کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. sh.millenium@icloud.com
الهه علی‌عسگری | استادیار، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (نویسنده مسئول). elahe.aliasgari@iau.ir

چکیده

هدف: فراوان‌ترین منابع استفاده شده برای بدست آوردن آنزیم‌های با قابلیت پایداری بیشتر، باکتری‌های ترموفیل می‌باشند. در سال‌های اخیر ال- آسپاراژیناز میکروبی به طور گسترده‌ای به عنوان عوامل درمانی در درمان سرطان‌های انسانی مورد استفاده قرار گرفته است. همچنین اخیراً از آن در درمان لوسمی حاد لنفوبلاستی استفاده می‌گردد. در این راستا، هدف مطالعه حاضر، غربالگری سویه‌های ترموفیل جدید با قابلیت تولید آنزیم‌های ال-آسپاراژیناز می‌باشد.

مواد و روش‌ها: چشمه آب گرم یله گنبد به عنوان محل جداسازی باکتری‌های ترموفیل انتخاب شد. کشت و تست‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، جهت شناسایی اولیه سویه انجام شد. سویه باکتریایی به منظور بررسی فعالیت آنزیمی ال- آسپاراژیناز بوسیله روش (RPA) غربالگری شد. محیط M9 اصلاح شده حاوی ال- آسپاراژین و فنل رد به عنوان معرف مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت یک سویه باکتریایی بوسیله تعیین سکانس ژن 16RrRNA بعد از PCR شناسایی شد.

یافته‌ها: در نهایت یک سویه ترموفیل از چشمه آب گرم یله گنبد جداسازی شد، که متعلق به باسیلوس لیکنیفورمیس بود. فعالیت ال-آسپاراژیناز در سویه YT مشاهده و *باسیلوس لیکنیفورمیس* تولید شد.

نتیجه‌گیری: چشمه آب گرم یله گنبد یکی از منابع با پتانسیل بالای محصولات مفید میکروبی است که می‌تواند به عنوان یک منبع مفید محصولات متعدد بیولوژیکی همانند آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: باکتری‌های اکسترموفیل، ال- آسپاراژیناز، آنزیم ضد سرطان، چشمه آبگرم یله گنبد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۳۱ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۵/۲۷ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۶/۱۶ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۰۶/۲۹
استناد به این مقاله: کاشف‌حقیقت، شقایق؛ علی‌عسگری، الهه (۱۴۰۲). جداسازی و شناسایی باکتری‌های اکسترموفیل تولیدکننده آنزیم ضد سرطان ال–آسپاراژیناز از چشمه آبگرم یله گنبد. *بیولوژی کاربردی*، ۱۳(۳)، ص ۷۵-۸۶.
ناشر: دانشگاه قم
© نویسندگان
نوع مقاله: پژوهشی

۱. مقدمه

چشمه‌های آبگرم بی‌شماری در ایران وجود دارند. هر یک از این چشمه‌های آبگرم به نوبه خود دارای خواص درمانی می‌باشند. به طور نمونه چشمه آبگرم یله گنبد که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است، به عنوان درمان با آب شناخته شده که برای درمان بیماری‌هایی مانند ورم مفاصل، انقباضات عضلانی، آنفولانزا، مشکلات سیستم تنفسی، روماتیسم، مشکلات گردش خون و بیماری‌های پوستی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). اکسترموفیل‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که رشد بهینه آنها در دمای بالاتر از ۴۵ درجه سلسیوس می‌باشد و در شرایط بسیار سخت رشد می‌کنند و آنزیم‌های آن‌ها اکسترموزیم نامیده می‌شوند. یکی از مهم‌ترین قابلیت اکسترموفیل‌ها باکتری‌های ترموفیل هستند. باکتری‌های ترموفیل بهترین منبع جداسازی برای آنزیم‌های مقاوم به حرارت می‌باشند. باکتری‌های ترموفیل برای قابلیت تحمل حرارتی بالایی که دارند، دارای آنزیم‌های مقاوم به حرارت می‌باشند.

