جداسازی و شناسایی باکتری تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز برون سلولی فاقد خاصیت گلوتامینازی از خلیج فارس

سالومه شعاعی نایینی*[1]، امید رعنایی سیادت[2]، غلامحسین ابراهیمی پور[1]، بیژن بمبئی[3]

دریافت:۱۳۹۶/۰۶/۱۶
پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

چکیده

آنزیم ال-آسپاراژیناز کاربردهای مختلفی در پزشکی و صنایع غذایی دارد. به دلیل ایجاد برخی عوارض جانبی و به دلیل فعالیت نامطلوب گلوتامینازی؛ تلاش برای یافتن منابع میکروبی جدید تولید کننده آنزیم فاقد فعالیت گلوتامینازی ادامه دارد. هدف مطالعه حاضر جداسازی باکتری تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز نوع دوم، فاقد خاصیت گلوتامینازی از آب خلیج فارس و اندازه گیری میزان آنزیم و شرایط افزایش آن می‌باشد. جهت بررسی تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی، باکتری‌های خالص جداسازی شده از آب دریا در محیط- M9 حاوی فنل رد و آسپاراژین کشت داده شد. به منظور بررسی خاصیت گلوتامینازی باکتری‌هایی که تست آسپاراژینازی مثبت داشتند، در محیط M9 دارای گلوتامین و فنل رد کشت داده شد. جهت شناسایی جدایه باکتریایی دارای خاصیت آسپاراژینازی مثبت و خاصیت گلوتامینازی منفی از روش‌های مورفولوژی، بیوشیمیایی و توالی یابی S rDNA ۱۶ استفاده شد. ارزیابی فعالیت آنزیمی ال- آسپاراژیناز طبق روش رنگ سنجی انجام گرفت. تاثیر القای بی هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال- آسپاراژینازیII با کشت در دو شرایط هوادهی و بدون هوادهی بررسی شد. نتایج مطالعه نشان داد که جدایه باکتری، Rhizobium nepotum strain SHN1 می‌باشد. فعالیت آنزیم آسپاراژینازی این باکتری معادل 0.467 U/mL و فعالیت ویژه آنزیمی آن 0.015 IU/mg بدست آمد. این فعالیت در شرایط القا بی هوازی بیش از ۵۰ درصد افزایش داشت. نتایج حاکی از آن بود که فلور میکروبی آبهای خلیج فارس میتواند منبع مناسبی برای تولید آنزیم ال – آسپاراژیناز دارای خاصیت ضد سرطانی و فاقد فعالیت گلوتامینازی باشد.

واژه های کلیدی: آنزیم ال- آسپاراژیناز، Rhizobium nepotum، گلوتامیناز

مقدمه

استفاده از آنزیم‌ها در صنایع پزشکی و داروسازی ازجمله کاربردهای بی‌شمار این بیوکاتالیزورها به شمار می‌آید. کاربرد اصلی

۱- دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران.
* (نویسنده مسؤل: saloomeh.sh@gmail.com)
۲- مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران
۳- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، بزرگراه کرج، تهران

آنزیم درمانی، در درمان سرطان هاست. یکی از آنزیم های نوترکیب درمانی، آنزیم ال- آسپاراژیناز است که برای درمان لوکمیای لنفوبلاستیک حاد بکار میرود. آسپاراژینازکه با نام‌های Crisantaspase، Erwinase و L-asparaginase (LA) نیز شناخته می‌شود، هیدرولیز ال-آسپاراژین را به اسید آسپارتیک و آمونیوم کاتالیز می‌کند. این آنزیم کاربردهای مختلفی بخصوص در پزشکی و در صنایع غذایی دارد (Gokmen & Palazoglu, 2008). آسپاراژیناز اولین آنزیم درمانی با خصوصیت ضد سرطانی می‌باشد که بیش از سه دهه توسط دانشمندان و محققین زیادی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است (Batool *et al.*, 2018). ایزوآنزیم‌های مختلف آسپاراژیناز از طیف گسترده ای از موجودات مانند گیاهان و میکروارگانیسم‌های زمینی و دریایی جدا شده است. دو ایزوآنزیم ال-آسپاراژیناز با نام‌های نوع یک و نوع دو توسط Ohnuma در سال ۱۹۶۷ شناسایی شده است (Campbell *et al.*, 1967). آسپاراژیناز نوع اول و نوع دوم توسط فعالیت آنزیمی که روی هر دو اسید امینه ال-آسپاراژین و ال-گلوتامین دارند مشخص شده‌اند. البته آسپاراژیناز نوع دوم در برابر ال- آسپاراژین عملکرد اختصاصی تری را دارد.

آسپاراژیناز نوع دوم دقیقا خاصیت ضد سرطانی از خود نشان می‌دهد و به عنوان یک داروی شیمی درمانی در بیماری لوسمی حاد لنفوبلاستی یا (Acute Lymphocytic Leukemia) استفاده می شود (Kotzia & Labrou,2009). آسپاراژیناز هایی که به صورت تجاری در دسترس هستند شامل Colapase، Crasnitin، Kidrolase، Espar، Erwinaze PEG - asparaginase، Pegasparagasum می‌باشند. حضور ال-آسپاراژیناز در موجودات مختلفی مانند حیوانات، گیاهان و میکروارگانیزم‌ها (باکتری، قارچ، جلبک، مخمر و اکتینومایست)، بجز انسان‌ها گزارش شده است. با اینکه آنزیم آسپاراژیناز در گروه‌های جانوری و گیاهی مختلف وجود دارد، ولی به دلیل پیچیده بودن روشهای استخراج آنزیم از آنها، منابع ممکن دیگری مانند باکتری، قارچ، جلبک، مخمر و اکتینومایست، توسط محققین مورد بررسی و مطالعات بیشتر قرار گرفته است. تولید آنزیم در مقیاس زیاد از میکروبها ساده‌تر می‌باشد، زیرا روشهای تولید آسانتری دارند (Patro *et al.*, 2011). آنزیم ال-آسپاراژیناز از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی زمینی و دریایی گزارش شده است (Izadpanah Geshmi *et al.*, 2014). به باکتریهای گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی کمتر پرداخته شده است (Savitri & Azmi, 2003). ال-آسپاراژیناز در اغلب باکتریهای گرم منفی به دو نوع اول و دوم تقسیم بندی می‌شود. آسپاراژیناز نوع اول (Type I)، بصورت کمی بیان می‌شود و دارای فعالیت آنزیمی بر روی اسید آمینه آسپاراژین و اسید آمینه گلوتامین می‌باشد. در صورتیکه نوع دوم آسپاراژیناز (Type II) فعالیت اختصاصی بالایی را روی اسید آمینه آسپاراژین دارد و تنها در شرایط بی هوازی القا می‌شود (Sanches *et al.*, 2003). آسپاراژیناز نوع دوم تولید شده توسط *Escherishia coli* و *Erwinia chrysanthemi*، به عنوان یک عامل ضد تومور جهت درمان موثر بیماری ALL، بیش از سه دهه مورد استفاده قرار گرفته است (Borek & Jaskolski, 2001). ال-آسپاراژینازی که از باکتریهای *Escherishia coli* و *Erwinia carotovora* بدست می‌آید در درمان بیماری لوسمی لنفوبلاستیک حاد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Narayana *et al.*, 2008).

قانع وبمبئی در سال ۲۰۰۹ وجود ژن ans B را در چند سویه از باکتری اشرشیاکلی اثبات نمودند (Ghane & Bambaei, 2009). یزدانی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ به جداسازی و شناسایی باکتریهای بومی ایران مولد آنزیم ال- آسپاراژیناز پرداختند و موفق به جداسازی باکتریهای ترموفیل باسیلوس با فعالیت ال-آسپاراژینازی شدند. ایزد پناه قشمی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ به جداسازی و شناسایی مولکولی باکتریهای جنس زوبللا تولید کننده ال-آسپاراژیناز از خلیج فارس اقدام نمودند. قربان موحد و همکاران در سال ۲۰۱۶ اقدام به تولید آنزیم ضد لوسمی ال- آسپاراژیناز توسط سویه‌ای از استافیلوکوکوس جداسازی شده از خاک کشاورزی نموده و شرایط بهینه تولید آنزیم در این سویه را مورد بررسی قرار دادند. در سال ۲۰۱۶، توالی ژن، کلونینگ و بیان ژن نوترکیب *Pseudomonas aeroginusa* سویه SN4 در باکتری اشرشیاکلی توسط بادویی- دلفرد و همکارانش انجام شد. با توجه به کاربرد آسپاراژیناز در زمینه‌های مختلف، بررسی منابع مختلف تولید کننده این آنزیم، شرایط بهینه تولید، تولید پروتئین نوترکیب این آنزیم و تخلیص آن به منظور تولید تجاری این آنزیم در کشور حایز اهمیت می‌باشد. در این راستا مطالعه حاضر به جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری دارای فعالیت ال-آسپاراژینازی و فاقد فعالیت گلوتامینازی پرداخته و فعالیت آنزیم آسپاراژینازی را مورد بررسی قرار داده و تاثیر القای بی‌هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازیII را بررسی نموده است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و جداسازی باکتری‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ انجام گردید. یک و نیم لیتر از آب دریای خلیج فارس در منطقه ساحلی جزیره قشم در شیشه‌ای استریل جمع آوری و به آزمایشگاه اکولوژی دریا دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی منتقل شد. این نمونه آب در یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس) نگهداری شد. جهت بررسی فلور میکروبی با هدف جداسازی باکتریهای تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر از آب را روی محیط کشت M9 تغییر یافته (دارای آسپاراژین ۰/۱درصد) با سمپلر ریخته و با پیپت پاستور استریل خم شده، در روی سطح پتری پخش شد. پس از چند دقیقه که آب کاملا جذب محیط کشت شد پتری به صورت برعکس (در پتری در روی زمین) در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. کلنی‌های زیادی بر روی محیط کشت رشد کردند که پنج کلنی که از سایرین از لحاظ میزان رشد و شکل کلنی قابل تمایز بودند به صورت جداگانه به محیطهای کشت M9 منتقل شد و پس از رشد ۲۴ ساعته آنها، در انکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس از هر کدام کشت سیزده در محیط جدید داده، تا تک کلنی خالص حاصل شود.

