

جداسازی و غربالگری سویه‌های مولد ال-آسپاراژیناز از طبیعت و بهینه‌سازی آن

فرشته قادری^۱، غلامرضا قزلباش^{۲*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۲۵)

چکیده

سابقه و هدف: ال-آسپاراژیناز یک داروی درمانی است که در انواع لوسمی‌ها و سرطان‌های خون به ویژه لوسمی حاد لنفوئیدی به کار می‌رود. میکروارگانیسیم‌ها مناسب‌ترین منبع برای تولید این آنزیم می‌باشند. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم ال-آسپاراژیناز از نمونه‌های محیطی مانند آب، خاک و گیاهان مختلف بود.

مواد و روش کار: جداسازی اولیه بر روی محیط‌های آگار مغذی و لوریا برتونی انجام شد و سپس سویه‌های بدست آمده بر روی محیط تمایزی آسپارژین دکستروز کشت داده شدند. کلنی‌های مولد ال-آسپاراژیناز بر اساس ایجاد هاله صورتی در اطراف کلنی انتخاب شدند. کلنی‌های رنگی برای مطالعه بیشتر فعالیت آنزیمی با استفاده از ال-آسپاراژین به عنوان سوبسترا انتخاب شدند. مقدار آمونوم آزاد شده توسط روش نسلر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیمی به صورت واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید. بهترین سویه بر اساس روش‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و همولوژی 16S rRNA شناسایی شد. به علاوه بعضی از فاکتورهای غذایی مانند منبع کربن، نیتروژن و pH به منظور تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز بهینه‌سازی شدند.

نتایج: سویه ۱۰۵ از میان سویه‌های جداسازی شده فعالیت ال-آسپاراژینازی بالایی را نشان داد و تحت عنوان *انتروباکتر* سویه ۱۰۵ شناسایی و با شماره دسترسی KX821736 در بانک ژنی NCBI ثبت شد. نشاسته ۱/۵ درصد به عنوان منبع کربن، آمونوم سولفات ۱/۵ درصد به عنوان منبع نیتروژن و pH برابر ۶ به عنوان بهترین شرایط تولید این آنزیم مشخص شدند. فعالیت اختصاصی آنزیمی در بهترین شرایط بهینه ۹/۴۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود.

نتیجه‌گیری: توانایی این سویه در فعالیت آسپاراژینازی نشان داد که با مطالعات بیشتر می‌توان این آنزیم را با اهداف صنعتی تولید کرد.

کلیدواژگان

آسپاراژیناز، انتروباکتر، لوسمی حاد لنفوئیدی.



مقدمه

در مطالعه کنونی نیز به جداسازی باکتری‌های مولد ال-آسپاراژیناز خارج سلولی می‌پردازد (۱، ۱۳ و ۱۴). آنزیم ال-آسپاراژیناز به صورت گسترده‌ای در حیوانات، سرم چونندگان، گیاهان و منابع میکروبی از قبیل باکتری‌ها، مخمر، قارچ، جلبک و اکتینومیست‌ها وجود دارد (۱۳، ۱۴ و ۱۵). اولین گزارش از منابع میکروبی مربوط به باکتری *اشریشیا کلای*^۶ بود (۸). مطالعات نشان می‌دهد در اثر استفاده طولانی مدت از این آنزیم واکنش‌های آلرژیک و فیزیولوژیکی نامطلوبی ایجاد می‌شود (۱۶ و ۱۷) فعالیت‌های غیر اختصاصی این آنزیم سبب ایجاد علائمی از قبیل سمیت عصبی، لخته شدن خون، هیپاتیت و واکنش‌های آلرژیک می‌گردد (۱) که استفاده از ال-آسپاراژیناز از موجودات مختلف می‌تواند این مشکل را کاهش دهد (۱۸). بنابراین با توجه به اهمیت و کاربرد روز افزون این آنزیم، اولین گام برای تولید انبوه آنزیمی با ویژگی‌های دارویی مناسب‌تر، یافتن منابع جدید با توان تولیدی بالاتر است. شایان ذکر است هم اکنون آنزیم تولیدی مورد استفاده بیماران از باکتری‌های *اشریشیا کلای* و *اروینیا*^۷ تولید و خالص‌سازی می‌شود (۱). متأسفانه تاکنون در این زمینه در داخل کشور تولیدی صورت نگرفته و این محصول از شرکت‌های تولیدکننده خارجی وارد می‌شود.

مطالعات زیادی بر روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز توسط میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از مکان‌ها و منابع مختلف صورت گرفته است. از جمله کارهای صورت گرفته می‌توان به مطالعات ابراهیم‌نژاد و همکاران اشاره کرد که باکتری‌های معتدل نمک‌دوست مولد ال-آسپاراژیناز را از دریاچه نمک جدا کردند (۳). یزدانی و همکاران از نمونه‌های آب و خاک (۱۹) و بارگاو^۸ و همکاران از ساحل دریای کرالا (۲۰)

