

Production of anti-leukemia L-Asparaginase by a strain of Staphylococcus Isolated from Agricultural Soil

Mahtab Ghorbanmovahed¹,
Gholamhossein Ebrahimipour²,
Javad Akhtari³,
Abdolrazagh Marzban⁴

¹ MSc in Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Immunogenetics Research Centre, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ PhD Student in Pharmaceutical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received July 30, 2015 Accepted November 30, 2015)

Abstract

Background and purpose: L-asparaginase is a well-known enzyme that is used as one of the most effective anti-leukemic drugs. Considering that the asparaginases used as antitumor are bacterial-based enzymes, the aim of this study was to find indigenous potential bacteria producing asparaginase.

Materials and methods: The enzyme producing bacteria was isolated from the agricultural soils around Gharchak, Tehran province, Iran. Screenings were performed on nutrient agar and M9 agar, respectively. The most efficient bacterium having asparaginase activity was selected and identified by biochemical and phylogenetic methods. Asparaginase activity was assayed by Nesslerization method. Optimization of the enzyme production was conducted by assessment of some factors such as the effect of carbon and nitrogen sources, salt concentration, pH, temperature and agitation.

Results: The selected bacterium was identified as a strain of *staphylococcus* that was named MGM1. The optimal conditions for enzyme activity was obtained at following conditions: 1% glucose as carbon source and 0.5 g/l beef extract as nitrogen source, without salt (NaCl) at pH range of 7-8 with shaking 120 rpm at 35 °C.

Conclusion: The optimal activity for the enzyme produced by MGM1 was similar to physiological conditions of human body, therefore, further studies on this enzyme would be of great value in finding a new efficient asparaginase enzyme.

Keywords: L-asparaginase, anticancer effect, *staphylococcus*

تولید آنزیم ضد لوسمی ال-آسپاراژیناز توسط سویه ای از استافیلوکوکوس جداسازی شده از خاک کشاورزی

مهتاب قربان موحد^۱

غلامحسین ابراهیمی پور^۲

جواد اختری^۳

عبدالرزاق مرزبان^۴

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم ال-آسپاراژیناز به عنوان یکی از بهترین داروهای ضد سرطان خون شناخته می‌شود. با توجه به این که آسپاراژینازهای دارویی از منابع باکتریایی می‌باشند، هدف از این تحقیق یافتن باکتری‌های تولید کننده ال-آسپاراژیناز بومی بود.

مواد و روش‌ها: جداسازی باکتری مولد آنزیم از خاک‌های کشاورزی جنوب تهران انجام شد. غربالگری اولیه بر روی نوترینت آگار و سپس روی محیط M9 آگار صورت گرفت. باکتری منتخب که بیش‌ترین فعالیت آنزیمی را داشت، توسط روش‌های بیوشیمیایی و فیلوژنی شناسایی شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی به روش نسلریزاسیون انجام شد. برای بهینه‌سازی تولید آنزیم فاکتورهای چون منبع کربن، نیتروژن، میزان نمک، تاثیر pH محیط، دما و هوادهی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: باکتری انتخاب شده یک سویه از استافیلوکوکوس بود که استافیلوکوکوس سویه MGMI نامیده شد. شرایط بهینه فعالیت آنزیمی بدین صورت به دست آمد که گلوکز ۱ درصد به عنوان منبع کربن، عصاره گوشت ۰/۵ g/l به عنوان منبع نیتروژن در غلظت صفر نمک با pH بهینه ۷ تا ۸ در غلظت نمک صفر با هوادهی ۱۲۰ rpm و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود.

استنتاج: با توجه به این که شرایط بهینه فعالیت آنزیمی باکتری MGMI مشابه با شرایط فیزیولوژیک بدن بوده، مطالعات بیش‌تر روی آنزیم تولید به دست آمده به منظور دستیابی به یک آسپاراژیناز موثر دارای اهمیت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ال-آسپاراژیناز، اثر ضد توموری، استافیلوکوکوس

مقدمه

آزادسازی آمونیاک به همراه اسید آمینه ال-آسپاراتات می‌شود. بنابراین سوسترای آنزیم ال-آسپاراژیناز اسید آمینه ال-آسپاراژین بوده و فعالیت هیدرولازی آن بستگی به وجود سوسترای آن در محیط می‌باشد. اختصاصی بودن فعالیت هیدرولازی ال-آسپاراژیناز سبب شده

آنزیم ال-آسپاراژیناز (L-asparagine amidohydrolase E.C.3.5.1.1) یکی از آنزیم‌های هیدرولازی بوده که از اهمیت ویژه‌ای در پزشکی برخوردار می‌باشد. این آنزیم با هیدرولیز پیوند آمیدی در ساختار اسید آمینه ال-آسپاراژیناز، سبب

E-mail: marzban86@gmail.com

مؤلف مسئول: عبدالرزاق مرزبان - مشهد: میدان آزادی، بلوار وکیل آباد، مجتمع دانشگاهی، دانشکده داروسازی

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، تهران، اوین

۲. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، تهران، اوین

۳. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات ایمونونئوتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۸/۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۹

