جداسازی و شناسایی اکینومایست‌های تولیدکننده L– آسپاراژیناز از خلیج فارس

فاطمه ایزدپناه قشمی [۱] دکتر صدیقه جوادپور [۲] دکتر کیانوش ملک‌زاده [۳] سعید تمدنی جهرمی [۴] مهسا رحیم‌زاده [۵]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم [۲] دانشیار گروه میکروبیولوژی، [۳] استادیار گروه ژنتیک، [۵] استادیار گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان [۴] دکترای بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

مجله پزشکی هرمزگان سال هجدهم شماره دوم خرداد و تیر ۹۳ صفحات ۱۲۹-۱۲۱

چکیده

مقدمه: *L– آسپاراژیناز یک ماده آنتی نئوپلاستیک است که در شیمی درمانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد به کار می‌رود. این آنزیم در بسیاری از جانوران، میکروارگانیسم ها و گیاهان وجود دارد. اما میکروارگانیسم‌ها منابع مناسبی برای استخراج آنزیم می‌باشند، زیرا توانایی تولید مقدار زیادی آنزیم را دارند. اکتینومایست‌ها باکتری‌های گرم مثبت رشته‌ای هستند که به طور وسیعی در محیط زیست دریا وجود دارند و متابولیت‌های ثانویه آنها، محصولات مهمی برای استفاده در صنایع غذایی و داروسازی می‌باشند. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی مولکولی اکتینومایست‌های تولیدکننده L– آسپاراژیناز از خلیج فارس می‌باشد.*

روش کار: *برای انجام مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۶۰ نمونه از آب دریا و رسوبات خلیج فارس در استان هرمزگان نمونه‌برداری شد. اکتینومایست‌ها در محیط نشاسته کازئین آگار کشت و خالص سازی شدند. تمام کلنی‌ها از نظر تولید آنزیم L– آسپاراژیناز، در محیط کشت M9 غربالگری شدند. سپس میزان تولید آنزیم، به وسیله روش رنگ‌سنجی مشخص شد و بر اساس فعالیت آنزیمی از میان اکتینومایست‌های تولیدکننده آنزیم L– آسپاراژیناز، سویه‌ای که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود، توسط توالی یابی ژن 16S rRNA شناسایی شد.*

نتایج: *تعداد ۳۲ سویه اکتینومایست، از نمونه‌های آب دریا و رسوبات آن جداسازی شد که از میان آنها ۲۳ سویه تولیدکننده آنزیم L– آسپاراژیناز بودند. سویه PG08 بیشترین فعالیت آنزیمی (۳۷×۱۰^{-۲} IU) را نشان داد و طبق آنالیز توالی ژن 16S rRNA این سویه بیشترین تشابه را به Streptomyces spp. OS1-33 نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *اکتینومایست‌های جداشده از خلیج فارس، منبع بالقوه‌ای از آنزیم L– آسپاراژیناز می‌باشند.*

کلیدواژه‌ها: *آسپاراژیناز، اکتینومایست‌ها – 16S rRNA – خلیج فارس*

نویسنده مسئول:
دکتر صدیقه جوادپور
مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی
دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان
بندرعباس – ایران
تلفن: ۹۱۲۳۷۹۵۳۶۷ ۹۸+
پست الکترونیکی:
sedigheh.javadpour@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۲/۱/۳۱ اصلاح نهایی: ۹۲/۶/۴ پذیرش مقاله: ۹۲/۶/۲۷

Archive of SID

مقدمه:

بیشتر از ۷۰ درصد سطح زمین را اقیانوس‌ها پوشانده‌اند و بیش از ۲،۰۰۰،۰۰۰ پروکاریوت در هر میلی لیتر از آب دریا در نزدیکی سواحل وجود دارد. میکروارگانیسم‌های موجود در محیط زیست دریا نسبت به انواع خشکی‌زی از نظر خصوصیات فیزیولوژیک و توانایی‌های متابولیکی متفاوت می‌باشند و دارای پتانسیل بالایی در تولید ترکیبات فعال زیستی کارآمد هستند (۱،۲). در میان میکروارگانیسم‌ها، اکتینومایست‌ها مسئول تولید نیمی از متابولیت‌های ثانویه شامل آنتی‌بیوتیک‌ها، عوامل آنتی‌توموری و آنزیم‌ها هستند که به طور وسیعی کاربرد دارند. اکتینومایست‌ها گروه بزرگ و متنوعی از باسیل‌های باریک گرم مثبت هستند که ساختار شاخه‌ای و فیلامنتوس ایجاد می‌کنند و به طور وسیعی در زیستگاههای دریایی پراکنده‌اند. حدود ۷۵ درصد از ترکیبات فعال ثانویه زیستی اکتینومایست‌ها توسط جنس استرپتومایسس تولید می‌شود و به همین لحاظ استرپتومایسس‌ها از نظر تجاری قابل توجه‌اند. جنس

www.SID.ir

استرپتومایسس در خانواده *Streptomycetaceae* طبقه‌بندی شده است و شامل اعضای گرم مثبت هوازی از راسته *Actinomycetales* و زیرراسته *Streptomycineae* در رده *Actinobacteria* می‌باشد (۳،٤).

