مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم شماره سی و یکم - تابستان ۱۳۹۷

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

شناسایی اکسترموفیل‌های تولیدکننده آنزیم‌های ضدسرطان ال-گلوتامیناز و ال-آسپاراژیناز از چشمه آبگرم لاریجان

الهام نورمحمدی[۱]، مهناز فرهمند[۱*]، احمدرضا اسماعیلی رستاقی[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران
۲. بخش انگل شناسی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: فراوان ترین منابع برای به دست آوردن آنزیم ها با قابلیت پایداری بیش‌تر، باکتری‌های ترموفیل هستند. در سال‌های اخیر ال- آسپاراژیناز میکروبی به‌طور گسترده‌ای در درمان سرطان های انسانی مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه به‌دلیل کاربرد زیاد ال-گلوتامیناز در صنعت پزشکی از آن در درمان لوسمی حاد لنفوبلاستی و بیماری ایدز استفاده می‌گردد. هدف مطالعه حاضر، غربالگری سویه‌های ترموفیل جدید با قابلیت تولید آنزیم‌های ال- گلوتامیناز وال- آسپاراژیناز بود.

مواد و روش‌ها: چشمه آبگرم لاریجان به عنوان محل جداسازی باکتری های ترموفیل انتخاب شد. کشت و تست‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، انجام شد. تمام سویه‌های باکتریایی به‌منظور بررسی فعالیت آنزیمی ال- آسپاراژیناز و ال- گلوتامیناز به‌وسیله روش (RPA) غربالگری شدند. محیط M9 اصلاح شده حاوی ال- آ سپاراژین و ال- گ لوتامین و فنل رد به عنوان معرف استفاده شدند. سویه‌های باکتریایی به‌وسیله تعیین سکانس ژن 6RrRNA بعد از PCR شناسایی شدند.

یافته‌ها: در مجموع ۶ سویه ترموفیل از چشمه آبگرم لاریجان جداسازی شدن aد که متعلق به گونه باسیلوس لیکنی فورمیس بودند. فعالیت ال- آسپاراژیناز در سویه‌های LT -5 ,LT-4 ,LT-3 ,LT-2,LT-1 مشاهده شد. فعالیت ال-گلوتامینازی به وسیله باسیلوس لیکنیفورمیس سویه‌هایLT-5,LT-6 ,LT-3 ,LT-1 تولید شد. سه سویه ترموفیل LT-1,LT-3,LT-5 باقابلیت تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز وال- گلوتامیناز با موفقیت جداسازی شدند.

نتیجه‌گیری: چشمه آبگرم لاریجان یکی از منابع با پتانسیل بالای محصول‌های مفید میکروبی است که می‌تواند به‌عنوان یک منبع مفید محصول‌های متعدد بیولوژیکی همانند آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی:باکتری‌های ترموفیل، ال- گلوتامیناز، ال-آسپاراژیناز، عامل ضدسرطان.

مقدمه

چشمه های آبگرم بی شماری در ایران وجود دارند. هر یک از این چشمه‌های آبگرم به‌نوبه خود دارای خواص درمانی هستند. به‌طور نمونه، چشمه آبگرم لاریجان که در این تحقیق مورد بررسی قرارگرفته است ، به‌عنوان درمان با آب شناخته شده که برای درمان بیماری‌هایی مانند : ورم مفاصل، انقباض‌های عضلانی، آنفلوانزا، مشکل‌های سیستم تنفسی، روماتیسم، مشکل‌های گردش خون و بیماری‌های پوستی مورد استفاده قرارمی گیرد (۲،۱). اکسترموفیل ها میکروارگانیسم هایی هستند که در شرایط بسیار سخت رشد می‌کنند و آنزیم‌های آن‌ها اکسترموزیم نامیده می‌شوند. یکی از مهم‌ترین و قابلیت اکسترموفیل‌ها باکتری‌های ترموفیل هستند (۶). باکتری‌های ترموفیل بهترین منبع جداسازی برای آنزیم‌های مقاوم به حرارت هستند. علاوه بر دمای بالا آن ها در شرایط اسیدی یا بازی شدید هم مقاومند و همین ویژگی‌ها سبب شده مورد توجه بسیاری از صنایع قرار گیرند (۲۲). بررسی اهمیت آنزیم ال-گلوتامیناز در سال ۱۹۵۶ آغاز شد. ال- گلوتامیناز یک

نویسنده مسئول:
گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران
آدرس الکترونیکی: farahmand90@yahoo.com
تاریخ دریافت :۱۳۹۶/۹/۲۱
تاریخ پذیرش :۱۳۹۶/۱۰/۲

