

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۵۴-۴۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۰

تولید آنزیم L-آسپاراژیناز خارج سلولی توسط سویه نمک‌دوست، *Vibrio sp.*

محدث ذوالفقار: کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، m.zolfaghar@ut.ac.ir
محمدعلی آموزگار*: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir
خسرو خواجه: استنادیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران، khajeh@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: L-آسپاراژیناز داروی ضدسرطان است که در شیمی درمانی لوسمی لنفوسیتی استفاده می‌شود. امروزه این آنزیم از منابع باکتریایی مشتق شده و اکثراً L-آسپاراژیناز *Escherichia coli* II به میزان کمتر L-آسپاراژیناز *Erwinia sp.* استفاده پزشکی دارد. به دلیل ایجاد واکنش‌های افزایش حساسیت، پیدا کردن و استفاده از آنزیم‌های جدید L-آسپاراژیناز امروزه درخور توجه است. با توجه به شناخت کمتر باکتری‌های نمک‌دوست غربال‌گری این آنزیم در این گروه از باکتری‌ها می‌تواند نتایج مفیدی را به همراه داشته باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، آنزیم L-آسپاراژیناز در ۱۳۰ باکتری نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک دریافت‌شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با استفاده از معرف فنل‌رد غربال شدند. سپس برای سویه منتخب منحنی رشد، سنجش آنزیمی انجام شد و نهایتاً اثر فاکتورهای مختلف بر تولید و فعالیت آنزیم‌ها بررسی شد.

نتایج براساس نتایج به دست آمده ۴۰ سویه مولد این آنزیم به دست آمد. بیشترین فراوانی جنس باکتریایی تولیدکننده L-آسپاراژیناز، متعلق به جنس *Halomonas* و *Marinobacter* بودند که هر یک ۲۱/۴ درصد از کل را به خود اختصاص دادند. در میان سویه‌های تولیدکننده، بیشترین میزان تولید متعلق به سویه GBPx3 بود که براساس آنالیز tRNA ۱۶S متعلق به جنس *Vibrio* بود. شرایط محیط کشت بهینه برای تولید آنزیم در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (۰/۶۵ IU/ml)، pH ۸ (۰/۹۲۶ IU/ml) و ۲/۵ درصد NaCl (۰/۹۰۳ IU/ml) به دست آمد و بیشترین میزان فعالیت آنزیم در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (۰/۷۸۱ IU/ml)، pH ۸ (۰/۸۲ IU/ml) و نبود NaCl (۰/۸۰۶ IU/ml) تعیین شد.

بحث و نتیجه‌گیری: این پروژه با هدف غربال‌گری باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک جداشده از مناطق شور ایران که تولیدکننده آنزیم L-آسپاراژیناز هستند، انجام شده است. از میان سویه‌های مثبت به دست آمده، سویه منتخب GBPx3 از جنس *Vibrio* به عنوان سویه منتخب در تولید آنزیم انتخاب شد که ممکن است دارای L-آسپاراژیناز با اثرات جانبی کمتر برای بیماران باشد.

واژه‌های کلیدی: L-آسپاراژیناز، باکتری نمک‌دوست، *Vibrio*، غربال‌گری

* نویسنده مسؤول مکاتبات، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

مقدمه

رشد هجومی و غیرقابل کنترل سلول‌ها را سرطان می‌گویند. این سلول‌ها ممکن است به سایر بخش‌های بدن انتشار یابند که به این حالت، متاستاز می‌گویند (۱). اگرچه درمان‌های سنتی سرطان شامل عمل جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی در مدیریت بیماری بسیاری از بیماران سرطانی مؤثر است، برای نیمی از سرطان‌ها غیراختصاصی و غیرمؤثر است و اثرات جانبی برای بیماران ایجاد می‌کند؛ بنابراین بهبود، تکمیل و یا جایگزین کردن روش‌های سنتی در حال توسعه است (۲).

آنزیم‌درمانی، یک روش مؤثر در درمان اختصاصی سرطان است. آنزیم‌ها دارای دو ویژگی مهم هستند که باعث تمایز آن‌ها از سایر انواع داروها می‌شود؛ اول، آنزیم‌ها اغلب با تمایل و اختصاصیت بالا به هدف خود متصل می‌شوند و دوم، مولکول‌هایی واکنش‌گر هستند که مولکول(های) هدف را به محصول مدنظر تبدیل می‌کنند. این دو ویژگی باعث شده است که آنزیم‌ها تبدیل به مولکول‌هایی قوی و اختصاصی شوند به گونه‌ای که مسیرهای درمانی بیوشیمیایی را در بدن انجام دهند که مولکول‌های کوچک‌تر قادر به انجام آن‌ها نیستند. این خصوصیات سبب توسعه بسیاری از داروهای آنزیمی جهت درمان طیف وسیعی از اختلالات از جمله سرطان شده است (۳). به‌طور بالقوه، فقر آمینواسیدی به‌عنوان یک روش کارآمد جهت درمان سرطان شناخته شده است. کاهش یک آمینواسید خاص در جریان خون از طریق رژیم با محتوای آمینواسیدی کم و یا به‌کارگیری آنزیم‌های کاتابولیکی خاص جهت هیدرولیز آمینواسید موردنظر، امکان‌پذیر است (۴ و ۵).

آنزیم L-آسپاراژیناز یکی از آنزیم‌های مؤثر در درمان لوسمی لنفوسیتی حاد است که برای مدت‌زمان

طولانی استفاده شده است. برای اولین بار در سال ۱۹۲۲، مشاهده شد که سرم خوکچه هندی منبع غنی از آنزیم L-آسپاراژیناز است که دارای فعالیت ضدلنفوما است (۶ و ۷). سوسترای L-آسپاراژین برای رشد سلول‌های تومور ضروری است که با تزریق آنزیم L-آسپاراژیناز و به دنبال آن هیدرولیز L-آسپاراژین، تراکم آن در مایعات بدن کاهش یافته و در نتیجه سوسترای لازم برای تکثیر سلول‌های توموری غیرقابل دسترس می‌شوند. در واقع، سلول‌های نرمال L-آسپاراژین را با استفاده از آنزیم آسپاراژین‌سینتتاز سنتز می‌کنند؛ درحالی‌که سلول‌های توموری به منبع L-آسپاراژین خارجی جهت عملکردهای سلولی نیازمندند؛ زیرا آنزیم سنتزکننده آن را ندارند (۸ و ۹). می‌توان سوسترای L-آسپاراژین را که برای رشد سلول‌های توموری مفید است، با تزریق آنزیم L-آسپاراژیناز کاهش داد و بدین ترتیب سوسترای موردنیاز برای تکثیر سلول‌های توموری را از دسترس این سلول‌ها خارج کرد.