آنزیم L–آسپاراژیناز (L– آسپاراژین آمینوهیدرولاز E.C.3.5.L.L) پیوند آمیدی را در L–آسپاراژین هیدرولیز کرده و آن را به L–آسپارتات و آمونیاک تبدیل می‌کند (۵).

Kidd و همکارانش در سال ۱۹۵۳ نشان دادند، سرم خوکچه هندی دارای خاصیت ضدتوموری می‌باشد. همچنین Broome در سال ۱۹٦۱ نشان داد که وجود خاصیت ضدتوموری سرم خوکچه هندی به دلیل آنزیم L– آسپاراژیناز است. Wriston و Mashburn گزارش دادند آنزیم L– آسپاراژیناز خالص شده از *Escherichia coli* مشابه سرم خوکچه هندی دارای فعالیت ضد توموری است (٦). این آنزیم یکی از مهمترین گروه آنزیم‌های درمانی از نظر بیوتکنولوژی و زیست پزشکی محسوب می‌شود که سازمان‌های FDA و WHO، آن را برای درمان مؤثر لوسمی لنفوبلاستیک حاد و لنفو سارکوما که شایع‌ترین بدخیمی در کودکان و نوجوانان می‌باشد، تصویب کرده‌اند (۷). همچنین این آنزیم در صنایع غذایی برای کاهش غلظت L–آسپاراژین به منظور جلوگیری از تشکیل ماده‌ای سرطان‌زا به نام آکریلامید در غذاهای گیاهی فرآوری شده در دماهای بالا به کار می‌رود (۸). میکروارگانیسم‌های مختلفی ازجمله استرپتومایسس‌ها، دارای پتانسیل تولید L– آسپاراژیناز می‌باشند (٦). امروزه تولید تجاری آنزیم L– آسپاراژیناز جدا شده از *Erwinia carotovara* و *E. coli* برای درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد و دیگر نئوپلاسمی‌های بدخیم در انسان صورت می‌گیرد (۹،۱۰).

گزارش‌های منتشر شده حاکی از این است که ویژگی‌های کینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم L–آسپاراژیناز به ماهیت ژنتیکی سویه میکروبی مورد استفاده بستگی دارد. به طور مثال، آنزیم به دست آمده از *E. coli* واکنش‌های آنافیلاکسی ایجاد می‌کند و آنزیم L– آسپاراژیناز به دست آمده از *E. carotovara* دارای نیمه عمر کوتاه است (۱۱). همچنین بروز حساسیت و واکنش‌های آنافیلاکسی از L– آسپاراژیناز به دست آمده از باکتری‌های دیگر گزارش شده است (۱۲). بنابراین با توجه به اهمیت و کاربرد روزافزون L–آسپاراژیناز، اولین گام برای تولید انبوه آنزیم با ویژگی‌های دارویی مناسب تر، یافتن منابع جدید با توان تولید بالا و اثرات سیتوتوکسیتی کمتر است و با توجه به مزایای متابولیت‌های ثانویه جدا شده از اکتینومایست‌ها نسبت به سایر باکتری‌ها، جداسازی و شناسایی اکتینومایست‌های مناسب حائز اهمیت می‌باشد. متأسفانه علی‌رغم منابع وسیع اکتینومایست‌ها، تحقیقات کمی برای جداسازی و شناسایی آنها از خلیج فارس صورت گرفته است، هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی اکتینومایست‌های تولیدکننده آنزیم L– آسپاراژیناز از خلیج فارس می‌باشد.

روش کار:

جمع‌آوری نمونه‌ها

در مطالعه تجربی حاضر به منظور جداسازی اکتینومایست‌های تولیدکننده آنزیم L–آسپاراژیناز، تعداد ٦۰ نمونه آب دریا و رسوبات آن از خلیج فارس در مناطق مختلف استان هرمزگان جمع‌آوری شد. نمونه‌های رسوب سواحل به وسیله قاشقک استریل از عمق ۱۰ – ۵ سانتی‌متری، در ظروف شیشه‌ای استریل جمع‌آوری گردیدند و نمونه‌های آب دریا از قسمت ساحلی و نواحی نزدیک ساحل توسط قایق با غوطه‌ور کردن ظروف شیشه‌ای استریل زیر سطح آب و قرار دادن دهانه آن کمی به طرف بالا و به سمت جریان آب، جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

جداسازی اکتینومایست‌ها

برای تهیه رقت لازم از نمونه‌های رسوب، ۱۰ گرم رسوب با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط گردید و به منظور تهیه رقت لازم از نمونه‌های آب دریا، ۱۰ میلی‌لیتر آب دریا با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد. از رقت 10^{-1} الی 10^{-4} حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت نشاسته کازئین آگار (Starch Casien Agar) حاوی سیکلوهگزامید و نالیدیکسیک اسید به صورت خطی کشت داده و به مدت ۱۰–۷ روز در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس کلنی‌های گچی و چرمی مشکوک به اکتینومایست با کشت مجدد در محیط SCA خالص سازی شدند (۱۳،۱٤).