ال- آسپاراژیناز آنزیمی است که در طبیعت توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌گردد و اسید آمینه ال- آسپاراژین را به دو جزء آسپارتیک اسید و آمونیاك تبدیل می‌کند. این اسید آمینه برای حیات سلول ضروری می‌باشد. منبع اصلی آنزیم ال- آسپاراژیناز برای کارآزمایی بالینی باکتری است. آنزیم ال- آسپاراژیناز یک آنزیم آمیدوهیدرولازی[2] است که تجزیه پیوند N گلیکوساکاریدهای گلیکو پروتئین‌ها را کاتالیز می‌کند که توسط ژن AGA کد می‌شود (۲).

ال- آسپاراژیناز (آسپاراژیناز، آمیدوهیدرولاز، 1E.C .1.5.3) یک آنزیم با ارزش درمانی بالا بوده، که منجربه استفاده در انواع سرطان درمانی بخصوص در لنفوبلاستیک حاد شده است. ال- آسپاراژیناز یک عامل مهم شیمی‌درمانی برای بسیاری از بیماری‌های سیستم لنفاوی و لنفوم مانند لوسمی لیتوپلاستیک حاد استفاده می‌شود (۳).

فعالیت آنزیم ال- آسپاراژیناز اولین بار در سال ۱۹۰۴ میلادی توسط لانگ[1] گزارش شد. بعد از گذشت چند سال، مشاهده کردند که آسپاراژیناز خالص شده از عصاره سلولی مانند سرم خوکچه هندی می‌باشد که فعالیت ضد توموری دارد و امروزه به عنوان یکی از عوامل ضد سرطانی مورد توجه قرار گرفته و استفاده می‌شود (۴). میکروارگانیسم‌هایی مانند آئروباکتر، سودوموناس، فوتوباکتریوم، زانتو موناس، استرپتومایسس، پروتئوس، و آسپرژیلوس توانایی تولید آنزیم ال - آسپاراژیناز را دارند (۵).

هدف پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم ال- آسپاراژیناز از چشمه

1. Long

آبگرم یله گنبد قزوین است. این آنزیم از مهم‌ترین داروهای شیمی‌درمانی در درمان مختلف لوسمی‌ها به ویژه لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌باشد و باکتری‌ها منبع سهل‌الوصولی برای استخراج بهینه این آنزیم هستند. هدف نهایی پژوهش، جداسازی منابع جدید و مناسبی برای تولید ال- آسپاراژیناز از آب و رسوبات چشمه آبگرم یله گنبد قزوین، و شناسایی آن به کمک تکنیک مولکولی PCR است.

۲. مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: ابتدا تعداد ۱۰ نمونه آب از نقاط مختلف چشمه آبگرم یله گنبد توسط فلاسک‌های استریل از عمق ۱ متری با دمای آب ۵۰ درجه جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه منتقل گردید (۶).

جداسازی باکتری‌های ترموفیل: برای جداسازی و غربالگری باکتری‌های موجود در نمونه‌های جمع‌آوری شده از آب چشمه، کشت بر روی آب چشمه با استفاده از سمپلر داخل لوله ۱ محیط کشت آگار انجام شد. برای این منظور ابتدا نمونه‌های ۱۰تایی آزمایش به محیط کشت استریل مایع (نوترینت براث) منتقل شدند. سپس لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، پس از مخلوط کردن و خوب هم زدن هر لوله آزمایش، ۱ ماکرولیتر از هر نمونه توسط سمپلر مجدداً به لوله‌های آزمایش جدیدی که پیش‌تر با محیط کشت براث تازه پر شده بودند، منتقل گردید و انکوبه شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از آب این محیط به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰rpm در سانتریفیوژ قرار گرفت و از رسوبات ته‌نشین شده بر روی محیط کشت جامد سی واتر آگار آماده شده به روش خطی کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفتند (۷).

غربالگری باکتری‌های ترموفیل تولیدکننده آنزیم ال - آسپاراژیناز: فعالیت ال- آسپاراژینازی کلنی‌های جدا شده مطابق با روش گولاتی و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از محیط کشت جامد اختصاصی M9 بررسی شد که در جدول (۱) مقدار و نوع ترکیبات مشخص شده است. مواد مورد نیاز نیز با توجه به مقدار آن تهیه گردید. سپس داخل اتوکلاو گذاشته شده و بعد از آن داخل پلیت‌ها ریخته شدند. حال از نمونه‌های کلونی که در سی واتر آگار بدست آمده بودند، روی این محیط کشت داده شد که در دمای مناسب $^{\circ}C$ ۵۰ انکوبه شدند. شاخص رنگ دور کلونی باکتری بعد از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تغییر رنگ می‌دهد. این فعالیت آنزیم آسپاراژینازی تحقیق، بوسیله ناحیه صورتی رنگ اطراف کلونی‌ها مشخص شد، این سویه‌ها با ترشح آنزیم ال - آسپاراژیناز، ال- آسپاراژین موجود در محیط کشت را به آمونیاک وال- آسپارتات تجزیه کرده و در نتیجه اطراف کلونی بدلیل تغییر PH محیط و حضور معرف فنول، رد هاله صورتی رنگ ایجاد شد (۸).