آنزیم ال-آسپاراژیناز^۱ (E.C.3.5.1.1) پیوند آمیدی موجود در اسیدآمین‌ها ال-آسپارژین را هیدرولیز کرده و آن را به آسپاراتات و آمونیاک تبدیل می‌کند (۱ و ۲) که از اهمیت ویژه‌ای در پزشکی برخوردار است (۳) و (۴). در سال ۱۹۵۳ کید^۲ و همکاران خاصیت ضدتوموری را در سرم خوکچه هندی نشان دادند (۶-۵). بروم^۳ نیز در سال ۱۹۶۱ نشان داد که وجود خاصیت ضد توموری سرم خوکچه هندی وابسته به حضور آنزیم ال-آسپاراژیناز است (۱ و ۷). مطالعات نشان داد به دلیل ناتوانی سلول‌های سرطانی در سنتز اسیدآمین‌ها آسپارژین، آنزیم ال-آسپاراژیناز به عنوان یک آنزیم اختصاصی مسئول هیدرولیز اسیدآمین‌ها آسپاراژین مورد نیاز سلول‌های توموری عمل می‌کند (۸ و ۹). از آنجائیکه سلول‌های طبیعی قادرند آسپاراژین مورد نیاز خود را سنتز کنند، این آنزیم با فعالیت اختصاصی و انتخابی خود بر روی سلول‌های سرطانی به عنوان یک عامل شیمی درمانی عمل کرده و موجب مرگ آن‌ها می‌شود (۱۰). این آنزیم از نظر بیوتکنولوژی و زیست پزشکی یکی از مهم‌ترین گروه آنزیم‌های درمانی محسوب می‌شود که مورد تأیید سازمان غذا و دارو آمریکا^۴ می‌باشد (۱ و ۱۱) که از آن برای درمان انواع لوسمی‌ها و سرطان‌های خون به ویژه لوسمی حاد لنفوئیدی^۵ و لنفوسارکوما که شایع‌ترین بدخیمی در کودکان و نوجوانان است استفاده می‌گردد (۱ و ۱۲). لازم به ذکر است دو نوع ال-آسپاراژیناز توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود که ال-آسپاراژیناز نوع دوم که خارج سلولی می‌باشد، توانایی فعالیت ضدسرطانی را داراست. بر همین اساس

1. L-asparagine amido hydrolase
2. Kidd
3. Broome
4. FDA
5. Acute Lymphoid Leukemia (ALL)

6. *Escherichia coli*
7. *Erwinia*
8. Bhargavi



جمع‌آوری نمونه و جداسازی اولیه باکتری‌ها

به منظور جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز، نمونه‌برداری هدفمند از منابع محیطی مستعد و مکان‌های محتمل حضور این باکتری‌ها مانند محیط‌های غنی از پروتئین انجام شد. این مناطق شامل خاک مناطق مختلف (مناطق سردسیر-سندج- و مناطق گرمسیر-اهواز)، آب، قسمت‌های مختلف گیاهان و جوانه ماش بودند (۲، ۱۶ و ۲۲). برای جداسازی اولیه باکتری‌ها ابتدا ۱۰ گرم از هر کدام از نمونه‌های جمع‌آوری شده در ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به مدت ۳ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد همراه با مخلوط شدن گرماگذاری گردید و در نهایت بر روی محیط آگار مغذی^۱ و محیط آگار لوریا برتونی^۷ کشت داده شدند و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

غربالگری و جداسازی کیفی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم ال-آسپاراژیناز

برای غربالگری و جداسازی کیفی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم هر کدام از سویه‌های جداسازی و خالص شده بر روی محیط اختصاصی آگار آسپارژین دکستروز سالت کشت شد. محتویات این محیط شامل ۱ درصد ال-آسپارژین، ۰/۱ درصد گلوکز، ۰/۰۵ درصد سولفات منیزیم، ۰/۱ درصد دی هیدروژن فسفات پتاسیم و ۰/۰۰۹ درصد فنل رد در یک لیتر آب بود (pH= ۶/۸). پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. آنزیم ال-آسپاراژیناز با هیدرولیز آسپاراژین موجود در محیط کشت باعث آزاد سازی آمونیوم و قلیایی شدن محیط کشت می‌شود در نتیجه با تغییر pH محیط از اسیدی به قلیایی باعث تغییر رنگ محیط از زرد به

سویه‌های مولد این آنزیم را جداسازی کردند. همچنین هیماواتهی^۱ و همکاران (۲۱)، نیمکند^۲ و همکاران (۲۲) و مگاواران^۳ و همکاران (۱۶) به ترتیب از مواد کشاورزی مختلف، سیر و خاک مناطق گرمسیری برای جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد ال-آسپاراژیناز استفاده کردند. فعالیت‌های دیگری از قبیل خالص‌سازی و کلون کردن آنزیم ال-آسپاراژیناز نیز صورت گرفته است (۲۳). هدف تحقیق حاضر جداسازی باکتری‌هایی با فعالیت ال-آسپاراژینازی فاقد فعالیت گلوتامینازی از منابع مختلف محیطی و بهینه‌سازی تولید این آنزیم توسط سویه‌های جداسازی شده است تا در نهایت با ادامه مطالعه و بهبود سویه‌های جدا شده بتوان به یک سویه صنعتی مولد آنزیم رسید. جداسازی سویه مولد ال-آسپاراژیناز که توان مصرف سوبستراهای ارزان را داشته باشد از اهداف اصلی این تحقیق بوده است.

روش کار

مواد و روش‌ها

تمام مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کشت در این تحقیق از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. همچنین موادی که در فرایند واکنش زنجیره‌ای پلی مرار^۴ استفاده شد از جمله پرایمرهای رفت و برگشت، مارکر ۱۰۰ جفت بازی، MgCl₂، آنزیم Taq^۵، بفر PCR و dNTP از شرکت سیناژن تهیه شد. دستگاه‌های مورد استفاده شامل دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (آلمان)، دستگاه یو وی ترانس لومیناتور (انگلستان) و دستگاه اسپکتروفتومتری شرکت اپتومایز (Optimize) کشور کره جنوبی بود.

1. Hymavathi
2. Nimkande
3. Meghavarnam
4. PCR
5. Taq DNA Polymerase

6. Nutrient agar
7. Luria Bertoni agar



صورت گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد با بافر (1x) TAE و با استفاده از رنگ ایمن توسط دستگاه یو وی ترانسلومیناتور مشاهده و بررسی شد. در نهایت به منظور توالی یابی محصول حاصل از PCR به شرکت زیست فناوری رنا (اصفهان) ارسال گردید. نتایج توالی‌های رفت و برگشت پس از ویرایش توسط نرم افزار Bio edit و FinchTV به صورت یک توالی کامل تهیه شد و توالی حاصل پایگاه داده‌های بانک ژنی NCBI^۱ مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان تشابه آن‌ها با سایر ژن‌های ثبت شده در این پایگاه بررسی گردید.