Archive of SID
www.SID.ir

غربالگری اکتینومایست‌های تولید کننده آنزیم L-آسپاراژیناز

با استفاده از محیط کشت جامد اختصاصی M9 (۱۰ گرم آسپاراژین، ٦ گرم $Na_2HPo_4.2H_2o$، ۲ میلی‌لیتر $MgSO_4.7H_2o$ (۱ mol /L)، ۰/۰۲۵ گرم فنل رد، ۱۰ میلی‌لیتر مالتوز ۲۰ درصد، ۰/۵ گرم Nacl، ۰/۷۵گرم KH_2Po_4 ۱ میلی‌لیتر $CaCl_2.H_2o$ (۰/۱mol /L)، ۲۰ گرم آگار و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) تولید آنزیم L-آسپاراژیناز در سویه‌های اکتینومایست جداشده، مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که اکتینومایست‌ها بر روی محیط M9 کشت داده شده و به مدت ۷ روز در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در این آزمون فعالیت L-آسپاراژینازی به وسیله ناحیه صورتی اطراف کلنی‌ها مشخص شد. از دو پلیت به عنوان کنترل استفاده گردید که یکی از آنها فاقد شناساگر (فنل رد) و دیگری فاقد آسپاراژین، اما در عوض حاوی $NaNO_3$ به عنوان منبع نیتروژن بود (٦،۱۵).

تهیه عصاره خام آنزیم L-آسپاراژیناز

سویه‌های مولد آنزیم L-آسپاراژیناز در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع M9 کشت داده و به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور در دور rpm ۲۰۰ با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محیط کشت را در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و در نهایت از مایع رویی به عنوان عصاره خام آنزیم استفاده شد (١٤).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم L –آسپاراژیناز

در این مطالعه به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز، از روش رنگسنجی (Colorimertic) توصیف شده توسط Imada و همکارانش در سال ۱۹۷۳ استفاده شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر L- آسپاراژین ۰/۰٤ مولار، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره خام آنزیم و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر Tris-Hcl ۰/۵ مولار را با هم مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه درون بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱/۵ مولار به آن اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته، با ۰/۲ میلی‌لیتر معرف نسلر و ۳/۷ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت مقدار آمونیاک آزاد شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۵۰ نانومتر محاسبه شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد بین‌المللی (IU) با استفاده از منحنی استاندارد آمونیوم سولفات محاسبه گردید (١٦).

شناسایی مقدماتی

برخی از خصوصیات سویه‌های جدا شده شامل مشخصات کلنی، رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی از جمله اکسیداز و کاتالاز بررسی و تعیین شد و با کتاب باکتریولوژی برگیز مقایسه گردید.

شناسایی سویه اکتینومایست توسط آنالیز ژن *16S rRNA*

در این تحقیق برای استخراج DNA اکتینومایست از کیت Peq Gold Bacterial DNA ساخت کشور آلمان استفاده شد. به وسیله پرایمرهای 27F (5́AGA GTT TGA TCC /TGG CTC AG3́) و 1525R (5́AAG GAG GTG ATC CAA3́) قطعه bp ۱۵۰۰ ژن *16S rRNA* تکثیر یافت. مخلوط PCR (۵۰ میکرولیتر) حاوی یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، یک میکرو لیترآنزیم Taq پلیمراز (۵u/μL)، یک میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، پنج میکرولیتر $MgCl_2$، پنج میکرولیتر بافر 10x PCR و۲/۵ میکرولیتر DNA نمونه استخراج شده بود. حجم نهایی مخلوط با استفاده از آب مقطر دیونیزه (۳۳/۵ میکرولیتر) به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) در شرایط دمایی شامل: مرحله Initiation denaturation به مدت ۱ دقیقه در دمای C˚ ۹۵ و به دنبال آن ۳۰ سیکل مرحله Denaturation به مدت ۱ دقیقه در دمای C˚ ۹۵، مرحله Annealling به مدت ۱ دقیقه در دمای C˚ ٥٦/۵ و مرحله Extension به مدت ۱دقیقه در دمای C˚ ۷۲ و مرحله Final extension به مدت ۱۰ دقیقه در دمای C˚ ۷۲ با ۱ سیکل انجام شد و به منظور آنالیز، محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید و بافر (۱x) TBE الکتروفورز گردید و توسط دستگاه ترانس لومیناتور با تابش اشعه ماورای بنفش مشاهده شد.

