مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره سوم (پیاپی ۲۸) پاییز ۱۳۹۵
صفحات ۲۵۶-۲۴۷

Original Article

جداسازی، شناسایی مولکولی و بررسی میزان تولید سویه های *باسیلوس* مولد آنزیم آسپاراژیناز از زیست بوم شهرستان جیرفت

ارسطو بدویی دلفارد*[۱]، زهرا کرمی[۲]، نرجس رمضانی پور[۳]

[۱] دانشیار، دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست شناسی،
[۳] کارشناس ارشد، دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست شناسی.

چکیده

سابقه و هدف: سلول های سرطانی قادر به تولید L-آسپاراژین نمی باشند و به L-آسپاراژین پلاسمای خون وابسته هستند. L-آسپاراژیناز (L-آسپاراژین آمیدوهیدرولاز EC 3.5.1.1) باعث تبدیل L-آسپاراژین به آسپاراتات و آمونیاک می شود. L-آسپاراژیناز اولین آنزیم با فعالیت ضد سرطان خون می باشد که به طور گسترده در انسان مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی سویه های مولد آنزیم آسپاراژیناز از زیست بوم شهرستان جیرفت انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی، نمونه های آب و خاک از باغات مرکبات و فاضلاب کارخانه شیر شهرستان جیرفت در استان کرمان جمع آوری گردید. باکتری های تولیدکننده L-آسپاراژیناز بر روی محیط جامد حاوی سوبسترای آسپاراژین و معرف فنل رد غربالگری شدند. میزان فعالیت آسپاراژینازی بر اساس قطر هاله ایجاد شده اندازه گیری گردید. بهترین سویه های انتخاب شده با روش مولکولی PCR شناسایی شدند.

یافته ها: نتایج تعیین توالی ژن *16S rRNA* نشان داد که سویه های برتر متعلق به جنس *باسیلوس* می باشند. بیشترین میزان تولید آسپاراژیناز توسط سویه DJK23 حدود ۱۶۵ واحد بر میلی لیتر بود. نتایج نشان داد که L-آسپاراژیناز در اسیدیته ۵ تا ۸ فعالیت دارد و بیشترین فعالیت آنزیمی در اسیدیته ۷ می باشد. همچنین این آنزیم در اسیدیته ۵ حدود ۳۶ درصد فعالیت آنزیمی از خود نشان داد.

نتیجه گیری: با وجود قابلیت *باسیلوس* ها در تولید تجاری آنزیم ها، L-آسپاراژیناز این باکتری ها کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. یافته های ما نشان داد که L-آسپاراژیناز *باسیلوس* فعالیت قابل توجهی در حضور اسیدیته خنثی و اسیدی نشان می دهد. بنابراین می تواند به عنوان یک آنزیم دارویی و صنعتی مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *باسیلوس*، L-آسپاراژیناز، غربالگری.

دریافت مقاله: اسفندماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۵

مقدمه

آنزیم‌های دارویی کاربردهای فراوانی در درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی دارند. آنزیم‌های تولید شده از منابع میکروبی در مراحل مختلف تشخیص، درمان و تحقیقات بیوشیمیایی نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۱ و ۲). سلول‌های توموری بدخیم به ویژه سلول‌های لنفاوی برای حفظ نرخ بالای رشد خود به مقدار بسیار زیادی اسید آمینه L-آسپاراژین نیاز دارند. ال-آسپاراژیناز یک عامل ضد سرطان موثر است که در سه دهه اخیر به طور گسترده در شیمی‌درمانی سرطان خون لنفوبلاستیک حاد به ویژه در کودکان مورد استفاده قرار گرفته است. ال-آسپاراژیناز از خانواده آمیدوهیدرولازها است (EC3.5.1.1) که به عنوان دارو، آسپاراژین مورد نیاز سلول‌های توموری را کاهش می‌دهد و آن را به آسپارتات و آمونیاک تجزیه می‌کند (۵-۳).