شناسایی مقدماتی باکتری‌های ترموفیل: برای شناسایی مقدماتی و اولیه، باکتری‌های ترموفیل تحت بررسی تست‌های بیوشیمیایی مختلف همانند تست‌های SIM، TSI، MR-VP، و سیمون سیترات آگار قرار گرفتند (۹).

شناسایی تکمیلی باکتری‌ها: شناسایی تکمیلی سویه‌های جدا شده از آب و رسوبات چشمه آبگرم یله گنبد از طریق آنالیز ژن 16SrRNA انجام شد. برای این منظور تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی مربوط به ژن 16SrRNA با استفاده از تکنیک PCR انجام گرفت (۹).

استخراج DNA از سویه‌های ترموفیل: برای استخراج DNA از نمونه‌ها از کیت مخصوص باکتری‌های گرم مثبت و کیت مخصوص باکتری‌های گرم منفی شرکت سیناکلون استفاده شد. باتوجه به دستورالعمل شرکت سازنده کیت، DNA باکتری‌ها استخراج شدند. پس از از استخراج، نمونه‌های DNA استخراج شده برای آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش PCR شناسایی تکمیلی باکتری‌ها بوسیله آنا لیز ژن 16SrRNA انجام شد. برای انجام آزمون PCR، ابتدا پرایمرهای یونیورسال از شرکت سیناکلون تهیه شد.

جدول ۱- توالی و مشخصات پرایمرهای فوروارد و ریورس

Name	Seq (5′→3′)	MW	TM	GC%	Mer
$16_{S\text{-}F}$	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	۶۱۴۸	۵۷/۳۰	۵۰	۲۰
$16_{S\text{-}R}$	GGTTACCTTGTTACGACTT	۵۷۸۵	۵۲/۳۵	۴۲	۱۹

مراحل دمایی واکنش PCR بدین شکل انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. باندهای محدوده ۱۵۰۰جفت بازی از روی ژل بریده شد و به منظور توالی‌یابی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. نتایج بدست آمده از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Bio edit وGene runner برنامه BLAST در پایگاه داده‌های بانک ژنی (NCBI) ABI System و میزان تشابه آنها با سایر ژن‌های ثبت شده در این پایگاه بررسی گردید.

۳. نتایج

۳-۱. نتایج اولیه مربوط به جداسازی باکتری‌های ترموفیل

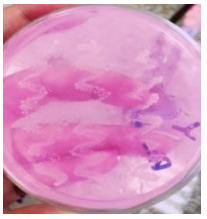
پس از کشت خطی اولیه، نمونه‌های آب و رسوبات چشمه بر روی محیط سی واتر آگار و ۲۴

ساعت گرماگذاری شد. مراحل خالص‌سازی و تهیه تک کلونی از هر پلیت رشد یافته بر روی پلیت استریل دیگر به صورت کشت خطی تا زمان به دست آوردن تک کلونی‌های خالص از باکتری تکرار شد و پلیت‌های متعددی از تک کلونی خالص بدست آمد، سپس هر پلیت برای بررسی و شناسایی کلونی باکتریایی نگهداری شد (شکل ۱).

شکل ۱- پلیت‌های کشت نمونه‌ها و تهیه کلونی

۳-۲. نتایج غربالگری ثانویه تولید ال- آسپاراژیناز در محیط اختصاصی M9

از میان سویه‌های رشد کرده در مرحله قبل، تعداد ۱ سویه ترموفیل فعالیت ال- آسپاراژینازی داشت. این فعالیت با صورتی رنگ شدن محیط اطراف کلونی مشخص گردید. سپس این سویه برای شناسایی تکمیلی در شکل (۲) مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲- کلونی سویه ترموفیل مولد آسپاراژیناز YT

۳-۳. نتایج اولیه شناسایی باکتری‌ها

برای شناسایی اولیه باکتری‌ها، ابتدا از رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد که در شکل (۳) قابل مشاهده می‌باشد.