جداسازی شده از میکروارگانیسم‌ها به خصوص باکتری‌ها، موثرتر از سایر ال-آسپاراژینازها بوده است (۹). میکروارگانیسم‌های تولیدکننده ال-آسپاراژیناز در طیف وسیعی از مناطق اکولوژیک یافت می‌شوند و در این رابطه باکتری‌های متعددی از آب و خاک جدا شده‌اند که فعالیت ال-آسپاراژینازی مطلوبی از خود نشان داده‌اند (۱۰-۱۳). با این وجود اکثریت ایزوآنزیم‌های شناخته شده دارای عوارض جانبی بوده که مهم‌ترین آن می‌توان به فعالیت گلوتامیناز ضعیف آن اشاره نمود (۱۴، ۱۵). فعالیت‌های غیر اختصاصی این آنزیم در بدن سبب ایجاد علائمی از قبیل سمیت عصبی، لخته شدن خون، هیپاتیت، واکنش‌های آلرژیک و آپاندیسیت می‌گردد (۱۶). موثرترین ایزوآنزیم‌های ال-آسپاراژیناز که امروزه به عنوان داروی ضدسرطان در دسترس بوده و به صورت تجاری تولید می‌شوند، از منابع میکروبی هم‌چون اشیشاکلی و اروینیا به دست آمده است (۱۷، ۱۸). این دو نوع آنزیم دارای خصوصیات تقریباً مشابه بوده ولی آنزیم تولیدی توسط اروینیا نیمه عمر کم‌تری نسبت به آنزیم تولیدی *E. coli* دارد. اگرچه این دو نوع آنزیم مورد تأیید سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) قرار گرفته است، ولی ممکن در افراد مختلف عوارض متفاوتی چون تب، راش‌های پوستی، واکنش‌های آلرژیک و شوک آنافیلاکسی را به دنبال داشته باشد (۲۱-۱۹). با توجه به این‌که آنزیم‌های موجود هم‌چنان دارای عوارض بوده و ایمنی آن‌ها صد در صد نیست، تحقیقات در زمینه یافتن ایزوآنزیم‌های ال-آسپاراژیناز که دارای عوارض کم‌تر باشند، ضرورت دارد. بنابراین تحقیق حاضر با هدف جداسازی یک باکتری که دارای فعالیت ال-آسپاراژینازی مطلوبی باشد، از بین چندین گونه مختلف باکتریایی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد و محیط کشت‌ها: مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق متعلق به شرکت Merck آلمان

است که این آنزیم به عنوان یک داروی با ارزش در درمان انواع لوسمی‌ها و سرطان‌های خون به ویژه لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL)، لنفوسارکوما و تومورهای وابسته به ال-آسپاراژین مورد استفاده قرار گیرد (۱). از آنجایی که در سلول‌های لنفوبلاستیک، بر خلاف سلول‌های طبیعی بدن، توانایی تولید ال-آسپاراژین بسیار پائین بوده و در اکثر رده‌های سلول سرطانی خون، تغییرات ژنتیکی سبب از دست رفتن کامل فرایند تولید این ال-آسپاراژین شده است، این سلول‌ها نیازمندی‌های خود را از طریق ال-آسپاراژین موجود در جریان خون تامین می‌کنند (۲). نقش آنزیم ال-آسپاراژیناز در حذف ال-آسپاراژین از خون برای اولین بار در سال ۱۹۲۲ توسط Clement بود (۳). در این تحقیق مشخص گردید که آنزیم ال-آسپاراژیناز موجود در سرم خوکچه هندی نقش اصلی را در فعالیت ضدتوموری به عهده دارد. Broome و همکارانش در سال ۱۹۶۱ برگشت لنفوسارکوما پیوندی در موش که با سرم خوک درمان شده بود را ناشی از تغذیه سلول‌های سرطانی از L-آسپاراژین بیرونی مربوط دانستند. این گزارش اولین بار بود که نقش آنزیم ال-آسپاراژیناز را به عنوان یک عامل ضد تومور مطرح می‌نمود (۴).

Tsuji و همکارانش در سال ۱۹۵۷ دامیداسیون ال-آسپاراژین توسط عصاره *E. coli* و آزادسازی آمونیم و آسپارتیک اسید را گزارش نمودند (۵). در ادامه تحقیقات Mashburn و Wriston (۱۹۶۳) توانستند آنزیم ال-آسپاراژیناز را از عصاره سلولی *E. coli* استخراج کنند و فعالیت ضد توموری آن را مشخص نمایند (۶). بنابراین اهمیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در شیمی درمانی به نقش آن در حذف یا کاهش ال-آسپاراژین از خون مربوط می‌شود که به تبع آن رشد سلول‌های سرطانی در غیاب ال-آسپاراژین با کاهش قابل ملاحظه‌ای همراه می‌باشد. تاکنون ایزوآنزیم‌های متفاوتی از ال-آسپاراژیناز با منشا گیاهی، یوکاریوتی و پروکاریوتی شناخته شده است (۷، ۸). با این حال ایزوآنزیم‌های

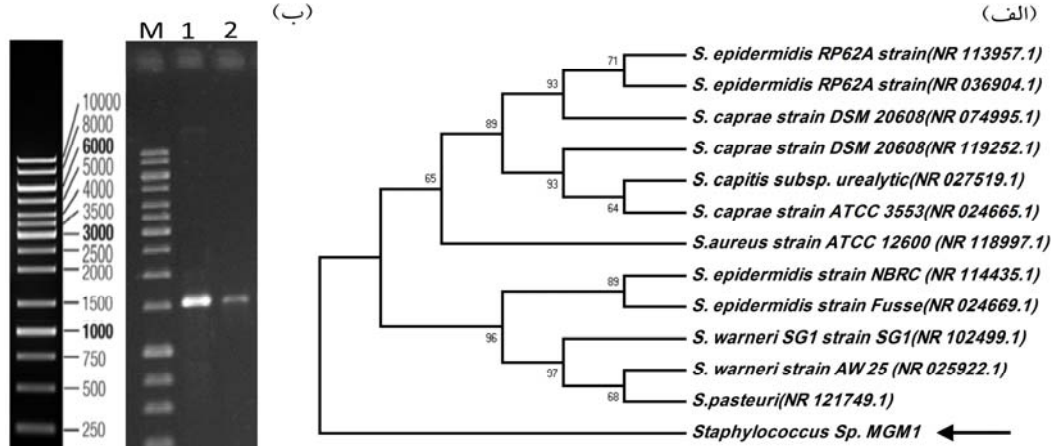
بود. به جز SIM که از شرکت Difco، TSI از شرکت Oxoid و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و $CuSO_4$ از شرکت RIEDEL-DEHAEN AG خریداری شدند. پرایمرهای استفاده شده در تکثیر قطعه ژن rDNA ۱۶S که شامل 20F و 1510R بودند، از شرکت پیشگام و مارکر وزن مولکولی هزار جفت‌بازی DNA از شرکت Fermentase تهیه شدند.