آسپاراژیناز به‌طور گسترده میان ارگانیسم‌های مختلف جانور، گیاه و منابع میکروبی توزیع شده‌اند. این آنزیم در باکتری‌های *Bacillus subtilis* (۱۰)، *Erwinia*، *Corynebacterium glutamicum*، *chrysanthemi* (۱۱)، *Serratia marcescens* (۱۲)، *Vibrio succinigenes* (۱۳)، *E. coli* (۱۴) و قارچ‌های *Aspergillus terreus* (۱۵) و *Candida utilis* (۱۶) گزارش شده است. از نظر تجاری، در میان منابع میکروبی *Erwinia carotovora*، *Escherichia coli* و *Serratia marcescens* بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند (۱۷ و ۱۸) درحالی‌که L-آسپاراژیناز از این منابع میکروبی باعث تحریک سیستم ایمنی بیماران و ایجاد اثرات جانبی می‌شوند. میکروارگانیسم‌هایی که در

محیط کشت حداقل تغییر یافته M9 (۲۰) دارای ترکیبات زیر، برای بررسی تولید L-آسپاراژیناز استفاده شد (گرم در لیتر آب مقطر): NaCl ، KH_2PO_4 ، CaCl_2 0/09، MgSO_4 2/4، MgCl_2 1/75، 20/25، L-آسپاراژین، فنل رد ۰/۰۷، گلوکز ۱، آگار ۰/۲۰. pH محیط توسط محلول باز تریس بر ۷/۴-۷/۲ تنظیم شد. محلول ذخیره ۲/۵ درصد فنل رد در اتانول مطلق تهیه و pH آن توسط باز تریس در ۷/۴-۷/۲ تنظیم شد. به عنوان کنترل، در محیط کشت M9 تغییر یافته به جای آمینواسید L-آسپاراژین، از NaNO_3 به عنوان منبع نیتروژن استفاده شد.

برای بررسی فاکتورهای مختلف دما، pH، درصد سدیم کلرید و منبع کربن از محیط مایع M9 با ترکیبات گفته شده و بدون فنل رد استفاده شد. کلیه ترکیبات استفاده شده در این پروژه از شرکت مرک تهیه شده است.

تولید L-آسپاراژیناز: جهت مشاهده و بررسی تولید آنزیم L-آسپاراژیناز، سویه‌ها در محیط کشت جامد M9 (حاوی ۲/۵ درصد غلظت کلی نمک) کشت و در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. L-آسپاراژیناز طی واکنش خود آمونیاک تولید می‌کنند و آمونیاک باعث افزایش pH می‌شود؛ بنابراین می‌توان از شاخص pH فنل رد برای شناسایی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده L-آسپاراژیناز استفاده کرد. تولید آنزیم L-آسپاراژیناز با ایجاد توسعه هاله صورتی‌رنگ اطراف کلنی‌های باکتریایی تعیین می‌شود. در میان سویه‌های تولیدکننده، بیشترین میزان تولید (با تلقیح یکسان) متعلق به سویه GBP_x3 بود که برای مراحل بعدی انتخاب شد.

محیط‌های شور زندگی می‌کنند دارای ویژگی‌هایی متفاوت از ویژگی‌های پروتئین‌های ارگانسیم‌های غیرنمکی هستند؛ به عبارت دیگر پروتئین‌هایی با ساختار تغییر یافته هستند که قادرند غلظت‌های زیاد نمک و فعالیت آبی کم را تحمل کنند. فوکوچی^۱ و همکارانش نشان دادند که تفاوت محتوای آمینواسیدی میان پروتئین‌های نمک دوست و مزوفیلیک یا گرمادوست بیشتر در سطح آن‌هاست تا درون آن‌ها (۱۹)؛ بنابراین باکتری‌های نمک دوست ممکن است دارای آنزیم‌هایی با ویژگی‌های ایمونولوژیکی جدید باشند که بتوان آن‌ها را در بیمارهای فوق حساس استفاده کرد؛ در نتیجه می‌توانند نسبت به سویه‌های صنعتی کنونی مانند *E. coli* برتر باشند.

طبق مطالب گفته شده در این پروژه، تولید آنزیم L-آسپاراژیناز و شرایط بهینه تولید آن از سویه نمک دوست (*Vibrio sp.*) سویه GBP_x3 انجام شد. سرعت رشد باکتریایی نیز در محیط سنجش آنزیمی (حاوی L-آسپاراژین) مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت: از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، ۱۳۰ سویه نمک دوست و تحمل‌کننده نمک که از مناطق شور ایران جداسازی شده‌اند، دریافت شد و در محیط کشت پیچیده^۲ ۲.۵% MH2.5 آگار محتوی ترکیبات زیر نگه‌داری شدند (گرم در لیتر آب مقطر):

CaCl_2 ، MgSO_4 2/4، MgCl_2 1/75، NaCl 20/25، 0/09، NaBr 0/0065، NaHCO_3 0/015، 0/09، 5، peptone 10، yeast extract 1، Glucose 1، آگار ۱۵. pH محیط نیز توسط باز تریس در ۷/۵ تنظیم شد.

رسم هم زمان منحنی رشد و سنجش آنزیمی:

به منظور بررسی میزان رشد با تولید آنزیم، ایزوله منتخب در ۷۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع M9 موجود در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری تلقیح شد (به میزان $10^8 \times 1/5$ CFU/ml) و در شیکر انکوباتور در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. رشد باکتریایی به روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. هم‌زمان با رسم منحنی رشد، سنجش آنزیمی نیز براساس روش زیر انجام گرفت.

فعالیت L-آسپاراژیناز با استفاده از معرف نسلر اندازه‌گیری شد. فرآیند سنجش برپایه نسلریزاسیون مستقیم آمونیاک تولیدشده توسط L-آسپاراژیناز صورت گرفت. بدین منظور، ۵۰۰ میکرولیتر محلول L-آسپاراژین ۱۰ میلی‌مولار (در بافر تریس-بیس ۵۰ میلی‌مولار، pH 7) و ۴۵۰ میکرولیتر بافر تریس-بیس ۵۰ میلی‌مولار، pH 7 به ۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس واکنش آنزیمی با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۵ درصد (w/v) متوقف و با سانتریفیوژ در 11500 rpm به مدت ۱۰ دقیقه، پروتئین‌های رسوبی حذف و از سوپرناتانت آن برای انجام واکنش نسلریزاسیون استفاده شد. به یک میلی‌لیتر سوپرناتانت، یک میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر معرف نسلر اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، جذب آن در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف آمونیوم سولفات رسم شد (۲۰).

بررسی اثر فاکتورهای مختلف (pH، دما، درصد NaCl، درصد گلوکز و منبع کربن) بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز: برای بررسی فاکتورهای مختلف، از ۲۵

میلی‌لیتر محیط کشت M9 مایع محتوی L-آسپاراژین در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری استفاده شد. پس از تلقیح (به میزان ۵ درصد نیم مک فارلند)، به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری و فعالیت آنزیم‌ها با روش نسلریزاسیون اندازه‌گیری شد (۲۱).

اثر دما بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز: اثر دما با تلقیح سویه‌ها (به میزان ۵ درصد کدورت نیم مک فارلند، $10^8 \times 1/5$ CFU/ml) در محیط کشت M9 که حاوی L-آسپاراژین است و گرماگذاری در دماهای مختلف ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد (۲۱).