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه شهید باهنر، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۳۴۳۳۲۰۲۰۴۴ پست الکترونیک: badoei@uk.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

اولین فعالیت بالای آنزیم آسپاراژیناز در سال ۱۹۲۲ در خوک گینه نو مشاهده گردید اما در سایر پستانداران چنین فعالیتی دیده نشد (٦). بعدها در سال‌های ۱۹٥٦ و ۱۹٦۱ محققین نشان دادند که رشد سلول‌های سرطانی وابسته به حضور آسپاراژین می باشد. نتایج نشان داد که رشد سلول‌های سرطانی در حضور آسپاراژیناز جدا شده از خوک گینه نو مهار می‌شود. از آنجایی که جداسازی مقدار مورد نیاز این آنزیم از سرم خوک، مشکل است منابع دیگر مانند باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

دانشمندانی مانند ماشبرن (Mushburn) و کامفل (Camphell)، ال-آسپاراژیناز باکتریایی *اشریشیا کلی* (*E. coli*) را تخلیص نمودند و خاصیت ضد توموری آن را شبیه سرم خوک گینه نو اعلام نمودند. این نتایج زمینه عملی برای تولید مقدار بالای این آنزیم را برای مطالعات بالینی فراهم نمود. اوتجن (Oettgen) برای اولین بار در سال ۱۹٦۷ کارایی آسپاراژیناز در بیماران مبتلا به سرطان خون را نشان داد (۹-٥).

در سال‌های اخیر، استفاده از L-آسپاراژیناز در درمان سرطان خون به طور گسترده‌ای افزایش یافته است. به همین دلیل در روش‌های پیشرفته درمانی، استفاده از آسپاراژیناز به عنوان یک روش درمانی مهم در کنار شیمی‌درمانی به شمار می‌رود. ال-آسپاراژیناز یک آنزیم با طیف نسبتا گسترده است که به غیر از بافت‌های انسان در تعدادی از باکتری‌ها، گیاهان و سرم موش‌های خاص یافت می‌شود. اما به دلیل اشکال در روش جداسازی این آنزیم، منابع دیگر مانند میکروارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰ و ۱۱).

ثابت شده است که میکروارگانیسم‌ها منابع کافی و ارزان این آنزیم هستند. توانایی کشت آن‌ها، شرایط را برای تولید در مقیاس بالا فراهم می‌آورد. گروه‌های متنوعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمر و اکتینومیست‌ها قادر به تولید این آنزیم هستند. از رایج‌ترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در تولید ال-آسپاراژیناز می‌توان به باکتری *اشریشیا کلی*، *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* (*Corynebacterium glutamicum*)، *اروینیا کاروتوورا* (*Erwinia caratovora*)، *باسیلوس* (*Bacillus*) و *سودوموناس استاتزری* (*P. stutzeri*) اشاره نمود (۱۷-۱۲).

از این میان ال-آسپاراژیناز باکتری *اشریشیا کلی* قدرت فوق‌العاده‌ای در مهار فعالیت سلول‌های توموری دارد. همچنین ال-آسپاراژیناز باکتری *اروینیا* کریزانتومی (*E. cherysantemi*) به عنوان یک عامل دارویی فعال شناخته شده است.

با وجود استفاده فراوان این آنزیم در درمان سرطان خون اما به دلیل ایجاد واکنش‌های آلرژیک و بیماری‌های متابولیک در اثر استفاده طولانی مدت، استفاده از این آنزیم‌های موجود با چالش‌هایی همراه است. از آنجایی‌که ویژگی‌های آنزیم‌های باکتریایی از یک ارگانیسم به ارگانیسم دیگر متفاوت است، غربالگری و یافتن منابع جدید تولیدکننده آسپاراژیناز به ویژه *باسیلوس* ها مورد توجه ویژه محققین قرار گرفته است.

هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی مولکولی سویه های *باسیلوس* مولد ال-آسپاراژیناز از زیست بوم شهرستان جیرفت بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌برداری: در این پژوهش نمونه‌های آب و خاک از مناطق مختلف جنوب استان کرمان از جمله (باغات مرکبات و فاضلاب کارخانه شیر شهرستان جیرفت) جمع‌آوری و مشخصات نمونه ها ثبت گردید (جدول ۱). نمونه برداری در شرایط استریل انجام گرفت. در مورد نمونه‌های آب، نمونه‌برداری از عمق ۵۰-۲۰ سانتی‌متری در لوله‌های فالکون استریل و در نمونه‌های خاک از عمق ۱۰-۳ سانتی‌متری با استفاده از چاقوی استریل نمونه‌برداری انجام گرفت. نمونه‌ها درون فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

ب) غربالگری باکتری‌های مولد ال-آسپاراژیناز: برای این منظور از محیط جامد M9 تغییر یافته حاوی آسپاراژین، استفاده شد. این محیط حاوی معرف فنل‌رد (۰/۰۲ درصد) می‌باشد که در اثر فعالیت آنزیم آسپاراژیناز، آمونیاک آزاد شده و اسیدیته محیط افزایش می‌یابد. درنتیجه موجب تغییر رنگ محیط واکنش می‌گردد. این محیط‌های جامد به مدت ۳ روز در انکوباتور قرار

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: اطلاعات مربوط به نمونه های مورد بررسی در مطالعه.