Archive of SID
www.SID.ir

آنزیم آمیدوهیدرولاز است که نقش مهمی در متابولیسم نیتروژن در سلول‌های زنده ایفا می‌کند. از آنجایی‌که این آنزیم باعث حذف گلوتامین در سلول‌های بدخیم می‌گردد موجب تخریب سلول‌های تومور وابسته به گلوتامین می‌شود (۹،۷). آنزیم ال-گلوتامیناز امروزه به‌عنوان یک آنزیم درمانی شناخته شده است. ال- گلوتامیناز فعالیت ضدسرطانی بالقوه‌ای دارد و هم‌چنین گلوتامین را به اسید گلوتامیک و آمونیاک تجزیه می-کند (۱۹). میکروارگانیسم‌های مختلفی مانند باکتری‌ها، مخمرها، کپک‌ها و قارچ‌های رشته‌ای قادر به تولید ال-گلوتامیناز است. ال-گلوتامیناز در کاربردهای بالینی، درمان بیماری ایدز و در صنایع غذایی اهمیت بسیاری دارد (۱۲).

ال- آسپاراژیناز آنزیمی است که در طبیعت توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌گردد و اسیدآمینه ال-آسپاراژین را به دو جزء آسپارتیک‌اسید و آمونیاک را می‌شکند. این اسیدآمینه برای حیات سلول ضروری است. آنزیم ال-آسپاراژیناز یک آنزیم آمیدو هیدرولازی است که تجزیه پیوند N گلیکوساکاریدهای گلیکو پروتئین‌هارا کاتالیز می‌کند که توسط ژن AGA کد می‌شود (۳). ال- آسپاراژیناز یک عامل مهم شیمی درمانی برای بسیاری از بیماری‌های سیستم لنفاوی و لنفوم مانند لوسمی لنفوبلاستیک حاد استفاده می‌شود (۵). فعالیت آنزیم ال- آسپاراژیناز اولین بار در سال ۱۹۰۴توسط لانگ Long گزارش شد. بعد از گذشت چند سال ریستون و همکارش مشاهده کردند که آسپاراژیناز خالص شده از عصاره سلولی مانند سرم خوکچه هندی فعالیت ضد توموری دارد و امروزه به‌عنوان یکی از عوامل ضدسرطانی مورد توجه قرار گرفته و استفاده می‌شود (۴). میکرو ارگانیسم‌هایی مانند: آئروباکتر[۱]، سودوموناس[۲]، فوتوباکتریوم[۳]، زانتوموناس[۴]، استرپتومایسس[۵]، پروتئوس[۶]، آسپرژیلوس[۷] توانایی تولید آنزیم ال - آسپاراژیناز را دارا هستند (۱۵).

هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی گونه‌های اکسترموفیل تولیدکننده آنزیم ال-گلوتامیناز وآنزیم ال-آسپاراژیناز از چشمه آبگرم لاریجان است. ال- گلوتامیناز در ترکیب یا به‌عنوان یک جایگزین برای ال آسپاراژیناز می‌تواند در درمان آنزیم برای سرطان به‌خصوص لوسمی لنفوبلاستی حاد اهمیت داشته باشد. ضرورت انجام این تحقیق در تلاش هر چه بیش‌تر برای یافتن گونه‌هایی از باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز و ال -گلوتامیناز بوده است که نسبت به گونه-های مشابه و دیگر منابع موجود دارای ویژگی‌های سرولوژیکی بهتر بوده و دارای عوارض کم‌تر باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در مورخ ۱۳۹۵/۸/۲۳ از چشمه آبگرم لاریجان (رینه) ساعت ۸ صبح نمونه‌برداری صورت گرفت. در این نمونه که شامل رسوبات و املاح همراه با آب بود درون فلاسک ریخته شد تا دمای آب که ۶۵ درجه سانتی‌گراد است کاهش نیابد سپس به آزمایشگاه منتقل گردید. مقدار cc ۱۰ از آب چشمه با ۳۰۰۰rmp دور به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

بعداز مرحله سانتریفیوژ برای رقت سازی (محیط کشت مایع)که به‌عنوان بانکی از نمونه باشد از دو محیط (Merck) NutrientAgar و (Merck) Nutrient Broth استفاده شد.

جداسازی باکتری‌های ترموفیل: رسوب ته لوله به‌وسیله سوآپ روی پلیت‌هایی که حاوی سی واترآگار بودند Seawater (Merck) Agar، به‌صورت خطی پر و زیگزاگ کشت داده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ -۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. به‌منظورخالص‌سازی کلونی‌ها کشت چهار مرحله‌ای یا خطی انجام شد و بارها تکرار گردید تا تک کلونی‌ها حاصل شدند.