بررسی کیفی باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز

باکتریهای جداسازی شده در محیط کشت M9 حاوی معرف رنگی فنل رد ۰/۰۰۹ درصد و آسپاراژین ۰/۱ درصد جهت بررسی

تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی کشت داده شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس وبه مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. لازم به ذکر است که برای این آزمایش کنترل مثبت و کنترل منفی هم در نظر گرفته شد. کنترل مثبت باکتری *Staphylococcus* sp. دارای خاصیت آسپاراژینازی برون سلولی تایید شده در آزمایشگاه باکتری شناسی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی و همچنین پتری حاوی محیط کشت M9 دارای فنل رد و عاری از کشت، جهت بررسی تغییر رنگ محیط کشت در طول زمان به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

بررسی کیفی باکتری از نظر دارا بودن خاصیت گلوتامینازی

جهت بررسی خاصیت گلوتامینازی، از محیط کشت M9 دارای گلوتامین ۰/۱ درصد و معرف رنگی فنل رد ۰/۰۰۹ درصد استفاده شد. باکتریهایی که تست آسپاراژینازی آنها مثبت بود در محیط دارای گلوتامین به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. قابل ذکر است که کنترل مثبت و کنترل منفی برای این آزمون در نظر گرفته شد. پتری حاوی محیط کشت M9 دارای فنل رد و گلوتامین و بدون کشت (تلقیح) باکتری جهت بررسی تغییر رنگ محیط کشت در طول زمان به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و نمونه باکتری باسیلوس جداسازی شده از خاک با فعالیت آسپاراژینازی-گلوتامینازی به عنوان کنترل مثبت این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی باکتری به روش کلاسیک و فیلوژنتیکی

به منظور شناسایی باکتری جداسازی شده از روش‌های مورفولوژی، بیوشیمیایی و توالی یابی ۱۶S rDNA استفاده شد. در بررسی مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم با استفاده ازکشت تازه باکتری در محیط نوترینت آگار و M9 با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی گرم شرکت لاب ترون (LABTRON Co.) صورت گرفت. از *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* به ترتیب به عنوان شاهد گرم منفی و مثبت استفاده گردید. پس از رنگ آمیزی گرم، لام نمونه باکتریایی مورد نظر در زیر میکروسکوپ به منظور مشاهده شکل میکروسکوپی و نوع دیواره (گرم مثبت / گرم منفی)، با بزرگنمایی ۱۰۰۰ بررسی شد. به منظور شناسایی باکتری، چندین تست بیوشیمیایی مختلف شامل تست افتراقی محیط Triple Sugar Iron agar (TSI)، تست افتراقی محیط کشت Simmons Citrate agar (SC)، تست افتراقی محیط کشت Sulfide Indol Motility (SIM)، تست افتراقی اوره آزدر محیط کشت Urea Agar Base، تست افتراقی اکسیداز (Oxidase Test)، تست افتراقی کاتالاز (Catalase Test)، و تست افتراقی متیل رد، تست وگس پرسکوئر (Methyl red Test & Voges-Proskaure Test) و تست اندول (Endol Test) انجام گردید.

شناسایی فیلوژنتیکی باکتری تولید کننده آنزیم L-آسپاراژیناز به روش 16S rDNA انجام شد. تعیین توالی 16S rDNA ابزاری مناسب برای مطالعه فیلوژنتیکی باکتریها به شمار می رود، این توالی در میان اکثر باکتریها حفاظت شده است و هر یک از گونه‌های باکتریایی دارای توالی 16S rDNAمنحصر به خود می‌باشند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت شرکت

سیناژن (Cinna Pure DNA KIT, Cat. No.: PR881613) صورت پذیرفت. این کیت برای استخراج DNA از باکتریهای گرم منفی بکار می‌رود. جهت تکثیر DNA استخراج شده باکتری SHN1 در منطقه 16S rDNA، از دو پرایمر یونیورسال 16S rDNA با نامهای پرایمر فوروارد 27F و پرایمر ریورز 1492R از شرکت ماکروژن (Macrogen Co.) استفاده شد. جهت PCR از مستر میکس لیوفیلیزه (AccuPower®ProFi Taq PCR PreMix) استفاده شده و در ویال مستر میکس لیوفیلیزه ۲۱ ماکرولیتر آب مقطر استریل DNAse free، 1 میکرولیتر پرایمر F۲۷ و ۱ ماکرولیتر پرایمر۱۴۲۹ R و ۲ ماکرولیتر DNA Template اضافه شد. توالی پرایمرهای یونیورسال به شرح زیر می‌باشد :

27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (Lane *et al.* 1991)
1492R: CGGTTACCTTGTTACGACTT (Turner *et al.* 1999)

به منظور تخلیص محصول PCR از ژل از کیت GF-1 GEL DNA RECOVERY (cat#GF-GP-50) از شرکت Vivantis استفاده شد. جهت اطمینان از بازیابی شدن DNA حدود ۴ ماکرولیتر از محصول ریکاوری شده را روی ژل آگارز بارگذاری نموده و در صورت مشاهده باند با غلظت کافی جهت توالی یابی (سکانس) به شرکت فزا پژوه ارسال شد.

بررسی بیوانفورماتیکی توالی 16S rDNA باکتری SHN1

پس از آماده شدن جواب توالی محصول PCR ارسال شده برای شرکت فزا پژوه، دوبار خوانش محصول با دو پرایمر فوروارد و ریورز، با کمک نرم افزار Vector NT1 و بلاست کردن در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) بررسی شد.

سنجش فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز

ارزیابی فعالیت آنزیمی ال-آسپاراژیناز طبق روش رنگ سنجی توصیف شده توسط ایمادا و همکاران در سال ۱۹۷۳ با کمی تغییرات، انجام گرفت. این روش بر اساس مقدار آمونیاک آزاد شده از ال-آسپاراژین در هنگام فعالیت آنزیم می‌باشد (Wriston, 1970). برای این منظور ابتدا ۱ میلی لیتر بافر تریس آمینو متان ۰/۱ مولار و با pH= ۸ را در لوله آزمایش تمیز و یا یک ویال ۲ میلی لیتری ریخته شد. سپس ۵۰۰ ماکرولیتر آسپاراژین ۰/۰۴ مولار به آن اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری نموده تا بافر و سوبسترا گرم شده و به دمای ایده ال فعالیت آنزیمی برسند. محلول رویی یا آنزیم را به لوله اضافه نموده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در زمان‌های متفاوت (۱۵ دقیقه تا ۳ ساعت) گذاشته شد. پس از اتمام زمان مورد نظر، ۲۰۰ ماکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱مولار (Trichloroacetic acid, TCA) به محتویات لوله آزمایش اضافه و بخوبی ورتکس شد. محتویات لوله را در ویال ۲ میلی لیتری ریخته و در دور 13000 g به مدت ۴ دقیقه سانتریوفوژ شد. یک میلی لیتر از مایع رویی را در لوله آزمایش تمیز ریخته، ۳ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰۰ ماکرولیتر نسلر (Nessler) اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداشته شد. جذب نمونه ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر

(Nano Quant, Infinite M200 Pro Tecan) خوانده شد. جهت کنترل منفی (Blank) محلول رویی و بافر و سوبسترا و تری-کلرواستیک اسید را از ابتدا در لوله ریخته و در بقیه موارد مانند پروتوکل عمل شد. در یک حالت دیگر بافر و محلول رویی (آنزیم) را در لوله ریخته و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه داشته (به مدت مورد نظر آزمایش) سپس تری‌کلرواستیک اسید و سوبسترا (آسپاراژین) به لوله اضافه و بقیه مراحل طبق پروتوکل پیش رفت. قابل توجه است که به علت گران بودن آمپول آسپاراژیناز کنترل مثبت برای این آزمایش لحاظ نشد. سپس منحنی استاندارد آمونیوم سولفات رسم گردید.

محاسبه فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز

میزان جذب بدست آمده درمعادل خطی منحنی استاندارد قرار داده شد و میزان میکرومول آمونیوم آزاد شده در اثر فعالیت آنزیمی محاسبه گردید. سپس این عدد در فرمول زیر قرار گرفت و میزان فعالیت آنزیمی با واحد یونیت در هر میلی‌لیتر (IU/mL)محاسبه گردید .

IU/mL= (µmol NH3.a)/(b.t.c)

a : حجم کل مواد اولیه با واحد میلی لیتر (۱میلی لیتر بافر+ ۰/۵ میلی لیتر سوبسترا+ ۰/۵ میلی لیتر سوپر ناتانت + ۰/۲ میلی لیتر تری‌کلرواستیک اسید)

b : حجمی از محلول a که برای مرحله نسلریزاسیون استفاده شد (۱ میلی لیتر)

t : زمان انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس به دقیقه

C : حجم محلول رویی مورد استفاده در واکنش با واحد میلی لیتر (۰/۵ میلی لیتر)

بر اساس این رابطه یک واحد فعالیت آنزیمی معادل مقداری از آنزیم می‌باشد که یک میکرومول آمونیوم را در یک دقیقه کاتالیز (آزاد) می‌کند.

محاسبه فعالیت ویژه آنزیم ال- آسپاراژیناز

فعالیت ویژه آنزیم ال-آسپاراژیناز از رابطه زیر محاسبه شد.