تولید آنزیم و سنجش فعالیت آنزیمی

به منظور سنجش کمی فعالیت آنزیمی تولید شده توسط سویه‌های منتخب ابتدا سویه مورد نظر به مدت ۱۲ ساعت بر روی محیط آگارآسپاراژین دکستروز سالت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد سپس یک لوپ از باکتری را به محیط آسپاراژین دکستروز سالت مایع منتقل کرده و بعد از این که کدورت محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۸-۰/۶ رسید با نسبت ۲ درصد به محیط‌های کشت آسپاراژین دکستروز سالت مایع تلقیح و هر ۲ ساعت یکبار از محیط کشت نمونه‌گیری و فعالیت آنزیمی از طریق اندازه‌گیری آمونوم آزاد شده با استفاده از روش نسلر سنجیده شد (۲۹). سپس منحنی تولید آنزیم و منحنی رشد رسم شد. برای تعیین فعالیت آنزیمی مقادیر ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی میکروبی حاصل از سانتریفوژ کشت میکروبی با دور ۵ هزار به مدت ۵ دقیقه با ۰/۹ میلی‌لیتر از بافر مخصوص اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی (حاوی ۰/۱ مولار آسپاراژین در ۰/۰۵ مولار تریس در اسید کلریدریک با pH برابر ۸/۶) از قبل گرم شده به مدت ۳۰ دقیقه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از اتمام زمان گرماگذاری، واکنش

صورتی می‌شود و بر همین اساس سویه‌های مولد آنزیم از سایر کلنی‌هایی که فاقد این خاصیت بودند متمایز شدند. سویه‌هایی که محیط را بیشتر صورتی کرده بودند و فعالیت آنزیمی بیش‌تری داشتند برای ادامه پژوهش انتخاب شدند (۱۷ و ۲۶).

شناسایی ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی بهترین باکتری تولیدکننده آنزیم

برخی از ویژگی‌های ظاهری و بیوشیمیایی سویه‌های منتخب به کمک رنگ‌آمیزی گرم و سایر تست‌های شیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند (۲۷). تعیین دقیق‌تر جایگاه فیلوژنی باکتری‌ها نیز با بررسی مولکولی 16S rRNA صورت گرفت. برای استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها از روش جوشاندن استفاده شد. قطعه ۱۵۰۰bp مربوط به ژن 16S rRNA طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی به وسیله پرایمرهای رفت (۳'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-۳') و برگشت (۵'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-۵') ابتدا تکثیر و سپس تعیین توالی شد (۲۸). مخلوط واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸ میکرولیتر آب، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر DNA الگوی باکتریایی، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز، ۰/۵ میکرولیتر دزکسی ریبونوکلوئیدها، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰x) و ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم انجام گرفت. واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (آلمان) با شرایط دمایی ۴ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشت شدن دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد مرحله گسترش نهایی



برادفورد مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط گرماگذاری شد و سپس جذب نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. مقدار پروتئین تولید شده با استفاده از نمودار استاندارد مشخص گردید که برای تهیه منحنی استاندارد ابتدا غلظت‌های مختلف از پروتئین آلبومین تهیه و سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های فوق با ۸۰ میکرولیتر بافر نمونه و ۱ میلی‌لیتر معرف برادفورد مخلوط شد. مخلوط فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری و جذب تمام رقت‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (۳۴).

انتخاب بهترین منبع کربن جهت تولید آنزیم

برای تعیین بهترین منبع کربن به منظور تولید بیشتر آنزیم از محیط مشابهی با اجزای محیط اختصاصی آسپاراژین دکستروز سالت مایع استفاده شد. شرایط کشت و گرماگذاری مشابه با مراحل قبل بود و تنها منابع کربنی مختلفی مانند گلوکز، مالتوز و نشاسته به عنوان منبع کربن (۱ درصد) مورد مطالعه قرار گرفتند. بعد از انتخاب بهترین منبع کربن، درصدهایی از این کربن در محدوده ۰/۵ درصد تا ۲ درصد بهینه‌سازی شد.

انتخاب منبع نیتروژن جهت بررسی تولید آنزیم

برای این منظور اثر منابع نیتروژنی مختلف از قبیل پپتون، عصاره مخمر و سولفات آمونیوم با مقدار ۱ درصد بر روی فعالیت آنزیم در محیط آسپاراژین دکستروز سالت مایع مورد مطالعه قرار گرفتند. همگی این محیط‌ها نیز بعد از تلقیح مطابق با شرایط از قبل گفته شده گرماگذاری شدند و در نهایت میزان رشد و فعالیت آنزیمی هر کدام مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که pH محیط کشت در همه ارلن‌ها ۶/۸ بود. بعد از انتخاب بهترین منبع نیتروژنی بهترین مقدار این منبع نیز در محدوده ۰/۵ درصد تا ۲ درصد تعیین شد.

با افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۱/۵ مولار متوقف شد. سپس نمونه‌ها در دمای اتاق دور ۱۰ هزار به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به دست آمده با ۱/۷۵ میلی‌لیتر آب و ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف نسلر مخلوط کرده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شد و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. نمونه شاهد نیز عیناً مشابه همان نمونه اصلی تهیه شد با این تفاوت که تری‌کلرواستیک اسید قبل از بافر اضافه شد. یک واحد آنزیمی معادل مقدار آنزیمی است که یک میکرومول آمونیاک را از ال-آسپاراژین در مدت یک دقیقه آزاد می‌کند. برای تبدیل جذب نوری نمونه‌های نامشخص به واحد آنزیمی نیز از منحنی استاندارد استفاده شد (۳۰).

