



(Research Paper)
Biological Journal of Microorganism
11th Year, No. 42, Summer 2022
Received: July 26, 2021
Accepted: November 8, 2021

Identification and Enhanced Production of L-Asparaginase Enzyme Using A Soil-Isolated Fungal Strain: *Sarocladium kiliense* IBRC-M 30453

Neda Fazeli

Department of Microbial Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, nedafazeli@ymail.com

Nayyereh Alimadadi

Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran, nayyereh_alimadadi@yahoo.com

Shaghayegh Nasr*

Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran, shaghayegh2963@yahoo.com

Abstract

Introduction: L-asparaginase is a significant anticancer enzyme used both in medicine and food industries. Considering the importance of L-asparaginase in different industries, finding new sources of producer strains that can produce higher levels of this enzyme with minimum side effects is preferred.

Materials and Methods: Initial screening for L-asparaginase-producing strain was performed via qualitative plate assay on modified Czapek Dox's agar medium using L-asparagine as the nitrogen source and phenol red as pH indicator. L-asparaginase activity of the fungal strain was quantified by the nesslerization method. Its identification was performed by using both morphological characteristics and phylogenetic analyses of DNA sequence data, including ribosomal DNA regions of ITS (Internal Transcribed Spacer) and LSU (large Sub-Unit) rDNA. L-asparaginase production was optimized by the One Factor-At-the-Time (OFAT) technique. The impacts of temperature, inoculum size, nitrogen, and carbon sources on the enzyme production were then evaluated.

* Corresponding author

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2021.129749.1406](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.129749.1406)



[20.1001.1.23225173.1401.11.42.5.4](https://ris.org/20.1001.1.23225173.1401.11.42.5.4)

Results: *Sarocladium kiliense* IBRC-M 30453 was isolated from soil and identified as a potent enzyme-producing strain. The enzyme production was based on the extracellular mode. An optimum enzyme activity of 62.4 U ml⁻¹ was obtained at the temperature of 25°C with inoculum size of 9% (v/v) and sucrose containing carbon and ammonium chloride as the nitrogen source. The optimization process led to 2.8-fold increase in the enzyme production.

Discussion and Conclusion: There is a market demand for an alternate source of L-asparaginase with fewer adverse effects due to an increase in the clinical and industrial applications of this enzyme. Fungal L-asparaginase can be the proper answer to the current status of the market. However, application of statistical optimization processes and genetic manipulation have been recommended in other studies to achieve its maximum production level and improve feasibility of its industrial production.

Key words: Anticancer, Isolation, L-asparaginase, Optimization, Submerged Fermentation, Yeast-Like Microorganisms

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال یازدهم، شماره ۴۲، تابستان ۱۴۰۱، صفحه ۸۵-۱۰۲
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۷

شناسایی و بهبود تولید آنزیم L-آسپاراژیناز با استفاده از سویه قارچی جدا شده از خاک: *Sarocladium kiliense* IBRC-M 30453

ندا فاضلی: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران، nedafazeli@ymail.com
نیره علی‌مددی: بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران، nayyereh_alimadadi@yahoo.com
شقایق نصر*: بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران، shaghayegh2963@yahoo.com

چکیده

مقدمه: L-آسپاراژیناز یک آنزیم ضدسرطان مهم است که در صنایع پزشکی و غذایی کاربرد دارد. با در نظر داشتن اهمیت L-آسپاراژیناز در صنایع مختلف، یافتن سویه‌های مولد جدیدی ارجحیت می‌یابد که بتوانند سطح بالاتری از آنزیم با حداقل عوارض جانبی را تولید کنند.

مواد و روش‌ها: غربالگری اولیه سویه‌های مولد L-آسپاراژیناز با آزمون کیفی روی پلیت محیط کشت زاپک داکس آگار تغییر یافته حاوی L-آسپاراژین به عنوان منبع نیتروژن و فنل رد به عنوان اندیکاتور pH انجام شد. فعالیت L-آسپاراژینازی سویه مولد با استفاده از روش نسلیزاسیون اندازه گیری شد. شناسایی سویه قارچی با تعیین ویژگی‌های مورفولوژیک و آنالیز فیلوژنی ژن‌های ریبوزومی ITS (نواحی فاصله‌انداز رونویسی شونده داخلی) و ژن LSU (زیر واحد بزرگ ریبوزومی) انجام شد. تولید L-آسپاراژیناز با روش یک عامل در هر زمان بهینه‌سازی شد. تأثیر دما، میزان مایه تلقیح، منبع کربن و نیتروژن بر تولید آنزیم ارزیابی شد.