Specific activity= activity (IU/mL)/Protein (mg/mL)

تعیین میزان پروتئین در محلول رویی به روش لوری

برای تعیین میزان پروتئین موجود در محلول رویی از روش پروتئین سنجی لوری (Lowry protein assay) استفاده شد.

تهیه محلول رویی باکتری *Rhizobium nepotum* سویه SHN1

جهت تهیه محلول رویی حاوی آنزیم باکتری *Rhizobium nepotum* سویه SHN1، ابتدا یک تک کلون از باکتری در محیط کشت M9 با کمی تغییرات (۰/۱ درصد آسپاراژین) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با دور شیکر 200 rpm به مدت ۱۶ ساعت (کشت شبانه) کشت داده شد. سپس از پیش کشت آماده شده در ارلن‌هایی با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت M9 با ۰/۱ درصد آسپاراژین، به میزان ۱ میلی لیتر تلقیح شد. محیط جدید تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور شیکر 200 rpm گرماگذاری شد. در فواصل زمانی مختلف OD (Optical Density) با اسپکتوفوتومتر (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instrument Lth.) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و مطابق با هر زمان اندازه‌گیری کدورت از محیط کشت تلقیح شده ۳-۴ میلی لیتر برداشته و در ویال ۲ میلی لیتری ریخته و با دور 13000g و مدت ۱۵ دقیقه سانتریوفوژ شده. محلول رویی به آرامی در ویال جدید ریخته شد.

بررسی تاثیر القای بی‌هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازی II

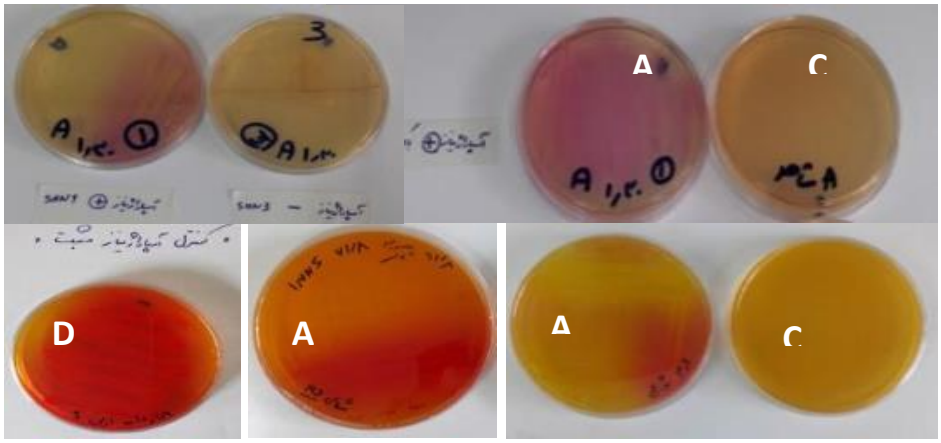
جهت بررسی تاثیر القای بی‌هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازی نوع دوم، باکتری در محیط M9 مایع حاوی ۰/۱ درصد آسپاراژین تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با دور ۲۰۰ rpm گرماگذاری شد. پس از ۱۶ ساعت (over night) یک میلی لیتر از پیش کشت آماده شده، به محیط M9 حاوی ۰/۱ درصد آسپاراژین تلقیح شد و مجددا در شیکر انکوباتور با دما ۳۷ درجه سلسیوس و دور ۲۰۰ rpm قرار گرفته و در فواصل زمانی مختلف از آنها چند میلی لیتر برداشته شد. بخشی از این نمونه را در ویال‌های استریل ریخته و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بطور ساکن قرار داده تا القای بی‌هوازی صورت گیرد. بخش دیگر نمونه ها را جهت تهیه محلول رویی استفاده نموده و همزمان کدورت باکتریها هم اندازه‌گیری شد. القای بی‌هوازی را در زمانهای ۱ ساعت انجام داده و سپس نمونه ها را سانتریوفوژ کرده و محلول رویی حاصله را جهت بررسی فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

جمع‌آوری نمونه و غربال‌گری کیفی باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز

برای جداسازی باکتریهای تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی، از آب جمع آوری شده از خلیج فارس، با ریختن ۱۰۰ میکرولیتر از آب روی محیط کشت M9 تغییر یافته، کلنی‌های زیادی در روی محیط کشت رشد کردند که از ۵ تا از آنها تک کلنی خالص حاصل شد. بدین ترتیب ۵ پلیت کشت باکتریایی خالص و متفاوت از لحاظ شکل ظاهری بدست آمد که به ترتیب SHN1، SHN2، SHN3، SHN4 و SHN5 نامگذاری شدند. این باکتریها در محیط کشت M9 حاوی معرف رنگی فنل رد ۰/۰۰۹ درصد و آسپاراژین ۰/۱ درصد جهت بررسی تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی کشت داده شدند. جدایه‌های

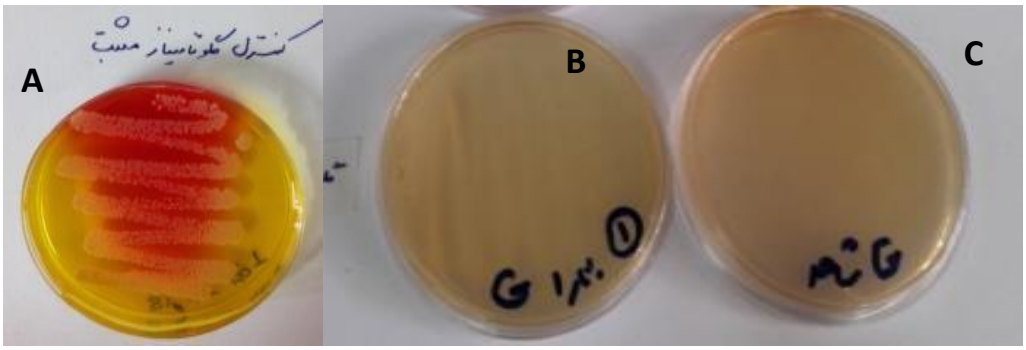
باکتریایی SHN1 وSHN4 تغییر رنگ محیط را با قرمز شدن محیط کشت اطراف رشد کلنی باکتریها پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان دادند. اما سه جدایه دیگر تغییر رنگی نشان ندادند. مجددا ۲۴ ساعت دیگر پتری‌ها در انکوباتور قرار گرفتند تا امکان تولید آنزیم مجددا در هر پنج جدایه باکتری بررسی شود. نتایج تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی در سه جدایه SHN2 ، SHN3 و SHN5 منفی بود و تغییر رنگی مشاهده نشد. SHN1 و SHN4 در اطراف کلنی باکتری محیط قرمز رنگ شد واین تغییر رنگ نشان دهنده قلیایی شدن محیط در اثر تولید آنزیم آسپاراژیناز برون سلولی و تبدیل آسپاراژین محیط به آمونیوم و آسپاراتات می‌باشد. آمونیوم آزاد شده نیز باعث قلیایی شدن و تغییر رنگ محیط می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی کیفی فعالیت آسپاراژینازی جدایه SHN1. A: فعالیت آسپاراژینازی مثبت جدایه SHN1، B: فعالیت آسپاراژینازی منفی (عدم تولید آنزیم آسپاراژیناز) جدایه SHN3، C: کنترل منفی، محیط کشت M9 تغییر یافته با ۰/۰۰۹ درصد فنول رد بدون کشت باکتری، D: کنترل مثبت، کشت باکتری *Staphylococcus* sp. دارای فعالیت آنزیم آسپاراژینازی.

بررسی کیفی باکتری از نظر دارا بودن خاصیت گلوتامینازی

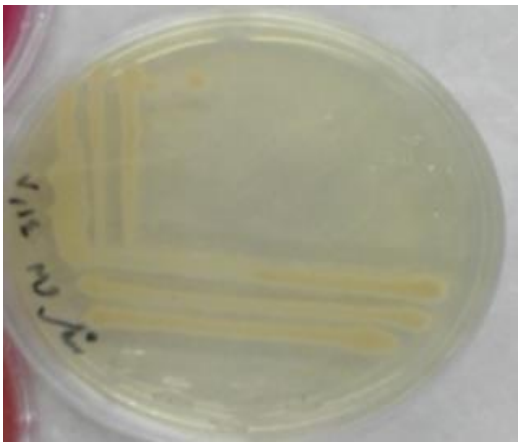
جهت بررسی خاصیت گلوتامینازی این دو جدایه SHN1 و SHN4، از محیط کشت M9 دارای گلوتامین ۰/۱ درصد و معرف رنگی فنل رد ۰/۰۰۹ درصد استفاده شد. در محیط تغییر رنگی منوط بر تولید آنزیم گلوتامیناز برون سلولی و تبدیل گلوتامین به گلوتامات و آمونیوم، مشاهده نشد. پس این دو جدایه آسپاراژیناز مثبت و گلوتامیناز منفی در نظر گرفته شدند (شکل ۲). با توجه به اینکه تغییر رنگ و میزان قرمز شدن محیط کشت در جدایه باکتری SHN1 از SHN4 بیشتر و قوی‌تر بود، لذا احتمال تولید آنزیم آسپاراژیناز بیشتر در جدایه SHN1 نسبت به SHN4، آن جدایه را تنها کاندید این پروژه، جهت بررسی فعالیت آسپاراژینازی و شناسایی آن باکتری مشخص نمود.