غربالگری باکتری‌های ترموفیل تولید کننده آنزیم ال – آسپاراژیناز: فعالیت ال- آسپاراژینازی کلونی‌های جدا شده با استفاده از محیط کشت اختصاصی M9 حاوی ۱۰ گرم آسپاراژین (Merck) ، آگار ۲۰ گرم (سیناژن)، ۷۵ KH_2PO_4 ۰/ گرم (Merck) ، ۲ میلی‌لیتر $MgSo_4.7H_2O$ (1mol/L) (Merck) ، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، ۶ گرم $Na_2HPo_4 \cdot 2H_2O$ ۰/۰۲۵Phenol red ، (Merck) (Merck) ، ۱۰ میلی‌لیتر مالتوز ۲۰٪ (Merck) ، (L / ۱(۰/۱ mol $CaCl_2.2H_{2o}$ میلی‌لیتر (Merck) انجام شد. از نمونه‌های کلونی که در سی واترآگار به‌دست آمده بودند روی این محیط کشت داده شد که در دمای مناسب ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند شاخص رنگ دور کلونی باکتری بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت تغییر رنگ می‌دهد. سویه‌های ترموفیل حاوی فعالیت ال-آسپاراژینازی با ترشح آنزیم ال - آسپاراژیناز ، ال-آسپاراژین موجود در محیط کشت را به آمونیاک و ال-

Archive of SID

www.SID.ir

آسپارتات تجزیه کرده و در نتیجه اطراف کلونی به‌دلیل تغییر PH محیط و حضور معرف فنول رد هاله صورتی رنگ ایجاد شد.

غربالگری باکتری‌های ترموفیل تولیدکننده آنزیم ال-گلوتامیناز: فعالیت ال-گلوتامیناری کلونی‌های جدا شده با استفاده از محیط کشت اختصاصی M9 حاوی ۵ گرم گلوتامین (Merck)، آگار۲۰ گرم (سیناژن)، KH_2PO_4 ۱ گرم (Merck)، $MgSo_4.7H_2o$ ۰/۵ گرم (Merck)، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، Nacl ۵ /۰ گرم (Merck) ، Phenol red۲٪/۵(Merck) KCL، (Merck) ۵ /۰گرم در لیتر سنجیده شد.

از نمونه‌های کلونی که در سی واتر آگار به‌دست آمده بود روی این محیط، کشت داده شد که در دمای مناسب ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

شاخص رنگ دورکلونی باکتری بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت تغییر رنگ می‌دهد. فعالیت گلوتامینازی دراین تحقیق به‌وسیله ناحیه صورتی رنگ اطراف کلونی‌ها مشخص شد.

شناسایی مقدماتی باکتری‌های ترموفیل: به کمک تست‌های بیوشیمیایی شامل: MRVP (Merck)، SIM (Merck)، TSI (Merck)، حرکت و احیای سیترات شناسایی مقدماتی انجام گرفت.

شناسایی تکمیلی باکتری‌های: شناسایی تکمیلی سویه‌های جداشده از آب و رسوبات چشمه آبگرم ازطریق آنالیز ژن 16SrRNA انجام شد.

برای این منظور تکثیر قطعه ۱۵۰۰جفت بازی مربوط به ژن 16SrRNA با استفاده از تکنیک PCR انجام شد.

استخراج DNA از سویه‌های ترموفیل: برای استخراج DNA از نمونه‌ها ازکیت مخصوص باکتری‌های گرم مثبت و کیت مخصوص باکتری‌های گرم منفی شرکت سیناکلون استفاده شد. باتوجه به دستورالعمل شرکت سازنده کیت،DNA باکتری‌ها استخراج شدند پس از استخراج، نمونه DNAهای استخراج شده برای آزمون PCR استفاده شدند.

واکنش PCR: شناسایی تکمیلی باکتری‌ها به‌وسیله آنالیز ژن 16SrRNA انجام شد. برای انجام آزمون PCR، ابتدا پرایمرهای یونیور سال Universal Primers ازشرکت سیناکلون تهیه شد (۲۰).

جدول (۱-۱)خصوصیت‌های پرایمرهای به‌کار رفته در این پژوهش

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Praimer Neam	Seq.(5-3)	MW	OD (1000µl)	nmol	Water/tube (µl)	TM	GC %	Mer
16S - F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	6148	4	21.47	214.70	57.30	50	20
16S - R	GGTTACCTTGTTACGACTT	5785	4	22.82	228.19	52.35	42	19

مراحل دمایی واکنش PCR بدین شکل انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام پذیرفت.

محصول‌های PCR پس از آنالیز کیفی درژل آگارز (سیناژن) و اطمینان از حضور محصول PCR در محدوده مورد انتظار، برای تعیین توالی‌یابی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار Bio edit و Gene runner برنامه BLAST در پایگاه داده‌های بانک ژنی (NCBI) و میزان تشابه آن‌ها با سایر ژن‌های ثبت شده در این پایگاه بررسی گردید.