اثر pH بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز: برای تعیین اثر pH بر تولید، محیط M9 محتوی L-آسپاراژین در pHهای مختلف ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ تهیه شد و بعد از استریلیزاسیون به میزان ۵ درصد کدورت نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ CFU/ml) تلقیح شد. بعد از ۷۲ ساعت گرماگذاری، فعالیت آنزیمی بررسی شد (۲۱).

اثر درصد NaCl بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز: محیط M9 با درصدهای مختلف NaCl، ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد تهیه شد و به میزان ۵ درصد کدورت نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ CFU/ml) تلقیح شد. بعد از ۷۲ ساعت گرماگذاری، سنجش آنزیمی بررسی شد.

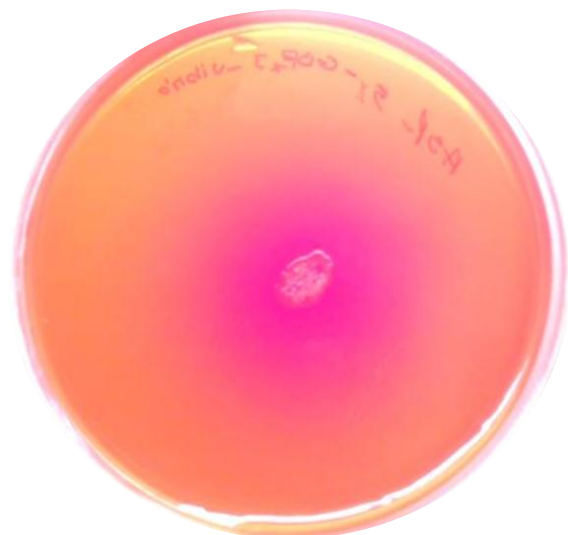
اثر درصد گلوکز بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز: محیط M9 با درصدهای مختلف گلوکز ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد تهیه شد و به میزان ۵ درصد کدورت نیم مک فارلند، ($10^8 \times 1/5$ CFU/ml) تلقیح شد. بعد از مدت زمان لازم برای گرماگذاری، سنجش آنزیمی آن انجام شد.

اثر منبع کربن بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز: منابع کربنی مختلف مانند گلوکز، سوکروز، مالتوز و فروکتوز به میزان ۰/۵ درصد در محیط کشت تولیدی اضافه شدند

نتایج

تولید L-آسپاراژیناز، بررسی رشد باکتریایی و

سنجش آنزیمی: از میان ۱۳۰ سویه باکتریایی ۴۰ سویه تولیدکننده آنزیم L-آسپاراژیناز تولید شد که بیشترین میزان تولید آنزیم در سویه GBP_x3 از جنس *Vibrio* مشاهده شد. سویه مدنظر نیز در محیط کشت M9 دارای فنل رد، پس از ۲۴ ساعت هاله صورتی رنگی تولید کرد (شکل ۱)



شکل ۱- هاله صورتی ایجاد شده نشان دهنده تولید L-آسپاراژیناز

همان طور که در شکل ۲ دیده می شود، هم زمان با رشد سویه، آنزیم نیز تولید می شود و در طی فاز لگاریتمی نیز میزان تولید افزایش می یابد؛ به نحوی که فعالیت آنزیمی در انتهای فاز لگاریتمی و فاز سکون به بیشترین میزان خود می رسد و بعد ثابت می ماند. بیشترین میزان تولید آنزیم ۰/۸۱ IU/ml است.

و بعد گرماگذاری شدند. فعالیت آنزیمی توسط سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ محیط تخمیر اندازه گیری شد.

بررسی اثر فاکتورهای مختلف دما، pH و درصد

NaCl بر فعالیت آنزیم: ۲۵ میلی لیتر محیط کشت M9 محتوی L-آسپاراژین در ارلن ۱۰۰ تهیه شد. شایان ذکر است که در اینجا pH، درصد NaCl و گلوکز و دمای گرماگذاری محیط های کشت، همان مقادیر بهینه به دست آمده است. پس از تلقیح به میزان ۵ درصد کدورت نیم مک فارلند، به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. بعد از گرماگذاری، در دور ۴۰۰۰× به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از سوپرناتانت جهت سنجش آنزیمی براساس نسلیزاسیون مطابق مراحل گفته شده، استفاده شد.

بررسی اثر فاکتور دما بر فعالیت آنزیم: برای بررسی

اثر دما بر فعالیت آنزیم پس از مخلوط کردن سوپرناتانت، بافر و سوسترا، از سه دمای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد جهت گرماگذاری آن استفاده شد.

بررسی اثر فاکتور pH بر فعالیت آنزیم: در اینجا بافر

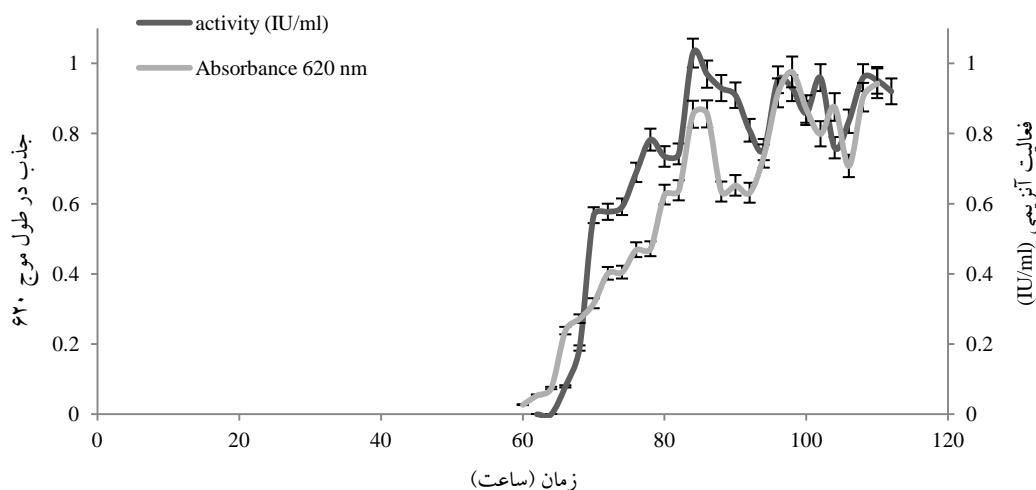
مخلوط (محتوی بافر استات، فسفات و تریس-بیس ۵۰ میلی مولار) در محدوده pH 5-9 تهیه شد و همان بافر برای آماده سازی محلول سوسترا به کار برده شد. از هر یک از این بافرها برای انجام سنجش آنزیم استفاده شد و میزان آمونیاک به وسیله معرف نسلر اندازه گیری شد.