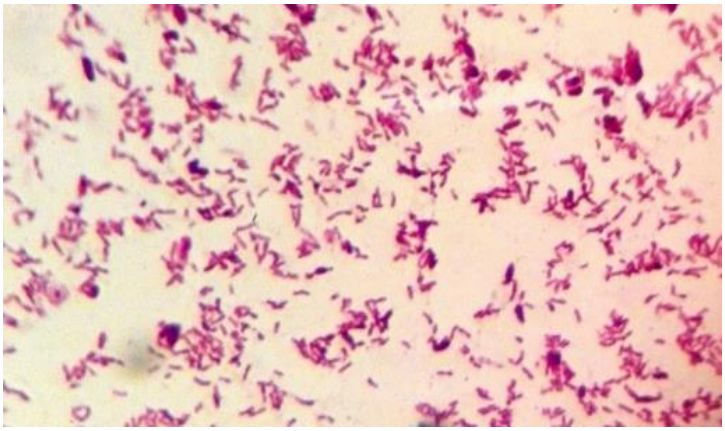
شکل ۲: بررسی کیفی فعالیت گلوتامینازی جدایه باکتریایی SHN1. A: فعالیت گلوتامینازی منفی جدایه SHN1 (فاقد فعالیت گلوتامینازی)، B: کنترل منفی، محیط کشت M9 تغییر یافته حاوی ۰/۱ درصد گلوتامین با ۰/۰۰۹ درصد فنول رد بدون کشت باکتری، C: کنترل مثبت، کشت باکتریایی (جدایه شناسایی نشده) دارای فعالیت آنزیم گلوتامینازی.

مشاهده میکروسکوپی و تست گرم (رنگ آمیزی گرم)

باکتری SHN1 در طی ۲۴ ساعت گرماگذاری در محیط M9 تغییر یافته در دمای ۳۰ درجه نشان داد که کلنی باکتری به رنگ کرم کمی مایل به زرد و لعابی شکل می‌باشد (شکل ۳). همچنین با رنگ آمیزی گرم و مشاهده زیر میکروسکوب نوری باکتری SHN1 به شکل باسیل و گرم منفی مشاهده گردید (شکل ۴).



شکل ۳: نمایی از کشت جدایه باکتری SHN1 در محیط M9 تغییر یافته.



شکل ۴: تصویر میکروسکوپی جدایه باکتری SHN1. باکتری باسیلی شکل و گرم منفی در تصویر مشهود است.

بررسی برخی تست های بیوشیمیایی باکتری SHN1

نتایج تست های بیوشیمیایی به شرح جدول ۱ آورده شده است.

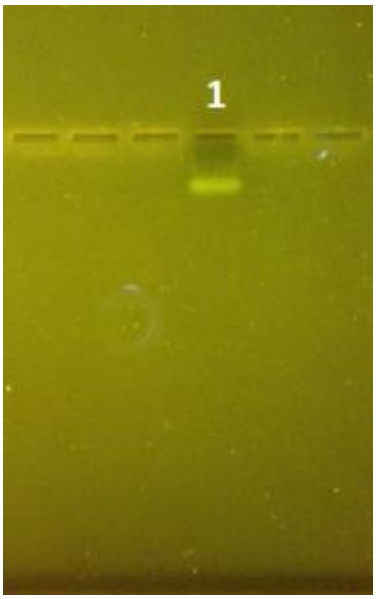
جدول ۱:تست بیوشیمیایی جدایه باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1

-	**تست TSI**
-	**تست سیمون سیترات**
-	Motility
-	H_2S
-	Indol
+	Urease
-	Metyle red
+	Oxidase
+	Katalase
-	VP

شناسایی فیلوژنتیکی باکتری تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز به روش 16 SrDNA

استخراج DNA ژنومی

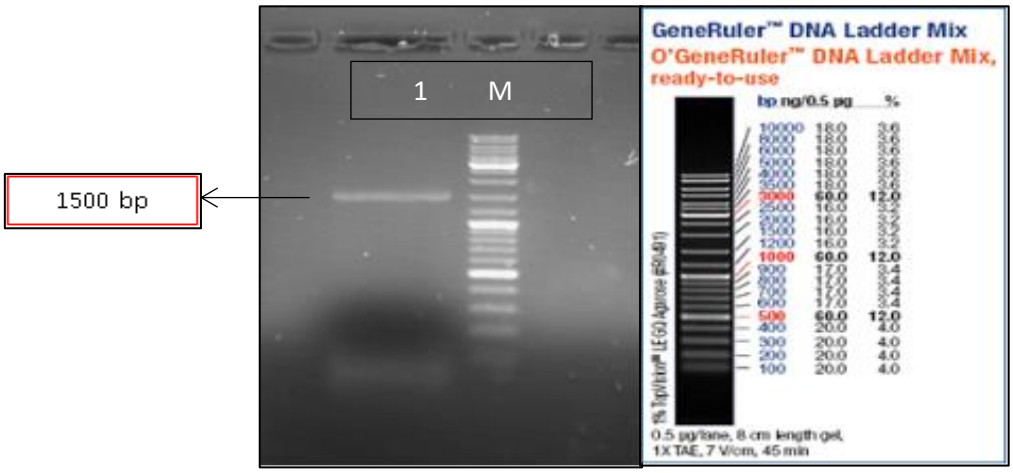
استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA باکتریهای گرم منفی انجام شد. جهت اطمینان از استخراج، محصول روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد (شکل ۵).



شکل ۵: نتیجه استخراج DNA جدایه باکتری SHN1 روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱ باند DNA استخراج شده رانشان می-دهد.

تکثیر DNA استخراج شده باکتری SHN1 در منطقه 16S rRNA (PCR)

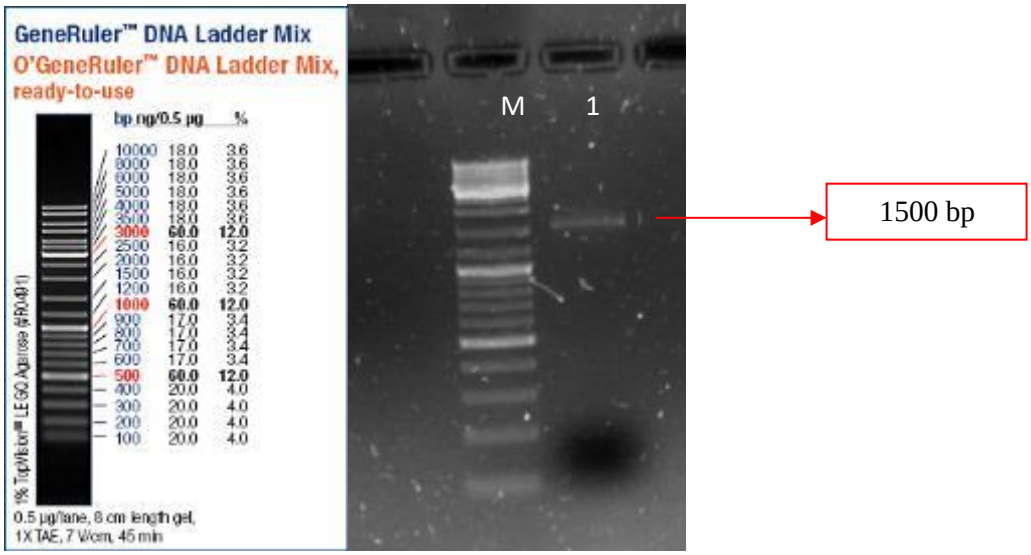
پس از استخراج DNA ژنوم باکتری و انجام PCR جهت تکثیر قطعه 16S rDNA، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. در نتیجه آن یک باند در نزدیکی محل ۱۵۰۰bp در مقایسه با مارکر kb ۱مشاهده شد که حاکی از درست بودن واکنش تکثیر 16S rDNA بود (شکل ۶).



شکل ٦: باند 16S rDNA حاصل از PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪. چاهک M نشانگر DNA (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)، چاهک ۱ باند نامبرده به طول ۱۵۰۰ جفت باز و چاهک سوم کنترل PCR بدون DNA الگو می باشد.

تخلیص محصول PCR از ژل

پس از ریکاوری محصول PCR از روی ژل آگارز، نتیجه خالص سازی مجددا بر روی ژل آگارز کنترل و باند ۱۵۰۰ جفت بازی مشاهده گردید (شکل ۷).



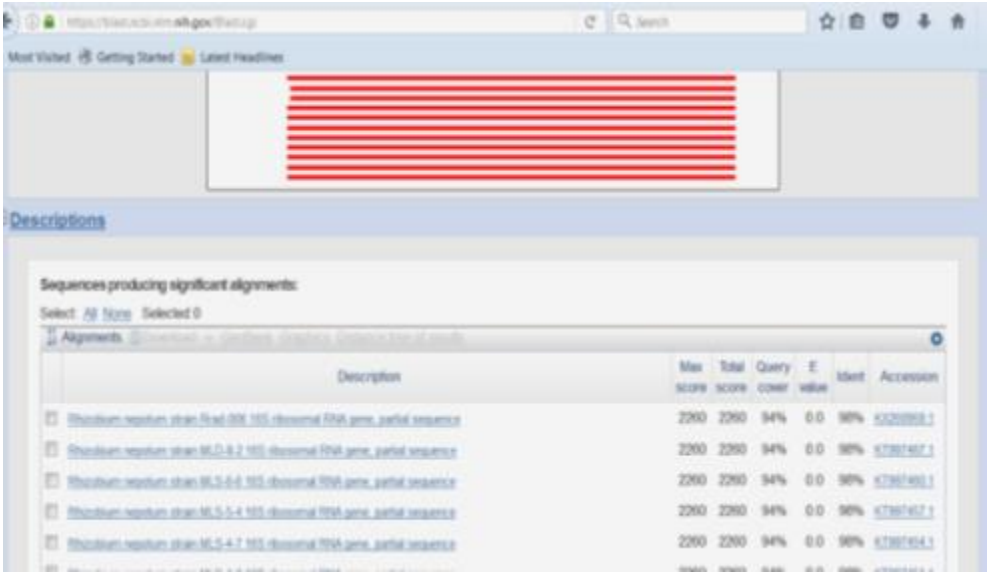
شکل ۷: نتیجه‌ی خالص‌سازی قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی باند 16S rRNA جدایه SHN1 از روی ژل آگارز. چاهک M نشانگر DNA (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas) چاهک ۱ باند تخلیص شده از روی ژل می‌باشد.

