Archive of SID

مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره اول (پیاپی ۳۰) بهار ۱۳۹۶
صفحات ۵۸-۴۹

Original Article

جداسازی و بهینه‌سازی آنزیم ال-آسپاراژیناز فاقد فعالیت گلوتامینازی توسط *سراشیا مارسسنس* جداسازی شده از منابع طبیعی

فرشته قادری[۱]، غلامرضا قزلباش[*۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم ال-آسپاراژیناز به عنوان یکی از بهترین داروهای ضد سرطان خون شناخته شده است. با توجه به این که آسپاراژینازهای داروئی موجود، از منابع باکتریایی می‌باشند، هدف از این پژوهش‌یافتن باکتری‌های تولید کننده این آنزیم از نمونه‌های طبیعی می باشد.

مواد و روش‌ها: سویه های باکتریایی مولد ال-آسپاراژیناز از انواع مختلفی از نمونه‌های طبیعی جداسازی شدند. جداسازی اولیه با استفاده از محیط نوترینت آگار و سپس محیط آسپارژین دکستروز سالت آگار حاوی فنل رد انجام شد. کلنی های دارای هاله صورتی و مولد ال-آسپاراژیناز برای مطالعه فعالیت آنزیمی و نیز شناسایی با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی انتخاب گردیدند. فعالیت آنزیمی توسط روش نسلر اندازه گیری شد. به منظور بهینه سازی تولید آنزیم برخی از فاکتورها مانند منبع کربن، نیتروژن و pH مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از میان ۱۳۳ جدایه، یکی از سویه های جدا شده از چربی مرغ دارای فعالیت ال-آسپاراژینازی بالا (۸/۹۲ واحد بر میلی‌گرم) و فاقد فعالیت گلوتامینازی بود. جدایه انتخاب شده به عنوان *سراشیا مارسسنس* سویه ۱۰۰ معرفی و با شماره دسترسی KX821734 در بانک ژنی NCBI ثبت گردید. شرایط بهینه محیط کشت به منظور تولید این آنزیم شامل مالتوز ۱/۵ درصد به عنوان منبع کربن، آمونیوم سولفات یک درصد به عنوان منبع نیتروژن و pH ۶/۸ بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به کاربرد آنزیم ال-آسپاراژیناز در زمینه‌های مختلف دارویی، پس از انجام مطالعات بیش‌تر بالینی بر روی این آنزیم، جدایه حاصل می تواند یک گزینه مناسب صنعتی برای تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز باشد.

واژگان کلیدی: *سراشیا مارسسنس*، ال-آسپاراژیناز، گلوتامیناز، بهینه‌سازی.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۵

مقدمه

آنزیم ال-آسپاراژیناز یکی از آنزیم های هیدرولازی می‌باشد که از اهمیت ویژه‌ای در پزشکی برخوردار است (۱ و ۲). این آنزیم با هیدرولیز پیوند آمیدی موجود در اسیدآمینه ال-آسپارژین، باعث آزادسازی آمونیوم همراه با تولید اسید آمینه ال-آسپارتیک اسید می شود (۳ و ٤). عملکرد اختصاصی آنزیم ال-آسپاراژیناز سبب شده که این آنزیم به عنوان دارویی با ارزش در درمان انواع لوسمی‌ها و سرطان‌های خون به ویژه لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) و لنفوسارکوما مورد استفاده قرار گیرد (۵ و ٦). سلول های توموری و سرطانی به دلیل فقدان آنزیم ال-آسپارژین سنتتاز، آمینواسید ال-آسپارژین مورد نیاز خود را از جریان خون تامین می کنند. بنابراین تزریق داخل وریدی آنزیم ال-آسپاراژیناز موجب کاهش غلظت

*) آدرس برای مکاتبه: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲۲٦٤٤۸۱۵ پست الکترونیک: gh.r.ghezelbash@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

آمینواسید ال-آسپارژین در خون شده و در نتیجه از رشد سلول های سرطانی جلوگیری می نماید (۷ و۸).

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 (۸). نقش آنزیم ال-آسپاراژیناز در حذف ال-آسپاراژین از خون برای اولین بار در سال ۱۹۲۲ توسط کلمنت (Clement) صورت گرفت و مشخص گردید که آنزیم ال-آسپاراژیناز موجود در سرم خوکچه هندی نقش اصلی را در فعالیت ضدتوموری این موجود به عهده دارد (۹ و ۱۰).

بروم (Broome) و همکاران در سال ۱۹۶۱ برگشت لنفوسارکومای پیوندی در موش که با سرم خوک درمان شده بود را ناشی از تغذیه سلول‌های سرطانی از ال-آسپاراژین با منشاء بیرونی مربوط دانستند. این گزارش برای اولین بار نقش آنزیم ال-آسپاراژیناز را به عنوان یک عامل ضد تومور مطرح نمود (۱۱ و ۱۲). تاکنون ایزوآنزیم‌های متفاوتی از ال-آسپاراژیناز با منشا گیاهی، یوکاریوتی و پروکاریوتی شناخته شده است. با این وجود آنزیم‌های جداسازی شده از میکروارگانیسم‌ها به ویژه باکتری‌ها موثرتر از سایر ال-آسپاراژینازها می باشد (۱۵-۱۳).