مکان نمونه برداری	دما (°C)	اسیدیته	موقعیت جغرافیایی
باغات مرکبات دلفارد جیرفت	۲۵	۸	N: 29° 0' 24" , E: 57° 35' 42", 688 Meter
فاضلاب کارخانه فرآورده های شیر جیرفت ایستگاه شماره ۱	۲۵	۱۰	N:28°34.029, EO:57°52.400, 672 Meter
فاضلاب مایع کارخانه فرآورده های شیر جیرفت ایستگاه شماره ۲	۲۵	۱۰	N:28°34.029, EO:57°52.400, 672 Meter
چاه آرتیزین جیرفت ایستگاه شماره ۱	۱۸	۷/۵	N:28°36.457, EO:57°42.547, 644 Meter
چاه آرتزین جیرفت ایستگاه شماره ۲	۱۸	۷/۵	N:28°36.457, EO:57°42.547, 644 Meter
خاک آبگرم بهادرآباد جیرفت	۲۸	٤/٥	N:28°13.111, EO:57°51.665, 540 Meter
خاک باغ مرکبات روستای چمن	۲٦	٦	N:28°35.921, EO:57°46.690, 634 Meter

داده شد و میزان تغییر رنگ اندازه‌گیری گردید. میزان آنزیم تولید شده بر اساس روش نسلر اندازه‌گیری شد (۱۸). هر واحد فعالیت آنزیم آسپاراژیناز به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که یک میکرومول آمونیاک را در مدت یک دقیقه در شرایط استاندارد آزاد نماید.

ج) شناسایی مولکولی: ابتدا باکتری‌ها بر روی محیط نوترینت آگار کشت چمنی داده شدند و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۰ °C گرماگذاری شد. سوسپانسیونی از باکتری رشد یافته در آب مقطر استریل تهیه و در دمای ٤ °C به مدت ۱۰ دقیقه و در دور g ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید (۱۹). DNA حاصل از رسوب باکتری با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناکلون، ایران استخراج شد. به منظور ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، جذب محلول رقیق شده DNA (با رقت ۱۰۰) در طول موج های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. با استفاده از رابطه DNA (µg/ml)= 50.d.A260Conc. و نسبت A260/A280 به ترتیب غلظت DNA و میزان خلوص آن تخمین زده شد. به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* از پرایمرهای عمومی طراحی شده Forward: 5' -AGT TTG ATC CTG GCT CAG –3' با Tm= 53.7 °C و Reverse primer: 5'- GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3' با Tm= 53.4 °C استفاده گردید (۱۸ و ۱۹). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از $MgCl_2$ (۲۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ پیکومول)، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase، ۱۸/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۰/۵ میکرولیتر از DNA الگو انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه مستر سایکلر گرادیانت ساخت شرکت اپندرف آلمان و با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، اتصال در دمای ٥٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۸ دقیقه انجام شد (۱۹ و ۲۰). محصول PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز یک درصد با استفاده از کیت استخراج DNA سیناکلون خالص‌سازی گردید. سپس توالی DNA با استفاده از توالی‌یاب DNA توسط بیونیر (کره جنوبی) تعیین شد. درخت فیلوژنی سویه ها با استفاده از نرم افزار مگا ٤ رسم گردید (۲۱).

د) تولید و خالص‌سازی نسبی آنزیم: باکتری مولد آسپاراژیناز به محیط M9 تغییریافته حاوی آسپاراژین تلقیح شد. این محیط به مدت ۲ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلیسیوس قرار داده شد. محیط کشت باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ رسوب داده شد. روماند با استفاده از آمونیم سولفات ۸۵ درصد تغلیظ و رسوب حاصل در ۱۰۰۰ میکرو لیتر بافر تریس با اسیدیته ۷/۵ حل گردید تا برای دیالیز مورد استفاده قرار گیرد (۳). خالص‌سازی نسبی به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی–(Q سفاروز) انجام شد. در ابتدا ستون با بافر تریس اسیدیته ۷/۵ به تعادل رسید. محتوی کیسه دیالیز که شامل آنزیم آسپاراژیناز بود از روی ستون عبور داده شد. پس از شستشوی

Archive of SID

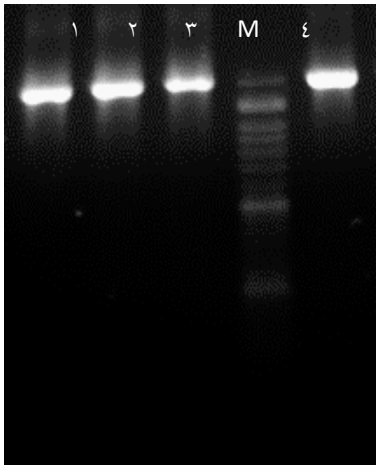
www.SID.ir

ستون با بافر تریس اسیدیته ۷/۵، نمونه‌های متصل شده به ستون با ایجاد شیب نمکی نمک طعام (۰/۵ مولار) جداسازی و فعالیت آنزیمی آنها اندازه گیری گردید (۵).