بررسی اثر فاکتور درصد NaCl بر فعالیت آنزیم:

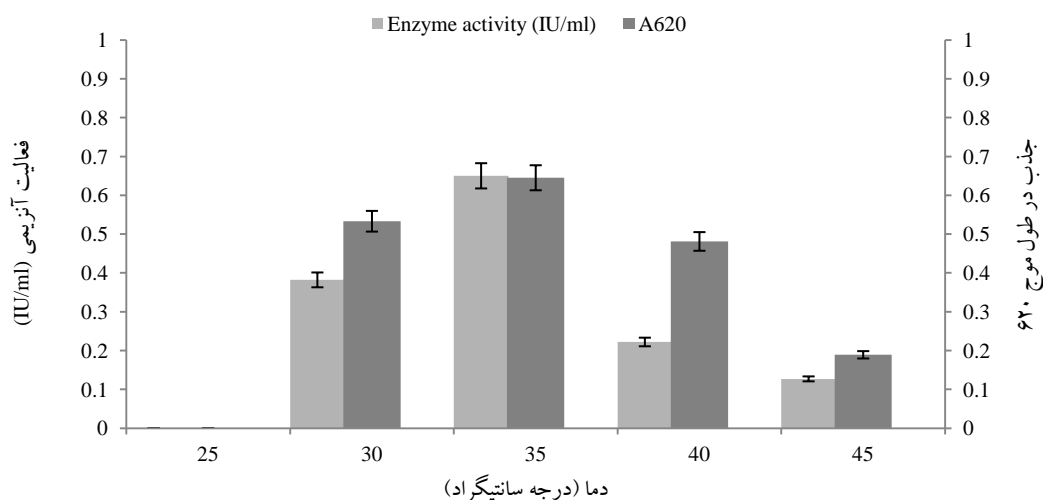
مخلوط واکنشی آنزیم با درصدهای مختلف نمک ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد تهیه شد و سپس گرماگذاری و بررسی میزان آمونیاک تولید شده به وسیله معرف نسلر انجام شد.

(شکل ۴). این آنزیم در سدیم کلرید و گلوکز با درصد به ترتیب ۲/۵ و ۰/۵ درصد و با منبع کربن ساکاروز بیشترین میزان تولید آنزیم را نشان می‌دهد که به ترتیب دارای فعالیت ۰/۹۷۱، ۰/۹۴۸، ۰/۹۰۳ IU/ml بودند (شکل ۵، ۶ و ۷). سویه بررسی شده در صفر درصد سدیم کلرید هیچ گونه رشدی نداشته است؛ اما در محدوده ۲/۵ تا ۱۰ درصد سیر نزولی رشد و تولید آنزیم را نشان داد.

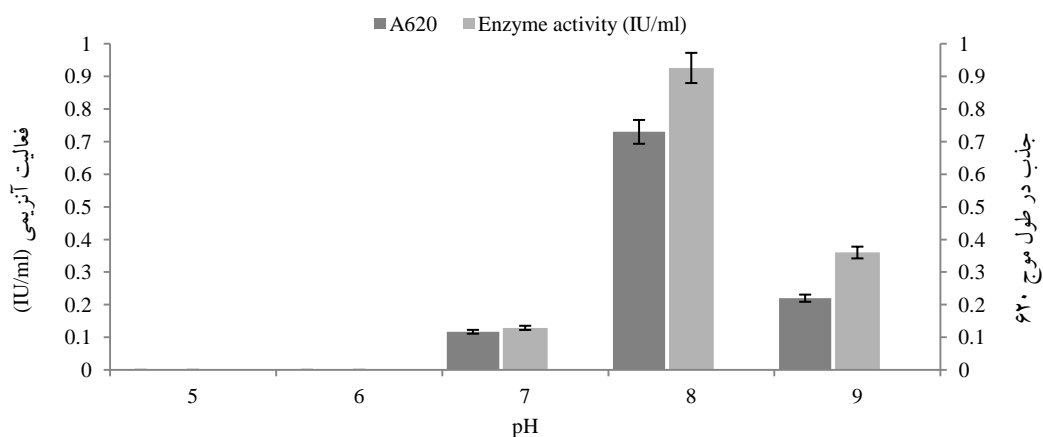
اثر فاکتورهای دما، pH، درصد NaCl، درصد گلوکز و منبع کربن بر تولید آنزیم: این سویه در محدوده دمایی ۳۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند و دارای فعالیت آنزیمی است؛ اما دمای ایده‌آل برای تولید آنزیم L-آسپاراژیناز ۳۵ درجه سانتی‌گراد است که در این دما فعالیت آنزیمی آن ۰/۶۵ IU/ml و رشد ۰/۶۴۵ (A620 nm) بود (شکل ۳). pH بهینه برای تولید آنزیم ۸ است که در این pH بهینه دارای فعالیت آنزیمی ۰/۹۲۶ IU/ml و جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر ۰/۷۳ بود



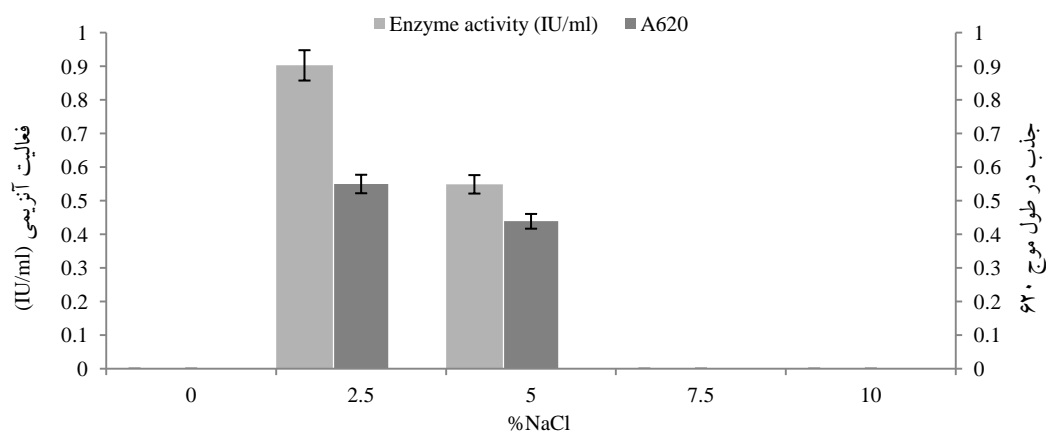
شکل ۲- منحنی رشد و فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز سویه *Vibrio sp.* GBP₃