میکروارگانیسم‌های تولید کننده ال-آسپاراژیناز در طیف وسیعی از مناطق اکولوژیک یافت می‌شوند. با این وجود اکثریت آنزیم‌های شناخته شده دارای عوارض جانبی بوده که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به فعالیت گلوتامینازی آن‌ها اشاره نمود (۱٤ و ۱٦). آنزیم‌های ال-آسپاراژینی که دارای فعالیت گلوتامینازی می‌باشند، در اثر استفاده طولانی مدت واکنش‌های آلرژیک و فیزیولوژیکی نامطلوب ایجاد می‌کنند. برهمین اساس یافتن آنزیم ال-آسپاراژینازهای فاقد فعالیت گلوتامینازی برای صنعت داروسازی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۱٤ و ۱٦).

فعالیت های غیر اختصاصی این آنزیم سبب ایجاد علائمی مانند سمیت عصبی، لخته شدن خون، هپاتیت و واکنش‌های آلرژیک می گردد (۱۷).

موثرترین آنزیم‌های ال-آسپاراژینازی که امروزه به عنوان داروی ضدسرطان در دسترس بوده و به صورت تجاری تولید می شوند از منابع میکروبی هم چون *اشریشیا کلی* (*E. coli*) و *اروینیا* (*Erwinia*) به دست می آیند. این دو نوع آنزیم خصوصیات تقریبا مشابهی دارند، اما آنزیم تولید شده توسط *اروینیا* نیمه عمر کم‌تری نسبت به *اشریشیا کلی* دارد (۱۸ و ۱۹).

مطالعات زیادی بر روی تولید میکروبی آنزیم آسپاراژیناز در ایران و دیگر کشورها صورت گرفته است. ناظمی (Nazemi) و همکاران (۷) و ایزد پناه قشمی (Izadpanhah Gheshmi) و همکاران (۹) در ایران به ترتیب از خاک و آب دریا برای جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد ال-آسپاراژیناز و تولید آزمایشگاهی آن استفاده کرده اند. همچنین امانول (Emmanuel) و همکاران (۲۰)، پاول (Paul) و همکاران (۲۱)، السباغ (El-Sabbagh) و همکاران (۲۲) و کریستینسن (Kristiansen) و همکاران (۲۳) نیز بر روی تولید میکروبی و خالص‌سازی آنزیم ال-آسپاراژیناز در کشورهای دیگر مطالعه کرده اند.

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌هایی با قابلیت تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز و عدم فعالیت گلوتامیناز بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه و جداسازی اولیه باکتری‌ها:

برای جداسازی باکتری های تولید کننده ال-آسپاراژیناز ابتدا ۱۰ گرم یا ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه های طبیعی (خاک، قسمت های مختلف گیاه، جوانه ماش، سیر، میوه‌های مختلف، مدفوع پرندگان، چربی مرغ و آب) به ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل افزوده شد و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید. سپس از آنها بر روی محیط نوترینت آگار و لوریا برتانی (Luria-Bertani) (مرک، آلمان) کشت داده شد. پس از ۲٤ تا ٤۸ ساعت گرماگذاری، تمام پرگنه های رشد یافته به صورت خالص جمع آوری شدند. به منظور بررسی تولید یا عدم تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز هر کدام از پرگنه های یاد شده بر روی محیط اختصاصی آسپارژین

www.SID.ir

Archive of SID

دکستروز سالت آگـار (مرک، آلمان) کشـت خطـی داده شـدند. این محیط حاوی ۱۰ گرم ال-آسپارژین، ۲ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم منیزیم سولفات، ۱ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات و ۰/۰۰۰۹ گرم فنل رد در یک لیتر آب است (pH ٦/٨). انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس انجام شد. سپس پرگنه های تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز با آزادسـازی آمونیـوم ناشی از هیدرولیز آسپاراژین باعث قلیـایی شـدن محـیط کشت و ایجاد رنگ صورتی شده و بدین وسیله از سایر کلنی‌های فاقد این ویژگی متمایز شدند. سویه های تولید کننده با بـیش تـرین فعالیـت برای ادامـه مطالعـه انتخـاب شدند (۷، ١٦ و ٢٤).

ب) شناسایی جدایه ها: برای این منظور از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون های معمول بیوشیمیایی استفاده شد (۱۱، ۲۵ و ۲٦). به منظور شناسایی مولکولی نیز ابتدا DNA ژنـومی با استفاده از روش جوشاندن اسـتخراج گردید (۲۷). در ادامه واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای عمومی رفت 27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') و برگشت 1429R (5'-TAAGGAGGTGATCCAGCC-3') با طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز انجام گرفت (۲۸). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر آنزیم، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۱ میکرلیتر DNA الگوی باکتریایی و ۱۷/۰۵ میلی لیتر آب مقطر استریل انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (آلمان) با شرایط دمایی ٤ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور (انگلستان) مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین توالی محصول حاصل توسط شرکت زیست فناوران رنا صورت گرفت. تـوالی‌هـای رفت و برگشت پس از ویرایش توسط نرم افـزار Bio edit و FinchTV به صورت یک توالی کامل تهیه شد. سپس توالی به دست آمده در پایگاه داده‌های بانک ژنی National Center for Biotechnology Information (NCBI) با باکتری های موجـود در آن مقایسـه شـد و نزدیـک تـرین سـویه‌هـای باکتریـایی بـر اساس توالی‌هـای *16S rRNA* تعیین گردید.