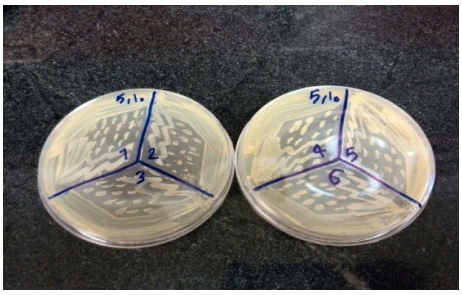
یافته‌ها

الف- نتایج اولیه مربوط به جداسازی باکتری‌های ترموفیل: پس از کشت خطی اولیه نمونه‌های آب و رسوبات چشمه بر روی محیط سی واتر آگار و ۲۴ ساعت گرما گذاری، از میان نمونه‌ها مختلف تعداد ۱۰ کلونی حاصل شد، که از این کلونی‌ها برای غربالگری اولیه باکتری‌های مولد ال- آسپاراژیناز و ال- گلوتامیناز (درمحیط اختصاص) M9 استفاده شد. (شکل (۱-۱)

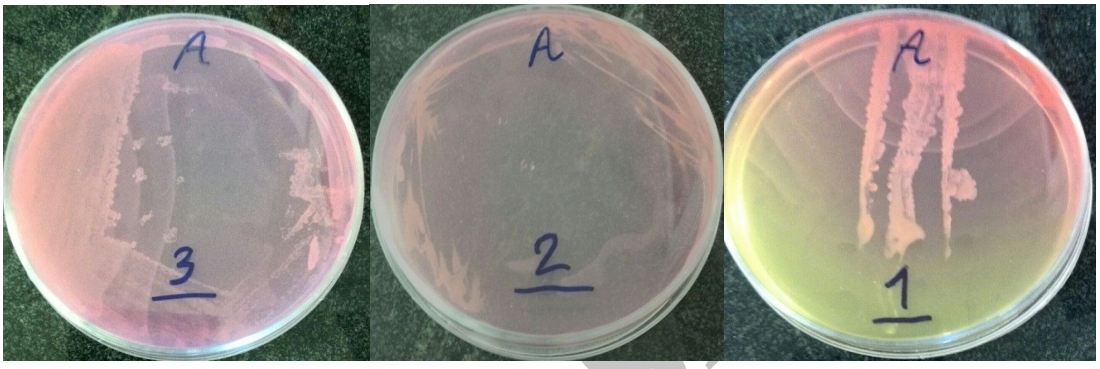
Archive of SID

www.SID.ir

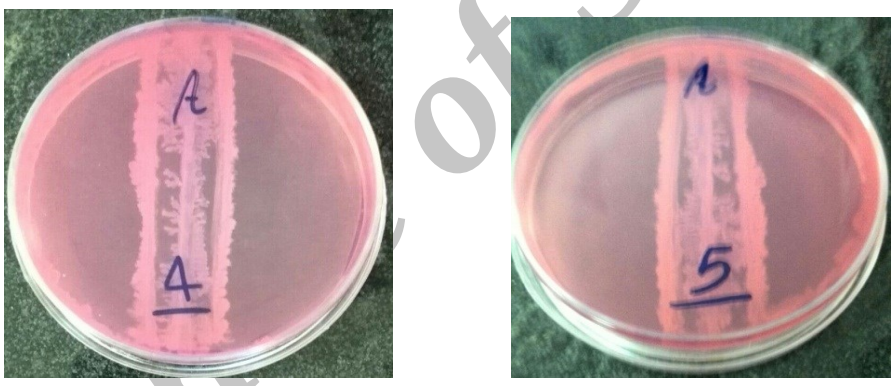
ب- نتایج غربالگری ثانویه تولید ال- آسپاراژیناز در محیط اختصاصی M9: از میان ۱۰سویه رشد کرده در مرحله قبل، تعداد ۵ سویه ترموفیل فعالیت ال- آسپاراژینازی نشان دادند. این فعالیت با صورتی رنگ شدن محیط اطراف کلونی مشخص گردید. سپس این سویه‌ها برای شناسایی تکمیلی مورد بررسی قرارگرفتند. (شکل های(۲-۱))