جمع‌آوری نمونه و جداسازی اولیه باکتری‌ها:
نمونه برداری از خاک کشاورزی در اطراف شهرستان قرچک واقع در استان تهران در مهرماه سال ۱۳۹۳ انجام شد. pH خاک مورد آزمایش برابر ۷ و شوری آن در حدود ۰/۰۱ درصد بود. نمونه‌ها توسط یک قاشق استریل از ۱۰ سانتی‌متری سطح خاک برداشته و در ظروف پلاستیکی استریل به آزمایشگاه انتقال یافت. بعد از انتقال نمونه به آزمایشگاه، یک گرم از خاک توزین و به ۹ ml سرم فیزیولوژی استریل افزوده شد. به منظور همگن شدن نمونه، مخلوط به مدت چند ساعت در دور rpm ۱۰۰ تکان داده شد. سپس مقدار ۱ ml از نمونه برداشته و داخل ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید، از محلول فوق رقت سریال تهیه شد و مقدار ۰/۱ ml از رقت‌های بالاتر به محیط نوترینت آگار انتقال داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ الی ۴۸ گرم‌گذاری شدند. بعد از این مدت از هر کدام از کلنی‌های تکلی، خالص‌سازی انجام شد. از هر کدام از کلنی‌های خالص روی محیط اختصاصی M9 آگار کشت خطی داده شد. غربالگری کیفی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم آل-آسپاراژیناز: به منظور جداسازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز، از محیط اختصاصی M9 با اصلاحاتی در فرمول آن استفاده شد. بدین صورت که ۱ گرم گلوکز، ۱۵ گرم آگار، ۰/۵ گرم آسپاراژین و ۰/۵ گرم پتاسیم هیدروژن فسفات به ۱ لیتر آب مقطر اضافه گردید. پس از اتوکلاو کردن محیط کشت، از استوک فنول رد استریل به اندازه‌ای اضافه شد تا رنگ محیط زرد گردید و سپس درون پلیت‌های ۶ سانتی‌متری

ریخته شد. برای تشخیص باکتری‌های تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز یک لوپ از هر کلنی بر روی پلیت به صورت نقطه‌ای گذاشته شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شدند. کلنی‌های دارای فعالیت آنزیم آسپاراژیناز با آزادسازی آمونیوم ناشی از هیدرولیز آسپاراژین باعث قلیایی شدن محیط شده و رنگ محیط از زرد به قرمز در اطراف کلنی باکتری تغییر می‌کند. در نهایت باکتری‌های دارای هاله صورتی تا قرمز به عنوان نتیجه مثبت انتخاب شدند و از بین آن‌ها یک کلنی که بیش‌ترین فعالیت را داشت، برای ادامه مطالعه انتخاب گردید (تصویر شماره ۱). شناسایی باکتری تولیدکننده آنزیم: شناسایی باکتری در ابتدا توسط مشاهده میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی سلول‌ها به همراه تست‌های بیوشیمیایی بر اساس کتاب باکتری شناسی برگتی انجام گرفت (۲۲). در تائید خصوصیات بیوشیمیایی و مشاهدات میکروسکوپی آنالیز فیلوژنی ژن rDNA ۱۶S انجام شد. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی با استفاده از کیت شرکت سیناژن استخراج شد. برای تکثیر قطعه ژن rDNA ۱۶S، از پرایمرهای یونیورسال و Forward: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و Reverse: 5'-TAAGGAGGTGATCCAGCC-3' برای انجام تکثیر DNA Sr ۱۶ از کیت PCR محصول شرکت فرمنتاز استفاده شد. برنامه تکثیر توسط دستگاه ترموسایکلر، بدین صورت بود که: واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴°C برای مدت ۵ دقیقه، مرحله تکثیر شامل: الف) واسرشت شدن: دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ب) اتصال پرایمرها: دمای ۵۶°C به مدت ۴۰ ثانیه، ج) طولیل شدن: دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد. محصول PCR ابتدا بر روی ژل مشخص (تصویر شماره ۱ ب) و سپس تعیین توالی توسط شرکت پیشگام انجام شد. توالی‌های Forward و Reverse پس از ویرایش توسط نرم‌افزار Bioedit 1.5 و Chromaspro 3.1 به صورت یک توالی کامل تهیه شد.

مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول رویی فاقد باکتری برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده گردید. فعالیت آنزیم بر اساس واکنش نسلریزاسیون اندازه گیری شد (۲۳). بدین صورت که مقدار ۰/۵ ml از سوپرناتانت با ۰/۵ ml آسپاراژین و ۰/۵ ml بافر فسفات ۰/۰۵ مولار ترکیب شد. سپس ترکیب به مدت ۲ ساعت در دمای 37°C گرماگذاری گردید. بعد از این مدت واکنش آنزیمی با افزودن ۰/۲ ml تری کلرواستیک (TCA) متوقف شد. در این مرحله آمونیم آزاد شده از فعالیت آنزیم آسپاراژیناز با افزودن ۰/۲ ml معرف نسلر و ۳ ml آب مقطر و قرار گرفتن نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه و سپس اندازه گیری جذب آن‌ها در طول موج ۴۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. پس از آن مقدار آمونیم از روی منحنی استاندارد تعیین گردید. برای تعیین مقدار فعالیت آنزیمی از واحد آنزیمی استفاده شد و یک واحد فعالیت آنزیمی بدین صورت تعریف شد که یک واحد آنزیمی برابر با مقداری از آنزیم است که $1\ \mu\text{mol}$ آمونیم را در مدت زمان یک دقیقه در دمای 37°C و در pH برابر ۸ تولید کند.