بررسی بیوانفورماتیکی توالی 16S rRNA باکتری SHN1

با تعیین توالی محصول PCR، ۷۶۰ نوکلئوتید با پرایمر فوروارد (27F) و حدود ۹۲۰ نوکلئوتید با پرایمر ریورز (1492R) خوانش شد. این توالی‌ها با کمک نرم افزار Vector NT1 متصل و تصحیح شده (Contig) و سپس با BLAST در NCBI نشان داد که باکتری جدا شده ۹۸٪ با سویه *Rhizobium nepotum* همولوژی دارد (شکل ۸). توالی 16S rDNA باکتری SHN1 جداسازی شده در این پژوهش در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: توالی 16S rDNA باکتری SHN1 جداسازی شده در این پژوهش.

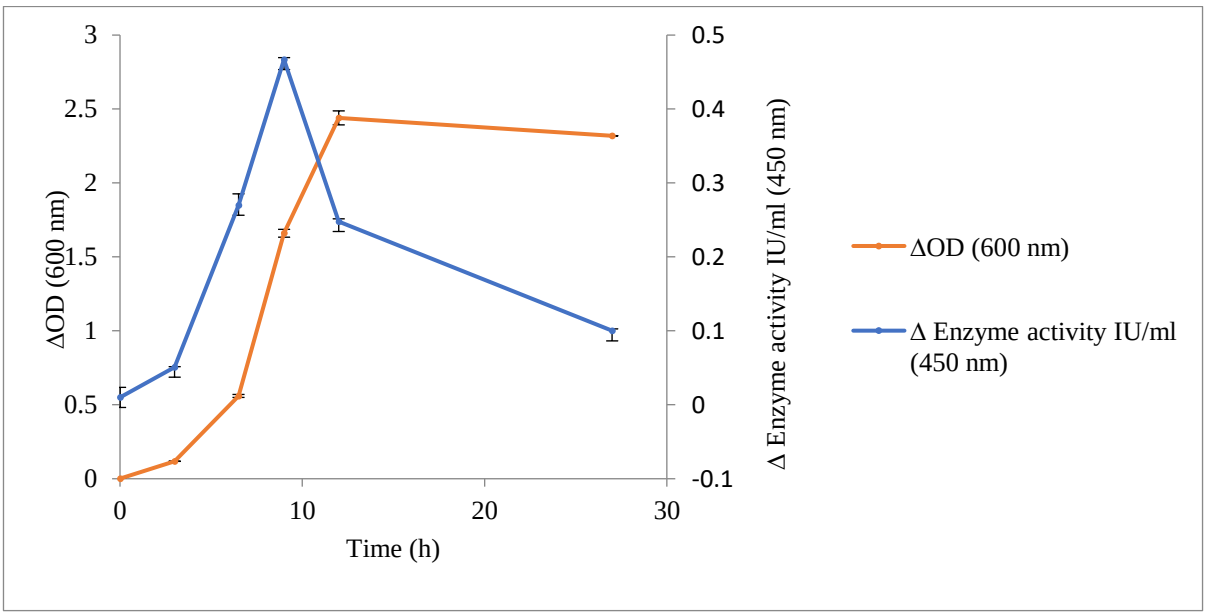
5′…acatactttaacattttgggttagcgggtttccaagctggttaacggagtaccttcgggtaaaaccaact
cccatggggtgacgggcggtgtgtacaaggcccgggaacgtattcaccgcagcatgctgatctgcgatta
ctagcgattccaacttcatgcactcgagttgcagagtgcaatccgaactgagatggcttttggagattag
ctcgacatcgctgtctcgctgcccactgtcaccaccattgtagcacgtgtgtagcccagcccgtaagggc
catgaggacttgacgtcatccccaccttcctctcggcttatcaccggcagtccccttagagtgcccaact
aaatgctggcaactaagggcgagggttgcgctcgttgcgggacttaacccaacatctcacgacacgagct
gacgacagccatgcagcacctgttctggggccagcctaactgaaggacaatgtctccactgcccaaaccc
cgaatgtcaagagctggtaaggttctgcgcgttgcttcgaattaaaccacatgctccaccgcttgtgcgg
gcccccgtcaattcctttgagttttaatcttgcgaccgtactccccaggcggaatgtttaatgcgttagc
tgcgccaccgaacagtatactgcccgacggctaacattcatcgtttacggcgtggactaccagggtatct
aatccctgtatgctctcccacgctttcgcacctcagcgtcagtaatgggaccagtaagccgccttcgcca
ctggtgttcctccgaatatctacgaatttcacctctacactcggaattccacttacctctcccatactca
atgatacccagtatcaaaggcagttccagagttgagctctgggatttcacccctggacttaaatatccgc
ctacgtgcgctttacgcccagtaattccgaacaacgctagcccccttcgtattaccgcggctgctggcac
gaagttagccggggcttcttctccggataccgtcattatcttctccggtgaaagagctttacaaccctaa
ggccttcatcactcacgcggcatggctggatcaggcttgcgcccattgtccaatattccccactgctgcc
tcccgtaggagtttgggccgtgtctcagtcccaatgtggctgatcatcctctcagaccagctatggatcg
tcgccttggtaggcctttaccccaccaactagctaatccaacgcgggctcatcataccccgataaatctt
tcccccgcccgggaagtatgcggtattaattccagtttcccggagctattccgcatttttttcttaattcc
cacgcgttactcacccgtatgccactccccttgcggggcgtggtaacaaccaagttaaataataaaaatg
tctaac…3′



شکل ۸: نتایج حاصل از بررسی همولوژی نوکلئوتیدهای تعیین توالی شده 16S rDNA باکتری SHN1 در NCBI. این جدایه همولوژی ۹۸٪ با باکتری *Rhizobium nepotum* نشان می‌دهد.

فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز

فعالیت آنزیمی جدایه SHN1 در محیط مایع M9 تغییر یافته در دور شیکر ۱۸۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سلسیوس از زمان تلقیح باکتری و به صورت همزمان با اندازه‌گیری تغییرات فاز رشدی باکتری، اندازه‌گیری شد و نتایج در شکل ۹ آورده شده است. این نتایج بیانگر این است که باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1 بیشترین فعالیت آنزیمی را در فاز لگاریتمی (ΔOD= 1.66) و به میزان ۰/۴۶۷ IU/mL داشته است.

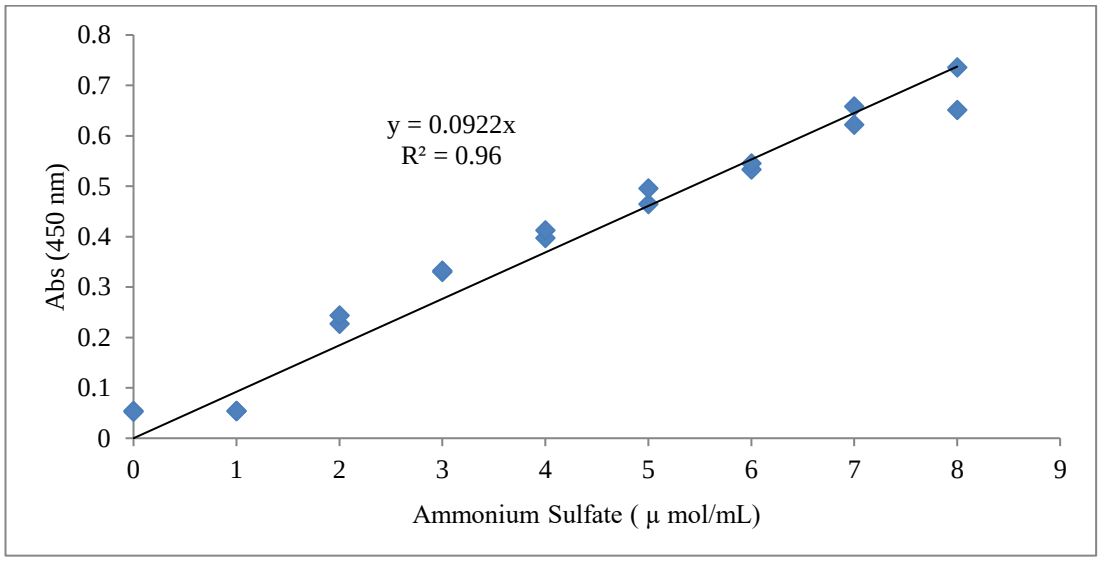


شکل ۹: بررسی ارتباط فعالیت آنزیمی و کدورت، در طول زمان تلقیح جدایه باکتری SHN1 در محیط کشت M9 تغییر یافته با ۱٪گلوکز، ۰/۱ ٪ آسپاراژین، دور شیکر rpm ۱۸۰و دمای ۳۷ درجه سلسیوس. بارها نمایانگر انحراف معیار (SE) می‌باشند.

منحنی استاندارد آمونیوم سولفات

به منظور محاسبه فعالیت آنزیمی و تعیین میزان میکرومول آمونیوم آزاد شده در طی واکنش آنزیمی این جدایه، منحنی استاندارد با معادله خطی زیر بدست آمد. $Y= 0.0922x, R^2= 0.96$

در این رابطه Y برابر با میزان جذب خوانده شده با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر و X برابر با میزان میکرومول آمونیوم در میلی‌لیتر می‌باشد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: منحنی استاندارد آمونیوم سولفات. این منحنی ارتباط جذب خوانده شده توسط دستگاه الایزا ریدر را با میزان میکرومول آمونیوم نشان می‌دهد.