ج) تولیـد آنـزیم و سـنجش فعالیـت آنزیمـی: ابتدا جدایه مورد نظر به صورت شبانه به مدت ۱۲ ساعت بر روی محیط آسپاراژین دکستروز سالت آگار (مرک، آلمان) در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس کشت داده شد. یک لوپ از باکتری یاد شده به محیط آسپاراژین دکستروز سالت براث (مرک، آلمان) منتقل شد. پس از رسیدن کدورت محیط در طول موج ٦۰۰ نانومتر به ۰/۸-۰/٦ با نسبت ۵ درصد به محیط های کشت آسپاراژین دکستروز سالت براث به عنوان محیط های تولید تلقیح شدند. سپس هر ۲ ساعت یکبار از محیط کشت، نمونه‌گیری شد و فعالیت آنزیمی از طریق روش اندازه گیری آمونیوم آزاد شده با استفاده از معرف نسلر سنجیده شد. سپس منحنی تولید آنزیم و رشد رسم گردید. براساس این نتایج بهترین زمان تولید آنزیم به دست آمد. سپس مطالعات بیش‌تر در زمان بیشینه تولید انجام گرفت. برای این منظور ۰/۱ میلی لیتر از روماند حاصل از سانتریفیوژ کشت میکروبی با دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه با ۰/۹ میلی لیتر از بافر از قبل گرم شده به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سلیسیوس نگهداری شد. بافر مخصوص اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی حاوی ۰/۱ مولار آسپارژین در ۰/۰۵ مولار تریس در اسید کلریدریک (pH ۸/٦) می باشد. پس از مدت زمان انکوباسیون ۰/۱ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱/۵ مولار واکنش متوقف گردید. نمونه شاهد مشابه نمونه اصلی تهیه شد و تری کلرو استیک اسید قبل از بافر به آن اضافه شد. پس از مدت انکوباسیون نمونه ها در دمای اتاق با rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از روماند به دست

www.SID.ir

Archive of SID

آمده با ۱/۷۵ میلی‌لیتر آب و ۰/۲۵ معرف نسلر ورتکس و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در طول موج ٤٨٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. یک واحد آنزیمی معادل مقدار آنزیمی است که یک میکرومول آمونیاک را از سوبسترا (ال-آسپاراژین) در مدت زمان ۱ دقیقه آزاد می کند. تبدیل جذب نوری نمونه های مجهول به واحد آنزیمی توسط یک منحنی استاندارد تعیین گردید (۲۹).

د) تعیین فعالیت گلوتامینازی: برای این منظور مانند سنجش ال-آسپاراژیناز عمل شد با این تفاوت که بافر مورد استفاده حاوی ۰/۱ مولار گلوتامین در ۰/۰۵ مولار تریس در اسید کلریدریک (pH ۸/٦) بود (۳۳-۳۰). آمونیوم آزاد شده از گلوتامین نیز با معرف نسلر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر شرکت اپتومایز (Optimize) کشور کره جنوبی خوانده شد.

ه) تعیین فعالیت اختصاصی آنزیم: فعالیت ویژه آنزیمی بر اساس میزان فعالیت آنزیم به ازای هر میلی‌گرم از آنزیم تعریف می‌گردد. بنابراین برای سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم باید مقدار پروتئین تولید شده توسط سویه تعیین شود. بر همین اساس و به منظور تعیین مقدار پروتئین تولید شده، از روش برادفورد (Bradford) استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از عصاره سلولی با ۸۰ میکرولیتر بافر تریس در اسید کلریدریک (pH ۸/٦) و ۱ میلی‌لیتر معرف برادفورد مخلوط شدند. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. سپس مقدار دقیق پروتئین با توجه به نمودار استاندارد مشخص گردید. برای تهیه منحنی استاندارد پروتئین، مقدار یک میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های متفاوت تهیه شده از آن برداشته و ۸۰ میکرولیتر بافر نمونه و یک میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه گردید. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب تمامی نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (۳٤).

و) انتخاب بهترین منبع کربن جهت تولید آنزیم: برای این منظور از محیط مایع مشابه با اجزای محیط اختصاصی آسپاراژین دکستروز سالت مایع استفاده شد. شرایط کشت و گرماگذاری نیز مشابه با آزمون قبل بود و منابع کربنی مانند گلوکز، مالتوز و نشاسته به مقدار یک درصد به عنوان منبع کربن مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از تعیین بهترین منبع کربن، درصدهای این منبع نیز در محدوده ۰/۵ درصد تا ۲ درصد بهینه سازی شدند.