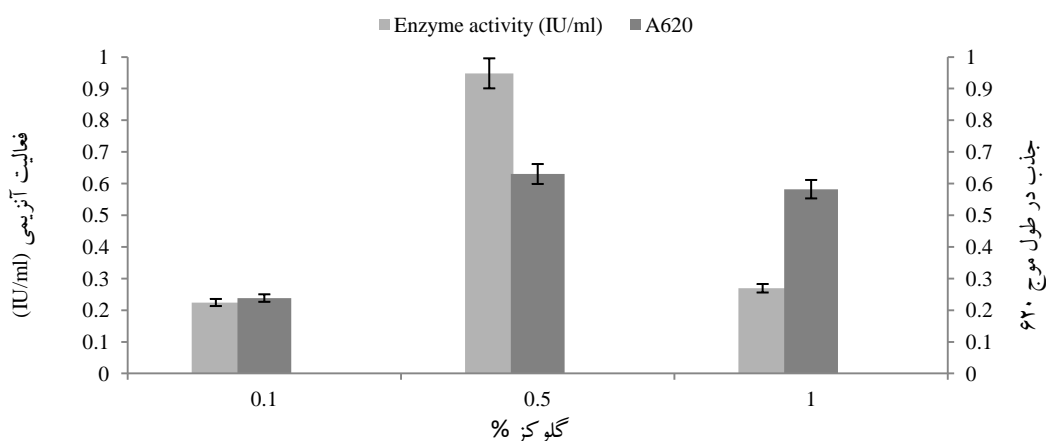
شکل ۳- اثر دما بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز و رشد سویه *Vibrio sp.* GBP₃



شکل ۴- اثر pH بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز و رشد سویه (*Vibrio sp.*) GBPx3



شکل ۵- اثر درصد سدیم کلرید بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز و رشد سویه (*Vibrio sp.*) GBPx3

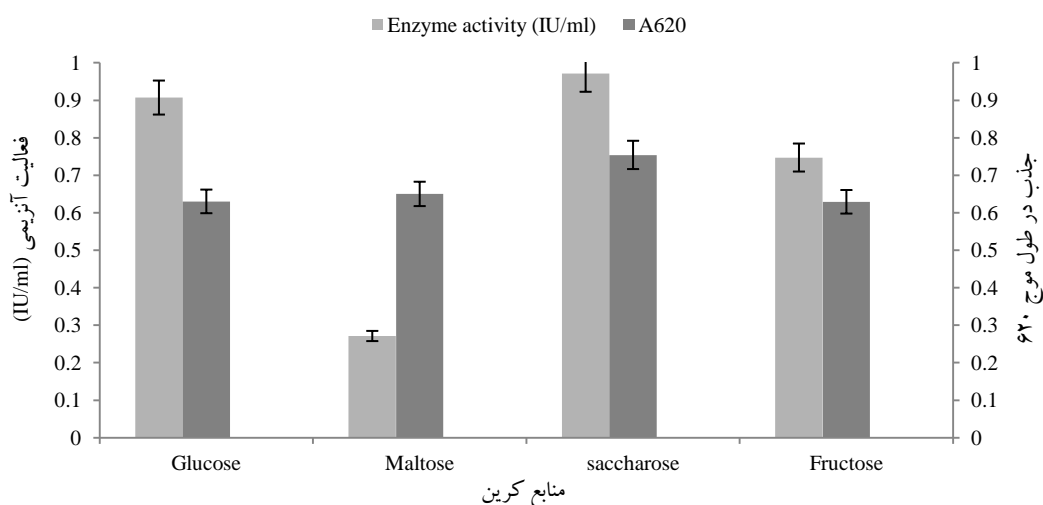


شکل ۶- اثر درصد گلوکز بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز و رشد سویه (*Vibrio sp.*) GBPx3

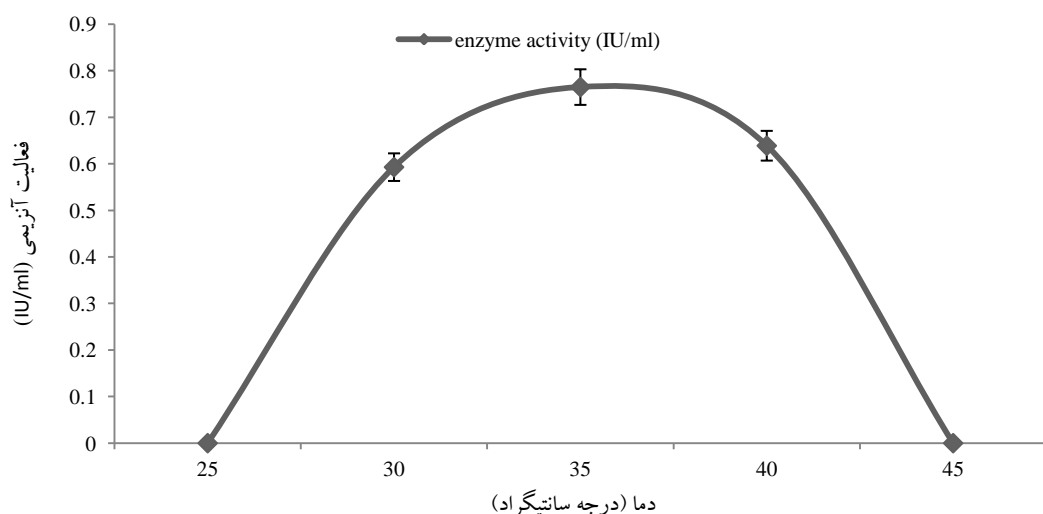
بهترین شرایط فعالیت آنزیم در محیط بدون نمک بود که در این حالت فعالیت آنزیمی 0.806 IU/ml بود (شکل ۱۰). با افزایش میزان سدیم کلرید، فعالیت آنزیمی کاهش یافت که نشان‌دهنده طبیعت هالوتولرانت بودن آنزیم است.

بررسی اثر فاکتورهای مختلف دما، pH و درصد

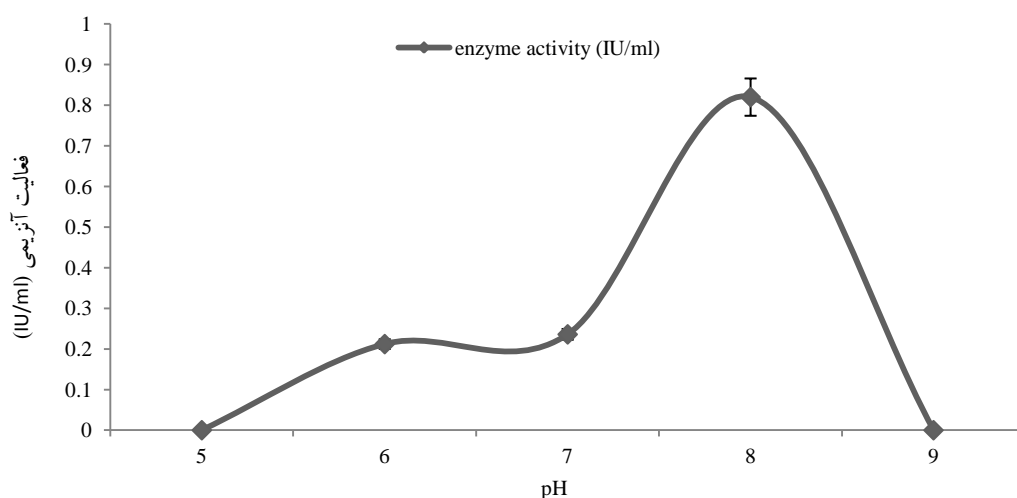
NaCl بر فعالیت آنزیم‌ها: بیشترین فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و در دماهای ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم دیده نشد (شکل ۸). pH بهینه فعالیت آنزیم ۸ بود که فعالیت آنزیمی آن 0.82 IU/ml بوده است (شکل ۹).