در نهایت توالی به دست آمده به کمک نرم افزار Blast در NCBI با باکتری‌های موجود در GenBank مقایسه شد و نزدیک‌ترین سویه‌های باکتریایی بر اساس توالی‌های rDNA S ۱۶ تعیین گردید. تولید آنزیم و سنجش فعالیت آنزیمی: سنجش فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در یک محیط مایع شبیه به M9 با اجزا و مقادیری شامل ۱ گرم گلوکز، ۰/۵۲ گرم کلسیم کربنات، ۰/۵۲ گرم منیزیم سولفات و ۱/۵۲ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات بود. برای درست کردن محیط از ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت استفاده گردید و پس از این که محیط کشت اتوکلاو شد، به هر ارلن ۰/۱ گرم آسپاراژین اضافه شد. قبل از اضافه کردن آسپاراژین استوک ساخته شده توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرون استریل شد. مقدار تلقیح به هر ارلن ۱ ml باکتری از کشت ۲۴ ساعته در نوترینت برات با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند با تعداد سلول 1.06×10^6 باکتری در میلی‌لیتر بود. پس از تلقیح و گرماگذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C مقدار ۲ ml از محیط کشت برداشته و با دور ۱۰۰۰۰ rpm برای



تصویر شماره ۱. الف) درختچه فیلوژنی رسم شده توسط نرم افزار Mega4 بر اساس روش neighbor-joining با هزار تکرار. اعداد ذکر شده در شاخه‌های درختچه نشان دهنده فاصله بر حسب تفاوت در نوکلئوتیدهای ژن DNA ۱۶S می‌باشد. ب) محصول PCR حاصل از تکثیر قطعه ژن rDNA ۱۶S بر روی ژل آگاروز به همراه مارکر مولکولی نشان دهنده اندازه توالی به دست آمده می‌باشد

بهینه سازی شرایط رشد باکتری و تولید آنزیم آسپاراژیناز:

انتخاب منبع کربن جهت بررسی رشد و تولید آنزیم

به منظور تعیین بهترین منبع کربن جهت رشد و تولید آنزیم، از محیط مایع مشابه با اجزای محیط اختصاصی M9 استفاده شد. شرایط کشت و گرماگذاری مشابه با آزمایش‌های ذکر شده قبلی بود که در ارلن‌های ۲۵۰ ml به مقدار ۱۰۰ ml از محیط کشت با پایه M9 حاوی ۱ درصد گلوکز، نشاسته، ساکارز، استات، سترات، ملاس و آب پنیر به عنوان منبع کربن و انرژی انجام گرفت. ارلن‌ها پس از تلقیح باکتری در شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ rpm و دمای °C ۳۵ برای مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. همه نمونه به صورت ۳ تکرار انجام گرفت و میانگین و انحراف معیار آن‌ها برای بررسی نتایج مورد استفاده قرار گرفت.

انتخاب منبع نیتروژن جهت بررسی رشد و تولید آنزیم

برای بررسی اثر منابع مختلف نیتروژن بر روی رشد و فعالیت آنزیم در محیط مایع M9 به مقدار ۰/۵ گرم در لیتر آمونیوم کلرید، اوره، پپتون، تریپتون، عصاره مخمر، عصاره مالت و عصاره گوشت اضافه شد. تمامی ارلن‌ها مطابق با قبل، تلقیح و گرماگذاری شدند و سپس میزان رشد و فعالیت آنزیمی هر کدام مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی رشد و تولید آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف نمک

برای تعیین بیش‌ترین رشد و تولید آنزیم در حضور نمک، از غلظت‌های مختلف نمک شامل بدون نمک، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد نمک کلرید سدیم استفاده شد. پس از ۷۲ ساعت، میزان رشد و فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد.

تعیین دامنه pH رشد و بررسی فعالیت آنزیمی

برای تعیین دامنه pH رشد و تولید آنزیم توسط باکتری مورد نظر، مطابق با آزمایش‌های قبلی، درون ارلن‌های ۲۵۰ ml حاوی ۱۰۰ ml محیط پایه M9 که pH اولیه آن‌ها از ۴ تا ۹ تنظیم شده بود، آزمایش‌ها انجام

گرفت. برای اندازه‌گیری رشد و فعالیت آنزیمی، پس از نمونه‌برداری، pH همه نمونه‌ها روی ۷ تنظیم شد و سپس سنجش فعالیت آنزیمی صورت گرفت.

تعیین میزان هوادهی بر رشد و فعالیت آنزیمی

میزان هوادهی و اثر آن بر روی رشد و تولید آنزیم توسط باکتری با قرار گرفتن ارلن‌های حاوی ۱۰۰ ml محیط کشت پایه در انکوباتور با دورهای ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰ دور در دقیقه (rpm) و یک ارلن ثابت انجام گرفت.

تعیین دامنه دمایی رشد و بررسی فعالیت آنزیمی

به منظور تعیین دامنه دمایی رشد باکتری و اندازه‌گیری فعالیت در محیط مایع با پایه M9، میزان رشد و فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف از ۴ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

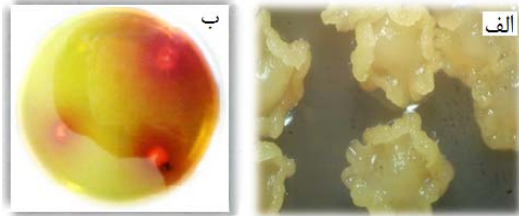
تجزیه و تحلیل آماری

برای اطمینان از نتایج حاصل از آزمایشات، سه تکرار از هر آزمایش انجام شد و میانگین و انحراف معیار (standard deviation) آن‌ها محاسبه و به عنوان نتیجه ثبت شد. برای مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی، از تحلیل واریانس یک طرفه و معنی‌دار بودن اختلاف‌ها بین آزمایشات، از آزمون تی در سطح $p < 0/05$ استفاده شد. این محاسبات با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism 5 انجام گرفت.