ز) انتخاب منبع نیتروژن جهت بررسی تولید آنزیم: برای بررسی اثر منابع مختلف نیتروژن بر روی فعالیت آنزیم در محیط آسپارژین دکستروز سالت مایع منابعی مانند پپتون، عصاره مخمر و سولفات آمونیوم با مقدار یک درصد مورد مطالعه قرار گرفتند. تمامی محیط های کشت بعد از تلقیح مطابق با شرایط یاد شده گرماگذاری شدند. سپس میزان رشد و فعالیت آنزیمی هر کدام مورد بررسی قرار گرفت. همچنین pH در تمامی ارلن‌ها معادل ٦/۸ بود. بعد از انتخاب بهترین منبع نیتروژن بهترین درصد منبع نیتروژن نیز در محدوده‌های یاد شده تعیین شد.

ح) تعیین دامنه pH و بررسی فعالیت آنزیمی: مطابق با آزمون های قبلی و محیط پایه آسپارژین دکستروز سالت مایع با بهترین نوع و درصد منابع کربنی و نیتروژنی دامنه pH بین ٦ تا ۸ مورد مطالعه قرار گرفت (۱۳، ۱٦، ۲٦ و ۳۵).

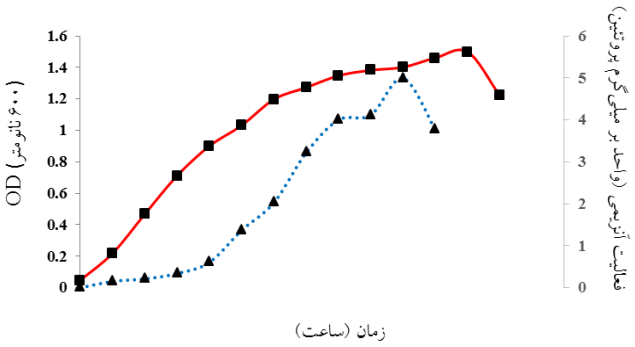
یافته‌ها

الف) جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز: در این مطالعه تعداد ۱۳۳ پرگنه مختلف بر روی پلیت‌های نوترینت آگار و لوریا برتانی جداسازی و خالص گردید. از این میان تنها ۳ پرگنه دارای فعالیت ال-آسپاراژینازی بر روی محیط آسپاراژین دکستروز سالت آگار حاوی معرف فنل‌رد بودند. جدایه ۱۰۰ که از چربی مرغ جداسازی شده بود به عنوان سویه اصلی این مطالعه انتخاب و مطالعات بیشتر بر روی آن انجام شد. شکل ۱ منحنی تولید آنزیم و منحنی رشد این سویه را نشان می دهد. همانطور که مشخص است جدایه ۱۰۰ پس از گذشت ۲۰ ساعت بیش‌ترین تولید آنزیم را نشان داد.

ب) شناسایی باکتری مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز: ارزیابی ویژگی ظاهری و میکروسکوپی نشان داد که باکتری مولد ال-آسپاراژیناز دارای کلنی های صورتی یا قرمز رنگ و

www.SID.ir

Archive of SID



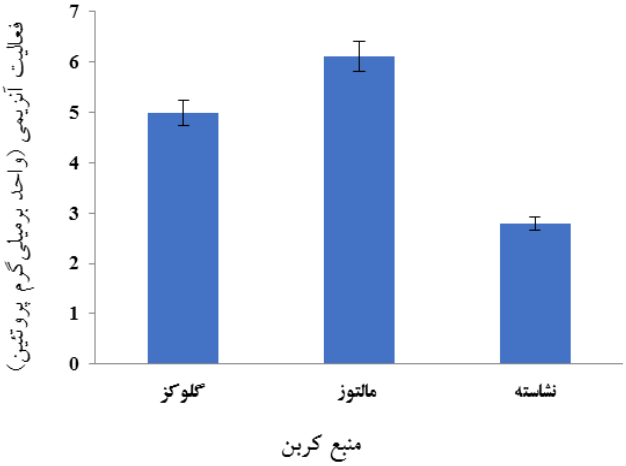
شکل ۱: منحنی رشد و تولید آنزیم اولیه سویه ۱۰۰ : ■: نمودار رشد باکتری، ▲: فعالیت آنزیمی ال-آسپاراژیناز.

موکوئیدی می‌باشد. همچنین رنگ آمیزی گرم نیز نشان دهنده وجود باسیل های کوتاه گرم منفی بوده است. شناسایی بیوشیمیایی این باکتری نیز در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس آنالیز فیلوژنی مشخص گردید که باکتری جداسازی شده دارای شباهت ۱۰۰ درصدی به *سراشیا مارسسنس* سویه S13 دارد . بر همین اساس، *سراشیا مارسسنس* سویه ۱۰۰ نام گذاری و با شماره دسترسی KX821734 در NCBI ثبت گردید.

ج) بهینه‌سازی منبع کربن: باکتری *سراشیا مارسسنس* سویه ۱۰۰ بر روی محیط آسپارژین دکستروز سالت آگار با منابع مختلف کربن کشت داده شد. این باکتری در تمامی محیط‌های مورد آزمایش قادر به رشد بود و فعالیت آنزیمی داشت. بیش‌ترین فعالیت آنزیمی در محیط حاوی مالتوز و بعد از آن در گلوکز و کم‌ترین فعالیت در حضور

جدول ۱: نتایج آزمون بیوشیمیایی و مورفولوژیکی جدایه ۱۰۰.