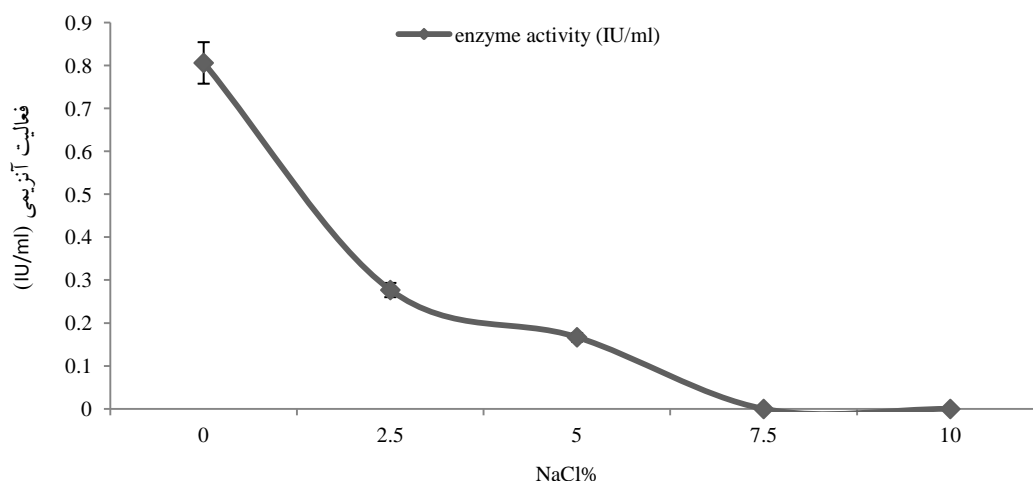
شکل ۷- اثر منبع کربن بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز و رشد سویه *(Vibrio sp.)* GBP_x3



شکل ۸- اثر دما بر فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز سویه *(Vibrio sp.)* GBP_x3



شکل ۹- اثر pH بر فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز سویه *Vibrio sp.* GBP_{x3}



شکل ۱۰- اثر درصد NaCl بر فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز سویه *Vibrio sp.* GBP_{x3}

این مطالعه غلظت های مختلف فنل رد را بررسی کردند و غلظت مناسب رنگ را براساس توانایی رشد میکروارگانیسم و مشخص بودن هاله تولید آنزیم گزارش کردند (۲۲). همچنین قاسمی^۴ و همکاران در سال ۲۰۰۸، یک محیط بهینه شده برای بررسی تولید L-آسپاراژیناز *Escherichia coli* گزارش کردند و طبق نتایج به دست آمده اعلام کردند که می توان از آن در بررسی تولید L-آسپاراژیناز در سایر میکروارگانیسم ها (باکتری ها و قارچ ها) استفاده کرد (۲۳). در این پروژه

بحث و نتیجه گیری

براین اساس که آنزیم L-آسپاراژیناز طی واکنش خود آمونیاک تولید می کنند و آمونیاک باعث افزایش pH می شود می توان از شاخص pH برای شناسایی میکروارگانیسم های تولید کننده آنها استفاده کرد. گالتی^۳ و همکاران در سال ۱۹۹۶، یک روش سریع بر پایه pH و رنگ (فنل رد) جهت بررسی تولید L-آسپاراژیناز توسط میکروارگانیسم ها گزارش کردند که نتایج آن با تخمین کمی در محیط مایع هماهنگ بود. در

pH، درصد NaCl و منبع کربن مناسب برای تولید حداکثر میزان آنزیم همان میزانی هستند که برای رشد بهینه سویه، نیاز است؛ چراکه با حداکثر میزان بیومس تولیدشده، مقدار تولید آنزیم نیز افزایش می‌یابد. همان‌طور که در نمودارها نیز نشان داده شده است، در شرایطی که بیشترین میزان جذب در ۶۲۰ نانومتر وجود داشت، بیشترین میزان تولید آنزیم‌ها نیز دیده شد. آلبانس و همکاران در سال ۱۹۷۸، در طی بررسی اثر ترکیبات محیط کشت در رشد و تولید L-آسپاراژیناز از *Vibrio succinogenes*، pH محیط را ۷/۴ در نظر گرفتند. مهاجا^۷ و همکاران در سال ۲۰۱۲، با بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز در *Bacillus licheniformis* به این نتیجه رسیدند که در pH 6 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان تولید آنزیم وجود دارد (البته تولید آنزیم در دماهای ۵۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد وجود داشت) و تغییرات میزان NaCl (0/25-1/25 g/l) اثری بر تولید آنزیم نگذاشته است (۳۰). بهترین pH برای حداکثر میزان تولید آنزیم L-آسپاراژیناز توسط *Staphylococcus*، 5/7 بود (۳۱). مورسی^۸ و همکاران در سال ۲۰۱۰، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را دمای بهینه تولید L-آسپاراژیناز از سویه از جنس *Bacillus* گزارش کرد (۳۲)؛ در حالی که pH و دمای بهینه برای *E.coli* (۳۳) و *Erwinia carotovora* (۳۴)، به ترتیب ۷ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. جنینگس^۹ و همکاران در سال ۱۹۸۹ نشان دادند که ژن *ansB* (کدکننده آنزیم L-آسپاراژیناز II) در *E.coli* را پروتئین فعال‌کننده کاتابولیت^{۱۰} (CAP) (پروتئین پذیرنده AMP حلقوی^{۱۱} نیز نامیده می‌شود) تنظیم می‌کند. مقادیر کم گلوکز درون سلولی باعث افزایش سطح AMP حلقوی و به دنبال آن افزایش کمپلکس AMP حلقوی-CAP

جهت بررسی سریع و پلیتی L-آسپاراژیناز از شاخص pH فلرد (۰/۰۰۷ درصد w/v) استفاده شد که این مقدار از رنگ فلرد باعث ایجاد رنگ زرد-نارنجی شد و در نتیجه تغییر رنگ محیط در اثر تولید آنزیم قابل تشخیص است؛ در دو گزارش ذکر شده نیز از همین میزان فلرد در محیط استفاده شده است. محیط M9 دارای ترکیب KH_2PO_4 و K_2HPO_4 ، به‌عنوان عوامل بافری است اما در این پروژه K_2HPO_4 حذف شد زیرا با حذف آن خاصیت بافری محیط کاهش یافت و در نتیجه مقادیر کم آمونیاک در محیط قابل تشخیص بود؛ قاسمی و همکاران نیز در گزارش خود به این نتیجه رسیده بودند (۲۳). دیستاسیو^۵ و همکاران در سال ۱۹۷۶، L-آسپاراژیناز را از باکتری بی‌هوازی *Vibrio succinogenes* روده گاو جداسازی و تخلیص کردند؛ این آنزیم فاقد فعالیت گلوتامینازی بود (۱۳، ۲۴ و ۲۵). تاکنون آنزیم L-آسپاراژیناز از تعدادی باکتری از جنس *Pseudomonas sp.* یافت و بعضی از آن‌ها تخلیص شده است؛ مانند *Pseudomonas aeruginosa* (۲۶)، *Pseudomonas stutzeri MB-405* (۲۷) و *Pseudomonas acidovorans* (۲۸).