فعالیت ویژه آنزیم ال-آسپاراژیناز

میزان فعالیت ویژه آنزیم ال- آسپاراژیناز در جدایه *Rhizobium nepotum* SHN1 محاسبه و به میزان ۰/۰۱۵ IU/mg بدست آمد.

میزان پروتئین در محلول رویی به روش لوری

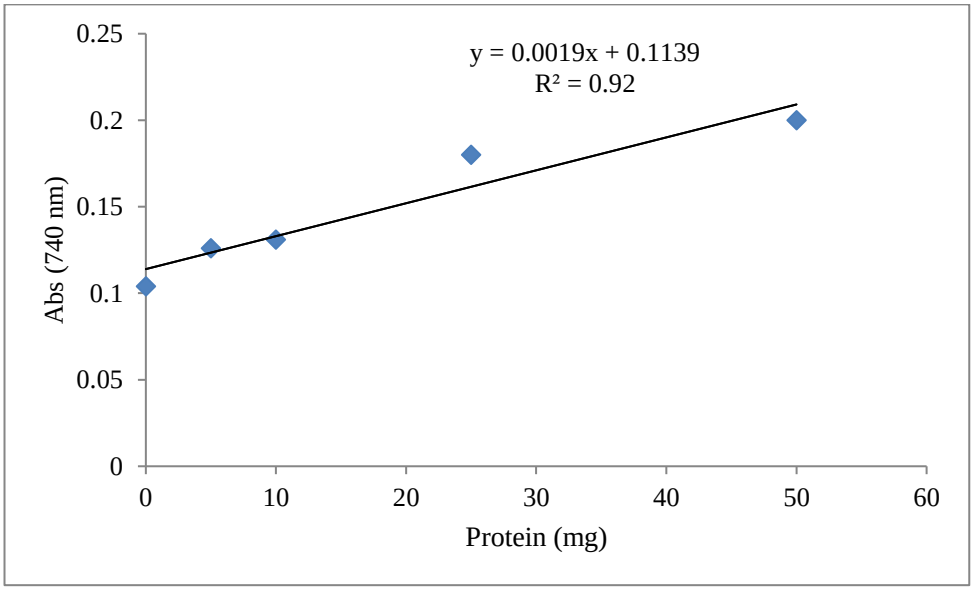
میزان پروتئین موجود در محلول رویی جدایه *Rhizobium nepotum* SHN1 در فاز لگاریتمی که بیشترین فعایت آنزیمی را نشان داه بود، با روش پروتئین سنجی لوری و با استفاده از منحنی استاندارد پروتئین سنجی ۳۰/۵۲ میلی گرم پروتئین در میلی‌لیتر محاسبه شد.

منحنی استاندارد پروتئین سنجی با روش لوری

به منظور محاسبه میزان پروتئین موجود در محلول رویی باکتری با روش پروتئین سنجی لوری، منحنی استاندارد با معادله خطی زیر بدست آمد.

$$Y= 0.0019x+ 0.1139, R^2= 0.92$$

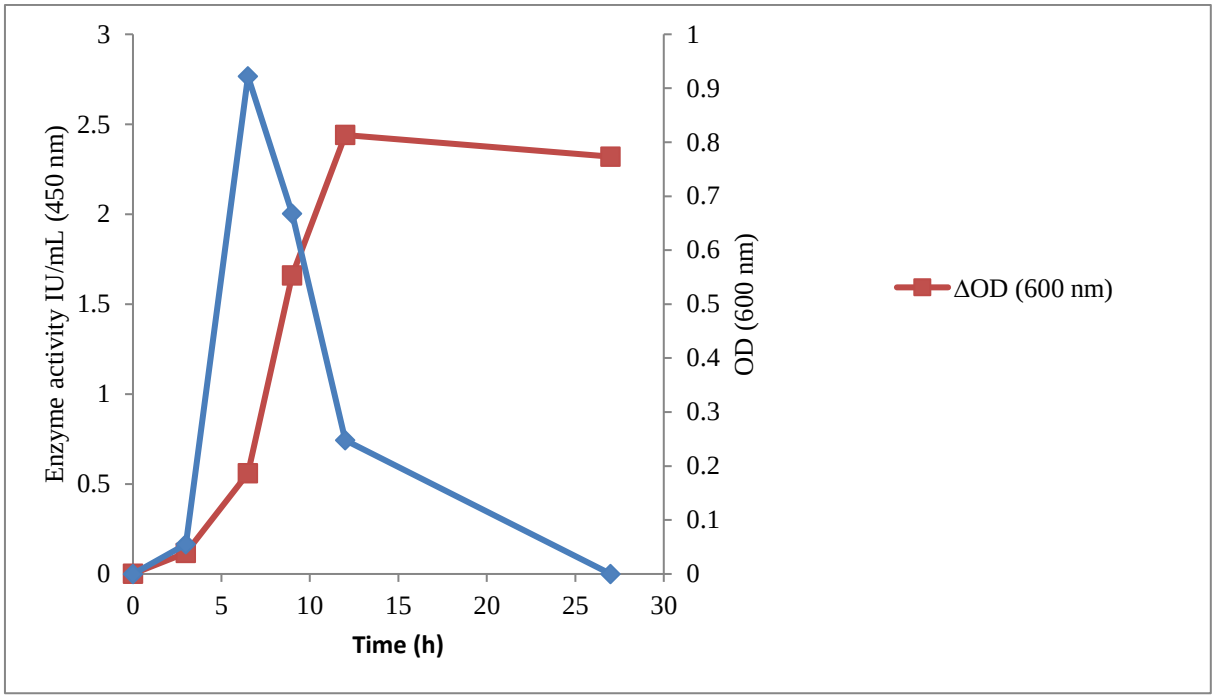
در این رابطه Y برابر با میزان جذب خوانده شده با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۷۴۰ نانومتر و X برابر با میزان پروتئین بر حسب میلی گرم می‌باشد (شکل ۱۱).



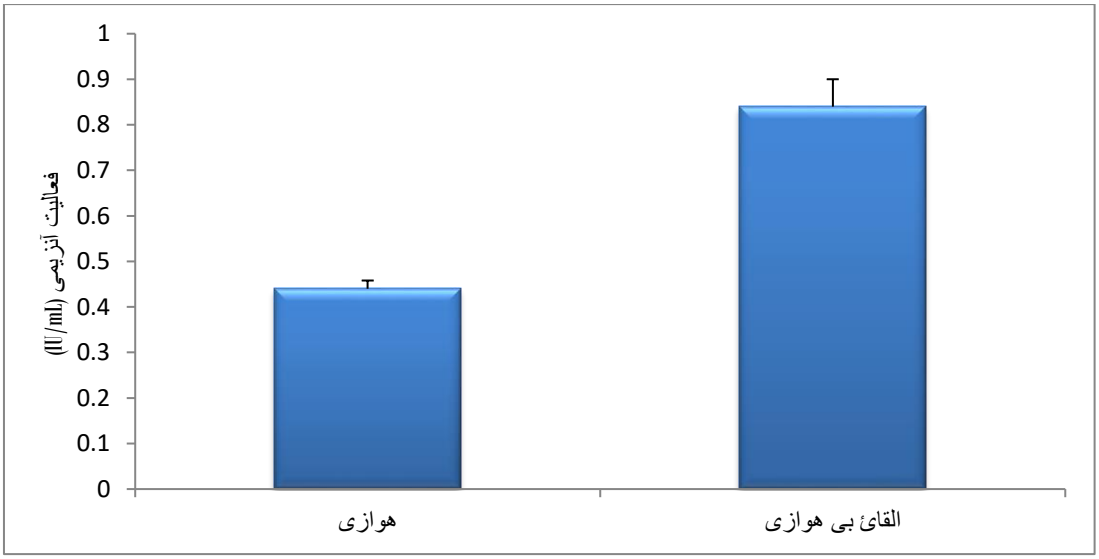
شکل ۱۱: منحنی استاندارد پروتئین سنجی به روش لوری. این منحنی ارتباط جذب خوانده شده توسط دستگاه الایزا ریدر را با میزان میلی گرم پروتئین نشان می‌دهد.

تاثیر القای بی‌هوازی در میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژینازی II

بررسی فعالیت آنزیمی جدایه SHN1 در محیط مایع M9 تغییر یافته در شرایط القا بی‌هوازی به مدت ۱ ساعت نشان داد که باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1 بیشترین فعالیت آنزیمی را در فاز لگاریتمی (OD= 1.66) در شرایط بی‌هوازی ۱ ساعته به میزان ۰/۹۲۲ IU/mL دارا می‌باشد (شکل۱۲). همچنین تفاوت در میزان فعالیت آنزیمی در شرایط هوازی و شرایط القا بی‌هوازی به دلیل عدم پیروی داده‌ها از توزیع نرمال (P-Value Shapiro-Wilk = 0.01) توسط آزمون غیر پارامتریک Mann-Whitney در نرم افزار SPSS v19 بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیمی در شرایط القا بی‌هوازی با میانگین (±نSE) ۰/۰۰۶ ۰/۰۱۸ (± SE) ۴۴/۰± به طور معنی داری بیش از فعالیت آنزیمی در شرایط هوازی با میانگین ۸۴/۰± می‌باشد (Mann – Whitney U = 0.000, Z= -1.96, P= 0.05) (شکل۱۳).



شکل ۱۲: فعالیت آنزیمی و OD (600 nm) جدایه باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1 در شرایط القا بی‌هوازی.



شکل ۱۳: بررسی فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز II در شرایط هوازی و شرایط القا بی‌هوازی (۱ ساعته) در جدایه باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1.