شکل ۳- باکتری رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوپ (لنز X ۱۰۰)

تصاویر مشخص شده تست‌های بیوشیمیایی در شکل (۴) نشان داده شده است.

شکل ٤- نمو نه‌ای از تست بیوشیمیایی سویه ترموفیل YT

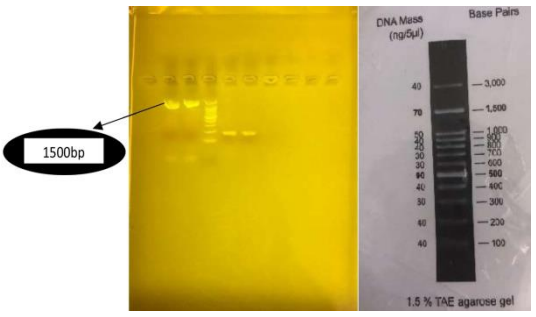
از تست‌های بیوشیمیایی مختلفی استفاده شده که نتایج حاصل در جدول (۲) نشان داده شده است.

جدول ۲- برخی از تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های ترموفیل

Colony no.	رنگ‌آمیزی گرم	MR	VP	حرکت	ایندول	سیترات	TSI
S_1	باسیلوس گرم+	-	+	+	-	+	Alk/Acid
S_2	باسیلوس گرم+	-	+	+	-	-	Acid/Acid
S_3	باسیلوس گرم+	-	+	-	-	-	Alk/Acid
S_4	باسیلوس گرم+	-	+	+	-	-	Alk/Acid
S_5	باسیلوس گرم+	-	+	+	-	+	Acid/Acid
S_6	باسیلوس گرم+	-	+	+	-	-	Gas^+ Alk/Acid

۳-٤. نتایج شناسایی تکمیلی سویه‌ها

پس از انجام واکنش PCR و تکثیر DNAهای استخراج شده از نمونه‌ها، مطابق با پرایمر طراحی شده 16SrRNA و سیکل دمایی و زمانی مشخص شده، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٫۵% برای انجام الکتروفورز منتقل شدند و باندهای تشکیل شده بر روی ژل بررسی و مشاهده شد (شکل ۵).



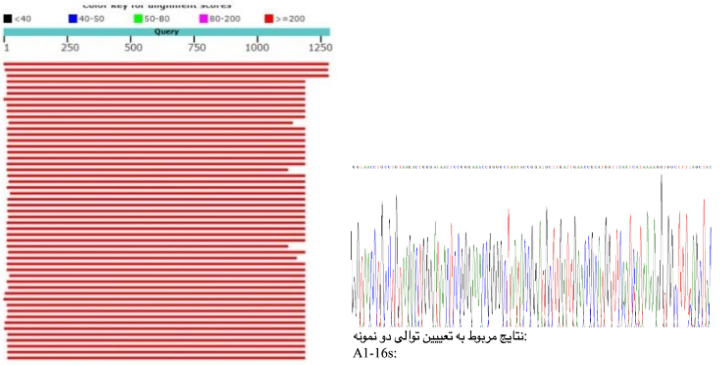
شکل ٥- نتایج الکتروفورز بر روی ژل آگارز

۳-۵. نتایج توالی‌یابی محصولات PCR

هر سه گونه باکتری ترموفیل ال- آسپاراژیناز را تولید می‌کردند، در بررسی آنالیز ژن 16SrRNA در پایگاه داده‌های ژنی، هر سه گونه متعلق به *گونه باسیلوس لیکنی فورمیس* بودند.

۳-۶. توالی سکانس‌های بدست آمده از سویه‌های جداسازی شده در پایگاه داده ژنی

همه سویه‌های مورد بررسی متعلق به گونه *باسیلوس لیکنی فورمیس* بودند. با توجه به شکل (۶) سکانس با استفاده از نرم‌افزار Bioedit مورد ارزیابی قرار گرفته است و توالی‌ها در چهار رنگ (آبی، سبز، قرمز، سیاه) به طور منظم در قسمت بالا قرار گرفته‌اند و الکتروگرام‌ها در قسمت پایین به صورت هماهنگ می‌باشند که هرکدام توالی مورد نظر را نشان می‌دهند که این برقراری نظم در الکتروگرام‌ها نشان‌دهنده آن است که تعیین سکانس به خوبی صورت گرفته و هیچ‌گونه نقصی نداشته است.