آلبانس^۶ و همکاران در سال ۱۹۷۸ گزارش کردند که *Vibrio succinogenes* در طول مرحله رشد لگاریتمی و ابتدای فاز سکون آنزیم L-آسپاراژیناز را تولید می‌کند (۲۹). در این پژوهش نیز تولید آنزیم L-آسپاراژیناز از سویه بررسی شده، در طی فاز لگاریتمی افزایش یافت و در فاز سکون به حداکثر میزان تولید خود رسید.

بررسی اثر فاکتورهای مختلف (pH، دما، درصد NaCl، درصد گلوکز و منبع کربن) بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز: طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که دما،

IU/mg و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با فعالیت آنزیمی ۰/۴۴ IU/mg بود (۳۷). طبق گزارشات قبلی دمای بهینه برای فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز از *E. coli*، *Bacillus Aspergillus terreus* 37 و *E. coli* sp. پاتوژنیک و ۳۸ درجه سانتی گراد است (۳۸ و ۳۹). در این پژوهش، L-آسپاراژیناز از سویه نمک دوست بررسی شده دارای دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی گراد و pH بهینه ۸ بود؛ بیشترین میزان فعالیت در نبود NaCl بود ولی با افزایش غلظت نمک در مخلوط واکنشی، میزان فعالیت کاهش یافت که نشان از این است که این آنزیم تحمل کننده NaCl است.

محیط‌های شور، دارای انواع وسیعی از میکروارگانیسم‌ها با ویژگی‌های نوین بیوتکنولوژیک هستند. نتایج این پروژه نشان می‌دهد که باکتری *Vibrio* GBP_x3 sp. از نظر تولید آنزیم ضد تومور L-آسپاراژیناز توانمند است؛ بنابراین برای ادامه پژوهش‌ها به آن توجه شده است.

References

- (1) Patyar S., Joshi R., Byrav DP., Prakash A., Medhi B., Das B. Review Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal Biomedical Science* 2010; 17 (1): 21- 30.
- (2) Ciardiello F., Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clinical Cancer Research* 2001; 7 (10): 2958- 70.
- (3) Vellard M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Current opinion in biotechnology* 2003; 14 (4): 444- 50.

می‌شود. این کمپلکس به یک جایگاه اختصاصی بر DNA که در مجاورت پروموتور ژن‌های تنظیم‌شونده توسط CAP قرار دارد متصل می‌شود و اتصال σ^{70} RNA پلی‌مراز را افزایش می‌دهد و بدین ترتیب باعث افزایش بیان ژن می‌شود؛ بنابراین گلوکز در *E. coli* یک مهارکننده برای ژن ansB است (۳۵)؛ اما در این پژوهش، میزان تولید L-آسپاراژیناز توسط سویه مورد نظر در غلظت ۰/۵ درصد گلوکز بیش از غلظت ۰/۱ درصد بود ولی غلظت ۱ درصد بر تولید آنزیم اثر مهاری داشت. پرما^{۱۱} و همکاران در سال ۲۰۱۳ طی بررسی اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز از سویه‌های موتانت و وحشی *Pseudomonas fluorescens* نتیجه گرفتند که غلظت ۱ درصد گلوکز باعث مهار کلی فعالیت آنزیم می‌شود در حالی که غلظت ۰/۱ درصد اثر تحریکی کمی بر تولید این آنزیم دارد (۳۶).

بررسی اثر فاکتورهای مختلف دما، pH و درصد NaCl بر فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز: به دلیل خارج سلولی بودن آنزیم‌های بررسی شده، از سوپرناتانت محیط‌های تلقیح شده با سویه مثبت برای بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

دیستاسیو و همکاران در سال ۱۹۷۶، pH بهینه فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز *Vibrio succinogenes* را ۷/۳ گزارش کردند (۲۴). کوشواها^{۱۳} و همکاران در سال ۲۰۱۲، اثر فاکتورهای مختلف pH و دما را بر فعالیت آنزیم L-آسپاراژیناز از سویه منتخب A2 که به‌عنوان *Bacillus subtilis* شناخته شده بود، بررسی کردند. این آنزیم در دامنه 7-9 pH و دمای ۵۰-۲۵ درجه سانتی گراد دارای فعالیت آنزیمی بود؛ اما بیشترین میزان فعالیت آنزیم در 7 pH با فعالیت آنزیمی ۰/۴۳۶

- (4) Vynnytska-Myronovska B., Kurlishchuk Y., Bobak Y., Dittfeld C., Kunz-Schughart LA., Stasyk O. Three-dimensional environment renders cancer cells profoundly less susceptible to a single amino acid starvation. *Amino acids* 2013; 45 (5): 1221-30.
- (5) Cantor JR., Panayiotou V., Agnello G., Georgiou G., Stone EM. Engineering reduced-immunogenicity enzymes for amino acid depletion therapy in cancer. *Methods Enzymology* 2012; 502 (29): 291-319.
- (6) Clementi A. La Désamidation Enzymatique De L'asparagine Chez Les Différentes Espèces Animales Et La Signification Physio Logique De Sa Presence Dans L'organisme. *Archives of Physiology and Biochemistry* 1922; 19 (4): 369-98.
- (7) Broome J. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature* 1961; 191 (11): 1114 - 15.
- (8) Hill JM., Roberts J., Loeb E., Khan A., MacLellan A., Hill RW. L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms: remission in human leukemia. *Jama* 1967; 202 (9): 882- 8.
- (9) Broome J. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. *The Journal of experimental medicine* 1963; 118 (1): 121- 48.
- (10) Fisher SH., Wray LV. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase. *Journal of bacteriology* 2002; 184 (8): 2148- 54.
- (11) Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochemistry* 2000; 40 (19): 64- 5655.
- (12) Stern ML., Phillips AW., Gottlieb AJ. Physical properties of L-asparaginase from *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology* 1976; 125 (2): 719- 27.
- (13) Distasio JA., Salazar AM., Nadji M., Durden DL. Glutaminase-free asparaginase from *vibrio succinogenes*: An antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. *International Journal of Cancer* 1982; 30 (3): 343- 7.
- (14) Campbell H., Mashburn L., Boyse E., Old L. Two L-Asparaginases from *Escherichia coli* B. Their Separation, Purification, and Antitumor Activity. *Biochemistry* 1967; 6 (3): 721- 30.
- (15) de-Angeli LC., Pocchiari F., Russi S., Tonolo A., Zurita VE., Ciaranfi E., et al. Effect of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* on ascites sarcoma in the rat. *Nature* 1970; 225 (54): 9- 550.
- (16) Kil J-O., Kim G-N., Park I. Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 1995; 59 (4): 749- 50.
- (17) Howard JB., Carpenter FH. L-asparaginase from *Erwinia carotovora* substrate specificity and enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry* 1972; (4) 247: 102- 30.
- (18) Heinemann B., Howard AJ. Production of tumor-inhibitory L-asparaginase by submerged growth of *Serratia marcescens*. *Applied microbiology* 1969; 18 (4): 550- 4.
- (19) Fukuchi S., Yoshimune K., Wakayama M., Moriguchi M., Nishikawa K. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *Journal of molecular biology* 2003; 327 (2): 347- 57.
- (20) Upadhyay R., Saxena A., Kango N. screening and production of tumour inhibitory *l-asparaginase* by bacteria isolated from soil. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2012; 5 (12): 135- 7.