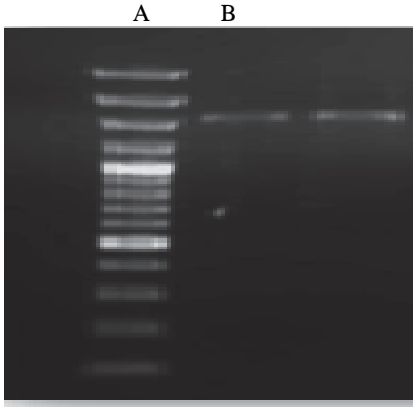
بررسی نتایج PCR به کمک مقایسه با DNA 100 bp size marker انجام گردید. در نهایت برای توالی‌یابی، محصول PCR به شرکت ژن فن‌آوران ارسال گردید. پس از توالی‌یابی

Archive of SID
www.SID.ir

ژن *16S rRNA* سویه اکتینومایست مورد مطالعه، نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit بررسی شد و توالی 16S rDNA سویه انتخابی با سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده‌های بانک ژنی National Center for Biotechnology Information (NCBI) با استفاده از برنامه BLAST مقایسه گردید (۱۷).

نتایج:

۳۲ کلنی از نمونه‌های آب و رسوبات خلیج فارس جداسازی شد که شامل ۳ کلنی از آب دریا و ۲۹ کلنی از رسوبات بودند. از میان ۳۲ کلنی جداشده ۹ کلنی بر روی محیط کشت اختصاصی M9 هیچ گونه رشدی نشان ندادند که نمایانگر عدم توانایی تولید آنزیم L–آسپاراژیناز توسط این کلنی‌ها بود. اما ۲۳ کلنی دیگر (۲ کلنی از آب دریا و ۲۱ کلنی از رسوبات) بر روی محیط M9 رشد کردند، زیرا این سویه‌ها توانایی تولید آنزیم L–آسپاراژیناز را داشته و سبب تجزیه L–آسپاراژین موجود در محیط M9 و تولید آمونیاک می‌گردند، در نتیجه pH محیط را قلیایی نموده و به دلیل وجود معرف فنل رد اطراف این کلنی‌ها، هاله صورتی رنگی تشکیل می‌شود. با محاسبه میزان فعالیت آنزیم بر حسب IU مقادیر متفاوتی از فعالیت آنزیم L–آسپاراژیناز در سویه‌ها مشخص گردید که حداکثر میزان فعالیت L– آسپاراژینازی IU ۳۷×۱۰^{-۲} و حداقل آن IU ۵×۱۰^{-۲} بود. ویژگی‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی ۱۱ سویه جدا شده و میزان فعالیت آنزیمی آنها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. از میان ۲۳ اکتینومایست مولد آنزیم، سویه PG 08 که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی (IU ۳۷×۱۰^{-۲}) بود، برای مطالعات بعدی انتخاب گردید. این سویه دارای کلنی سفید، گچی و بدون پیگمانت بود و رشدی در طی ٤ روز نشان داد. شناسایی مولکولی سویه انتخاب شده به وسیله تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای 27F و 1525R انجام شد. سپس محصول bp ۱۵۰۰ حاصل از PCR تعیین توالی گردید. شکل (۱) الکتروفورز محصول PCR را نشان می‌دهد.



شکل ۱- بررسی باند ژن *16S rRNA* سویه PG08
محصول PCR بر روی آگارز ۱٪ A: مارکر B : سویه PG08

نتایج تعیین توالی در بانک ژنی NCBI بلاست شد و بیشترین درصد تشابه به عنوان جنس و گونه باکتری تعیین گردید. توالی نوکلئوتیدی سویه PG08 بیشترین درصد تشابه را به Streptomyces spp. OS1-33 (FN178404.1) موجود در NCBI داشت (جدول شماره ۲). در واقع درصد تشابه توالی بلاست شده با توالی‌های موجود دیگر در NCBI نشان داد که این سویه متعلق به جنس استرپتومایسس می‌باشد.

جدول شماره ۱- ویژگی‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی سویه‌های جدا شده و میزان فعالیت آنزیمی آنها