شکل (۱-۱): کلو نی‌های رشد کرده در محیط سی واتر آگار

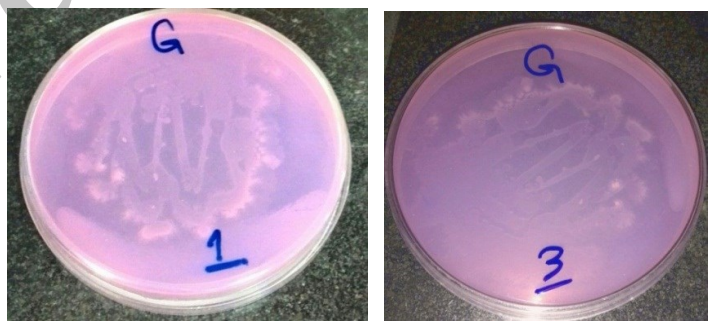


کلونی سویه ترموفیل LT3 مولد آسپاراژیناز کلونی سویه ترموفیل LT2 مولد آسپاراژیناز کلونی سویه ترموفیل LT1 مولد آسپاراژیناز



کلونی سویه ترموفیل LT5 مولد آسپاراژیناز کلونی سویه ترموفیل LT4 مولد آسپاراژیناز

شکل‌های (۱-۲): فعالیت ال – آسپاراژینازی باکتری‌ها باعث تشکیل ناحیه صورتی رنگ اطراف کلونی‌ها می‌شود.



کلونی سویه ترموفیل LT3مولد گلوتامیناز کلونی سویه ترموفیل LT1 مولدگلوتامیناز

Archive of SID

www.SID.ir

کلونی سویه ترموفیلLT6 مولدگلوتامیناز

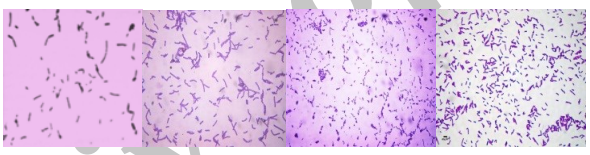
کلونی سویه ترموفیلLT5 مولدگلوتامیناز

شکل‌های(۳-۱): فعالیت ال – گلوتامیناز باکتری‌ها باعث تشکیل ناحیه صورتی رنگ اطراف کلونی‌ها می‌شود

ج- نتایج مربوط به تولید ال-گلوتامیناز توسط سویه‌های ترموفیل: از میان ۱۰سویه رشد کرده تعداد ۴ سویه خاصیت تولید ال-گلوتامیناز داشتند که این خاصیت با تشکیل هاله صورتی اطرافی کلونی سویه‌ها مشخص شد. سپس این سویه‌ها برای شناسایی تکمیلی مورد بررسی قرارگرفتند. (شکل‌های (۱-۳))

چ- نتایج مربوط به غربالگری نهایی در محیط اختصاصی M9: از تعداد ۱۰سویه جداشده تعداد ۵ سویه دارای خاصیت تولید ال- آسپاراژیناز و تعداد ۴ سویه دارای خاصیت تولید ال- گلوتامیناز بودند. از آنجایی‌که تعداد ۳ سویه هم دارای خاصیت تولید ال- آسپاراژیناز و ال- گلوتامیناز با هم بودند، لذا در نهایت تعداد ۶ سویه جهت شناسایی تکمیلی و آنالیز ژن 16S rRNA مورد بررسی قرارگرفت.

ح- نتایج اولیه شناسایی باکتری‌ها : نتایج مشاهده میکروسکوپی باکتری‌های جداشده که با رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت، نشان داد که تمام باکتری‌ها به‌صورت گرم مثبت بودند. نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی نشان داد که تمام سویه‌ها متعلق به جنس باسیلوس بودند. (شکل (۴-۱)