شکل ٦- ارزیابی سکانس

٤. بحث

اخیراً مطالعات در مورد آنزیم ال- آسپاراژیناز به دلیل خاصیت ضدسرطانی آن مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. آسپاراژیناز در بسیاری از گیاهان، پستانداران و گونه‌های باکتری وجود دارد (۱۰). آنزیم آسپاراژیناز در علم پزشکی به عنوان دارویی جهت درمان لوسمی لنفوبلاستی (سرطان خون) شناخته می‌شود. این آنزیم علی‌رغم اینکه در مقایسه با سایر داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی، سازگاری بسیار بالایی با بافت و سازوکارهای حیاتی بدن دارد، کاربردهای فراوانی دارد که یکی از کاربردهای درمانی اصلی آنزیم، درمان سرطان است (۱۱). آسپاراژیناز آنزیمی است که در درمان بدخیمی‌های چند اندامی به کار می‌رود. از این آنزیم برای درمان سرطان و نیز در صنایع غذایی برای کاهش غلظت آکریلامید استفاده می‌شود (۱۲). همچنین ثابت شده است که آنزیم

آسپاراژیناز، بخصوص در درمان لوسمی لنفوسایتیک حاد می‌تواند امیدبخش باشد. میزان ۶۰ درصد بهبودی کامل، در بررسی حدود ۶۰۰۰ مورد از لوسمی لنفوسایتیک حاد گزارش شده است. این آنزیم به صورت داخل وریدی تزریق می‌شود (۱۳). در تحقیق حاضر نیز یک سویه ترموفیل با قابلیت تولید ال- آسپاراژیناز جدا شد که دارای شباهت ۹۹ درصدی به گونه *باسیلوس لیکنی فورمیس* بودند. پاگلا و کوکسی[1] در تحقیقی تولید ال-آسپاراژیناز با استفاده از استافیلوکوکوس کاپیتیس را بررسی کردند. باکتری‌ها در محیط M9 حاوی فنل رد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. منطقه صورتی در اطراف کلونی باکتری نشان‌دهنده آن بود که تولید ال- آسپاراژیناز توسط باکتری‌ها به دلیل PH قلیایی (تجمع آمونیاک در محیط کشت) صورت گرفته است. برای سنجش فعالیت آنزیم از روش نسلر استفاده شد. نتایج نشان داد شرایط مطلوب برای فعالیت آنزیم استخراج شده از استاف PH=6/2، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶ روز است (۱۴). در این پژوهش نیز به منظور بررسی تولید ال- آسپاراژیناز توسط سویه‌های ترموفیل از محیط M9 حاوی فنل رد استفاده شد و کلنی‌های آسپاراژیناز مثبت توسط مشاهده منطقه صورتی اطراف کلنی تشخیص داده شدند.

در مطالعه‌ای که توسط کوماری[2] و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد، از میان اکتینومایست‌های تولیدکننده آنزیم ال- آسپاراژیناز، سویه‌ای که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود، براساس آنالیز توالی نوکلئوتیدی 16S rDNAبه عنوان استرپتومایسس گریسئولوتس سویه WS3/1 شناسایی شد. این سویه WS3/1 *Streptomyces griseolutes* دارای شباهت 99 درصدی به جنس استرپتومایسس بود (۱۵). ابراهیمی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۱) نیز باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم ال- آسپاراژیناز را از دریاچه مهارلو جداسازی کردند. آنها همچنین باکتری‌هایی که بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان دادند، براساس آنالیز توالی نوکلئوتیدی 16SrDNA شناسایی نمودند (۱۶). پترسون و سیگلر[3] در تحقیقی تولید ال- آسپاراژیناز توسط باکتری‌های مختلف را بررسی کردند. در این تحقیق باکتری‌ها در محیط TGY براث در ۲۸ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از روش نسلریزاسیون اندازه‌گیری شد که در آن هر واحد فعالیت آنزیم برابر با یک میکرومول آمونیاکی است که در مدت یک دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد آزاد کند. نتایج نشان داد که NRRLB دارای