- (21) Kavitha A., Vijayalakshmi M. A Study on L-Asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL_113. *The Scientific World Journal* 2012; 1604 (34): 33- 493.
- (22) Gulati R., Saxena R., Gupta R. A rapid plate assay for screening l-asparaginase producing micro-organisms. *Letters in applied microbiology* 1997; 24 (1): 23- 6.
- (23) Ghasemi Y., Ebrahimzadeh A.R, Rasool-Amini S., Zarrini Gh.R, Ghoshoon MB., Raee MJ., et al. An Optimized Medium for Screening of L-Asparaginase production by *Escherichia coli*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2008; 4 (4): 422- 4.
- (24) Distasio JA., Niederman RA., Kafkewitz D., Goodman D. Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. *Journal of Biological Chemistry* 1976; 251 (22): 6929- 33.
- (25) Kafkewitz D., Goodman D. L-Asparaginase production by the rumen anaerobe *Vibrio succinogenes*. *Applied microbiology* 1974; 27 (1): 206- 9.
- (26) El-Bessoumy AA., Sarhan M., Mansour J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. *Journal of biochemistry and molecular biology* 2004; 37 (4): 387- 93.
- (27) Manna S., Sinha A., Sadhukhan R., Chakrabarty S. Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. *Current microbiology* 1995; 30 (5): 291- 8.
- (28) Davidson L., Brear DR., Wingard P., Hawkins J., Kitto GB. Purification and properties of L-glutaminase-L-asparaginase from *Pseudomonas acidovorans*. *Journal of bacteriology* 1977; 129 (3): 1379- 86.
- (29) Albanese E., Kafkewitz K. Effect of medium composition on the growth and asparaginase production of *Vibrio succinogenes*. *Applied and environmental microbiology* 1978; 36 (1): 25- 30.
- (30) Mahajan RV., Saran S., Kameswaran K., Kumar V., Saxena R. Efficient production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. *Bioresource technology* 2012; 12 (5): 11- 6.
- (31) Prakasham R., Rao C., Rao RS., Lakshmi GS., Sarma P. l-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp.-6A: design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. *Journal of applied microbiology* 2007; 102 (5): 1382- 91.
- (32) Moorthy V., Ramalingam A., Sumantha A., Shankaranaya RT. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4 (18): 1862- 7.
- (33) Kenari SLD., Alemzadeh I., Maghsodi V. Production of l-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing* 2011; 89 (4): 315- 21.
- (34) Abbas MA., Askar SN. Production, Purification and characterization of extracellular L-Asparaginase from *Erwinia Carotovora*. *International Journal of Bioassays* 2014; 3 (12): 3553- 9.
- (35) Jennings MP., Beacham IR. Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L-asparaginase II, ansB, and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins. *Journal of bacteriology* 1990; 172 (3): 1491- 8.
- (36) Prema P., Devi MN., Alagumanikumar N. production of tumor inhibitory L-asparaginase by wild and mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. Manuscript Info Abstract. *International Journal* 2013; 1 (4): 163- 71.
- (37) Kushwaha A., Ahmed F. Jayanand and

- Pushpendra Singh. Production and Purification of L-Asparaginase from bacterial sources. *International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences* 2012; 132 (12): 34- 82.
- (38) Li L-Z., Xie T-H., Li H-J., Qing C., Zhang G-M., Sun M-S. Enhancing the thermostability of *Escherichia coli* l-asparaginase II by substitution with pro in predicted hydrogen-bonded turn structures. *Enzyme and microbial technology* 2007; 41 (4): 523- 7.
- (39) Aljewari HS., Nader MI., Alfaisal AHM., Weerapreeyakul N., Sahapat S. High efficiency, selectivity against cancer cell line of purified L-asparaginase from pathogenic *Escherichia coli*. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 2010; 65: 416- 21.

¹- Fukuchi

²- Moderate halophilic

³- Gulti

⁴- Ghasemi

⁵- Distasio

⁶- Albanese

⁷- Mahaja

⁸- Moorthy

⁹- Jennings

¹⁰- Catabolite activator protein

¹¹- Cyclic AMP receptor protein

¹²- Perma

¹³- Kushwaha

Production of extracellular L- asparaginase by halophilic bacterium *vibrio* sp.

Mahdis Zolfaghar

M.Sc. of Microbial biotechnology, University of Tehran, Iran, m.zolfaghar@ut.ac.ir

Mohammad Ali Amoozegar*

Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir

Khosro Khajeh

Professor of biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, khajeh@modares.ac.ir

Abstract

Introduction: L-Asparaginase is an anti-neoplastic drug used in lymphoblastic leukemia chemotherapy. Nowadays, this enzyme derived from bacterial sources, mostly L-asparaginase II from *Escherichia coli* and in lesser amount L-asparaginase of *Erwinia* sp. has medical utilization. The long-term usage of these agents leads to allergic reactions; therefore new L- asparaginase with new immunological characteristics is required. Halophilic bacteria might contain L-asparaginase with novel immunological properties that can be used in hypersensitive patients.

Materials and methods: In this study, the production of L-asparaginase by 130 halophilic and halotolerant bacteria isolated from saline environments in Iran was screened. Modified M-9 agar medium was used for qualitative analysis. In the selected strain, growth curve plotting, asparaginase activity assay and analysis for the effect of some factors on the production and enzyme activity were done.

Results: 40 strains produced L-asparaginase. Most of L-asparaginase producers were member of genus *Halomonas* and *Marinobacter* (21.4%). GBP_x3 is potent bacteria in L-asparaginase production which belonged to *Vibrio* sp. based on 16S rRNA analysis. Optimized factors for L-asparaginase production were 35⁰C (0.65 IU/ml), pH 8 (0.926 IU/ml) and 2.5% NaCl (0.903 IU/ml). The highest activity of L-asparaginase was in 35⁰C (0.781 IU/ml), pH 8 (0.82 IU/ml) and without NaCl (0.806 IU/ml).

Discussion and conclusion: The aim of this study was to screen the production of L-asparaginase through 130 halophilic and halotolerant bacteria which were isolated from saline environments in Iran. The results of this work indicate that the bacterium, *Vibrio* sp. GBP_x3 displays to be potent for asparaginase production.

Key words: L-asparaginase, *Halophilic* bacteria, *Vibrio* sp., screening

* Corresponding author

Received: March 14, 2015 / **Accepted:** May 31, 2015