نتایج: سویه *Sarocladium kiliense* IBRC-M 30453 از خاک، جداسازی و به‌عنوان یک سویه بالقوه مولد L-آسپاراژیناز شناسایی شد. روش تولید آنزیم خارج سلولی بود. فعالیت بهینه آنزیم $62/4 \text{ U ml}^{-1}$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، میزان مایه تلقیح حجمی ۹ درصد و با استفاده از سوکروز به‌عنوان منبع کربن و آمونیوم کلراید به‌عنوان منبع نیتروژن به دست آمد. فرایند بهینه‌سازی به افزایش ۲/۸ برابری تولید آنزیم منجر شد.

بحث و نتیجه‌گیری: به دلیل افزایش کاربردهای پزشکی و غذایی L-آسپاراژیناز در بازار تجاری، تقاضا برای این آنزیم از منابع جدید و با عوارض جانبی کمتر وجود دارد و L-آسپاراژیناز قارچی می‌تواند پاسخی مناسب به وضعیت کنونی بازار باشد؛ با وجود این، به کارگیری روش‌های آماری بهینه‌سازی و دست‌ورزی‌های ژنتیکی در مطالعات پیش رو برای دستیابی به حداکثر میزان تولید و بهبود قابلیت تولید صنعتی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ضدسرطان، جداسازی، L-آسپاراژیناز، بهینه‌سازی، تخمیر غوطه‌ور، شبه‌مخمر

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



10.22108/BJM.2021.129749.1406



20.1001.1.23225173.1401.11.42.5.4

مقدمه

مورد نیاز در جهان و یک سوم نیاز به ترکیبات ضدلوکمی و ضدلنفوما را تأمین می‌کند (۳).

آنزیم L- آسپاراژیناز در بافت‌های حیوانی و توسط گیاهان و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود؛ اما انسان قابلیت تولید این آنزیم را ندارد (۷) و منابع میکروبی تولید، به دلیل سرعت بالای رشد میکروارگانیسم‌ها و امکان به‌کارگیری سویسترای ارزان قیمت در فرایند تولید نسبت به سایر منابع ترجیح داده می‌شوند (۲). در زمان حاضر تمامی L- آسپاراژیناز دارویی موجود در بازار از دو منبع باکتریایی *Escherichia coli* و *Dickeya dadantii* (با نام قبلی *Erwinia chrysanthemi*) تولید می‌شوند (۱ و ۳)؛ اگرچه مصرف این آنزیم‌ها می‌تواند با عوارض جانبی مانند واکنش حساسیت بیش از حد در بیماران و به‌دنبال آن شوک آنافیلاکسی و خنثی شدن دارو همراه شود (۸). در مقابل تولید آنزیم از منابع یوکاریوتی به دلیل شباهت بیشتر این میکروارگانیسم‌ها به انسان می‌تواند با عوارض جانبی کمتری همراه باشد و سمیت کمتر و پاسخ ایمنی کمتری را القا کند (۹ و ۱۰). برخی از ویژگی‌های این آنزیم مانند حساسیت حرارتی به دماهای بالا، نیمه‌عمر کوتاه و واکنش‌های آلرژیک، فعالان حوزه بیوتکنولوژی را بر آن داشته است تا به‌دنبال یافتن منابع میکروبی جدید برای تولید این آنزیم با بازده تولید بالاتر و عوارض جانبی کمتر باشند (۹ و ۱۰). آنزیم L- آسپاراژیناز در میکروارگانیسم‌ها به‌صورت درون سلولی و خارج سلولی تولید می‌شود؛ اما آنزیم‌های خارج سلولی به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند تمایل بالاتر برای آسپاراژین به‌عنوان سویسترا، سهولت استخراج آنزیم، پایداری بیشتر و کاهش هزینه‌های فرایند تولید نسبت به نمونه‌های درون سلولی برتری دارند. با توجه به اینکه قارچ‌ها توانایی بالایی در تولید آنزیم‌های خارج سلولی