بحث

ال-آسپاراژینازها (L-asparagine amidohydrolase E.C.3.5.1.1) آنزیم‌هایی هستند که هیدرولیز ال-آسپاراژین به ال-آسپاراتات و آمونیوم را کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها توسط تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها مانند *Escherichia coli* (Campbell *et al.*, 1969,1967)، *Erwinia cartovora* (Maladkar *et al.*, 1993)، *Enterobacter aerogenes* (Mukherjee *et al.*, 2000)،

Vibrio Succinogenes ،(Kil *et al.*, 1995) *Candida utilis* ،(Mesas *et al.*, 1990) *Corynebacterium glutamicum* (Ortuno – Olea *et al.*, 2000) *Rhizobium etli* و (Pritsa *et al.*, 2001) *Thermus thermophilus* ،(Lubcowski *et al.*, 2003) و ... تولید می‌شوند. کاربرد این آنزیم در علوم پزشکی به عنوان داروی ضد سرطان و در صنایع غذایی به عنوان جلوگیری کننده از تشکیل ماده سرطان زا اکریل‌آمید، سبب مطالعات گسترده‌ای در طی چندین دهه بر روی این آنزیم (منابع تولید آن، مکانیسم عمل آنزیم، ساختار آنزیم، خالص‌سازی آنزیم، عوارض جانبی آنزیم در درمان و پیدا کردن منابع تولید آنزیم با عوارض جانبی کمتر، کلون نمودن ژن آنزیم، بیان پروتئین ال-آسپاراژیناز در مقیاس کوچک و بزرگ) شده است که نهایتا در زمینه درمان بتوانند به تولید داروی موثرتر با حداقل عوارض جانبی و قیمت ارزانتر برسند و در سایر صنایع هم به حداکثر استفاده از آن نایل شوند. این مهم ما را نیز به تلاش جهت پیدا کردن منبع باکتریایی تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز نوع دوم با خصوصیت گلوتامینازی کمتر یا فاقد خاصیت گلوتامینازی آنزیم آسپاراژیناز به منظور کاهش عوارض جانبی این آنزیم، برانگیخت. باکتری جداسازی و خالص سازی شده از آب دریای خلیج فارس در منطقه قشم دارای خاصیت آسپاراژینازی نسبتا خوب و فاقد فعالیت گلوتامینازی بود. این باکتری با شناسایی مولکولی متعلق به خانواده *Rhizobiaceae* و تا ۹۸ درصد متعلق به گونه *Rhizobium nepotum* می‌باشد. پیش از بدست آمدن نتایج شناسایی مولکولی، برخی مطالعات بیوشیمیایی روی این باکتری انجام شد که با بسیاری از ویژگی های بیوشیمیایی که شهزاد و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی باکتری *Rhizobium meliloti* انجام داده بودند، هم‌خوانی داشت (کاتالاز مثبت، متیل رد منفی، وی پی منفی، اندول منفی، سیمون سترات منفی، تولید H_2S منفی). مطالعات رزاهون و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز ساختار میله‌ای شکل، گرم منفی، بدون توان حرکت را در *Rhizobium papuli* بیان نموده که در این خصوصیات ذکر شده با باکتری مورد مطالعه ما از نظر جنس هم‌خوانی داشت. همچنین Ghorpade و Gupta در سال ۲۰۱۶ نتایجی از تست‌های بیوشیمیایی *Rhizobium nepotum* را ارائه دادند که با تمام تست‌های بیوشیمیایی انجام شده بر روی جدایه باکتری این مطالعه مطابقت داشته است. بر این اساس شناسایی این جدایه در حد گونه*Rhizobium nepotum* با اطمینان بیشتری مورد تائید قرار گرفت و چون این گونه از آب‌های ساحلی خلیج فارس جداسازی شد با عنوان strain SHN1 نامگذاری شد. جداسازی جنس *Rhizobium* از آب دریای شمالی چین نیز توسط لیو و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش شده است که این نتیجه، امکان زیست باکتری مورد مطالعه ما را در آب دریای جنوب ایران تا حدودی مورد تائید قرار می دهد، البته بررسی‌های بیشتر در رابطه با تحمل شوری جدایه مورد مطالعه ما، مورد نیاز است، همچنین لازم به ذکر است که جدایه‌هایی از جنس *Rhizobium* مقاوم به شوری هم توسط مناسری و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش شده است.

در این پژوهش جهت غربالگری کیفی باکتریها از نظر تولید آنزیم، سویه‌ها بر روی محیط M9 حاوی فنل رد کشت داده شدند. فنل رد در pH اسیدی زرد رنگ و در pH قلیایی قرمز رنگ می‌شود. اگر باکتری مولد آنزیم باشد با تبدیل آسپاراژین

به آمونیاک باعث قلیایی شدن pH محیط و در نتیجه باعث قرمز شدن رنگ آن می‌شود. پورانی و همکاران در سال ۲۰۰۹ و باشا و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز از این محیط جهت غربالگری اولیه میکروارگانیسم‌ها استفاده کردند. مقدار آنزیم تولیدی در این پژوهش بر اساس روش نسلریزاسیون (Nesslerization method) بررسی گردید. آنزیم آسپاراژیناز با اثر بر روی سوبسترای خود (آسپاراژین) اسید آسپارتیک و آمونیاک تولید می‌کند. معرف نسلر(Nessler reagent) با یونهای آمونیوم آزاد شده در محیط، واکنش داده و باعث زرد شدن رنگ محلول می‌شود. سپس جذب نمونه ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

از آنجایی که آنزیم آسپاراژیناز II حاوی پپتید نشانه بوده و وارد فضای پریپلاسمی می‌شود (Mathews & Browm, 1974)، در این پژوهش محتویات پریپلاسمی و نیز محیط کشت فاقد باکتری (محلول رویی) جهت بررسی آسپاراژیناز استفاده شد. فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در عصاره پریپلاسمی (محلول رویی) سویه مورد آزمایش با روش نسلر ۰/۴۶۷ IU/mL بود. ایزد پناه قشمی و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت آنزیمی اسینتو باکتر سویه PF-14 جدا شده از آب خلیج فارس را ۰/۰۷ IU/mL و در سویه سودوموناس جدا شده از آب خلیج فارس را ۶/۱ IU/mL گزارش نمودند. بمبئی و قانع در سال ۲۰۰۹ فعالیت آنزیمی آسپاراژیناز در عصاره پریپلاسمی سویه های (*E. coli* (DH5α, LAB, K12,TOPTEN، ۳/۶ unit/mL گزارش دادند.

گزارشی در رابطه با میزان فعالیت آنزیم ال- آسپاراژینازی II در باکتری *Rhizobium nepotum* در سایر نقاط دنیا مشاهده نشد. این فعالیت آنزیمی بدست آمده جدایه مورد تحقیق (۰/۴۶۷ IU/mL) قطعا با بهینه سازی شرایط برای تولید آنزیم (دما، pH، منابع کربن و نیتروژن مناسب، میزان هوادهی و ...) ، افزایش چشمگیر تری نشان خواهد داد. با مقایسه اعداد بدست آمده برای فعالیت آنزیم آسپاراژیناز می توان گفت، دلایل متفاوتی برای این اختلاف وجود دارد از جمله نوع باکتری، معرف نسلر، منحنی استاندارد، مقدار آنزیم مورد سنجش، زمان انکوباسیون و مقدار معرف نسلر. همچنین در صورتی می توان یک آنزیم را برای کارهای دارویی و پزشکی استفاده کرد که توانایی آن آنزیم در از بین بردن سلول های سرطانی پس از بررسی های مختلف و انجام مطالعات بر روی حیوانات آزمایشگاهی در نهایت خط سلولی تایید شود و در نهایت توسط FDA تایید گردد.

افزایش تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز در شرایط القای بی‌هوازی تا حدود ۲ برابر شرایط هوازی در جدایه باکتری *Rhizobium nepotum* strain SHN1 مشاهده شد. شوارتز و سداردر سال ۱۹۶۸ از افزایش تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز II در باکتری *E. coli* با القا شرایط بی‌هوازی، گزارش دادند. همچنین بیلیموریا در سال ۱۹۶۹ در رابطه با تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز II در *E. coli*، پی برد که هوادهی آرام شرایط مناسبی را برای رشد خوب باکتری و میزان بالای آنزیم فراهم می‌کند، در حالیکه هوادهی قوی رشد خوب باکتری را سبب می‌شود ولی کاهش تولید آنزیم را به همراه دارد. به عبارتی هوادهی و تکان دادن ارلن حاوی کشت باکتری‌ها، عوامل تعیین کننده‌ای در میزان تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز هستند. مطالعات انجام شده توسط شوارتز و همکاران (۱۹۶۶) نشان داد که تولید آنزیم در محیط کشت تنها در صورت تغییر شرایط از حالت هوازی به بی‌هوازی امکان پذیر است. در تحقیق حاضر با القا شرایط بی‌هوازی میزان بیان آسپاراژیناز در محلول رویی افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت. دلیل

این امر نیز مربوط به پروموتور ژن ansB است. این امر نیز مربوط به پروموتور ژن ansB است. این پروموتور در شرایط هوازی توسط مهار کننده حساس به اکسیژن غیرفعال است. در شرایط کمبود اکسیژن این مهارکننده از پروموتور جدا شده و آنزیم RNA پلی‌مراز می‌تواند ژن را رونویسی کرده و به کمک ریبوزوم‌ها منجر به تولید پروتئین شود. از آنجایی که باکتری *Rhizobium nepotum* هوازی اجباری بوده و بهترین شرایط رشد آن در حالتی است که اکسیژن محلول در محیط کشت در حد مناسبی جهت تولید توده سلولی باشد، این امر موجب تضاد درونی می‌گردد. یعنی تولید آنزیم، شرایط بی هوازی را می‌طلبد و تولید توده سلولی نیاز به هوادهی دارد. یکی از راه‌حل‌های انجام شده، دو فازی باکتری‌هاست. در این روش ابتدا باکتری در شرایط هوازی رشد داده می‌شود تا توده سلولی به میزان مناسبی برسد و سپس اقدام به القا و تغییر شرایط از هوازی به بی‌هوازی می‌شود تا آنزیم آسپاراژیناز با میزان بیشتری بیان شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر محمدرضا شکری بدلیل راهنمایی در انجام آنالیزهای آماری و آقای دکتر داریوش مینایی تهرانی بدلیل راهنمایی در انجام آزمایشات بیوشیمیایی و خانم زهرا جاویدان به موجب مساعدت در استفاده از مواد و تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Badoei-Dalfard, A., Karami, Z. and Ramezani–pour, N. (2016) Isolation and identification of L-asparaginase producing Erwinia strains which isolated from potato farms. Biological Journal of Microorganism, 5(18): 55-67.