کد سویه	رنگ‌آمیزی گرم	رنگ سطح کلنی	رنگ پشت کلنی	تست اکسیداز	تست کاتالاز	میزان فعالیت آنزیم (IU)	منبع جداسازی
PG01	رشته های باریک گرم مثبت	قهوه ای	کرم	منفی	مثبت	۲۳×۱۰^{-۲}	آب
PG02	رشته های باریک گرم مثبت	سفید	کرم	منفی	مثبت	۱۳×۱۰^{-۲}	رسوب
PG03	رشته های باریک گرم مثبت	صورتی	صورتی	منفی	مثبت	۳۳×۱۰^{-۲}	رسوب
PG04	رشته های باریک گرم مثبت	سفید	کرم	منفی	مثبت	۲۰×۱۰^{-۲}	رسوب
PG05	رشته های باریک گرم مثبت	کرم	قهوه ای	منفی	مثبت	۱۰×۱۰^{-۲}	رسوب
PG06	رشته های باریک گرم مثبت	قرمز	قرمز	منفی	مثبت	۳٤×۱۰^{-۲}	آب
PG07	رشته های باریک گرم مثبت	قهوه ای	قهوه ای	منفی	مثبت	۳۳×۱۰^{-۲}	رسوب
PG08	رشته های باریک گرم مثبت	سفید	کرم	منفی	مثبت	۳۷×۱۰^{-۲}	رسوب
PG09	رشته های باریک گرم مثبت	سفید	قهوه ای	منفی	مثبت	۱۹×۱۰^{-۲}	رسوب
PG10	رشته های باریک گرم مثبت	سفید	زرد	منفی	مثبت	۲٦×۱۰^{-۲}	رسوب
PG11	رشته های باریک گرم مثبت	سفید	کرم	مثبت	مثبت	۵×۱۰^{-۲}	رسوب

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۲- شناسایی مولکولی توسط آنالیز ژن 16SrRNA سویه انتخاب شده

نام سویه	توالی	شناسایی سویه	شماره دستیابی
PG08	CTTTGGTGGATCACTGCCGAACCGCTGAGCCCTTTTAGGGAAATCAGCCGTGNANAAGGGG ACAAGCAGAGACCCCTGGACAGAAAACCGGAGACGACACAGGAAGGCAGCGCCTCGGGGC GGAAAGCGCCGGCGGCGCAGGACGAGCCCGCGGCCCACAACCGAGCGGGGGGGGAGACGG CCGACCAAGGCGACGACCGGAAGCCGGCCGGAGAGGGCGACCGGCCACACGGGCACGGAG ACACGGACGAAAAACCGACGGGAGGCAGAAACGGGGAAAAGAGCACAACGGGACCAAGC CGGAGGCAACGACGCCCCGCCAGGGAAGACGGCCACCGGGAGGCCAACCCCGCCCAGCCG GGAAGAAGCGCAAGCGACGGAACCCGCAGAAGAAGCACCGGCAAACGACCAGCCAGCAGC CGCGGAAAGACGCAGGGAGCGAGAGCGGACCGGAAAAACGGGGGGCAAAGAGCACGAAG GCGGAAAGGCACGCCGGAAGAGAAACAGCGGGGCAGAACCACGGGAAGGCAGGCGACAC GGACAGGCAAGAGGGCGACAGGGGAGAACAGAACGCCAGGAGGAGCGGCGAAAAGAGAC CACAACAGGAGGAACACCGGCGGCCAAGGAAGAACCCGGGGCGGAAAAGGACGCGGAGG AGCAAAAGCGGGGGGAGCGAACAGGAAAAAACACCCGGGGAGACCAGGACCGGAACGGG GGGCAACAAGCGCCGACAAACAACCACGACGCCCAGGCCGCAGCGAACCCAACAAGCCCC CCCCCGGCGCAAAAAAGGCCCCCAGGCAAAAACCCAAAGGAAGCGCCCGGGGCCCCCCCA CAGGGCGGAAACAGGGGACAAGAAGCCAACAACCCCAAAAAACCAACCAAGGGCGCGGCA	*Streptomyces spp. OS1-33*	FN178404.1

بحث و نتیجه‌گیری:

در مطالعه تجربی حاضر تعداد ۳۲ سویه اکتینومایست، از نمونه‌های آب دریا و رسوبات خلیج فارس جداسازی شد که از میان آنها ۲۳ سویه تولیدکننده آنزیم L–آسپاراژیناز بودند. به طور کلی منابع وسیعی از میکروارگانیسم‌ها با کاربردهای مفید در دریاها پراکنده‌اند. باکتری‌ها و قارچ‌های دریایی، بر اساس زیستگاه و ساختار اکولوژیک‌شان آنزیم‌های متفاوتی را تولید می‌کنند. این آنزیم‌ها فقط واکنش‌های شیمیایی درون سلول را کاتالیز نمی‌کنند، بلکه در فرآیندهای معدنی شدن ترکیبات آلی از طریق مسیر تجزیه آن‌ها و چرخه مواد در محیط زیست‌های گوناگون مؤثر هستند. آنزیم‌های میکروارگانیسم‌های دریایی بسیار مورد توجه هستند، به طوری که تعدادی از آنزیم‌ها مورد توجه محققین قرار گرفته و از رسوبات و آب دریاها تخلیص شده‌اند و کاربردها و ویژگی‌های آنها توصیف گردیده است. آنزیم‌های میکروبی نسبت به آنزیم‌های مشتق شده از منابع گیاهان و جانوران مزیت‌هایی دارند که شامل خصوصیات متنوع فعالیت‌های کاتابولیکی آنها، هزینه ارزان‌تر آنزیم‌های میکروبی، منابع فراوان مستمر و حتی کمیت و پایداری آنها می‌باشد بازار جهانی آنزیم حدود ۲ میلیارد دلار تخمین زده می‌شود و در هزاره جدید در حال پیشرفت و گسترش است (۱۸).