نوع تست	نتایج	نوع تست	نتایج
رنگ آمیزی گرم	-	تولید H_2S	-
مصرف مالتوز	+	تست متیل رد	-
مصرف مانیتول	+	تست وژپروسکوئر	+
مصرف گلوکز	+	تست اکسیداز	-
مصرف سوکروز	+	تست اوره آز	-
مصرف سیترات	+	تولید ایندول از تریپتوفان	-
تولید گاز از گلوکز	-	حرکت	+
مصرف لاکتوز	-	هیدرولیز توئین ۸۰	+
مصرف آرابینوز	-	هیدرولیز ژلاتین	+
مصرف سوربیتول	+	تولید پیگمان قرمز	+

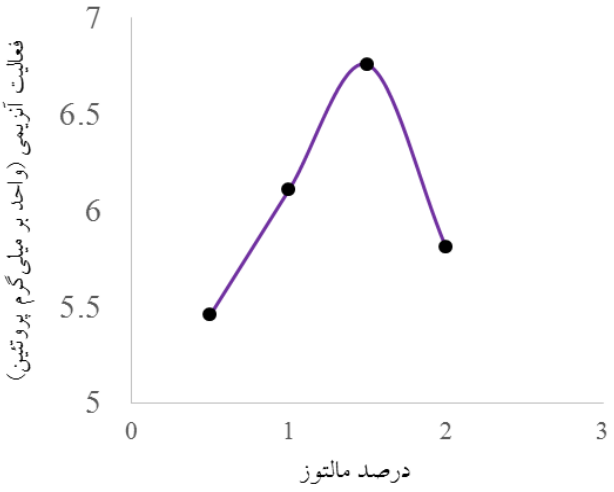


شکل ۲: فعالیت آنزیمی باکتری *سراشیا مارسسنس* سویه ۱۰۰ در حضور منابع مختلف کربن.

نشاسته مشاهده شد. بیش‌ترین فعالیت آنزیمی در مقدار ۱/۵ درصد مالتوز، معادل ۷۵۸/٦ واحد بر میلی‌گرم به دست آمد (شکل ۲). شکل ۳ نیز بهینه‌سازی مالتوز را نشان می‌دهد.

د) بهینه‌سازی منبع نیتروژن: در میان منابع مختلف، یک درصد سولفات آمونیوم بیش‌ترین تاثیر را بر روی فعالیت آنزیمی داشت و پس از آن به ترتیب پپتون و عصاره قرار داشتند (شکل ٤). همچنین بهینه‌سازی درصدهای مختلف سولفات آمونیوم در شکل ۵ قابل مشاهده می‌باشد.

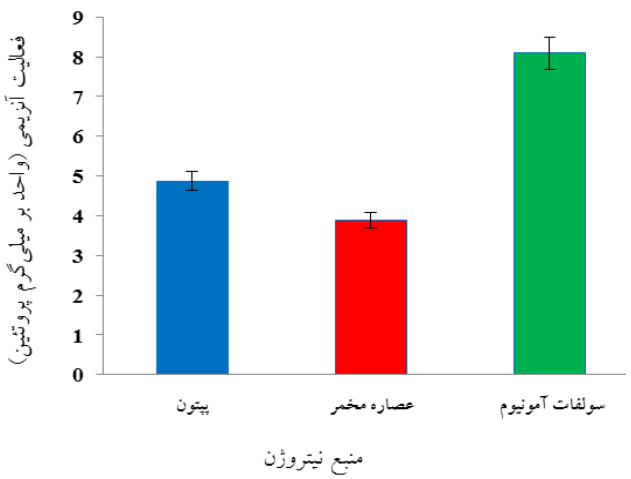
*ه) بهینه‌سازی*pH : نتایج نشان داد که بهترین شرایط برای تولید



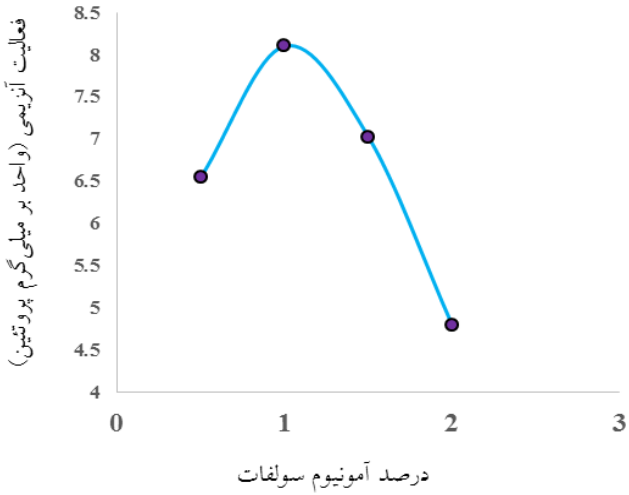
شکل ۳: فعالیت آنزیمی باکتری *سراشیا مارسسنس* سویه ۱۰۰ در حضور درصدهای مختلف مالتوز.