تعیین فعالیت گلوتامینازی

برای سنجش فعالیت آنزیمی گلوتامینازی مشابه سنجش ال-آسپاراژیناز عمل شد و تنها سوپسترا متفاوت بود. بافر مورد استفاده حاوی ۰/۱ مولار گلوتامین در ۰/۰۵ مولار تریس در اسید کلریدریک (pH=۸/۶) بود (۳۱، ۳۲، ۳۳ و ۳۴). آمونیوم آزاد شده از گلوتامین نیز با معرف نسلر خوانده شد (۳۰).

تعیین غلظت پروتئین

میزان فعالیت آنزیم به ازای هر میلی‌گرم از پروتئین به عنوان فعالیت ویژه آنزیمی تعریف می‌گردد. بنابراین به منظور سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم مقدار پروتئین تولید شده توسط سوبه تعیین می‌شود. بر همین اساس برای تعیین مقدار پروتئین تولید شده، از روش برادفورد^۱ استفاده شد. برای این منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره سلولی با ۸۰ میکرولیتر بافر تریس در اسید کلریدریک (pH=۸/۶) و ۱ میلی‌لیتر معرف

1. Bradford



شد و فعالیت آنزیمی با استفاده از کشت مایع برای آن‌ها صورت گرفت.

جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز

بر اساس مقدار آمونیوم آزاد شده از بین سویه‌های جدا شده *انتروباکتر* سویه ۱۰۵ به عنوان سویه اصلی برای ادامه کار انتخاب شد. این سویه از جوانه ماش جدا شد. شکل ۱ منحنی رشد و منحنی تولید آنزیم توسط این سویه را نشان می‌دهد. این سویه نسبت به سویه‌های دیگر دارای بیش‌ترین تولید آنزیم در کم‌ترین زمان (چهاردهمین ساعت) از منحنی رشد خود را نشان داد. بنابراین این سویه به عنوان سویه اصلی برگزیده شد و تمامی مراحل بهینه‌سازی با توجه به زمان ماکزیمم تولید صورت گرفت.

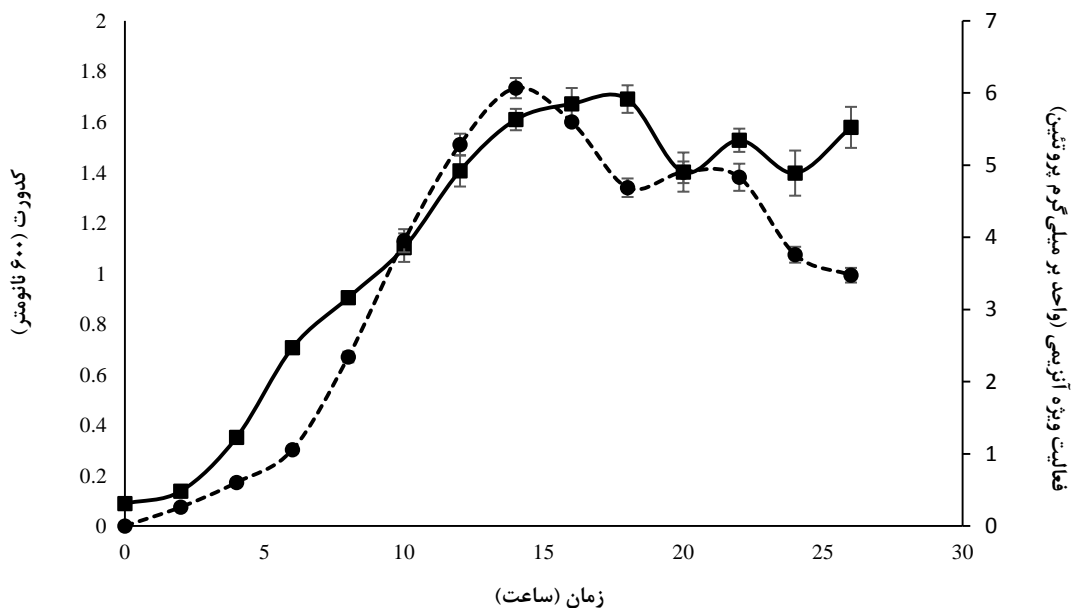
تعیین دامنه pH و بررسی فعالیت آنزیمی

بعد از تعیین بهترین منابع کربن و نیتروژن در محیط پایه آسپاراژین دکستروز سالت مایع محدوده pH نیز بین ۵ تا ۸ بررسی شد (۳۶-۳۵). شایان ذکر است هوادهی در همه مراحل ثابت در نظر گرفته شد (۱۲۰ rpm).

نتایج

جداسازی باکتری‌های اولیه

در مجموع ۱۳۳ سویه از نمونه‌های جمع‌آوری شده، جداسازی و خالص‌سازی شد که از این میان ۳۰ سویه قادر به تولید آنزیم مورد نظر بودند. ۱۰ سویه که هاله صورتی پررنگ‌تر یا بزرگتری را داشتند انتخاب



شکل ۱- منحنی رشد و تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز/ *انتروباکتر* سویه ۱۰۵: ■ نمودار رشد باکتری، ● فعالیت ویژه آنزیمی ال-آسپاراژیناز

موکوئیدی بوده و نتیجه رنگ‌آمیزی گرم نیز باسیل های کوتاه گرم منفی را نشان داد. نتایج حاصل از واکنش‌های بیوشیمیایی صورت گرفته برای شناسایی

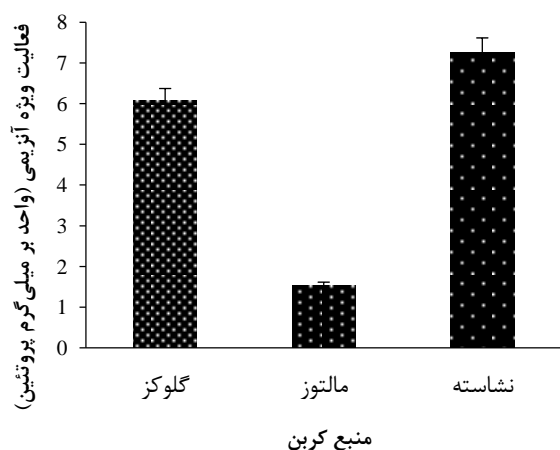
شناسایی باکتری مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز

ویژگی ظاهری و میکروسکوپی این سویه نشان داد که این سویه دارای کلنی‌های زرد یا گرم رنگ و

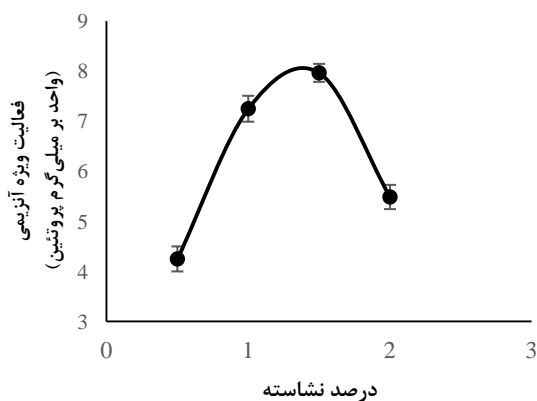


بهینه‌سازی منبع کربن جهت بررسی تولید آنزیم

نتایج حاکی از آن بود که این سویه در تمامی منابع کربنی مورد آزمایش قادر به رشد بود و فعالیت آنزیمی داشت اما بیش‌ترین فعالیت آنزیمی در محیط حاوی نشاسته مشاهده شد و کم‌ترین فعالیت آنزیمی در حضور مالتوز بود. بهترین درصد نشاسته به منظور بیش‌ترین فعالیت آنزیمی در مقدار ۱/۵ درصد نشاسته بدست آمد و میزان فعالیت آنزیمی اختصاصی ۷/۹۶۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. شکل ۳ و ۴ به ترتیب بهینه‌سازی منابع مختلف کربنی و بهینه‌سازی درصد‌های مختلف بهترین منبع کربنی (نشاسته) را نشان می‌دهد.



شکل ۳- اثر منابع کربنی مختلف بر میزان تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز در باکتری اترئوباکتر سویه ۱۰۵

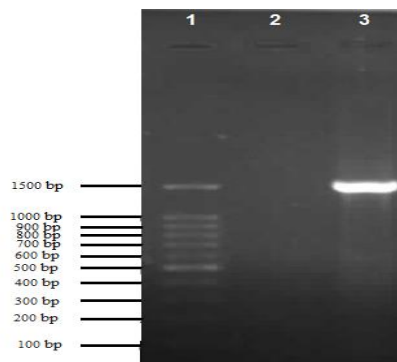


شکل ۴- میزان تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز در باکتری اترئوباکتر سویه ۱۰۵ در حضور درصد‌های مختلف نشاسته

این سویه در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق بررسی توالی ژن 16S rRNA مشخص گردید که باکتری منتخب ۹۸ درصد به *Enterobacter agglomerans* شباهت دارد که با تست‌های بیوشیمیایی نیز مطابقت داشت. بر همین اساس اترئوباکتر سویه ۱۰۵ نام گذاری شد و با کد KX821736 در NCBI ثبت گردید. نمایی از ژل الکتروفورز محصول PCR در شکل ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- نتایج تست بیوشیمیایی اترئوباکتر سویه ۱۰۵

نوع تست	نتایج
رنگ آمیزی گرم	-
تست اوره‌آز	-
تست اکسیداز	-
مصرف لاکتوز	+
تولید ایندول از تریپتوفان	-
حضور اسپور	-
تست وژرپروسکوئر	+
مصرف گلوکز	+
تولید H ₂ S	-
مصرف سیترات	+
تولید گاز از گلوکز	+
تولید پیگمان زرد	+
مصرف لاکتوز	+
تست متیل رد	-
تست مالتوز	+

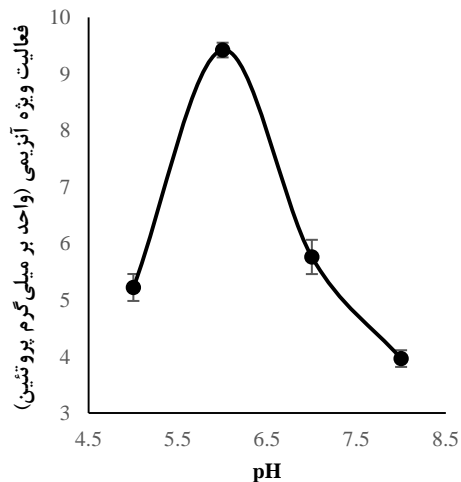


شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR (۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، (۲) نمونه منفی، (۳) نمونه مثبت



بهینه‌سازی pH اولیه محیط تولید آنزیم

نتایج نشان داد که بهترین شرایط تولید آنزیم در محدوده اسیدی به سمت خنثی می‌باشد. با این وجود بیش‌ترین فعالیت آنزیمی در pH برابر با ۶ و کم‌ترین فعالیت آنزیمی در pH برابر با ۸ مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۶- تأثیر pH بر روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز توسط اتروباکتر سویه ۱۰۵