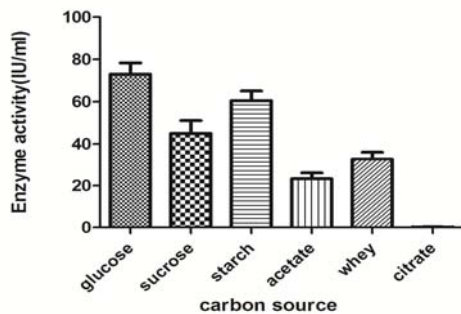
یافته‌ها

در مرحله اول جداسازی باکتری‌ها، تعداد ۷۵ کلونی مختلف از نمونه‌های خاک بر روی پلیت‌های نوترینت آگار جداسازی و خالص گردید. پس از آن غربالگری کلونی‌های تولیدکننده ال-آسپاراژیناز انجام شد که منجر به جداسازی ۴ کلونی شد. از این ۴ کلونی، یکی از آن‌ها که بیش‌ترین فعالیت آنزیمی را بر حسب ایجاد هاله صورتی - قرمز در اطراف آن نشان داد، جهت ادامه مطالعه انتخاب شد.

درصد فاصله اطمینان بود، به جز استات و آب پنیر که اختلاف معنی دار نبود (نمودار شماره ۱).



تصویر شماره ۲: شکل ظاهری کلونی باکتری منتخب- الف) روی نورترینت آگار و ب) بر روی محیط کشت اختصاصی اسپاراژیناز



نمودار شماره ۱: فعالیت آنزیم در حضور منابع کربن مختلف در محیط کشت M9 با دور شیکر ۱۲۰ rpm و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد

جدول شماره ۱: خصوصیات بیوشیمیایی و مشاهدات میکروسکوپی باکتری منتخب

Staphylococcus sp. MGM1	Staphylococcus pasteurii	Staphylococcus warneri	خصوصیات ظاهری و متابولیکی
محدب، با حاشیه برآمده، کرم رنگ، دارای لعاب	کلی چسبناک، بالا آمده، نرم، براق، مات	کلی چسبناک، بالا آمده، نرم، براق، مات	مورفولوژی کلی
کوکسی	کوکسی	کوکسی	شکل میکروسکوپی
مثبت	مثبت	مثبت	گرم
منفی	منفی	منفی	اسپور
مثبت	مثبت	مثبت	کاتالاز
منفی	منفی	منفی	اکسیداز
منفی	منفی	منفی	حرکت
منفی	مثبت	مثبت	رشد در شرایط بی هوازی
مثبت	-	-	مصرف نشاسته
مثبت	منفی	منفی	هیدرولیز زلاتین
مثبت	مثبت	مثبت	تست لیاز
مثبت	ضعیف	ضعیف	همولیز
-	منفی	منفی	کواگولاز
مثبت	متغیر	ضعیف	احیای نترات به نیتريت
مثبت	مثبت	مثبت	هیدرولیز اوره
-	مثبت	مثبت	گلوکوزیلاز
-	منفی	منفی	هیدرولیز کازئین
مثبت (۲-۱۵٪)	مثبت	مثبت	رشد در ۱۰-۱۵ درصد نمک
مثبت	-	-	رشد در ۴-۴۰ درجه

آنالیز فیلوژنی باکتری و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و ظاهری باکتری منتخب

بر طبق آنالیز فیلوژنی ژن rDNA ۱۶S، مشخص گردید که باکتری منتخب با ۹۷ درصد شباهت به جنس استافیلوکوکوس تعلق دارد. بر همین اساس این سویه به نام استافیلوکوکوس MGM1 نام گذاری گردید. درختچه فیلوژنی باکتری مورد نظر با سویه‌هایی که در پایگاه ژنی NCBI توسط نرم افزار Mega4 رسم گردید، نشان دهنده قرابت این سویه از استافیلوکوکوس با سویه‌های ثبت شده در NCBI می‌باشد (تصویر شماره ۱ الف).

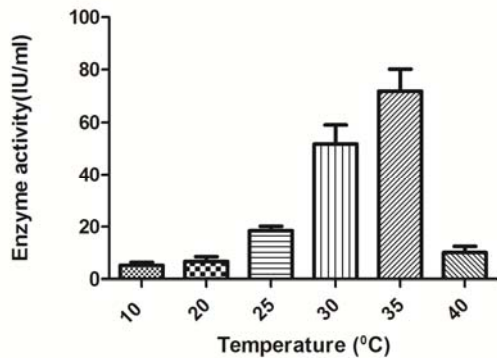
خصوصیات ظاهری کلونی و مشاهده میکروسکوپی سویه MGM1 در تصویر شماره ۲ شماره ۲ قابل مشاهده است. همان گونه که می‌بینید کلنی باکتری به رنگ کرم، برآمده، حاشیه‌دار، دارای لعاب و قوام بوده که روی محیط اختصاصی M9 شیری مایل به زرد بود. علاوه بر این، خصوصیات بیوشیمیایی سویه MGM1 به‌طور کامل در جدول شماره ۱ آورده شده است. همان گونه که در جدول مذکور مشاهده می‌شود، تفاوت‌ها و شباهت‌های ظاهری و متابولیکی باکتری مورد نظر با دو سویه از استافیلوکوکوس که بیش‌ترین شباهت را از نظر فیلوژنی داشتند، دیده می‌شود. خصوصیات متابولیکی و ظاهری دو سویه که با باکتری مقایسه شده است، از کتاب باکتری‌شناسی برگئی استخراج گردید (۲۲).