www.SID.ir

Archive of SID

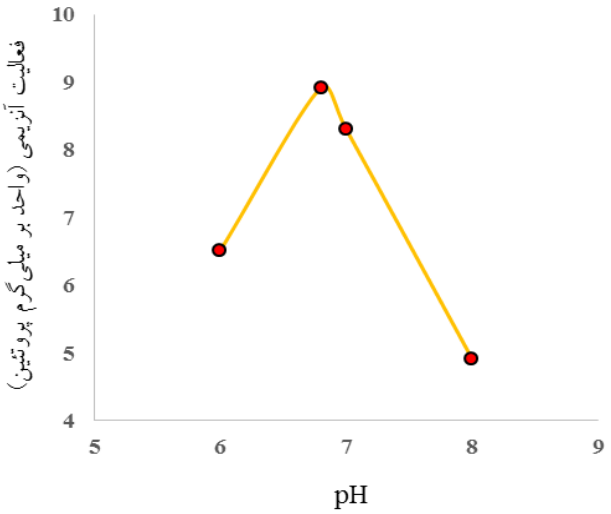


شکل ٤: اثر منابع نیتروژن مختلف بر فعالیت آنزیمی باکتری *سراشیا مارسسنس* سویه ۱۰۰.



شکل ٥: اثر درصدهای مختلف سولفات آمونیوم بر فعالیت آنزیمی باکتری *سراشیا مارسسنس* سویه ۱۰۰.

آنزیم در محدوده خنثی به سمت اسیدی می باشد. با این وجود بیش‌ترین فعالیت آنزیمی pH ۸/٦ و کم‌ترین فعالیت در pH ۸ بود. تاثیر دامنه های مختلف pH بر روی سویه مورد نظر در شکل ٦ مشاهده می‌شود.



شکل ٦: تاثیر pH بر روی تولید آنزیم توسط *سراشیا مارسسنس* سویه ۱۰۰.

بحث

در این مطالعه با استفاده از محیط آسپاراژین دکستروز سالت آگار حاوی معرف فنل‌رد غربالگری اولیه برای جداسازی باکتری‌های مولد ال-آسپاراژیناز صورت گرفت. سپس با استفاده از معرف نسلر مقدار فعالیت آنزیمی سویه‌های مولد محاسبه شد. بیشترین فعالیت آنزیمی برابر با ۸/۹۲ واحد بر میلی‌گرم در شرایط بهینه بود. این سویه *سراشیا مارسسنس* متعلق به خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد و فاقد فعالیت گلوتامینازی است. در این پژوهش برای غربالگری باکتری‌های مولد آنزیم از محیط کشت آسپاراژین سالت آگار استفاده شد. مینا (Meena) و همکاران (۲) نیز از این محیط کشت استفاده نمودند. اما واکیل (Wakil) و همکاران (۱۵) و همچنین یزدانی (Yazdani) و همکاران (۳٦) از محیط کشت M9 استفاده کردند. نقطه مشترک تمام محیط های غربالگری وجود معرف فنل‌رد و آسپاراژین در همه آن‌هاست که متعاقب فعالیت آنزیمی ال-آسپاراژینازی آمونیاک تولید شده و تغییر pH موجب تغییر رنگ محیط از زرد به صورتی می‌شود.

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی براساس مقدار آمونیاک تولید شده وجود دارد. در این تحقیق همانند پژوهش صورت گرفته توسط پراکاشام (Prakasham) و همکاران از روش نسلریزاسیون و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری انجام شد (۳۷). آگروال (Agarwal) و همکاران در پژوهش‌های خود سویه *سراشیا مارسسنس* SK-07 را جداسازی کردند. این سویه قادر به تولید آنزیم ال-

www.SID.ir

Archive of SID

آسپاراژیناز بود. آن‌ها همچنین اثر منابع مختلف کربن و نیتروژن، pH و اکسیژن محلول (DO) را بر مقدار تولید آنزیم مورد بررسی قرار دادند. برای بهینه‌سازی مختلف کربن و نیتروژن از طرح مرکب مرکزی گردش (CCRD) استفاده شد. بر همین اساس منابع کربنی شامل ال-آسپاراژین، گلوکز، عصاره مخمر و پپتون مورد بررسی قرار گرفتند. بهترین منبع کربن برای تولید آنزیم ال-آسپاراژین به دست آمد. همچنین بهترین pH نیز ٦/٥ محاسبه گردید (٣٨).

در مطالعه حاضر نیز سویه جداسازی شده *سراشیا مارسسنس* بود. بهینه‌سازی این سویه نشان داد که بهترین منبع برای کربن، مالتوز و بهترین pH تولید نیز برابر با ٦/٨ می باشد. در این پژوهش آنزیم ال-آسپاراژینازی فاقد فعالیت گلوتامینازی بود. همچنین در مطالعه ای که توسط کومار (Kumar) و همکاران صورت گرفت آنزیمی با همین ویژگی از باکتری *پستوباکتریوم کارتوروم* جداسازی گردید (٦).

همچنین پراکاشام (Prakasham) و همکاران نیز ال-آسپاراژیناز جدیدی جداسازی نمودند که در مقایسه با آنزیم‌های موجود در سیستم تولیدی مقدار گلوتامیناز کمتری داشت. سویه تولید کننده آنزیم متعلق به گونه *باسیلوس سرکولانس* بود (٥).