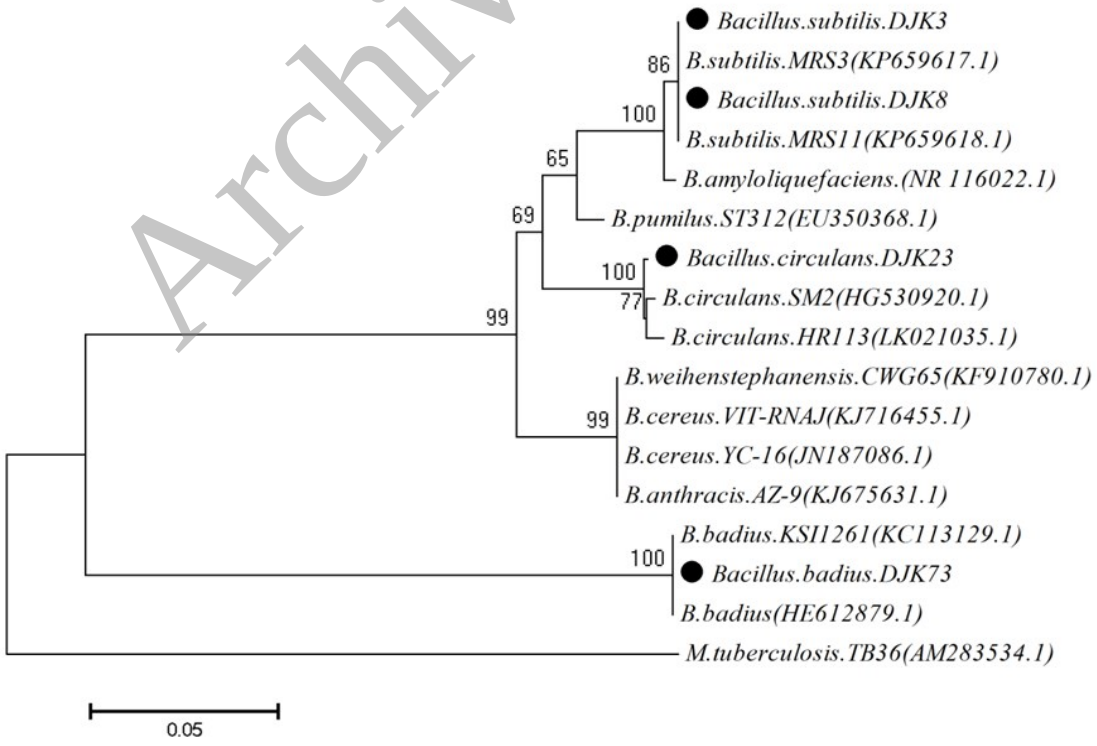
ه) اثر اسیدیته‌های مختلف بر روی فعالیت آسپاراژینازی: تاثیر اسیدیته بر روی فعالیت آسپاراژینازی در محدوده pH های ۳ تا ۹ مورد مطالعه قرار گرفت. بافرهای مورد مطالعه ۰/۰۵ مولار سیترات سدیم (اسیدیته ۳)، سدیم استات (اسیدیته ٤ و ٥)، سدیم فسفات (اسیدیته ٦ و ٧) و تریس (اسیدیته ٨ و ٩) بودند. سنجش فعالیت آنزیمی مطابق با روش یاد شده انجام شد. با این تفاوت که در هر مرحله از یک بافر با pH ویژه استفاده گردید (۲۲).