آنزیم L- آسپاراژیناز یا به عبارت کامل‌تر L- آسپاراژین آمینویدرولاز^۱ آنزیمی است که هیدرولیز اسید آمینه آسپاراژین را به آسپارتیک اسید و آمونیاک کاتالیز می‌کند (۱). این آنزیم از لحاظ ساختاری هموترامریک است و معمولاً وزن مولکولی ۱۴۰ تا ۱۵۰ کیلودالتون دارد (۲). L- آسپاراژیناز کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی و داروسازی دارد. آنزیم L- آسپاراژیناز در صنایع غذایی با هدف کاهش میزان تولید آکریل آمید در واکنش میلارد و در هنگام پخت یا سرخ‌شدن مواد غذایی غنی از نشاسته به کار گرفته می‌شود (۱) و در صنایع دارویی با مصرف L- آسپاراژین در سلول‌های سرطانی، موجب مهار سنتز پروتئین‌ها و توقف رشد سلول در مرحله G1 می‌شود و سلول‌ها را به سمت آپوپتوز سوق می‌دهد؛ از این رو به‌عنوان داروی ضدسرطان در درمان لوکمی لنفوبلاستیک حاد^۲ و به‌صورت تزریق درون سیاهرگی یا عضلانی استفاده می‌شود (۳ و ۴). سلول‌های سرطانی به دلیل فقدان آنزیم L- آسپاراژین سنتتاز نمی‌توانند اسید آمینه L- آسپاراژین مورد نیاز خود را بسازند و از این رو به منابع خارجی آن وابسته‌اند؛ درحالی‌که سلول‌های سالم به دلیل داشتن آنزیم مذکور قادرند پاسخگوی نیاز خود به L- آسپاراژین باشند (۵). علاوه بر صنایع فوق، آنزیم L- آسپاراژیناز می‌تواند از طریق تعیین میزان L- آسپاراژین به‌عنوان سنسور زیستی در صنایع غذایی و سایر صنایع به کار گرفته شود (۶). بازار جهانی آنزیم‌های کاربردی در بخش درمانی روند رو به رشدی دارد و انتظار می‌رود این بازار با رشد ۷/۴ درصدی از ۵ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۶ به ۶/۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۱ برسد. آنزیم L- آسپاراژیناز ۴۰ درصد کل آنزیم

شدند. پس از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه شد و مقدار ۰/۱ میلی لیتر از محلول تلقیح (حاوی ۰/۱ درصد توین ۸۰ و ۰/۵ درصد آگار) به میکروتیوب افزوده و سپس همگن شد. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با استفاده از سرسمپلر استریل برداشته و سویه مدنظر به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت زاپک داکس آگار تغییر یافته^۶ حاوی معرف فل رد ۰/۰۰۹ درصد کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز گرماگذاری شدند (۱۱ و ۱۲). pH اولیه محیط کشت روی ۶/۲ تنظیم شد و پلیت‌های تلقیح نشده، کنترل در نظر گرفته شدند (۱۳). فعالیت آنزیم آسپاراژیناز با آزادسازی آمونیاک ناشی از هیدرولیز آسپاراژین باعث قلیایی شدن محیط می‌شود و رنگ محیط اطراف کلنی مخمرها تغییر می‌کند. قطر ناحیه تغییر رنگ یافته به عنوان هاله هیدرولیز اندازه‌گیری شد (۴ و ۱۴).

ترکیب محیط کشت مایع YPD شامل عصاره مخمر ۵، پپتون ۱۰ و گلوکز ۲۰ گرم در هر لیتر است (۱۵). ترکیب محیط کشت غربالگری شامل گلوکز ۲، L-آسپاراژین ۱۰، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۱/۵۲، کلرید پتاسیم ۰/۵۲، سولفات منیزیم هفت آبه ۰/۵۲ و آگار ۲۰ گرم در هر لیتر است و pH محیط کشت روی ۶/۲ تنظیم شد (۱۶).

غربالگری برای فعالیت آنزیمی گلوتامینازی: فعالیت L-گلوتامینازی در سویه قارچی مولد L-آسپاراژیناز بررسی شد. برای این منظور در ترکیب محیط کشت زاپک داکس آگار تغییر یافته به جای L-آسپاراژین مقدار ۱۰ گرم در لیتر L-گلوتامین قرار گرفت و قابلیت تولید گلوتامیناز پس از ۵ روز گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بررسی شد (۱۷).

تهیه مایه تلقیح در محیط پیش‌کشت: برای تلقیح

دارند، می‌توانند به عنوان منابع میکروبی مناسبی برای تولید آنزیم به کار گرفته شوند (۲ و ۹).

هدف این پژوهش معرفی سویه جدید قارچی مولد آنزیم L-آسپاراژیناز خارج سلولی و بهبود کارایی تولید آنزیم در این سویه با به کارگیری روش بهینه‌سازی یک عامل در هر زمان طی فرایند کشت غوطه‌ور است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانسیم و شرایط کشت: سویه قارچ مدنظر از نمونه خاک (تهران، 35°42'46.1"N 51°18'15.4"E)، با تهیه رقت‌های سریال ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۶} از محلول نمکی (۰/۹ NaCl درصد) و به روش کشت سطحی^۳ روی محیط کشت رز بنگال کلرامفنیکل آگار^۴ جداسازی شد. پلیت‌ها به مدت ۷ روز در اینکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. ترکیب محیط کشت رز بنگال کلرامفنیکل آگار شامل پپتون سویا ۵، گلوکز ۱۰، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۱، سولفات منیزیم هفت آبه ۰/۵، رنگ رز بنگال ۰/۰۵، کلرامفنیکل ۰/۱ و آگار ۱۷ گرم در هر لیتر است و pH محیط کشت روی ۵/۵ تنظیم شد (۱۱). سویه قارچی پس از آن به محیط کشت عصاره مخمر - پپتون - دکستروز آگار^۵ (YPD آگار) انتقال داده و نگهداری موقت قارچ با تجدید کشت با فواصل زمانی یک ماهه روی همین محیط انجام شد.