آنزیم‌های ال-آسپاراژینی که دارای فعالیت گلوتامینازی می‌باشند در اثر استفاده طولانی مدت واکنش‌های آلرژیک و فیزیولوژیکی نامطلوب ایجاد می‌کنند. بر همین اساس یافتن آنزیم ال-آسپاراژینازهای فاقد فعالیت گلوتامینازی برای صنعت داروسازی بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

مینا (Meena) و همکاران نیز سویه *نوکاردیاپسیس آلبا* NIOT-VKMA08 با فعالیت ال-آسپاراژینازی و فاقد فعالیت گلوتامینازی را جداسازی کردند. همچنین از میان منابع کربن و نیتروژن ارزیابی شده برای بهینه‌سازی تولید آنزیم، حداکثر تولید ال-آسپاراژیناز با ترکیبی از ال-آسپاراژین و مالتوز (١/٥ درصد) به ترتیب به عنوان بهترین منابع نیتروژن و کربن و pH ٨ محاسبه شد (٢).

پژوهش حاضر نیز نشان داد که ١/٥ درصد مالتوز بهترین منبع کربن تولید این آنزیم است و سویه جداسازی شده فاقد فعالیت گلوتامینازی می باشد. بنابراین احتمال عوارض جانبی در طول درمان سرطان کاهش می‌یابد. قانع (Ghane) و همکاران سویه‌های *اشریشیا کلی* تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز را غربالگری نمودند (٣٥).

همچنین مقدار فعالیت آنزیمی آن معادل ٣/٦ واحد بر میلی‌لیتر بود. سویه غربالگری شده در پژوهش قانع و همکاران همانند سویه جداسازی شده در این مطالعه متعلق به خانواده انتروباکتریاسه می‌باشند. اما مقدار فعالیت آنزیمی به دست آمده در مطالعه حاضر ٨/٩٢ واحد بر میلی‌گرم بود.

نتیجه گیری

سویه جداسازی شده در این مطالعه به دلیل نداشتن فعالیت گلوتامینازی می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مهم و کاربردی در صنایع دارویی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با تغییرات زیست فناوری و ژنتیکی می‌توان فعالیت ال-آسپاراژینازی این باکتری را برای بهره‌بری بیش‌تر افزایش داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل حمایت مالی این پایان نامه کمال امتنان را دارند.

References

1. Ebrahiminezhad A, Amini SR, Ghasemi Y. L-asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo salt lake. Indian J Microbiol. 2011; 51 (3): 307-311.
2. Meena B, Anburajan L, Dheenan PS, Begum M, Vinithkumar NV, Dharani G, Kirubagaran R . Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. Bioprocess Biosyst Eng. 2014; 38(2):

www.SID.ir

Archive of SID

3. Bhat M, Marar T. Cytotoxic effect of purified L-asparaginase from *Salinicoccus sp*. MKJ997975. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2015; 4(4): 701-712.

4. Kishore V, Nishita KP, Manonmani HK. Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* for large scale production in *E. coli* BL21. Biotech. 2015; 5(6): 975-981.

5. Hymavathi M, Sathish T, Brahmaiah P, Prakasham RS. Impact of carbon and nitrogen sources on L-asparaginase production by isolated *Bacillu circulans* (MTCC8574): application of saturated plackett-burman design. Chem Biochem Eng Q. 2010; 24(4): 473-480.

6. Kumar S, Pakshirajan K, Dasu VV. Development of medium for enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. Appl Microbiol Biotechnol. 2009; 84(3): 477-486.

7. Nazmi A, Gholamian S, Miri Nargesi. Isolation and molecular identification of *Bacillus* species that produce extracellular L-asparaginase, an anti-cancer enzyme, from soils. New Cell Mol Biotechnol J. 2013; 3(11): 9-13. [In Persian]

8. Yong W. Clinical study of L-asparaginase in the treatment of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. Hematol Oncol. 2015; 34(2): 61-68.

9. Izadpanah F, Javadpour S, Malekzadeh K, Jahromi ST, Rahimzadeh M. Isolation and identification of L-asparaginase producing actinomycetes from Persian Gulf. J Hormozgan Univ Med Sci. 2013; 18(2): 121-129. [In Persian]

10. Shrivastava A, Khan AA, Khurshid M, Kalam MA, Jain SK, Singhal PK. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. Crit Rev Oncol Hematol. 2016; 100 (1): 1-10.

11. Kumar DS, Sobha K. L-asparaginase from microbes: a comprehensive review. Adv Biores. 2012; 3(4): 137-157.

12. Nagarethinam S, Naik AN, Udupa N, Rao VJ, Vanathi MB. Microbial L-asparaginase and its future prospects. Asian J Med Sci. 2012; 1(4): 159-160.

13. Zuo S, Zhang T, Jiang B, Mu W. Recent research progress on microbial L-asparaginases. Appl Microbiol Biotechnol. 2014; 99(3): 1069-1079.

14. Meghavarnam Ak, Janakiraman S. A simple and efficient dye-basde technique for rapid screening of fungi for L-asparaginase production. J Exptl Biol Agricult Sci. 2015; 3(2): 123-130.

15. Wakil SS M, Adelegan AA. Screening, production and optimization of L-asparaginase from soil bacteria isolated in Ibadan, south-western Nigeria. J Basic Appl Sci. 2015; 11(1): 39-51.