یافته ها

الف) شناسایی مولکولی: الکتروفورز محصولات PCR نشان دهنده تکثیر قطعه حدود ۱۵۰۰ جفت باز بود (شکل ۱). درخت فیلوژنی سویه‌های مولد آنزیم آسپاراژیناز در شکل ۲ نشان داده شده است. تعیین توالی ژن 16*S rRNA* و مقایسه با توالی ثبت شده در بانک جهانی نشان داد که سویه های DJK3 و DJK8 متعلق به *باسیلوس سوبتیلوس* (*Bacillus subtilis*)، سویه D J K 8 متعلق به *باسیلوس سیرکولانس* (*Bacillus circulans*) و سویه DJK73 متعلق به *باسیلوس بادیوس* (*Bacillus badius*) می‌باشند. تمامی سویه ها دارای قرابت ۱۰۰ درصدی با گونه های ثبت شده بودند.



شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی ژن *16S rRNA*. ستون ۱) سویه DJK3، ستون ۲) سویه DJK8، ستون ۳) سویه DJK23، M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ٤) سویه DJK73.



شکل ۲: درخت فیلوژنی سویه های *باسیلوس* مولد آنزیم آسپاراژیناز با استفاده نرم افزار MEGA4. سویه *میکروباکتریوم توبرکلوسیس* به عنوان outgroup در نظر گرفته شد.

Archive of SID
www.SID.ir

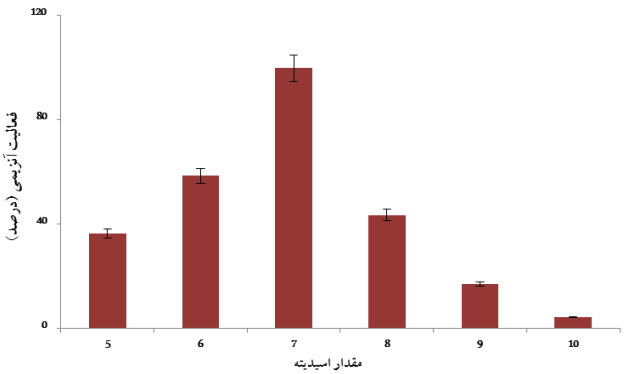
جدول ۲: میانگین قطر هاله تشکیل شده توسط سویه ها بر روی محیط جامد M9 حاوی فنل رد و سوبسترای آسپاراژین (بر حسب میلی متر).

سویه ها	پس از ۳ ساعت	پس از ۶ ساعت	پس از ۹ ساعت	پس از ۱۲ ساعت
DJK3	۱۳±۲	۱۷±۲	۲۳±۱	۲۵±۲
DJK8	۱۲±۱	۲۲±۱	۲٤±۱	۲٦±۱
DJK23	۱٤±۰/۸	۲٤±۰/۵	۳۸±۰/۵	۵۳±۰/۸
DJK73	۱۷±۰/۳	۲۳±۱	۳۱±۱	۳٦±۱

ب) غربالگری باکتری مولد آسپاراژیناز: کلنی‌هایی که هاله قرمز مایل به صورتی بر روی محیط حاوی فنل‌رد ایجاد کردند به عنوان سویه‌های مولد آنزیم انتخاب و به محیط M9 آگار جدید انتقال یافتند. در فواصل زمانی مختلف میزان هاله ایجاد شده توسط این سویه ها اندازه گیری شد (جدول ۲). نتایج نشان داد که سویه *باسیلوس سیرکولانس* DJK23 پس از ٦ و ۱۲ ساعت کشت در محیط اختصاصی به ترتیب بیشترین میزان هاله (۲٤ و ۵۳ میلی‌متر) را دارد.

ج) بررسی میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز: از میان سویه‌های *باسیلوس* جداسازی شده، سویه DJK23 برتری قابل توجهی (۱٦۵ U/ml) نسبت به سایر سویه‌های داشت. اما میزان تولید آنزیم در سویه DJK23 به میزان ۳۰ U/ml، سویه DJK8 به میزان ۳۰ U/ml و سویه DJK73 به میزان ٦۰ U/ml بود.

د) بررسی فعالیت آسپاراژینازی در اسیدیته‌های مختلف: از آنجایی که اسیدیته یکی از پارامترهای اصلی در استفاده بیوتکنولوژیکی آنزیم آسپاراژیناز می‌باشد، فعالیت آسپاراژینازی سویه برتر در حضور اسیدیته های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که آسپاراژیناز DJK23 بیشترین (۸٤ درصد) فعالیت خود را در اسیدیته ۷ نشان می‌دهد. اما در اسیدیته ٦ و ۸ به ترتیب دارای فعالیت آنزیمی حدود ٦۰ و ٤۵ درصد بود (نمودار ۱).



نمودار ۱: فعالیت آسپارازینازی سویه *باسیلوس سیرکیولانس* DJK23 در اسیدیته های مختلف.