L– آسپاراژیناز آنزیمی است که در درمان بدخیمی‌های چند اندامی به کار می‌رود و از این آنزیم برای درمان سرطان استفاده می‌شود (۱۹). همچنین این آنزیم در صنایع غذایی برای کاهش غلظت آکریلامید به کار می‌رود و نیز اهمیت فراوانی در بیوسنتز آمینواسیدهای خانواده آسپارتیک ایفا می‌کند (۲۰،۲۱). بنابراین جستجو برای یافتن آنزیم L–آسپاراژیناز مناسب حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به مزایای آنزیم‌های میکروبی نسبت به سایر منابع، جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های مناسب، اولین گام برای تولید انبوه آنزیم L–آسپاراژیناز می‌باشد.

در مطالعه حاضر، از محیط Starch Casien Agar حاوی سیکلوهگزامید و نالیدیکسیک اسید که به ترتیب مانع رشد قارچ‌ها و باکتری‌های گرم منفی می‌شوند، برای جداسازی اکتینومایست‌ها استفاده شد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Ramesh و همکارانش در هند انجام شد، از محیط Starch Casien Agar برای جداسازی اکتینومایست‌ها استفاده گردید، زیرا این محیط رشد کلنی سایر باکتری‌ها و قارچ‌ها را بسیار محدود نموده و اکتینومایست‌ها در آن بهتر رشد می‌کنند (۱۳).

از نمونه‌های جمع‌آوری شده آب و رسوبات دریا در این مطالعه، ۳۲ کلنی اکتینومایست جداسازی شد که شامل ۳ کلنی جدا شده از آب دریا و ۲۹ کلنی جدا شده از رسوبات آن است.

این نتایج حاکی از آن است که اکتینومایست‌های بیشتری از رسوبات نسبت به آب دریا جداسازی شده است که با مطالعه Ramesh و همکارانش همخوانی دارد. از میان ۱۲۳ نمونه جمع‌آوری شده از ساحل دریا توسط Ramesh و همکارانش، ۹۸ کلنی اکتینومایست از ۸۰ نمونه رسوب و ۵ کلنی اکتینومایست از ۴۳ نمونه آب جمع‌آوری شده جداسازی گردید (۱۳). با توجه به اینکه رسوبات دریا حاوی ذخیره وسیعی از کربن ارگانیک،

Archive of SID
www.SID.ir

گرادیانتی از غلظت اکسیژن و مواد غذایی آلی و غیرآلی می‌باشند، در واقع ترکیبی را فراهم می‌کنند که نیچ ویژه‌ای برای میکروارگانیسم‌های متفاوت می‌باشد. بنابراین جداشدن سویه‌های بیشتری از رسوبات در مقایسه با آب دریا امری منطقی به نظر می‌رسد.

در این مطالعه به منظور جداسازی اکتینومایست‌های تولیدکننده آنزیم L–آسپاراژیناز از محیط کشت اختصاصی M9 حاوی فنل رد استفاده شد. در محیط کشت M9 با توجه به اینکه L –آسپاراژین به عنوان تنها منبع نیتروژن به کار می‌رود، فقط سویه‌هایی که قادر به سنتز آنزیم L–آسپاراژیناز هستند، رشد می‌کنند. از میان ۳ کلنی جدا شده از آب دریا ۲ کلنی و از ۲۹ کلنی جدا شده از رسوبات، ۲۱ کلنی بر روی محیط M9 رشد کردند. نتایج حاصل نشان می‌دهد که ۷۲ درصد اکتینومایست‌های جداسازی شده توانایی تولید آنزیم آسپاراژیناز را دارا بودند. با محاسبه فعالیت آنزیم مقادیر متفاوتی از تولید آنزیم L–آسپاراژیناز توسط۲۳ سویه اکتینومایست بدست آمد. سویه‌ای که بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان داده بود، با استفاده از روش مولکولی آنالیز ژن 16S rRNA شناسایی شد. این روش ابزار مهمی برای شناسایی دقیق گونه‌های میکروبی می‌باشد، زیرا با توجه به کند رشد بودن اکتینومایست‌ها، روش‌های قدیمی شناسایی و طبقه‌بندی نامطمئن و دشوار می‌باشند.

انواع اکتینومایست‌ها در زیستگاههای دریایی و خشکی‌ها به فراوانی گسترش یافته‌اند. اکتینومایست‌های دریایی منبع مهمی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند و طیف وسیعی از این ترکیبات توسط جنس استرپتومایسس تولید می‌شود. در این مطالعه از میان اکتینومایست‌های جدا شده، سویه متعلق به جنس استرپتومایسس (PG 08) با فعالیت آنزیمی ۳۷×۱۰^{-۲} IU دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود.