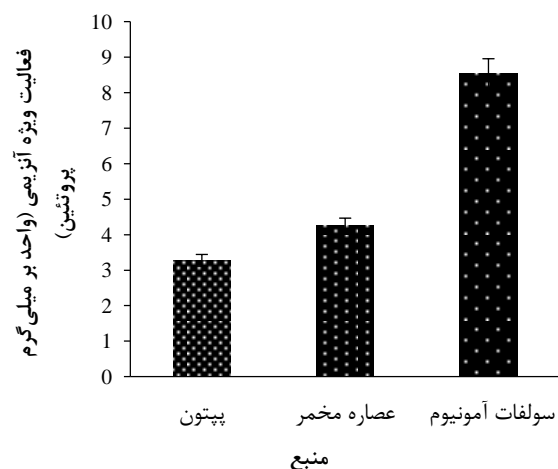
بحث

در مطالعه حاضر غربالگری اولیه جهت جداسازی باکتری‌های مولد ال-آسپاراژیناز با استفاده از محیط آگار آسپاراژین دکستروز سالت حاوی معرف فلررد صورت گرفت و برای محاسبه فعالیت آنزیمی سویه‌های مولد از روش نسلر استفاده شد. پس از نمونه‌گیری و جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد ال-آسپاراژیناز از منابع مختلف محیطی حضور اسیدآمین ال-آسپاراژین در دانه‌ها و غلات به عنوان منبع ذخیره‌سازی نیتروژن نقش مهمی در فراوانی این میکروارگانیسم‌ها در آنها داشت. به طوریکه در مطالعه‌ی از هیماواتهی و همکاران سویه‌های مولد ال-آسپاراژیناز از موادی مانند پوسته قرمز گرم^۱، پوسته گرم بنگال^۲، نارگیل و

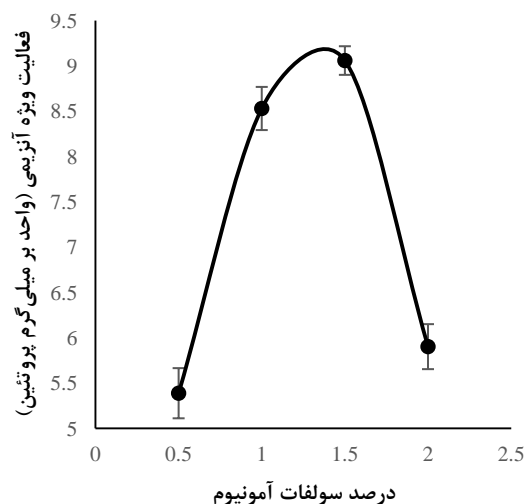
1. Red gram husk
2. Bengal gram husk

بهینه‌سازی منبع نیتروژن بر روی فعالیت آنزیمی

در میان منابع نیتروژنی مختلف مورد آزمایش باکتری اتروباکتر سویه ۱۰۵ بیش‌ترین فعالیت آنزیمی را در ۱/۵ درصد سولفات آمونیوم داشت. بعد از آن عصاره مخمر و کم‌ترین فعالیت آنزیمی نیز مربوط به پیتون بود. بهینه‌سازی منبع نیتروژن و درصدهای مختلف سولفات آمونیوم به عنوان بهترین منبع کربنی در شکل ۵ (الف) و (ب) قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۵ (الف)- اثر منابع نیتروژن مختلف بر میزان تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز در باکتری اتروباکتر سویه ۱۰۵



شکل ۵ (ب)- اثر درصدهای مختلف سولفات آمونیوم بر میزان تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز در باکتری اتروباکتر سویه ۱۰۵



معادل ۲۶/۶۹ واحد بر میلی‌لیتر محاسبه کردند (۴۰). فراگ در مطالعه‌ای دیگر نشان داد که کم‌ترین تولید این آنزیم توسط سویه‌ی *از اسپرژیلوس* در محیط نشاسته صورت می‌گیرد و بیش‌ترین تولید با استفاده از منبع کربن دکستروز است (۴۱). این تفاوت‌ها به راحتی نقش سویه در استفاده از منبع کربن و همین‌طور تولید این آنزیم را نشان می‌دهد.

غالب سویه‌های مولد ال-آسپاراژیناز بیش‌ترین تولید خود را در حضور منابع نیتروژنی آلی از خود نشان می‌دهند. *اسپرژیلوس ترئوس*^۷ در حضور آسپاراژین (۴۱)، *باسیلوس پلی‌میکسا*^۸ و *باسیلوس فرموس*^۹ در حضور عصاره مخمر (۴۲)، *استرپتومایسس جین‌سینگ‌آیسولی*^{۱۰} در حضور پپتون و *استرپتومایسس آلبیدوفلاووس*^{۱۱} در حضور عصاره مخمر (۱۷) از این موارد هستند. منابع نیتروژنی معدنی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر هستند و بر همین اساس جدا از منابع آلی از منابع معدنی هم به منظور بهینه‌سازی استفاده شد. پژوهش احمد و همکاران بیش‌ترین فعالیت آنزیمی در سولفات آمونیوم و برابر با ۲۱/۴۵ واحد بر میلی‌لیتر را نشان داد (۴۰)، همچنین دیوتا^{۱۲} و همکاران (۴۳) بیش‌ترین فعالیت آنزیمی را برای سویه *سودوموناس آئروژینوزا* در حضور سولفات آمونیوم ۲۴۴/۵۶ واحد بر میلی‌لیتر گزارش کردند. در مطالعه حاضر نیز سولفات آمونیوم بهترین منبع تولید این آنزیم بود. مقدار آنزیم تولیدی در مقدار بهینه سولفات آمونیوم معادل ۹/۰۵۸ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

pH محیط در نقل و انتقال مواد مختلف از غشاء سلولی و تنظیم فعالیت‌های متابولیکی سلول نقش

بادام‌زمینی جداسازی شدند (۲۱). همچنین نیم‌کند و همکاران نیز از سیر برای جداسازی سویه‌های تولیدکننده ال-آسپاراژیناز استفاده کرده‌اند (۲۲). *انتروباکتر سویه ۱۰۵* فعالیت ویژه آنزیمی ۹/۴۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین با فعالیت گلوتامینازی بسیار پایین (۰/۵۳۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) از خود نشان داد که از این گونه کمتر به عنوان تولیدکننده این آنزیم نام برده شده است. *انتروباکتر آئروژنز، سراسیا مارسسنس*^۱، *ای. کلای* و *اروینیا* از مولدین این آنزیم از خانواده انتروباکتریاسه می‌باشند (۱، ۸ و ۳۷) پژوهش‌های گوش^۲ و همکاران بر روی سویه *سراسیا مارسسنس NCIM 2919* با فعالیت آنزیمی معادل ۳/۸۷ واحد بر دسی گرم از مطالعات مشابه این تحقیق است (۳۷). همچنین آگروال^۳ و همکاران نیز سویه *سراسیا مارسسنس SK-07* را به عنوان سویه مولد ال-آسپاراژیناز جداسازی و معرفی کردند (۳۸). از تولیدهای بالای این آنزیم می‌توان به فعالیت ال-آسپاراژینازی تولید شده توسط سویه *پکتوباکتریوم کاروتوروم*^۴ MTCC 1428 اشاره کرد که معادل ۲۷/۸۸ واحد بر میلی‌گرم پروتئین تولید داشت (۲۹).