تعیین شرایط بهینه تولید آنزیم توسط سویه MGM1

انتخاب منبع کربن جهت بررسی تولید آنزیم

باکتری MGM1 بر روی محیط پایه معدنی حاوی منابع مختلف کربن کشت داده شد که در تمامی محیط‌ها، باکتری قادر به رشد بود و فعالیت آنزیمی داشت، اما در محیط حاوی گلوکز و بعد از آن نشاسته، بیش‌ترین فعالیت آنزیمی مشاهده شد، در صورتی که کم‌ترین فعالیت در حضور سیترات به دست آمد. با این وجود تحلیل آماری نتایج این آزمایش نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف بین همه منابع کربن در حد ۹۵

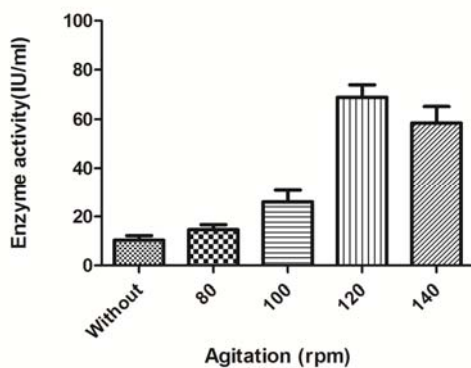
کم و فعالیت آنزیمی آن نیز بسیار ضعیف بود. تحلیل آماری نتایج نیز نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی گراد با سایر دماها بود (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: فعالیت آنزیمی باکتری در دماهای مختلف در محیط کشت M9 با دور شیکر ۱۲۰ rpm و با منابع کربن ۱ درصد گلوکز

تاثیر هوادهی بر روی رشد و فعالیت آنزیمی

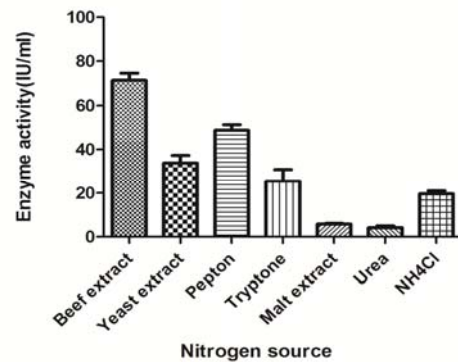
برای بررسی تاثیر هوادهی، باکتری MGM1 در محیط حاوی گلوکز و beef extract و دمای ۳۵ °C در دور شیکرهای ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دور در دقیقه (rpm) و بدون شیک کشت داده شد. نتایج نشان داد که بهترین هوادهی که منجر به بیشترین فعالیت آنزیمی و هم چنین رشد باکتری شد، میزان تکان دهی با دور شیکر ۱۲۰ بود. با این وجود بررسی های آماری، تفاوت معنی داری بین هوادهی ۱۰۰ و ۱۴۰ را نشان نداد (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: اثر میزان هوادهی بر فعالیت آنزیمی در محیط کشت M9 با ۱ درصد گلوکز به عنوان منبع کربن و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد

تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر روی فعالیت آنزیمی

در میان منابع مختلف، عصاره گوشت (beef extract) بیشترین تاثیر را بر روی فعالیت آنزیمی داشت. پس از آن، به ترتیب پپتون، عصاره مخمر و تریپتون بیشترین فعالیت آنزیمی داشتند. در محیط حاوی اوره و NH_4Cl ، رشد باکتری خوب بود، ولی فعالیت آنزیمی در مقایسه با سایر منابع بسیار کم تر بود. در این آزمایش، تفاوت معنی داری بین beef extract و سایر منبع دیده شد، اما تفاوت معنی دار بین تریپتون- آمونوم کلراید و عصاره مالت- اوره دیده نشد. نتایج حاصل در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۲: اثر منابع نیتروژن مختلف بر فعالیت آنزیمی در محیط کشت M9 با دور شیکر ۱۲۰ rpm و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد

اثر دما بر روی فعالیت آنزیمی

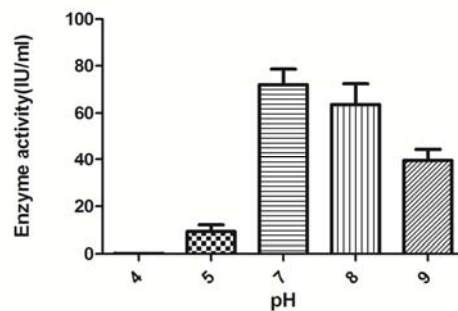
ارزیابی فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف در حضور گلوکز و beef extract به عنوان منبع کربن و نیتروژن صورت گرفت. به طور کلی فعالیت آنزیمی و رشد باکتری در دماهای ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد نشان داد که باکتری MGM1 در دماهای ۳۵ درجه سانتی گراد بیشترین فعالیت آنزیمی را داشت. پس از بیشترین فعالیت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به دست آمد. در واقع نتایج نشان‌دهنده این نکته بود که بهترین شرایط رشد و تولید آنزیم محدوده دمایی ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی گراد می باشد. با این وجود باکتری در دماهای ۱۰ و ۴۰ درجه سانتی گراد قادر به رشد