غربالگری سویه‌های قارچی برای دستیابی به سویه‌های مولد L-آسپاراژیناز: کشت تازه از قارچ هدف، در محیط کشت مایع YPD تلقیح شد و پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در شیکر اینکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور همزنی ۱۵۰ rpm، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت از لوله‌ها برداشته و به درون میکروتیوب‌های استریل ریخته شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در ۱۰۰۰۰ ×g سانتریفیوژ

شدند. تشکیل هاله تغییر رنگ یافته در اطراف چاهک به‌عنوان فعالیت L-آسپاراژینازی خارج سلولی تلقی خواهد شد (۱۸).

سنجش میزان فعالیت آنزیمی: میزان تولید آنزیم L-آسپاراژیناز در سویه فارچی مدنظر با استفاده از روش نسلریزاسیون ارائه‌شده توسط ریستون^۸ و یلین^۹ در سال ۱۹۷۳ (۱۹) و ایمادا^{۱۰} و همکاران در سال ۱۹۷۳ (۲۰) از طریق سنجش میزان آمونیاک آزادشده به‌عنوان محصول نهایی واکنش آنزیمی کمی‌سازی شد. مخلوط واکنش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر L-آسپاراژین ۰/۴ مولار، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر تریس - اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۸/۶ و ۰/۵ میلی‌لیتر غلظت مناسبی از آنزیم خام است که برای مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. واکنش آنزیمی با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۱/۵ مولار تری کلرو استیک اسید متوقف می‌شود. نمونه کنترل منفی با افزودن آنزیم خام غیرفعال (تیمارشده در دمای جوش به مدت ۳۰ دقیقه) پس از گرماگذاری در شرایط مشابه خوانش شد. برای حذف پروتئین‌های رسوب‌کرده، مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در $10000 \times g$ ، سانتریفیوژ و مایع شفاف رویی برای انجام سنجش جمع‌آوری شد. برای سنجش میزان آمونیاک آزادشده، ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع شفاف رویی واکنش آنزیمی با ۳/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف نسلر مخلوط شد. پس از مدت زمان ۱۰ دقیقه میزان جذب نوری نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-1800 (شرکت شیماتزو^{۱۱} سوئیس) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد. میزان آمونیاک آزادشده در نمونه مجهول با مقایسه میزان جذب نوری این نمونه با منحنی استاندارد رسم‌شده برای غلظت‌های ۰/۹-۰ میلی‌مولار آمونیوم

محیط تولید، سویه فارچ مدنظر در لوله آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط زاپک داکس آگار تغییر یافته کشت داده شد و برای مدت ۷۲ ساعت در شیکر اینکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور همزنی rpm ۱۵۰ گرماگذاری شد. سپس مایع کشت به مدت ۱۵ دقیقه در $10000 \times g$ ، سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. سلول‌های رسوب داده شده در محیط کشت مایع سوسپانسیون شدند و جذب نوری محیط کشت تولید به کمک این سلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی ۰/۱ تنظیم شد.

تولید L-آسپاراژیناز در محیط تولید به روش کشت غوطه‌ور: فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع زاپک داکس آگار تغییر یافته با سویه فارچی تلقیح شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور همزنی rpm ۱۵۰ گرماگذاری شد. پس از ۴ روز گرماگذاری، محیط کشت با سانتریفیوژ یخچالدار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در $10000 \times g$ ، سانتریفیوژ و مایع شفاف رویی به‌عنوان آنزیم خام در آنالیزهای بعدی استفاده شد.