تولید محصولات صنعتی و دارویی از منابع ارزان همیشه یک برتری به سویه انتخابی می‌دهد. تولید ال-آسپاراژیناز از نشاسته و فعالیت کم گلوتامینازی این سویه بهترین خصوصیتی است که ارزشمندی این مطالعه در مقایسه با دیگر مطالعات مشابه را نشان می‌دهد. تولید این آنزیم از منبع ارزانی مانند نشاسته تا کنون توسط چند سویه از *استرپتومایسس* (۱۷) و (۳۹) و چند سویه *اسپرژیلوس* (۴۰) گزارش شده است. احمد^۵ و همکاران فعالیت آنزیمی ال-آسپاراژیناز در سویه‌ی *از اسپرژیلوس*^۶ را با استفاده از منبع نشاسته

7. *Aspergillus terreus*
8. *Bacillus polymyxa*
9. *Bacillus firmus*
10. *Streptomyces ginsengisoli*
11. *Streptomyces albidoflavus*
12. Dutta

1. *Serratia marcescens*
2. Ghosh
3. Agarwal
4. *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428
5. Ahmed
6. *Aspergillus*



مراحل دقیق‌تر مطالعات بیوشیمیایی را دارد. به علاوه به دلیل نیازمندی به این داروی ارزشمند می‌توان طی تکنیک‌های بیوشیمی و زیست فناوری به خالص سازی و افزایش تولید آن نیز در مطالعات بعدی اندیشید.

تشکر و قدردانی

محققین این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل حمایت مالی و همکاری در انجام این پایان نامه تشکر و قدردانی ویژه به عمل می‌آورند.

اساسی ایفا می‌کند. واکیل^۱ و همکاران (۴۲)، سادھیر^۲ و همکاران (۳۹) و راجش^۳ و همکاران (۴۴) نیز از این محدوده pH در مطالعات خود برای بهینه‌سازی استفاده کردند. این سویه در طیف وسیعی از pH قادر به رشد است و می‌تواند تولید آنزیم قابل ملاحظه‌ایی را در سه pH اسیدی، خنثی و قلیایی از خود نشان دهد. مطالعات تولید این آنزیم در این سویه نشان داد که pH=۶ بهترین شرایط برای تولید این آنزیم است. باکتری‌های مولد ال-آسپاراژیناز با تولید آمونیاک باعث تغییر pH محیط به سمت قلیایی می‌شود و موجب می‌شوند باکتری‌ها تا رسیدن به شرایط نامطلوب pH قادر به رشد و تولید آنزیم باشند. از همین رو این باکتری در محدوده pH اسیدی-خنثی فعالیت آنزیمی بهتری را نسبت به سایر مقادیر pH دارد. مشابه این تحقیق واکیل و همکاران pH بهینه برای سویه‌های پانی باسیلوس^۴ و باسیلوس سرکولانس^۵ را ۶ گزارش کردند (۴۰). همچنین بیش‌ترین فعالیت آنزیمی ناشی از کلون کردن آنزیم ال-آسپاراژیناز سودوموناس فلورسنس^۶ در باکتری اشریشیا کلای که توسط کیشور^۷ و همکاران صورت گرفت در pH برابر ۶/۳ و معادل ۰/۹۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر فعالیت آنزیمی بود (۱۸).

نتیجه‌گیری

جداسازی سویه مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز در بهترین زمان ممکن با کمترین فعالیت گلوتامینازی از منابع ارزان از اهمیت این تحقیق بود که پس از جداسازی‌های مکرر حاصل شد. سویه حاضر به دلیل داشتن خصوصیات خوب صنعتی اکنون قابلیت اجرای

1. Wakil
2. Sudhi
3. Rajesh
4. Paenibacillus
5. Bacillus circulans
6. Pseudomonas fluorescens
7. Kishore



منابع و مآخذ

1. Narta UK, Kanwar SS, Azmi W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. 2007; 61(3):208-221.
2. Kornbrust B, Stringer MA, Lange NK, Hendriksen HV. Asparaginase – an enzyme for acrylamide reduction in food products. Whitehurst, R. J., and Van Oort, M. *Enzymes in food technology*. 2nd ed. Vol. 388. Chichester: Wiley-Blackwell, USA. 2010; 59-87.
3. Ebrahimezhad A, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. l-asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo salt lake. *Indian Journal of Microbiology*. 2011; 51(3):307-311.
4. Meena B, Anburajan L, Dheenan PS, Begum M, Vinithkumar NV, Dharani G, Kirubakaran R. Novel glutaminase free l-asparaginase from nocardiosis alba NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2015; 38(2):373-388.
5. Kidd JG. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum II. *Journal of Experimental Medicine*. 1953; 98(6):583-606.
6. Kidd JG. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum I. *Journal of Experimental Medicine*. 1953; 98(6), 565-582.
7. Broome JD. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature*. 1961; 191(4793):1114-1115.
8. Nagarethinam S, Naik AN, Udupa N, Rao VJ, Vanathi MB. Microbial L-Asparaginase and its future prospects. *Asian Journal of Medical Research*. 2012; 1(4):159-68.
9. Kumar DS, Sobha K. L-asparaginase from microbes: a comprehensive review. *Advances in Bioresearch*. 2012; 3(4):137-157.
10. Capizzi RL, Bertino JR, Handschumacher RE. L-asparaginase. *Annual Review of Medicine*. 1970; 21(1):433-444.
11. Taylor CW, Dorr RT, Fanta P, Hersh EM, Salmon SE. A phase I and pharmacodynamic evaluation of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2001; 47(1):83-88.
12. Earl M. Incidence and management of L-asparaginase-associated adverse events in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2009; 7(9):600-606.
13. Usman A. Seeking efficacy in L-asparaginase to combat acute lymphoblastic leukemia (ALL): A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015; 9(32):793-805.
14. Borek D, Jaskólski, M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica* 2001; 48(4):893-902.
15. Doriya K, Jose N, Gowda M, and Kumar DS. Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of l-asparaginase. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2016; 78:115-35.
16. Meghavarnam AK, Savitha J. A simple and efficient dye-based technique for rapid screening of fungi for L-asparaginase production. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2015;3(2):123-30.
17. Deshpande N, Choubey P, Agashe M. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:1-6.
18. Kishore V, Nishita KP, Manonmani HK. Cloning, expression and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* for large scale production in *E. coli* BL21. *3 Biotech*. 2015; 5(6):975-81.