در سال ۲۰۰۹، Poorani و همکارانش در هند، ۳٤ سویه اکتینومایست را از رسوبات دریایی جداسازی کردند، سویه EPD27 بیشترین فعالیت آنزیمی خارج سلولی را نشان داد که بر اساس آنالیز توالی نوکلئوتیدی 16S rDNA این سویه بیشترین شباهت را به جنس استرپتومایسس نشان داد (۱٤).

در سال ۲۰۰۹، Basha و همکارانش در هند، اکتینومایست‌های دریایی تولیدکننده آنزیم L–آسپاراژیناز را از رسوبات دریا جداسازی کردند، در میان ۱۰ اکتینومایست جدا شده، ۳ مورد از آنها توانایی تولید آنزیم داشتند و نمونه S3 متعلق به جنس استرپتومایسس دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود (۲۲). در سال ۲۰۰۵، Dhevagi و همکارانش در هند، اکتینومایست‌های تولیدکننده آنزیم L–آسپاراژیناز را از رسوبات دریا جداسازی کردند. از میان اکتینومایست‌های جدا شده، استرپتومایسس PDK2 و PDK7 فعالیت بالقوه آسپاراژینازی نشان دادند (۲۳).

Kumari و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در هند، ٦۷ سویه اکتینومایست از رسوبات دریا جداسازی کردند که در میان آنها ۳۲ سویه توانایی تولید آنزیم L–آسپاراژیناز را داشتند. با توجه به بیشترین میزان فعالیت L–آسپاراژینازی، سویه انتخاب شده بر اساس آنالیز توالی نوکلئوتیدی 16S rDNA به عنوان Streptomyces griseolutes WS3/1 شناسایی شد (۲٤).

از محدودیت‌های این پژوهش، دشواری تهیه نمونه از مناطق مختلف دریا و عدم دسترسی به رسوبات نواحی عمیق دریا بود.

نتایج این مطالعه حاکی از این است، که سویه‌های متعلق به جنس استرپتومایسس تولیدکنندگان مناسبی برای آنزیم L–آسپاراژیناز می‌باشند، که با سایر مطالعات همخوانی دارد. در مجموع مطالعه حاضر نشان می‌دهد، خلیج فارس منبع بالقوه‌ای از اکتینومایست‌ها می‌باشد که از نظر تولید آنزیم L–آسپاراژیناز بسیار فعال‌اند و می‌توان با مطالعه بیشتر، سویه‌های جدید تولیدکننده این آنزیم را شناسایی کرد.

سپاسگزاری:

با تشکر فراوان از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه هرمزگان که با حمایت مالی و علمی برای انجام و اتمام این پروژه یاری رساندند.

Archive of SID
www.SID.ir

References منابع

1. Imada C, Koseki N, Kamata M, Kobayashi T, Hamada-Sato N. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Nihon Hosenkin Gakkaishi*. 2007;21:27-31.
2. Lu Y, Dong X, Liu S, Bie X. Characterization and identification of a novel marine streptomyces spp. produced antibacterial substance. *Mar Biotechnol*. 2009;11:717-724.
3. Dharmaraj S. Marine streptomyces as a novel source of bioactive substances. *World Journal of Microbiol Biotechnilogy*. 2010;26:2123-2139.
4. Khamna S, Yokota A, Lumyong S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and sidrophore production. *World Journal of Microbiol Biotechnilogy*. 2009;25:649-655.
5. Singh Y, Srivastava S. Screening and characterization of microorganisms capable of producing antineoplastic drug, L-asparaginase. *Int J Biol Med Res*. 2012;3:2548-2554.
6. Ghasemi Y, Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Zarrini G, Ghoshoon M, Javad Raee M, et al. An optimized medium screening of L-asparaginase production by Escherichia coli. *Am J Biochem Biotechnol*. 2008;4:422-424.
7. Warangkar S, Khobragade C. Screening, enrichment and media optimization for L-asparaginase production. *J Cell Tissue Res*. 2009;9:1963-1968.
8. Kushwaha A, Ahmed F, Pushpendra S. Production and purification of L-asparaginase from bacterial source. *Int J Univers Pharm Life Sci*. 2012;2:39-61.
9. Shah A, Karadi R, Parekh P. Isolation optimization and production of L-asparaginase from coliform bacteria. *Asian J Biotechnol*. 2010;2:169-177.
10. Ashraf A, Bessoumy E, Sarhan M, Mansour J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from Pseudomonas aeruginosa 50071 using solid-state fermentation. *J Biochem Mol Biol*. 2003;37:387-393.
11. Kumar M, Selvam K. Isolation and purification of high efficiency L-asparaginase by quantitative preparative continuous-elution SDS PAGE electrophoresis. J Microbial Biochem Technol. 2011; 3: 073-083.
12. Sahu M, Poorani E, Sivakumar K, Thangaradjou T, Kannan L. Partial purification and anti-leukemic activity of L-asparaginase enzyme of the actinomycete strain LA-29 isolated from the estuarine fish, Mugil cephalus (Linn.). *J Environ Biol*. 2007;28:645-650.
13. Ramesh S, Mathivanan N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiol Biotechnilogy*. 2009;25:2103-2111.
14. Poorani E, Saseetharan M, Dhevagi P. L-asparaginase production and molecular identification of marine Streptomyces spp strain EPD 27. *International Journal of Integrative Biology*. 2009;7:150-155.
15. Gulati R, Saxena R, Gupta R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 1997;24:23-26.
16. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organism. *Journal of General Microbiology*. 1972;76:85-99.
17. Nimnoi P, Pongsilp N, Lumyong S. Endophytic actinomycetes isolated from Aquilaria crassna Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World Journal of Microbiol Biotechnilogy*. 2010;26:193-203.
18. Chandrasekaran M, Rajeev Kumar S. Marine microbial enzymes. *Biotechnology*. 2010;9:1-15.
19. Kornbrust BA, Stringer MA, Krebs Lange NE, Hendriksen HV, Whitehurst RJ, van Oort M. Asparaginase-an enzyme for acrylamide reduction in food products. *Enzyme food Technol*. 2010;4:59-87.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Hatanaka T, Usuki H, Arima J, Uesugi Y, Yamamaoto Y, Kumagai Y, et al. Extracellular production and characterrization of two streptomyces L-asparaginase. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;163:836-844.