بحث

باکتری جداسازی شده در این مطالعه از جنس *استافیلوکوکوس* بود که از نظر خصوصیات بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفت. با این وجود مطالعات فیلوژنی شباهت این باکتری را در حدود ۹۷ درصد با *استافیلوکوکوس وارنری* و *استافیلوکوکوس پاستوری* نشان داد. همان طور که در گزارشات ذکر شده است، برای مشخص نمودن سویه یک باکتری، باید شباهت بالای ۹۸ درصد به دست آید، در غیر این صورت احتمال این که باکتری مورد نظر یک سویه جدید باشد، افزایش می یابد. این نکته از این نظر حائز اهمیت است که اگر باکتری مورد نظر سویه جدیدی از *استافیلوکوکوس* باشد، احتمال این که آنزیمی با خصوصیات متفاوت تولید نماید را افزایش می دهد، هر چند که اثبات جدید بودن باکتری MGMI نیازمند انجام مطالعات مولکولی دقیق تر و جزئی تر می باشد. همان طور که ذکر شد، باکتری MGMI، یک باکتری گرم مثبت از جنس *استافیلوکوکوس* می باشد که از خاک های کشاورزی جداسازی شد و آنزیم ال-آسپاراژیناز آن مورد بررسی قرار گرفت. با مقایسه خصوصیات آنزیم ال-آسپاراژیناز تولید شده توسط باکتری تحت مطالعه با گزارش هایی که تاکنون منتشر شده است، مشخص گردید که آنزیم به دست آمده از این باکتری در برخی از خصوصیات، متفاوت از ایزوآنزیم های گزارش ها می باشد. در یک مطالعه که روی *استافیلوکوکوس کاپتیس* انجام شد، فعالیت آسپاراژینازی این باکتری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و pH برابر با ۶/۵ گزارش شد. در این رابطه یک سویه *استافیلوکوکوس* به نام *Staphylococcus sp. OJ82* توسط Han و همکارانش در سال ۲۰۱۴ شناسایی شده است که شرایط بهینه فعالیت ال-آسپاراژیناز آن در دمای ۳۷ تا ۵۰ درجه سانتی گراد و pH آن در محدوده ۸ تا ۹ می باشد. این باکتری که از غذاهای دریایی جداسازی شده است، از نظر شرایط تولید آنزیم مشابهت زیادی با باکتری جداسازی شده در این مطالعه

تأثیر pH اولیه محیط بر رشد و تولید آنزیم

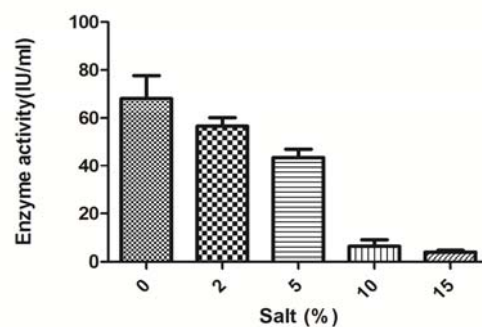
نتایج نشان داد که بهترین شرایط برای رشد باکتری، در محدوده خنثی بود که مقدار رشد باکتری در تصویر نشان داده نشده است. با این وجود بیش ترین فعالیت آنزیمی، در pH برابر با ۸ بود؛ اگرچه از نظر آماری تفاوت معنی داری به دست نیامد (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵: تأثیر pH بر روی تولید آنزیم توسط باکتری MGMI در محیط کشت M9 با ۱ درصد گلوکز به عنوان منبع کربن و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد با دور شیکر ۱۲۰ rpm

تأثیر غلظت های مختلف نمک بر روی تولید آنزیم

باکتری MGMI در محیط بدون نمک، بیش ترین فعالیت آنزیمی را از خود نشان داد. این ترتیب برای رشد باکتری نیز وجود داشت که در این جا نشان داده نشده است. آنالیز آماری نیز نشان داد که تفاوت معنی داری بین صفر و ۲ درصد وجود ندارد، در حالی که فعالیت آنزیم در صفر و ۲ درصد با ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد معنادار بودند (نمودار شماره ۶).



نمودار شماره ۶: اثر غلظت های مختلف نمک بر روی فعالیت آنزیم در محیط کشت M9 با ۱ درصد گلوکز به عنوان منبع کربن و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد با دور شیکر ۱۲۰ rpm

بدن، ممکن است در بدن تحت تاثیر شرایط خون قرار نگیرد و قادر به حفظ فعالیت آنزیمی باشد.

با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه و بررسی فعالیت آنزیمی باکتری در مقایسه با تحقیقات مشابه، می توان امیدوار بود که آنزیم ال-آسپاراژیناز تولید شده توسط باکتری مورد نظر، یک ایزوآنزیم با خصوصیات متفاوت باشد که بایستی تحقیقات گسترده تری روی آن انجام گیرد. در خصوص باکتری MGM1، به نظر می رسد این باکتری یک سویه جدید از استافیلوکوکوس بوده که نیاز به مطالعات تکمیلی برای شناسایی دقیق آن می باشد. این موضوع از این نظر دارای اهمیت است که شناسایی دقیق منشا تولیدکننده آنزیم، کمک زیادی به تحقیق و آنالیز آنزیم تولید شده توسط باکتری مورد نظر می نماید.

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی بوده که در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی انجام شده است. نویسندگان مقاله از مسئولین محترم دانشکده علوم زیستی به ویژه جناب آقای دکتر جواد فخاری و دانشجویان کارشناسی ارشد و دکترای میکروبیولوژی که در این تحقیق لطف زیادی به ما نمودند، کمال تشکر و سپاس را داریم.