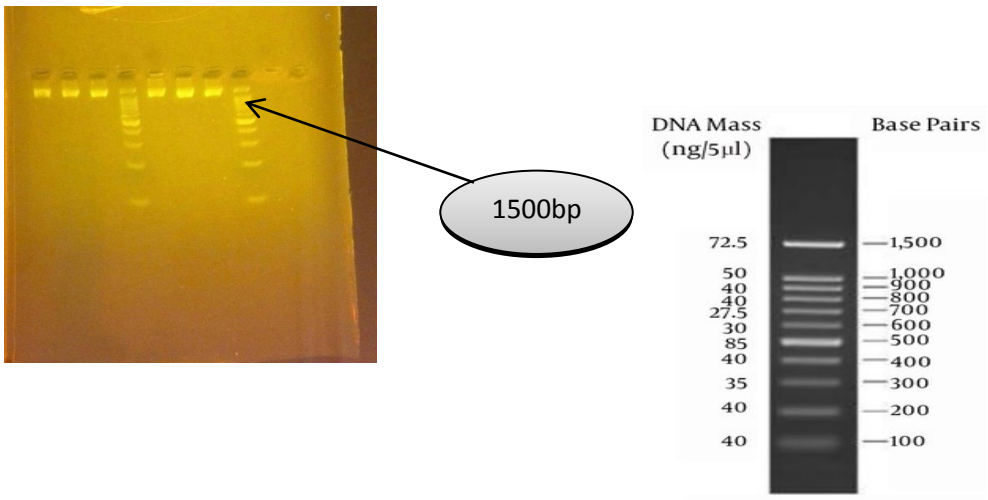


شکل (۴-۱) مشاهد ه میکروسکوپی باکتریهای جدا شده

خ- نتایج شناسایی تکمیلی سویه‌ها: به‌منظور شناسایی سویه‌های جداشده از تکنیک PCR استفاده شد. تکثیر قطعه ۱۵۰۰جفت بازی ژن 16S rRNA، ۶ سویه جداشده، توسط دستگاه ترموسایکلر (Senseques t) با برنامه مشخص انجام شد و محصول‌های حاصل از PCR به‌منظور رویت باند مربوطه بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید که نتایج آن در شکل زیر مشاهده می‌شود. همان‌طورکه در شکل مشاهده می‌شود الکتروفورز محصول‌های PCR حضور باند محدوده ۱۵۰۰جفت بازی را به کمک مارکر (Merck) ۱۰۰bp تأیید می‌کند. (شکل (۱-۵))

Archive of SID

www.SID.ir



شکل (۵-۱): نتایج الکتروفورز روی ژل

د- نتایج توالی‌یابی محصول‌های PCR: نتیجه شناسایی هر ۶ گونه باکتری ترموفیل که هم ال- آسپاراژیناز و هم ال-گلوتامیناز تولید کردند، طی بررسی آنالیز ژن 16SrRNA در پایگاه داده‌های ژنی نشان داد که هر ۶ سویه متعلق به گونه باسیلوس لیکنی فورمیس بودند.

ذ- توالی سکانس‌های به‌دست آمده ازسویه‌های جداسازی شده در پایگاه داده ژنی: سکانس‌های حاصل از هر ۶ سویه با استفاده نرم‌افزار Bio edit مورد ارزیابی قرارگرفتند. به‌عنوان نمونه در شکل (۶-۱) توالی‌ها در سویه LT-1در چهار رنگ (آبی- سبز- قرمز -مشکی) به‌طور منظم در قسمت بالا قرار گرفته اند و الکتروگرام‌ها در قسمت پایین به‌صورت هماهنگ هستند که هر کدام توالی مورد نظر را نشان می‌دهند که این برقراری نظم در الکتروگرام‌ها نشان دهنده این است که تعیین سکانس به‌خوبی صورت گرفته و هیچ‌گونه نقصی نداشته است. در مورد هر ۶ سویه الکتروگرام‌ها به‌صورت منظم مشاهده گردید.

شکل(۶-۱): توالی سویه LT-1

بحث

باکتری‌ها منبع سهل الوصول و اقتصادی برای تولید آنزیم‌های مختلف به‌شمار می‌روند. تحقیق‌های پیشین گزارش‌هایی از استخراج آنزیم ال-آسپاراژیناز از باکتری‌های مختلف ارائه داده-اند، که از آن جمله می‌توان به استخراج L-AsparaginaseII از باکتری *E.coli* ، Pseudomonas، Bacillus، Streptomyces اشاره کرد (۱۱).

آنزیم آسپاراژیناز در علم پزشکی به‌عنوان دارویی جهت درمان لوسمی لنفوبلاستی (سرطان خون) شناخته می‌شود. این آنزیم علی‌رغم این‌که در مقایسه با سایر داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی سازگاری بسیار بالایی با بافت و سازوکارهای

Archive of SID

www.SID.ir

حیاتی بدن دارد، کاربردهای فراوانی دارد که یکی از کاربردهای درمانی اصلی آنزیم، درمان سرطان است (۱۰).

کاربرد مهم آسپاراژیناز در بیماری‌هایی همانند لوسمی لنفوسایتیک، بیماری هوچکین، لوسمی میلوسایتیک حاد، لوسمی منوسایتیک حاد، لوسمی لنفوسایتیک مزمن، درمان لنفوسارکوما و ملانوسارکوما است. عملکرد ضدسرطانی این آنزیم مربوط به کاهش ال- آسپارژین است. از این‌رو سلول‌های تومور ناتوان در سنتز این اسیدآمینه، به‌علت فقدان ال-آسپاراژین به‌طور انتخابی می‌میرند. هم‌چنین ثابت شده است که آنزیم آسپاراژیناز، به‌خصوص در درمان لوسمی لنفوسایتیک حاد می‌تواند امیدبخش باشد. میزان ۶۰ درصد بهبودی کامل، در بررسی حدود ۶۰۰۰ مورد از لوسمی لنفوسایتیک حاد گزارش شده است. این آنزیم به‌صورت داخل وریدی تزریق می-شود (۲۱). ابراهیمی نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایران نیز باکتری‌های نمک دوست تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز را از دریاچه مهارلو جداسازی کردند. شناسایی باکتری‌های مولد آنزیم ال- آسپاراژینازشناسایی شده متعلق‌به جنس‌های باسیلوس، پروتئوس و سودوموناس بودند. در این تحقیق نیز براساس آنالیز توالی باکتری‌های مولد ال-آسپاراژیناز وال-گلوتامیناز شناسایی شده متعلق به جنس باسیلوس و گونه لیکنی فورمیس بودند (۸). لیرو سیگنال درسال ۲۰۰۹یک سویه پرویدنشیا را از آب دریا جداکردند. بیش‌ترین بازده این آنزیم توسط این باکتری در دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد.