ارزیابی روش تولید آنزیم: روش تغییر یافته چاهک پلیت برای ارزیابی نحوه تولید آنزیم L-آسپاراژیناز استفاده شد. در این روش پلیت جامد حاوی محیط کشت زاپک داکس آگار تغییر یافته به همراه ۰/۰۰۹ درصد رنگ فنل رد تهیه و پس از جامد شدن محیط کشت چاهک‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر با استفاده از پیت پاستور در آنها ایجاد شد. چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم خام فیلتر شده (با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر استات سلولز شرکت سارتوریوس^{۱۲}) پر شدند. آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری

آمیزی ژل با رنگ اتیدیوم بر مایند بررسی شد. پس از مشاهده باند حاصل روی ژل الکتروفورز، محصول واجد کیفیت مناسب برای تعیین توالی به شرکت فزایپروه فرستاده شد. پس از توالی‌یابی، توالی‌های به دست آمده با نرم افزار ChromasPro ویرایش شدند و توالی حاصل از خوانش در دو جهت موتناژ شد و توالی نهایی در پایگاه‌های داده CBS و GenBank بررسی و سویه شناسایی شد.

رسم درخت فیلوژنتیکی: سویه‌های شاخص نزدیک در جنس مدنظر انتخاب شد و توالی‌های آنها از پایگاه داده GenBank دریافت شدند. برای هم‌ترازی توالی‌ها از الگوریتم Clustal W (۲۴) موجود در نرم‌افزار MEGA7 استفاده شد. برای تعیین موقعیت تاکسونومیک سویه‌ها، درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor-Joining توسط نرم‌افزار MEGA7 با استفاده از الگوریتم کیمورا^{۱۱} دو پارامتره رسم شد (۲۵). سطوح اطمینان شاخه‌ها توسط آنالیز Bootstrap (۲۶) با ۱۰۰۰ تکرار تخمین زده شد.

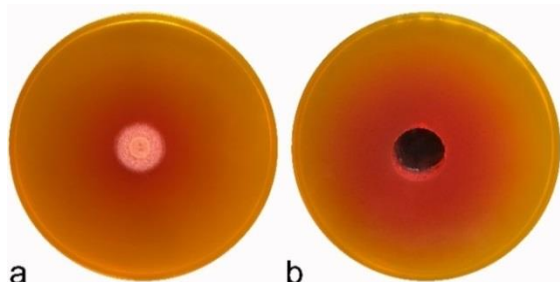
بهینه‌سازی تولید آنزیم با روش یک عامل در هر زمان: فرایند بهینه‌سازی سویه قارچی مدنظر، بر اساس روش یک عامل در هر زمان^{۱۳} انجام شد که در آن در هر مرحله از آزمایش تنها یک فاکتور تغییر می‌کند و بقیه عوامل ثابت نگاه داشته می‌شوند. در این بررسی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت درون فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری به‌عنوان حجم تولید لحاظ شد. پارامترهای میزان مایه تلقیح (۱، ۳، ۶ و ۹ درصد حجمی)، دمای گرماگذاری (۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، منابع کربن مختلف با غلظت ۱ درصد (گلوکز، سوکروز، سیتریک‌اسید و گلیسرول)، منابع نیتروژن غیرآلی با غلظت ۱ درصد (کلرید آمونیوم و نترات سدیم) و منابع نیتروژن آلی با غلظت ۱ درصد (عصاره مخمر، پرولین و L-

سولفات به دست آمد. یک واحد L-آسپاراژیناز (U) به صورت میزان آنزیمی تعریف شد که در هر دقیقه ۱ میکرومول آمونیاک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۸/۶ تولید می‌کند.

تعیین ویژگی‌های مورفولوژیک: ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویه قارچی پس از ۷۲ ساعت رشد روی محیط کشت YPD آگار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی و تصویربرداری شد.

شناسایی مولکولی: استخراج DNA به روش فنل کلروفرم و با استفاده از دانه‌های شیشه‌ای انجام شد (۲۱). برای شناسایی سویه قارچی، ناحیه D1/D2 ژن rRNA زیرواحد بزرگ ریپوزومی (LSU) با استفاده از پرایمرهای NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' و 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') NL4 (شامل قسمت انتهایی ژن rRNA زیرواحد کوچک ریپوزومی، ناحیه ITS1، ژن 5.8S rRNA، ناحیه ITS2 و قسمت ابتدایی ژن rRNA LSU) با استفاده از پرایمرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به روش PCR تکثیر و سپس توالی‌یابی شد (۲۲ و ۲۳). برنامه PCR شامل مرحله واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل ۴۵ ثانیه واسرشت شدن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن برای مدت ۱ دقیقه و یک مرحله طویل شدن نهایی ۷ دقیقه‌ای تنظیم شد. محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر X TAE ۰/۵، بارگذاری و پس از الکتروفورز به مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۱۲۰ ولت و رنگ

انجام و فعالیت آنزیمی مایع بدون سلول به دست آمده، به روش چاهک پلیت ارزیابی شد. در اطراف چاهک هاله تغییر رنگ به قطر حدود ۳ سانتی‌متر مشاهده شد که بیان‌کننده تولید آسپاراژیناز خارج سلولی توسط این سویه است (شکل ۱b).