16. Deshpande N, Choubey P, Agashe M. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. Scientific World J. 2014; Doi: 10.1155/2014/895167.

17. Narta UK, Kanwar SS, Azmi W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. Crit Rev Oncol Hematol. 2007; 61(3): 208-221.

18. Earl M. Incidence and management of asparaginase-associated adverse events in patients with acute lymphoblastic leukemia. Clin Adv Hematol Oncol. 2009; 7(9): 600-606.

19. Warangkar SC, Khobragade CN. Screening, enrichment and media optimization for L-asparaginase production. J Cell Tissue Res. 2009; 9(3): 1963-1968.

20. Emmanuel E, Nzelibe HC, Onyike E. Isolation, partial purification and characterization of L-asparaginase from Hedgehog serum. J Microb Biochem Technol. 2015; 7(6): 404-409.

21. Paul HJ. Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* L-asparaginase. Biochem J. 1982; 203 (1): 109-115.

www.SID.ir

Archive of SID

22. El-Sabbagh SM, El-Batanony NH, Salem TA. L-Asparaginase produced by *Streptomyces* strain isolated from Egyptian soil: purification, characterization and evaluation of its anti-tumor. Afr J Microbiol Res. 2013; 7(50): 5677-5686.

23. Kristiansen T, Einarsson M, Sundberg L, Porath J. Purification of L-asparaginase from *E. coli* by specific adsorption and desorption. FEBS Lett. 1970; 7(3): 294-296.

24. Jia M, Xu M, He B, Rao Z. Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11−06. J Agric Food Chem. 2013; 61(39): 9428-9434.

25. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Parts A, B and C, Springer-Verlag. New York; 2005.

26. Singh Y, Gundampati RK, Jagannadham MV, Srivastava SK. Extracellular L-asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhattai* ITBHU02: purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity in vitro. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 171(7): 1759-1774.

27. Ausuble FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols from in molecular Biology. 2nd ed. John Wiley and Sons. New York; 1999.

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. Appl Environ Microbiol. 2008; 74 (8): 2461-2470.

29. Geckil H, Gencer S, 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 Microb Technol. 2004; 35 (2): 182-189.

30. Singhal B, Swaroop K. Optimization of culture variables for the production of L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum*. Afr J Biotechnol. 2013; 12(50): 6959-6967.

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. J Gen Microbiol. 1973; 76(1): 85-99.

33. Sharma A, Husain IS, Mishra S. Evaluation of antitumor activity of glutaminase free L-asparaginase from indigenous bacterial strains for potential chemotherapeutic application. Int J Pharm Biol Sci. 2014; 5(2): 16-26.

34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72(1): 248-254.

35. Ghane M, Mumbai B, Ghane M. screening of *Escherichia coli* strains for asparaginase II. Iran J Biol. 2001; 3(4): 47-54. [In Persian]

36. Yazdani R, Mobini-Dehkordi M, Rastegari AA. Isolation and identification of native Iranian L-asparaginase producing bacteria. J Microb World. 2012; 5 (1&2): 39-46. [In Persian]

37. Prakasham RS, Hymavathi M, Rao CS, Arepalli SK, Rao JV, Kennady PK, Nasaruddin K, Vijayakumar JB, Sarma PN. Evaluation of antineoplastic activity of extracellular asparaginase produced by isolated *Bacillus circulans*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 160(1): 72-80.

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. Lett Appl Microbiol. 2011; 52 (4): 307-313.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 1, April 2017

Original Article

Isolation and optimization of glutaminase-free L-asparaginase enzyme producing *Serratia marcescens* isolated from natural sources

Fereshteh Ghaderi[1], Gholam Reza Ghezelbash[2]

[1]M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: L-asparaginase enzyme is known as one of the best antineoplastic drugs. Since the available commercial asparaginases are from bacterial sources, the aim of this study was to identify and isolate the L-asparaginase- producing bacteria from natural sources.

Materials & Methods: Asparaginase- producing bacterial strains were isolated from various natural sources. The primary isolation was performed on nutrient agar and asparagine dextrose salts *(*ADS) agar medium, supplemented with phenol red. Asparaginase- producing colonies with pink color zone were selected for enzyme activity study, and identification using biochemical and molecular tests. Enzyme activity was determined using Nessler's method. Some factors such as carbon, nitrogen source, and pH were examined to optimize enzyme production process.

Results: Among 133 isolates, the strain isolated from chicken fat exhibited high glutaminase-free L-asparaginase enzyme activity (8.92 U/mg). The selected isolate was identified as *Serratia marcescens* strain 100 and was registered with accession number KX821734 in NCBI GenBank. The optimal enzyme-producing conditions were as follows: 1.5% (w/v) maltose as a carbon source, 1 % (w/v) ammonium sulfate as the nitrogen source, and initial pH of 6.8.

Conclusion: Considering the use of L-asparaginase enzyme in various pharmaceutical fields, this strain could be a suitable option for industrial production of the enzyme after further clinical studies.

Keywords: *Serratia marcescens*, L-Asparaginase, Glutaminase, Optimization.

Correspondence to: Gholam Reza Ghezelbash

Tel: +98 9122644815

E-mail: gh.r.ghezelbash@gmail.com

Journal of Microbial World 2017, 10(1): 49-58.

www.SID.ir