در تحقیق حاضر نیز ۳ سویه ترموفیل از منبع آبی چشمه آبگرم لاریجان جداسازی شد که هر سویه دارای قابلیت تولید آنزیم‌های ال-آسپاراژیناز و ال-گلوتامیناز در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد بودند (۱۳).

پاگلا وراجولاپاتی درتحقیقی تولید ال-آسپاراژیناز با استفاده از استافیلوکوکوس کاپیتیس را بررسی کردند. باکتری‌ها رادر محیط M9 حاوی فنل رد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ساعت انکوبه کردند، منطقه صورتی در اطراف کلونی باکتری نشان‌دهنده آن بود که تولید ال- آسپاراژیناز توسط باکتری‌ها به‌دلیل PH قلیایی(تجمع آمونیاک در محیط کشت) صورت گرفته است. برای سنجش فعالیت آنزیم از روش نسلر استفاده شد. نتایج نشان داد شرایط مطلوب برای فعالیت آنزیم استخراج شده از استافیلوکوکوس کاپیتیس PH=۶/۲، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶ روز است (۱۶). در این پژوهش نیز به‌منظور بررسی تولید ال- آسپاراژیناز توسط سویه‌های ترموفیل از محیط M9 حاوی فنل رد استفاده شد و کلنی‌های آسپاراژیناز مثبت توسط مشاهده منطقه صورتی اطراف کلنی تشخیص داده شدند.

براساس مطالعه‌های هوآنگ و همکاران در سال ۲۰۱۱، ال-گلوتامیناز تولید شده توسط باکتری سودوموناس 7A می‌تواند سلول‌های عفونی شده با HIV را مهار کند. یکی از کاربردهای درمانی ال-گلوتامیناز در مهار ملانوم و بیوسنتز DNA در سلول‌های آسیب دیده است. درمان (HIV) توسط ال-گلوتامیناز از سودوموناس ارائه شده است. بنابراین فعالیت ترانس کریپتاز در سرم، کاهش قابل توجهی درتکثیر سلول‌های آلوده به HIV را نشان می‌دهد.

در پروژه حاضر، ترموفیل تولید شده توسط باکتری باسیلوس از گونه لیکنی فورمیس جداسازی شدند که دارای قابلیت تولید ۴ سویه آنزیم ال-گلوتامیناز بودند (۱۴). طبق مطالعه‌های سابو و همکاران در سال ۱۹۷۰ تا ۲۰۰۰ آنزیم‌های درمانی مانند ال-آسپاراژیناز و تیروزیناز، ال -گلوتامیناز و بتا گلوکوزیداز در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این تحقیق نیز آنزیم ال-آسپاراژیناز از تعداد ۵ سویه وال-گلوتامیناز از ۴ سویه ترموفیل جداسازی شدند (۱۸). فعالیت ال-گلوتامیناز در باکتری‌های مختلفی از جمله باسیلوس، میکروکوکوس، سودوموناس و اکتینومیست‌ها گزارش شده است. اما تنهاترین سویه‌ای که به‌عنوان سویه‌های تجاری در تولید ال-گلوتامیناز مطرح می‌باشند با سیلوس‌ها هستند. در تحقیق حاضر نیز فعالیت تولید ال-گلوتامیناز متعلق به جنس باسیلوس بوده و هر ۴ سویه دارای فعالیت ال-گلوتامیناز متعلق‌به گونه لیکنی فورمیس بودند (۱۷).

نتیجه‌گیری

در بررسی سویه‌های ترموفیل موجود در چشمه آبگرم لاریجان تعداد ۱۰سویه جداسازی شد که از این ۱۰سویه باکتری‌های ترموفیل دارای فعالیت ال- آسپاراژینازی متعلق به سویه‌های *LT1-LT2-LT3-LT4-LT5* بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

هم‌چنین بر اساس نتایج به‌دست آمده باکتری‌های ترموفیل سویه‌های *LT1-LT3-LT5-LT6* دارای قابلیت تولید آنزیم ال-گلوتامیناز بودند.

در ضمن باکتری‌های *ترموفیل LT-5، LT-3، LT-1* قادر به تولید هر دو آنزیم ال-آسپاراژیناز و ال-گلوتامیناز بودند.