Basha, N.S., Rekha, R., Komala, M. and Ruby, S. (2009) Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marin actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: purification and characterization. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 8(4): 353-360.

Batool, T., Makky, E.A., Jalal, M. and Yussof, M.M. (2016) A comprehensive review on L- Asparaginase and its applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, 178(5): 900-923.

Bilimoria, M.H. (1969) Conditions for the production of L-asparaginase 2 by coliform bacteria. Applied Microbiology, 18: 1025-1030.

Borek, D. and Jaskolski, M. (2001) Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. Acta Biochimica Polonica, 48: 893-902.

Campbell, H.A., Mashburn, L.T., Boyse, E.A. and Old, L.J. (1967) Two L-asparaginases from Escherichia coli B. their separation, purification and antitumor activity. Biochemistry, 6: 721-727.

Cedar, H. and Schwartz, J.H. (1968) Production of L-asparaginase II by Escherichia coli. Journal of Bacteriology, 96: 2043-2048.

Ghane, M., Bambaei, B. (2009) Screening of Esherichia coli strains for asparaginase ii production. Biological Sciences (Danish-I Zisti-I Iran), 3(4): 47-54.

Ghorbanmovahed, M., Ebrahimipour, G., Akhtari, J. and Marzban, A. (2015) Production of anti-leukemia L-Asparaginase by a strain of Staphylococcus isolated from agricultural soil. Journal of Mazandaran Univiversity of Medical Science, 25(132): 1-12.

Ghorpade, V.M. and Gupta, S.G. (2016) Siderophore production by Rhizobium nepotumisolated from stem nodule of Aeschynomene indica. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, 3(7): 105-108.

Gokmen, V. and Palazoglu, T. K. (2008) Acrylamide formation in foods during thermal processing with a focus on frying. Food and Bioprocess Technology, 1: 35-42.

Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K. and Isono, M. (1973) Asparaginase and glutaminase activities of microorganism. Journal of General Microbiology, 76(1): 85-99.

Izadpanah Qeshmi, F., Javadpour, S., Malekzadeh, K., Tamadoni Jahromi, S. and Rahimzadeh, M. (2004) Persian Gulf is a bioresource of potent L-Asparaginase producing bacteria: Isolation & molecular differentiating. International Journal of Environmental Research, 8(3): 813-818.

Kil, J.O., Kim, G.N. and Park, I. (1995) Extraction of extracellular L-asparaginase from Candida utilis. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59: 749-750.

Kotzia, G.A. and Labrou, N.E. (2009) Engineering thermal stability of l-asparaginase by in vitro directed evolution. FEBS Journal, 276: 1750–1761.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing pp. 115-175. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons, New York, NY.

Liu, Y., Wang, R.P., Ren, C., Lai, Q.L. and Zeng, R.Y. (2015) Rhizobium marinum sp. nov., a malachite-green-tolerant bacterium isolated from seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65(12): 4449-4454.

Lubkowski, J., Dauter, M., Aghaiypour, K., Wlodawer, A. and Dauter, Z. (2003) Atomic resolution structure of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 59(1): 84-92.

Maladkar, N.K., Singh, V.K. and Naik, S.R. (1993) Fermentative production and isolation of L-asparaginase from Erwinia cartovora EC-113. Hindustan Antibiotics Bulletin, 35: 77-86.

Mathews, W. and Brown, H. (1974) Isolation of two L-Asparaginases from Guinea pig liver. Enzyme, 17(5): 276-86.

Mesas, J.M., Gil J.A. and Martin, J.F. (1990) Characterization and partial purification of l-asparaginase from Corynebacterium glutamicum. Journal of General Microbiology, 136: 515-519.

Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M.E. and Mhamdi, R. (2007) Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N2-fixation with Phaseolus vulgaris constitute a novel biovar (bv. mediterranense) of Sinorhizobium meliloti. Archives of Microbiology, 187: 79–85.

Mukherjee, J., Majumdar, S. and Scheper, T. (2000) Studies on nutritional and oxygen requirements for production of l-asparaginase by Enterobacter aerogenes. Applied Microbiology and Biotechnnology, 53: 180-184.

Narayana, K.J.P., Kumar, K.G. and Vijayalakshmi, M. (2008) L-asparaginase production by Streptomyces albidoflavus. Indian Journal of Microbiology, 48: 331-336.

Ortun-o-Olea, L. and Dura'n-Vargas, S. (2000) The L-asparagine operon of Rhizobium etli contains a gene encoding an atypical asparaginase. FEMS Microbiology Letters, 189: 177-182.

Patro, K.K.R., Satpathy, S. and Gupta, N. (2011) Evaluation of some fungi for L-asparaginase production. The Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, 1: 219-221.

Poorani, E., Saseetharan, M. and Dhevagi, P. (2009) L-asparaginase production and molecular identification of marine Streptomyces sp. strain EPD 27. International Journal of Integrative Biology,7: 150-155.

Pritsa, A.A., Papazisis, K.T., Kortsaris, A.H., Geromichalos, G.D. and Kyriakidis, D. (2001) Antitumor activity of L-asparaginase from Thermus thermophilus. Anticancer Drugs, 12: 137-142.

Rozahon, M., Ismayil, N., Hamood, B., Erkin, R., Abdurahman, M., Mamtimin, H., Abdukerim, M., Lal, R. and Rahman, E. (2014) Rhizobium populi sp. nov., an endophytic bacterium isolated from Populus euphratica. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64: 3215–3221.

Sanches, M., Barbosa, J.A.R.G., De Oliveira, R.T., Abrahão Neto, J. and Polikarpov, I. (2003) Structural comparison of Escherichia colil-asparaginase in two monoclinic space groups. Acta Crystallographica Section D, 59: 416-422.

Savitri, A.N. and Azmi, W. (2003) Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. Indian Journal of Biotechnology, 2: 184-194.

Schwartz, J.H., Reeves, J.Y. and Broome, J.D. (1966) Two L-asparaginases from E. coli and their action against tumors. The Proceedings of the National Academy of Sciences, 56: 1516.

Shahzad, F., Shafee, M., Abbas, F., Babar, S., Tariq, M.M. and Ahmad, Z. (2012) Isolation and biochemical characterization of Rhizobium meliloti from root nodules of alfalfa (Medico sativa). Journal of Animal and Plant Sciences, 22(2): 522-524.

Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W. and Palmer, J.D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. Journal of Eukaryotic Microbiology, 46: 327–338.

Wriston, J.C. (1970) Asparaginase. Methods in Enzymology, 17: 732-742.

Yazdani, R., Mobini-Dehkordi, M. and Rastegari, A.A. (2012) Isolation and identification of native Iranian L-asparaginase producing bacteria. Journal of Microbiology World, 5(1&2): 39-46.

Isolation and characterization of a bacterium with free glutaminase L-Asparaginase II from the Persian Gulf

S. Shoaei Naeeni[1*], O. Ranaei Siadat[2], G. Ebrahimipour[1], B. Bambai[3]

Received:1396.06.16
Accepted:1397.12.19

Abstract

L-asparaginase enzyme has various applications, particularly in medicine and food industry. Given some side effects and adverse possession of a minor amount of glutaminase activity, the search for new sources of microbes producing glutaminase-free L-asparaginase type II is underway. The present study aimed to isolate a bacterium from the Persian Gulf that produces glutaminase-free L-asparaginase type II. It is also aimed to measure the amount of this enzyme and the condition under which it increases. In order to assess the capability of extracellular asparagine production, the isolated bacteria from the seawater were cultured in M9 medium containing phenol red and asparagine. Those bacteria with positive asparaginase test were cultured in M9 medium containing glutamine and phenol red to assess their glutamine activity. The bacterium isolate producing asparaginase was identified using morphological and biochemical means and 16 SrDNA. L-asparaginase enzyme activity of the isolate was explored with a colorimetric method. The effect of anaerobic condition on the amount of L-asparaginase type II activity was explored by culturing under aeration condition and with no aeration. The result showed that the isolated bacterium was *Rhizobium nepotum* strain SHN1. The asparaginase enzyme activity and the specific activity of this bacterium were 0.467 IU/mL and 0.015 IU/mg, respectively. These characteristics increased to more than 50% in anaerobic condition. The results indicated that microbial flora from the Persian Gulf flora could be a remarkable source of glutaminase-free L-asparaginase enzyme.

Key words: L-asparaginase enzyme, *Rhizobium nepotum*, glutamination

1-Faculty of Life Sciences and Biothecnology, Shahid Beheshti University, G.C., Evin, Tehran

*(Corresponding author: Saloomeh Shoaei Naeeni, saloomeh.sh@gmail.com)

2-Protein Research Center of Shahid Beheshti University, G.C., Evin, Tehran

3-National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Karaj Highway