بحث

در مطالعه حاضر، باکتری‌های مولد آسپاراژیناز از زیست بوم شهرستان جیرفت جداسازی و با روش‌های مولکولی شناسایی گردیدند. نتایج نشان داد که میزان تولید آسپاراژیناز سویه DJK23 حدود ۱٦۵ واحد بر میلی‌لیتر می‌باشد. بیشترین فعالیت آنزیمی این ال-آسپاراژیناز در اسیدیته ۷ گزارش شد.

با وجود استفاده فراوان آنزیم آسپاراژیناز از منبع *اروینیا* در درمان سرطان خون، اما به دلیل ایجاد واکنش‌های آلرژیک و بیماری‌های متابولیک در اثر استفاده طولانی مدت، استفاده از آنزیم *اروینیا* با چالش‌هایی همراه است. از آنجایی‌که ویژگی‌های آنزیم‌های باکتریایی از یک ارگانیسم به ارگانیسم دیگر متفاوت است، غربالگری و یافتن منابع جدید تولیدکننده آسپاراژیناز در سال های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. در پژوهش حاضر، سویه‌های *باسیلوس* مولد آنزیم آسپاراژیناز از اقلیم متنوع جنوب استان کرمان غربالگری و جداسازی شدند. نتایج نشان داد که بهترین سویه مولد آنزیم آسپاراژیناز *باسیلوس سیرکولانس* می‌باشد.

تاکنون تولید آسپاراژیناز بیشتر معطوف به باکتری‌های گرم منفی بوده است و از بین باکتری‌های گرم مثبت تولید این آنزیم در تعداد معدودی سویه *باسیلوس سوبتیلس* گزارش شده است (۲۷-۲۳). نتایج نشان می‌دهد که سویه *باسیلوس سیرکیولانس* پس از ٦ و ۱۲ ساعت کشت در محیط اختصاصی به ترتیب بیشترین میزان هاله (۲٤ و ۵۳ میلی‌متر) را داشته است. گولاتی (Gulati) و همکاران در بررسی هاله حاصل از فعالیت

Archive of SID
www.SID.ir

ال-آسپاراژینازی باکتری‌های مختلف در بازه زمانی ۱۸ ساعت، ایجاد قطر هاله ٦ میلی‌متری *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis*) را گزارش نمودند (۲۸).

همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ انجام پذیرفت، محققین با استفاده از روش یاد شده، موفق به جداسازی باکتری *اروینیا آرویید‌یه* (*Erwinia aroideae*) با قطر هاله ۱۰ میلی‌متر در کنار سایر باکتری‌های برتر مولد ال-آسپاراژیناز مانند *باسیلوس سوبتیلوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس فلوریسنس* (*Psendomonas florescens*) و *پروتئوس ولگاریس* (*Proteus vulgaris*) شدند (۲۹).

نتایج تولید آنزیم در محیط مایع نشان داد که سویه DJK23 بیشترین میزان تولید آسپاراژیناز را به میزان ١٦٥ واحد بر میلی‌لیتر پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون در محیط اختصاصی حاوی آسپاراژین دارد. پرادهان (Pradhan) و همکاران در سال ۲۰۱۳، موفق به شناسایی یک سویه باکتریایی *باسیلوس سوبتیلوس* شدند که قادر به تولید ۲۳/۸ واحد بر میلی‌لیتر آسپاراژیناز خارج سلولی بود (۳۰). باشا (Basha) و همکاران در سال ۲۰۰۹، تعداد ۱۰ سویه باکتریایی جداسازی نمودند که توانایی تولید ٢٤/٦١ تا ٤٩/٢٣ واحد بر میلی‌لیتر آنزیم را داشت (۳۱). علاوه بر این، فعالیت آسپاراژینازی سویه *پکتوباکتریوم کاروتووروم* (*Pectobacterium carotovorum*) MTCC 1428 به میزان ١/٦٤ واحد بر میلی‌لیتر توسط کومار (Kumar) و همکاران نیز گزارش گردید (۳۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که سویه *باسیلوس سیرکولانس* DJK23 پتانسل قابل توجهی در تولید آسپاراژیناز دارد. به طوری که میزان تولید آسپاراژیناز آن، ۳ برابر بهترین گونه های باکتریایی گزارش شده می‌باشد. نتایج بررسی فعالیت در گستر های مختلف pH نشان داد که آسپاراژیناز DJK23 بیشترین فعالیت آنزیمی خود را در اسیدیته ۷ نشان می‌دهد و در اسیدیته‌های ٦ و ٨ به ترتیب حدود ٦٠ و ٤٥ درصد فعالیت دارد. نکته قابل‌توجه این است که این آنزیم در اسیدیته ٥ حدود ٣٦ درصد نیز فعالیت آنزیمی از خود نشان می‌دهد.