براساس نتایج حاصل از بررسی توالی ژن *16SrRNA* هر ۶ سویه متعلق به گونه باسیلوس لیکنی فورمیس بودند.

باتوجه‌به نتایج فوق، این باکتری‌ها می‌توانند منبع بسیار مناسبی برای تولید آنزیم‌های ضد سرطان ال-آسپاراژیناز و ال-گلوتامیناز باشند و با توجه به این‌که بعضی از سویه‌ها هر دو آنزیم را تولید می‌کردند از ارزش بالاتری برخوردار هستند.

سپاسگزاری

از استاد اندیشمند و ارزنده سرکار خانم دکتر مهناز فرهمند که در این پژوهش همواره راهنمای من بودند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

۱. جنیدی ، م، ج ،۱۳۸۴ ، شناخت آب معدنی و چشمه های معدنی ایران.

۲.کیانی،ک ،۱۳۸۷ ،خواص درمانی آبهای گرم و شفا بخش معدنی ایران.

3. Appel I. M , C.van Kessel-Bakvis, R. Stigter, R. Pieters. "Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia"PMID.2007 ; 21 (11): 2377.

4. Arif H.M . World journal of pharmacy and ph armaceutical sclences.volumes 3,Issue .2014, 6,52-62.

5. Bessoumy A. A., S. Mohamed and M. Jehan. Production, Isolation, andPurification of L- asparaginase from Pseudomonas Aeruginosa 50071 Using Solid-stateFermentation..Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2008; 37(4): 387-393.

6.Bury V.D. Extremophiles as a source for novel enzymatic,Cur Opin Microbiol . 2003,6: 213 -218.

7.Bülbül. D, E Karakuş. Production and optimization of L-glutaminase enzyme from Hypocrea jecorina pure culture, Preparative Biochemistry and Biotechnology, - Taylor & Francis., 2013. Pages 385-397.

8.Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. 2011 .L-Asparaginase production by moderate halophilic bac-teria isolated from maharloo salt lake. Indian J Micro-biol.;51:307-11.

9. Goldstein L. Schooler,J. M. Regulation of ammonia pro- duction in the rat kidney, Advan. Enzyme Regul. 2000: pp 5- 71.

10. Garaev M , and E. I. Golub. Mechanism of the effect of glucose on Lasparaginse synthesis by Escherichia coli bacteria, Mikrobiologia. 1977;46(3):433-439

11. Janthon E. Sune Eriksson , and Margareta Törnqvist.Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated. 2002 Pages 238–249.

12.Kumar S. V. V. Dasu and K. Pakshirajan. Localization and production of novel L- asparaginase from Pectobacterium carotovorum MTCC 1428. Process Biochem . 2010 45: 223- 229.

13.Lyer PV singhal RS.screening and selection marine isolated for L-glutaminase production and media Apple Biotechnol .2009;159:233-250.

14. Marca H. Wauben and Fred Hochberg , Standardization of sample collectionisolation and analysis methods in extracellular vesicle research. 2013; Issue 1, pp. 18-26.

15.Nandakumar R., Yoshimune K., Wakayama M. & MoriguchiM. Microbial glutaminase: biochemistry, molecular ap-proaches and applications in the food industry. J. Mol. Catal. B Enzym .2003; 23: 87–100.

16 . Paglla and K. E. Cooksey. Regulation of L- asparaginase EC-3.5.1.1 in a chlamydomonas species in response to ambient concentration of combined nitrogen. Journal of Bacteriology .2013147(1):9-12

17.Prasanth Kumar K, Prabhakar T , Sathish T , Grija Sankar G ,Moges F , Swarajya Lakshmi G,Ramana H.,. Studies on extracellular L-glutaminase production by halophilic Aspergillus sp. J Pharm Chem. 20093(1):4-7.

18. Sabu A, Chandrasekaran M, Pandey A. Biopotentialof microbial glutaminases. Chem Today. 2000;11/12.

19.Spiers AS, Wade HE.Bacterial glutaminase in treatment of acute leukemia.Br med J. 1976;1(6021):1317-1319.

20. Srinivasan R,Karaoz U,Volegova M,Mackichan J,Kato-Maeda M,Miller SUse of 16srRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial pathogens.PLos one ,et al 2015 10(2)

21.Tong W.H van der Sluis IM .Alleman CJ, van Litsenburg RR , Kaspers GJ ,Pieters., .Cost tanalysis of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia with asparationase preparations:the impact of expensive chemotherapy.Haematologica. 2013:98(5):753-

Archive of SID

www.SID.ir

22.Vielle and zeikus. Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by Enterobacter aerogenes. appl Microbiol Biotechnol.2001.53:, 180 184.

Archive of SID

www.SID.ir