1. Paglla & Cooksey
2. Kumari
3. Peterson & Ciegler

بیشترین فعالیت آنزیم بوده است (۱۷). در تحقیق حاضر از محیط seawater agar استفاده شد و سویه‌ها به دلیل ترموفیل بودن در ۵۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

۵. نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر سویه باکتری ترموفیل از چشمه آبگرم یله گنبد جدا شد که این سویه‌ها قابلیت تولید ال-آسپاراژیناز را داشتند. همه سویه‌ها متعلق به گونه *باسیلوس لیکنی فورمیس* بودند. با توجه به نتایج فوق این باکتری می‌تواند منبع بسیار مناسبی برای تولید آنزیم ضد سرطان ال-آسپاراژیناز باشد.

References

1. Kiani K. *Properties of Therapy Warm and Healing mineral water of Iran with addresses and locations.* Zar ghalam publication; 2008: 304. [in persian]
2. Appel IM, van Kessel-Bakvis C, Stigter R & Pieters R. Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic. *Leukemia.* 2007; 21(11): 2377. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404793
3. Bessoumy AA, Mohamed, S & Jehn M. Production, Isolation, and Purification of L-asparaginase from Pseudomonas Aeruginosa 50071 Using Solid-stateFermentation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2008; 37(4): 387-393.
4. Rafi MD. Evaluation of antioxidant, cytotoxic and thrombolytic activity of kalanchoepinnata leaf. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sclences*. 2014; 3(6): 52-62.
5. Nandakumar R, Yoshimune K, Wakayama M & Moriguchi M. Microbial glutaminase: biochemistry, molecular ap-proaches and applications in the food industry. *J. Mol.Catal.B Enzym*. 2003*;* 23: 87-100.
6. Ramesh S & Mathivanan N. Screening of marine Actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World J Microb Biot.* 2009; 25(12): 2103-2111.
7. Akmar HN, Asma I, Venugopal B, Latha LY & Sasidharan S. Identification of appropriate sample and culture method for isolation of new thermophilic bacteria from hot spring. *African Journal of Microbiology Research.* 2011; 5: 217-221.
8. Gulati R, Saxena R & Gupta R. A rapid plate assay for screening L- asparaginase producing microorganisms. *Lett Appl Microbiol*. 1997; 24(1): 23-26.
9. Nimnoi P, Pongsilp N & Lumyong S. Endophytic Actinomycetes isolated from Aquilaria crassna, Pierreex lec and screening of plant growth promoters' production. *World J Microbiol Biot.* 2010; 26(2): 193-203.
10. Abkhoi L, Minaei Tehrani D, Kolahdouz Mohammadi, M, Iftikhar F, Karaji N, Mir Fakhar F & Waziri Tabar N. Purification and determination of kinetic properties of asparaginase enzyme in Serratia marcescens. *Journal of Cell and Molecular Research*. 2014; 3(6). [in persian]
11. Garaev MM & Golub EI. Mechanism of the effect of glucose on Lasparaginse synthesis by Escherichia coli bacteria. *Mikrobiologia.* 1977; 46(3): 433-439.
12. Savitri N, Asthana N & Azmi W. Microbial L-asparaginase: a potent antitumour enzyme. *Indian J Biotechnol*. 2002; 2(2): 184-194.
13. Tong WH & et al. Cost tanalysis of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia with asparationase preparations: the impact of expensive chemotherapy. *Haematologica.* 2013; 98(5): 753-9. https://doi.org/10.3324/haematol.2012.073510
14. Paglla K & Cooksey E. Regulation of L- asparaginase EC-3.5.1.1 in a chlamydomonas species in response to ambient concentration of combined nitrogen. *Journal of Bacteriology*. 2013; 147(1): 9-12.

15. Kumari P, Sankar G & Prabhakar T. L- asparaginase production and molecular identification of marine Streptomycete strain WS3/1. *Int J Pharm Biomed Res.* 2012; 2(4): 244-249.
16. Ebrahiminezhad A, Rasoul-amini S & Ghasemi Y. L- asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. *Indian J Microbiol.* 2011; 51(3): 307-311.
17. Peterson RE & Ciegler A. L-Asparaginase Production by Erwinia aroideae, *Environ. Microbiol*. 2011; 18(1): 64-67. https://doi.org/10.1128/am.18.1.64-67.1969