شکل ۱- تشکیل هاله تغییر رنگ در محیط کشت زاپک داکس آگار تغییر یافته به همراه ۰/۰۰۹ درصد رنگ فنل رد؛ (a) کشت سویه قارچی برای غربالگری اولیه، (b) روش چاهک پلیت برای بررسی خارج سلولی بودن آنزیم L-آسپاراژیناز

تولید آنزیم آسپاراژیناز در کشت غوطه‌ور: کشت

غوطه‌ور سویه قارچی IBRC-M 30453 در فلاسک‌های حاوی محیط کشت مایع زاپک داکس تغییر یافته به مدت ۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور همزنی ۱۵۰ rpm انجام شد. فعالیت آنزیمی مایع روی کشت با سنجش میزان آمونیاک آزاد شده به روش نسلریزاسیون و با استفاده از منحنی استاندارد (شکل ۲) اندازه‌گیری شد. میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط این سویه $22/3 \pm 4/2 \text{ U ml}^{-1}$ به دست آمد.

آسپاراژین (ارزیابی شدند. نمونه برداری از محیط تولید، پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری انجام و تراکم سلولی در طول موج ۶۰۰ نانومتر و میزان فعالیت آنزیمی در هر نمونه تعیین شد.

آنالیزهای آماری: تمامی آزمایش‌ها با سه بار تکرار

انجام شدند و نتایج ارائه شده حاصل میانگین این تکرارها \pm استاندارد خطای میانگین این سه تکرار مستقل‌اند. داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی با ضریب اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار Minitab ویرایش ۱۷، آنالیز و داده‌هایی با P values کمتر از ۰/۰۵ معنادار تلقی شدند.

نتایج

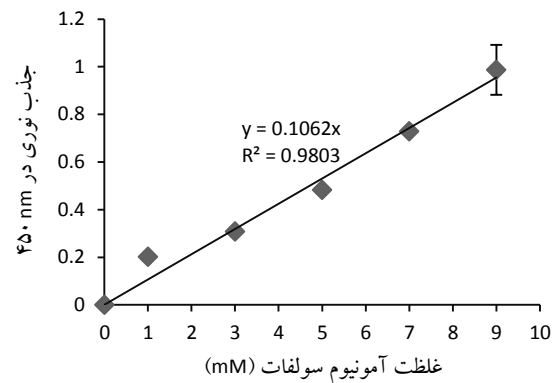
غربالگری برای تولید آنزیم‌های آسپاراژیناز و

گلوتامیناز: سویه قارچی IBRC-M 30453 از خاک جداسازی شد و قابلیت تولید آنزیم L-آسپاراژیناز توسط آن روی محیط کشت زاپک داکس آگار تغییر یافته حاوی L-آسپاراژین و معرف فنل رد بررسی شد. پس از ۵ روز گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، تغییر رنگ در محیط کشت به صورت تشکیل هاله‌ای به رنگ قرمز با قطر حدود ۲/۵ سانتی‌متر مشاهده شد (شکل ۱a). این تغییر رنگ بیان‌کننده تولید آنزیم L-آسپاراژیناز و قلیایی شدن محیط بر اثر آزادسازی آمونیاک ناشی از هیدرولیز آسپاراژین است. در شرایط گرماگذاری یکسان، کشت سویه قارچی روی محیط کشت حاوی L-گلوتامین و معرف فنل رد نیز منجر به تشکیل هاله‌ای قرمز رنگ به قطر حدود ۵ سانتی‌متر شد که بیان‌کننده تولید آنزیم گلوتامیناز توسط این سویه است.

به منظور بررسی نحوه تولید آنزیم آسپاراژیناز، کشت غوطه‌ور در محیط کشت زاپک داکس آگار تغییر یافته،