این نتایج نشان می دهد که آسپاراژیناز جزء خانواده آنزیم‌های اسیدی بوده و دارای قابلیت استفاده در زیست پزشکی می باشد. الشافعی (Elshafei) و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیشترین فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز جدا شده از *پنیسیلیوم بریوکامپکتیوم* (*Penicillium brevicompactum* NRC 829) را در محدوده اسیدیته‌های ۹/٥-۷/٥ گزارش نمودند (۳۳). همچنین خامنا (Khamna) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز فعالیت بهینه ال-آسپاراژیناز *سراشیا مارسیسنس* (*Serratia marcescens*) را در محدوده اسیدیته ٥ تا ٩ گزارش کردند (۳٤).

نتیجه‌گیری

باسیلوس سیرکیولانس DJK23 جدا شده در این پژوهش قادر به تولید میزان قابل توجهی آنزیم آسپاراژیناز است که بیشتر از سایر باکتری های گزارش شده می‌باشد. فعالیت بهینه در اسیدیته خنثی و فعالیت قابل توجه در pH اسیدی ویژگی متمایز این آنزیم برای استفاده در بیوتکنولوژی می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به دلیل حمایت مالی از این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Keating M, Holmes R, Lerner S, Ho D. L-asparaginase and PEG asparaginase-past, present, and future. Leukemia & Lymphoma. 1993; 10: 153-157.
2. Muller HJ, Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. Crit Rev Oncol Hematol. 1998; 28: 13-97.

Archive of SID
www.SID.ir

3. Roberts J, Prager M, Bachynsky N. The antitumor activity of *Escherchia coli* L-asparaginase. Cancer Res. 1966; 26: 2213-2217.

4. Sanjay K, Pakshirajan K, Venkata DV. Development of medium for enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. Appl Microbiol Biotechnol. 2009; 84: 477-486.

5. Arya LS. Childhood cancer-challenges and opportunities. Indian J Pediatr. 2003; 70: 159-162.

6. Broome JD. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects and properties of the L-Asparaginase of pig serum in relation to those of antilymphoma substances. J Exp Med. 1963; 118: 99-120.

7. Fisher SH, Wray LV. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding Lasparaginase. J Bacteriol. 2002; 184: 2148-2154.

8. Mesas JM, Gil JA, Martin JF. Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. J Gen Microbiol. 1990; 136: 515-519.

9. Pieters R, Appel I, Kuehnel HJ, Tetzlaff-Fohr I, Pichlmeier U, van der Vaart I, Visser E, Stigter R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial. Blood. 2008; 112(13): 4832-4838.

10. Georgia AK, Nikolaos EL. L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. J Bacteriol. 2007; 127: 657-669.

11. Prista AA, Kyridio DA. L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: purification, properties and identification of essential amino acids for catalytic activity. Mol Cell Biochem. 2001; 216: 93-101.

12. Amardeep K, Yogender P, Mukherjee KJ. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. Appl Microbial Biotechnol. 2005; 68: 189-197.

13. Ashraf AEB, Mohamed S, Jehan M. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. J Biochem Mol Biol. 2004; 37: 387-393.

14. Dhevendaran K, Anithakumari YK. L-asparaginase activity in growing conditions of *Streptomyces* sp. associated with *Therapon jarbua* and *Villorita cyprinoids* of Veli lake, South India. Fish Technol. 2002; 39: 155-159.

15. Geckil H, Gencer S. Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing Vitreoscillahemoglobin for efficient oxygen uptake. Appl Microbiol Biotechnol. 2004; 63: 691-697.

16. Pinheiro IO, Araujo JM, Ximenes ECPA, Pinto JCS, Alves TLM. Production of L-asparaginase by *Zymomonas mobilis* strain CP4. Biomaterial Diagnostic. 2001; 6: 243-244.

17. Savitri N, Asthana AW. Microbial L-asparaginase: a potent antitumor enzyme. Indian J Biotechnol. 2003; 2: 184-194.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. J Gen Microbiol. 1973; 76: 85-99.

19. Ramezani–pour N, Badoei-Dalfard A, Namaki-Shoushtari A, Karami Z. Nitrile-metabolizing potential of *Bacillus cereus* strain FA12; Nitrilase production, purification and characterization. Biocatal Biotransform. 2015; 33: 156-166.

20. Badoei-Dalfard A, Karami Z. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: Activity optimization by response surface methodology. J Mol Catal B: Enzym. 2013; 89: 15-23.

21. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Bio Evol. 2007; 24: 1596-1599.

22. Badoei-Dalfard A. Purification and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. Biocatal Agric Biotechnol. 2015; 4: 388-397.

23. Gholamian S, Gholamian S, Nazemi A, Nargesi MM. Optimization of culture media for L-asparaginase production by newly isolated bacteria, *Bacillus* sp. GH5. Microbiol. 2013; 82 (6): 856-863.

24. Hymavathi M, Sathish T, Subba RC, Prakasham RS. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. Appl Microbiol Biotechnol. 2009; 159: 191-198.

25. Mahajan RV, Kumar V, Rajendran V, Saran S, Ghosh PC, Saxena RK. Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: in vitro evaluation of anti-cancerous properties. PLoS ONE. 2014; 9(6): e99037.

26. Mahajana RV, Saranb S, Kameswarana K, Kumara V, Saxena RK. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. Bioresour Technol. 2012; 125: 11-16.

27. Wafaa KH, Maysa EM. L-asparaginase hyperproducing recombinant *Bacillus* strains obtained by interspecific protoplast fusion. J Genet Eng Biotech. 2010; 8(2): 67-74.

28. Gulati R, Saxena RK, Gupta R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. Lett Appl Microbiol. 1997; 24(1): 23-26.

29. Audipudi AV, Pallavi R, Supriya G. Characterization of L-asparaginase producing bacteria from Mangrove Soil. Int J Chem Tech Res. 2013; 5(1): 109-112.

30. Pradhan B, Dash SK, Sahoo S. Screening and characterization of extracelluar L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha, India. Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(12): 936-941.

31. Basha NS, Rekha R, Komala M, Ruby, S. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine *Actinomycetes* by solid state and submerged fermentation: purification and characterization. Trop J Pharm Res. 2009; 8(4): 353-360.

Archive of SID

www.SID.ir

32. Kumar S, Dasu VV, Pakshirajan K. Localization and production of novel L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. Process Biochem. 2010; 45: 223-229.

33. Elshafei MA, Mohamed HM, Abd-Elmontasr AM, Mahmoud DA, Elghonemy DH. Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. Br Microb Res J. 2012; 2(3): 158-174.

34. Khamna S, Yokota A, Lumyong S. L-asparaginase production by *actinomycetes* isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. Int J Integr Biol. 2009; 6(1): 22-26.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 3, September 2016

Original Article

Isolation, molecular identification and production investigation of *Bacillus*-producing L-Asparaginase from Jiroft microflora

Arastoo Badoei-Dalfard[1], **Zahra Karami**[2], **Narjes Ramezani-pour**[3]

[1]Associate Professors, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[2]Assistant Professors, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[3]M.Sc., Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Cancer cells are not capable of producing L-asparagine, and mainly are depended to the L-asparagine from the circulating plasma pools. L-Asparaginase (L-asparagine amidohydrolase EC 3.5.1.1) catalysis the conversion of L-asparagine to L-aspartate and ammonium. L-asparaginase is the first enzyme with anti-leukemic activity to be intensively studied in human beings. Isolation and identification of L-asparaginase producing bacteria from Jiroft microflora was the aim of this study.

Materials & Methods: In this sectional study, soil and water samples were collected from citrus orchards and waste of milk factory in Jiroft, Kerman province. The bacterial-producing L-asparaginase was screened on agar medium supplied with L-asparagine and phenol red indicator dye. L-asparaginase activity was detected on the basis of pink color around the colony. The best strains were finally identified using PCR method.

Results: *16S rRNA* sequencing results showed that the best isolate-producing L-asparaginase belonged to the *Bacillus* genus. DJK23 strain produced the maximum L-asparaginase, approximately 165 U/ml. The our analysis showed that L-asparaginase was active in a pH rang of 5 to 8, with maximal enzyme activity at pH 7. It is mentioned that this enzyme retains 36% of its initial activity at pH 5.

Conclusion: Although L-asparaginase from bacteria has been extensively characterized, a similar attention has not been paid to *Bacillus*. These results showed that *Bacillus* L-Asparaginase has desirable activity in the presence of neutral and acidic pH, which can be considered as a therapeutic and industrial enzyme.

Keywords: *Bacillus*, L-asparaginase, Screening.

Correspondence to: Arastoo Badoei-Dalfard

Tel: +98 3433202044

E-mail: Badoei@uk.ac.ir

Journal of Microbial World 2016, 9(3): 247-256.

Archive of SID

www.SID.ir