References

1. Ramya LN, Doble M, Rekha VPB, Pulicherla KK. L-Asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia. Appl Biochem Biotechnol 2012; 167(8): 2144-2159.
2. Pradhan B, Dash SK, Sahoo S. Screening and characterization of extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha,

دارد(۲۴). در مطالعه دیگری که توسط Prakasham و همکارانش در سال ۲۰۰۶ انجام شد، بهترین شرایط تولید آسپاراژیناز را برای *Staphylococcus sp. 6A* در دمای ۳۹°C و pH برابر ۷/۵ در حدود ۵۴ IU/ml به دست آورد(۲۵). با این وجود، نتایجی که از این مقایسه ها به دست می آید حاکی از آن است که باکتری MGM1 از نظر خصوصیات متابولیسمی و منشا جداسازی، متفاوت با استافیلوکوکوس های گزارش شده قبلی، بوده و از نظر برخی از خصوصیات آنزیم آسپاراژینازی نیز دارای تفاوت های آشکاری می باشد. برای مثال آنزیم به دست آمده در این تحقیق، دارای فعالیت کم تری نسبت به آسپاراژیناز سویه OJ82 می باشد، که طبق گزارش های انجام گرفته، فعالیت آنزیمی بالا، دلیل بر مناسب بودن آنزیم برای استفاده دارویی نمی باشد، بلکه خصوصیتی مانند حفظ فعالیت ال-آسپاراژینازی در شرایط فیزیولوژیک خون مانند pH و اسمولاریته نقش بسیار مهمی در این مورد دارد(۲۶-۲۹،۱۸) نکته مهم دیگر نیز عوارض جانبی آنزیم بوده که در مورد آنزیم هایی که هم اکنون نیز به عنوان دارو استفاده می شوند، وجود دارد. بنابراین آنزیم به دست آمده از باکتری MGM1 اگرچه دارای فعالیت کم تری در مقایسه با آنزیم های باکتریایی دیگر دارد، ولی به دلیل داشتن شرایط بهینه نزدیک به شرایط فیزیولوژیک

- India. Asian Pacific J Trop Biomed 2013; 3(12): 936-941.
3. Kidd JG. Asparaginase and cancer—yesterday and today. in: Experimental and Clinical Effects of L-Asparaginase, Grundmann E, Oettgen HF(ed), Berlin, Springer, 1970: 3-14.
4. Broome J. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. J Exp Med. 1963;118:99-120.

5. Whelan HA, Wriston Jr JC. Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli* B. *Biochemistry* 1969; 8(6): 2386-2393.
6. Mashburn LT, Wriston JC. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase. *Biochem Bioph Res Co* 1963; 12(1): 50-55.
7. El Shora HE, Ali AS. Enhancement the Activity of L-asparaginase and Antioxidant Enzymes in *Cicer arietium* L Cotyledons under Stress Conditions. *Int J Agron Plant Prod* 2013; 4: 3724-3735.
8. War Nongkhlaw FM, Joshi SR. L-Asparaginase and antioxidant activity of endophytic bacteria associated with ethnomedicinal plants. *Indian J Biotechnol* 2015; 15(1): 59-64.
9. Shukla D, Shrivastav VK, Jana A, Shrivastav A. Exploration of the potential L-asparaginase producing bacteria from the soil of Gwalior (India). *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2014; 3(5): 665-672.
10. Sherifah MW, Adesewa AA. Screening, Production and Optimization of L-Asparaginase From Soil Bacteria Isolated in Ibadan, South-western Nigeria. *J Basic Appl Sci* 2015; 11: 39-51.
11. Shrivastava A, Khan AA, Jain SK, Singhal PK. Bacterial asparaginase: A potential antineoplastic agent for treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Bacteria and Cancer*. London-Springer, 2014.
12. Bhat MR, Badi RB, Dubey SD, Chande AC. L-asparaginase producing *gordonia terrae* from lonar lake. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2014; 5(4): 848-854.
13. Yazdani R, Mobini-Dehkordi M, Rastegari AA. Isolation and identification of native Iranian L-asparaginase producing bacteria. *Journal of Microbial World* 2012; 5(1&2): 36-39 (Persian).
14. Mahajan RV, Saran S, Kameswaran K, Kumar 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.
15. Sharma A, Husain I, Mishra S. Evaluation of antitumor activity of glutaminase free L-asparaginase from indigenous bacterial strains for potential chemotherapeutic application. *Int J Pharma Bio Sci* 2014; 5(2): 16-26.
16. Pourhossein M, Korbekandi H. Cloning, expression, purification and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli*. *Adv Biomed Res* 2014; 3: 82.
17. Ghasemi Y, Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Zarrini G, et al. An optimized medium for screening of L-asparaginase production by *Escherichia coli*. *American J Biochem Biotechnol* 2008; 4(4): 422-424.
18. Verma N, Kumar K, Kaur G, Anand S. L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. *Crit Rev Biotechnol* 2007; 27(1): 45-62.
19. D'Iakov IN, Pokrovskii VS, Sannikova EP, Bulushova NV, Pokrovskaja MV, Aleksandrova SS. Cross-immunogenicity of various bacterial L-asparaginases. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2014; 6: 100-104.
20. Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH. L-asparaginase and PEG asparaginase-past, present, and future. *Leuk Lymphoma* 1993; 10(S1): 153-157.
21. Bisht SS, Praveen B, Panda A, Panda K, et al. Isolation, purification & characterization of asparaginase from *Escherichia coli*. *Int J Pharma Bio Sci* 2011; 2(4): 174-179.
22. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of*

-
- Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
23. Gulati R, Saxena R, Gupta R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24(1): 23-26.
24. Han SW, Jung J, Park WJ. Biochemical Characterization of L-Asparaginase in NaCl-Tolerant *Staphylococcus* sp. OJ82 Isolated from Fermented Seafood. *J Microbiol Biotechnol* 2014; 24(8): 1096-1104.
25. Prakasham RS, Rao CS, Rao RS, Lakshmi GS, Sarma PN. L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp. -6A: Design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. *J Appl Microbiol* 2007; 102(5): 1382-1391.
26. Howard JB, Carpenter FH. L-asparaginase from *Erwinia carotovora* substrate specificity and enzymatic properties. *J Biol Chem* 1972; 247(4): 1020-1030.
27. 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.
28. Graham ML. Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv Drug Delivery Rev* 2003; 55(10): 1293-1302.
29. Savitri AN, Azmi W. Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. *IJBT* 2003; 2(2): 184-194.

Archive of SID