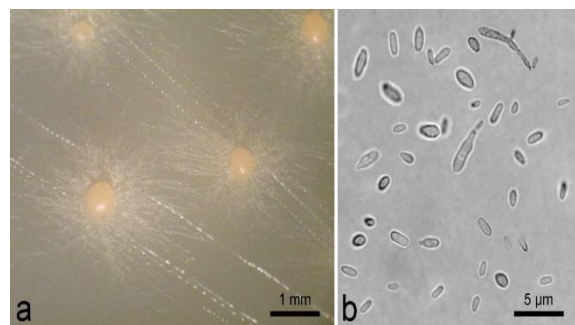
شناسایی مولکولی سویه قارچی IBRC-M 30453 با استفاده از آنالیز دو توالی ریوزومی انجام شد. قطعه‌ای به طول حدود ۶۰۰ جفت باز به عنوان محصول PCR برای هر دو ناحیه تکثیر شد (شکل ۴). پس از توالی‌یابی، توالی ناحیه D1/D2 در ژن LSU rDNA و ITS به ترتیب با شماره دسترسی MN128534 و MN128515 در پایگاه داده GenBank ثبت شد. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه‌های داده GenBank و CBS نشان داد این توالی‌ها به میزان ۹۹-۱۰۰ درصد به توالی‌های مربوط به سویه‌هایی از گونه *Sarocladium kiliense* شباهت داشت. با جستجوی توالی‌های ناحیه D1/D2 میان توالی‌های سویه‌های شاخص^{۱۴} در پایگاه‌های داده مشخص شد نزدیک‌ترین توالی مربوط به سویه شاخص گونه *S. kiliense* با میزان تشابه ۹۹/۸۳ درصد است (جدول ۱). این توالی همچنین به میزان ۱۰۰ درصد با توالی سویه‌هایی از این گونه مانند سویه‌های CBS 377.70F و CBS 145.62 (شماره دسترسی MH871482 و MH878541) شباهت داشت. با مقایسه توالی ناحیه ITS در پایگاه‌های داده نیز نزدیک‌ترین توالی مربوط به سویه شاخص گونه *S. kiliense* با میزان تشابه ۹۹/۶۲ درصد است (جدول ۱). توالی ناحیه ITS این سویه به میزان ۱۰۰ درصد با توالی ITS سویه‌هایی از این گونه مانند سویه‌های AUMC 11033 و Kw63-15 (شماره دسترسی LN864540 و KX384658) شباهت دارد.

برای تعیین موقعیت تاکسونومیک سویه قارچی، درخت فیلوژنتیکی براساس توالی‌های به دست آمده و توالی‌های سویه‌های شاخص گونه‌های نزدیک رسم شد. این سویه در درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده برای

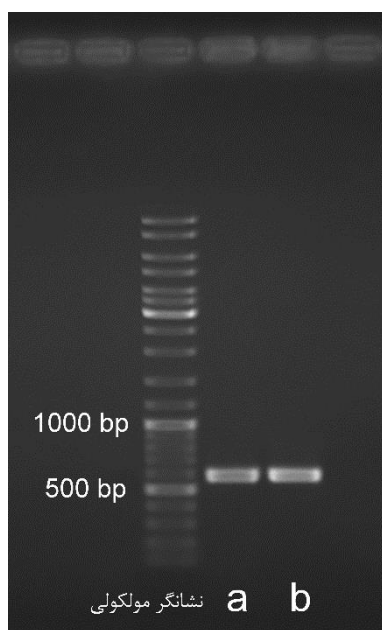


شکل ۲- منحنی استاندارد برای سنجش میزان آمونیاک با استفاده از معرف نسلر که بیان‌کننده رابطه خطی بین جذب نوری و غلظت یون آمونیوم در دامنه‌های مشخص شده جذب و غلظت است.

شناسایی سویه مولد آسپاراژیناز: ویژگی‌های مورفولوژیک سویه قارچی IBRC-M 30453 پس از رشد روی محیط کشت YPD آگار به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شدند (شکل ۳). کلنی این سویه گلبهی رنگ، مات، محدب، با قوام کره‌ای و با حاشیه میسلومی گسترده بود. سلول‌ها بیضی شکل تا استوانه‌ای با انتهای گرد بودند و با جوانه‌زنی قطبی تکثیر می‌شدند. سلول‌های کشیده‌تر و هیف نیز در کشت این سویه مشاهده شدند که بیان‌کننده حالت شبه مخمری و دی‌مورفیک بودن آن هستند.



شکل ۳- تصاویر ماکرومورفولوژی (a) و میکرومورفولوژی (b) سویه قارچی IBRC-M 30453 *Sarocladium kiliense* پس از رشد روی محیط کشت YPD آگار به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