19. Yazdai R, Mobii Dehkordi M, Rastegari AA. Isolation and identification of native Iranian L-asparaginase producing bacteria. *Journal of Microbial World*. 2012; 5(1&2):39-46.
20. Bhargavi M, Jayamadhuri R. Isolation and screening of marine bacteria producing anti-cancer enzyme L-asparaginase. *American Journal of Marine Science*. 2016; 4(1):1-3.
21. Hymavathi M, Sathish T, Brahmaiah P, Prakasham RS. Impact of carbon and nitrogen sources on L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574): Application of saturated Plackett-Burman design. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2010; 24(4):473-80.
22. Nimkande KD, Khan ZH, Mular SM, Kunjwani SS. Isolation, purification and characterization of L-asparaginase from dry seeds of *Pisum sativum* and *Vigna radiata*. *IJAR*. 2015; 1(7):628-31..
23. Rozalska M. Staphylococcal L-asparaginase: purification and properties of enzymic protein. *Acta Microbiologica Polonica*. 1989; 38(3-4):233-45.
24. Badoei-Dalfard A. L-asparaginase production in the *pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JHS-71 isolated from Jooshan hot-spring. *Molecular Biology Research Communications*. 2016; 5(1):1-10.
25. Manasa C, Nalini MS. L-Asparaginase activity of fungal endophytes from tabernaemontana heyneana wall.(apocynaceae), endemic to the Western Ghats (India). *International Scholarly Research Notices*. 2014; 2014; 1-7.
26. Jia M, Xu M, He B, Rao Z. Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013; 61(39):9428-34.
27. Goto M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd edn, vol 2, part B. Springer, USA. 2005:404-6.
28. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74(8):2461-70.
29. Kumar S, Pakshirajan K, Dasu VV. Development of medium for enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Applied microbiology and biotechnology*. 2009; 84(3):477-86.
30. Geckil H, Gencer S and Uckun M. Vitreoscilla hemoglobin expressing *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004; 35(2):182-189.
31. Husain I, Sharma A, Kumar S, Malik F. Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from *Enterobacter cloacae*: in-vitro evaluation of cytotoxic potential against human myeloid leukemia HL-60 cells. *PloS one*. 2016; 11(2):e0148877.
32. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. *Microbiology*. 1973; 76(1):85-99.
33. Sharma A, Husain I. Evaluation of antitumor activity of glutaminase-free periplasmic asparaginase from indigenous bacterial isolates as candidates for cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2017; 87(3):997-1004.
34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1-2):248-54.
35. Emmanuel E, Nzelize HC, Onyike E. Isolation, partial purification and characterization of l-asparaginase from Hedgehog serum. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 2015;7(6):404-409.
36. Zuo S, Zhang T, Jiang B, Mu W. Recent research progress on microbial L-asparaginases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015; 99(3):1069-79.



37. Ghosh S, Murthy S, Govindasamy S, Chandrasekaran M. Optimization of L-asparaginase production by *Serratia marcescens* (NCIM 2919) under solid state fermentation using coconut oil cake. Sustainable Chemical Processes. 2013 Dec 1;1(1):9.
38. Agarwal A, Kumar S, Veeranki VD. Effect of chemical and physical parameters on the production of l-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. Letters in applied microbiology. 2011; 52(4):307-13.
39. Sudhir AP, Dave BR, Trivedi KA, Subramanian RB. Production and amplification of an l-asparaginase gene from actinomycete isolate *Streptomyces* ABR2. Annals of Microbiology. 2012; 62(4):1609-14.
40. Ahmed Mervat MA, Nageh AD, Taher TM, Fareed HS. Production, purification and characterization of L-asparaginase from marine endophytic *Aspergillus* sp. ALAA-2000 under submerged and solid state fermentation. Journal of Microbial & Biochemical Technology. 2015; 7(3):165-72.
41. Farag AM, Hassan SW, Beltagy EA, El-Shenawy MA. Optimization of production of anti-tumor l-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. The Egyptian Journal of Aquatic Research. 2015; 41(4):295-302.
42. Wakil SS, Adelegan AA. Screening, production and optimization of L-asparaginase from soil bacteria isolated in Ibadan, South-western Nigeria. Journal of Basic & Applied Sciences. 2015; 11:39-51.
43. Dutta S, Roy R, Lahiri D. L-asparaginase and l-glutaminase from *Pseudomonas aeruginosa*: production and some physicochemical properties. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2015; 5(1):34-39.
44. Moses JR, Leelavathy R, Vanapalli VS, Thirumurugan G, Rajaram MS. Effect of inducers and physical parameters on the production of L-asparaginase using *Aspergillus terreus*. Journal of Bioprocessing and Biotechniques. 2011;1:1-6.