21. Savitri N, Asthana N, Azmi W. Microbial L-asparaginase: A potent antitumor enzyme. *Indian Journal of Biotechnology*. 2002;2:184-194.

22. Saleem N, Rekha R, Komala M, Ruby S. Production of extracellular anti-leukemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: Purification and characterization. *Tropical Journal of Pharmacology Research*. 2009;8:353-360.

23. Dhevagi P, Poorani E. Isolation and characterization of L-asparaginasefrom marine actinomycetes. *Indian Journal of Biotechnology*. 2006; 5: 514-520.

24. Kumari P, Sankar G, Prabhakar T. L-asparaginase production and molecular identification of marine streptomycete strain WS3/1. *Int J Pharm Biomed Res*. 2011;2:244-249.

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation and identification of L-asparaginase producing actinomycetes from Persian Gulf

F. Izadpanah qeshmi, MSc Student [1] S. Javadpour, PhD [2] K. Malekzadeh, PhD [3] S. Tamadoni Jahromi, PhD [4] M. Rahimzadeh, PhD [5]

MSc Student of Microbiology [1], Jahrom Branch, Azad University, Jahrom, Iran. Associate Professor Department of Microbiology [2], Assistant Professor Department of Genetics [3], Assisstant Professor Department of Biochemistry [5], Molecular Medicine Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran. PhD of Biotechnology [4], Persian Gulf and Oman Ecological Research Instituted

(Received 20 Apr, 2013 Accepted 15 Sep, 2013)

ABSTRACT

Introduction: L-asparaginase is an anti-neoblastic agent used in the chemotherapy of lymphoblastic leukemia. This enzyme is widely distributed among microorganisms, plants and animals, but microorganisms have proved to be a better alternative for L-asparaginase, thus facilitating its large-scale production. Actinomycetes are filamentous, Gram-positive bacteria widely distributed in the marine environment. Secondary metabolites of actinomycetes are important products, especially in food and pharmaceutical industries. The aim of this study was isolation and molecular identification of L-asparaginase producing actinomycetes isolated from Persian Gulf.

Methods: In this study, 60 samples were collected from Persian Gulf in Hormozgan, Iran. Starch Casien Agar medium were used for isolation and purification of actinomycetes. All colonieses were screened for L-asparaginase activity with modified M9 medium. L-asparaginase activity was measured by colorimertic method. Based on the enzyme activity, the strain with high L-asparaginase activity were selected and identified by nucleotide sequencing of 16S *rRNA* gene.

Results: Thirty-two colonies of actinomycetes were obtained from sediment and seawater samples, among which 23 isolates were L-asparaginase producers. The strain *PG08* with 37×10^{-2} IU activity showed the highest activity. Based on the analysis *16S rRNA* gen sequences of this strain was showed maximum similarity to *Streptomyces spp.OS1-33*.

Conclusion: Actinomycetes isolated from Persian Gulf may be potential source of enzyme L-asparaginase, *Streptomyces spp.PG08* with high productivity L-asparaginase can used for chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia.

Correspondence:
S. Javcadpour PhD.
Molecular Medicine Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences.
Bandar Abbas, Iran
Tel:+98 912 3795367
Email:
sedigheh.javadpour@yahoo.com

Key words: Asparaginase - Actinomycetes - *16S rRNA* - Persian Gulf

Archive of SID

www.SID.ir