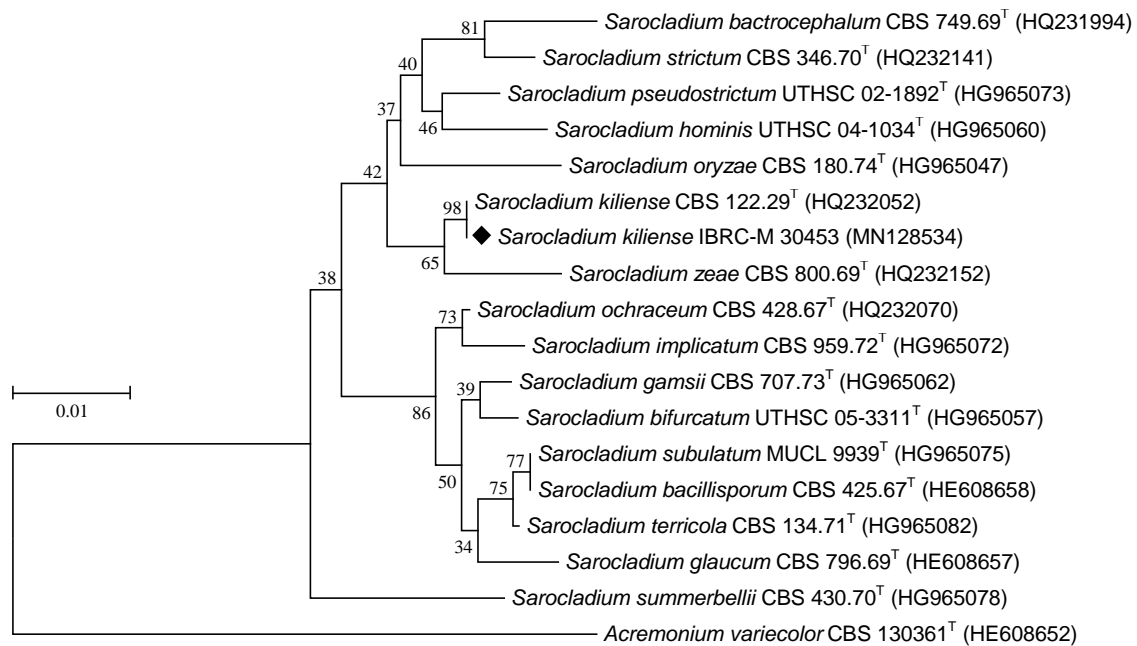


شکل ۴- تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR تکثیرشده از ناحیه D1/D2 در ژن LSU rRNA (a) و ناحیه ITS (b) در سویه قارچی *Sarocladium kiliense* IBRC-M 30453

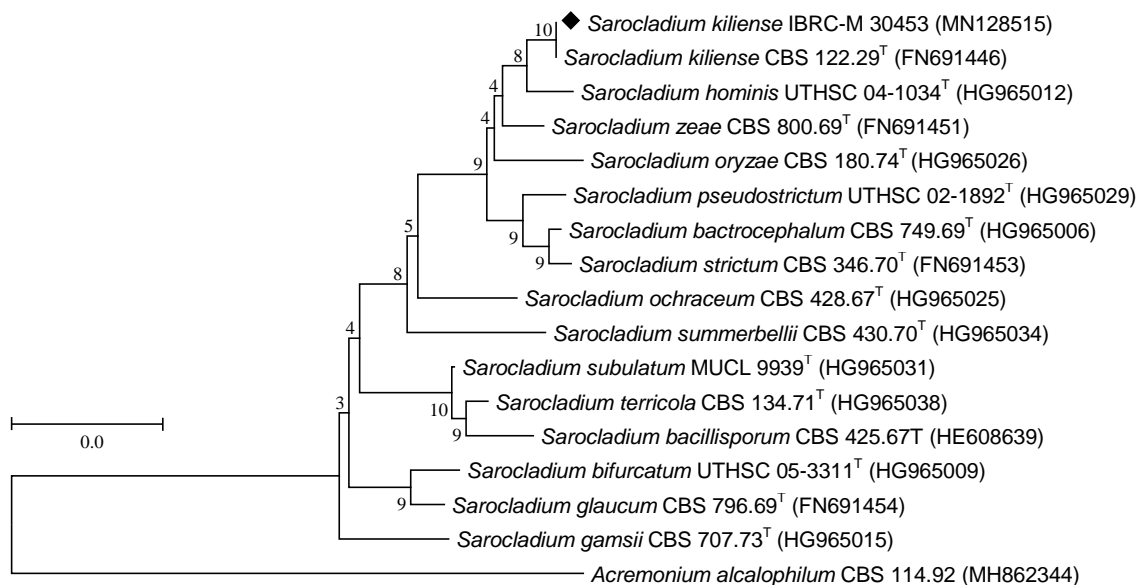
نواحی D1/D2 ژن LSU rRNA و ITS (شکل‌های ۵ و ۶)، در جایگاه یکسانی با گونه *S. kiliense* قرار گرفت. این جایگاه فیلوژنتیک با نتایج به دست آمده از BLAST توالی‌ها در پایگاه‌های داده نیز مطابقت داشت؛ بنابراین، براساس میزان تشابه و همچنین آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌ها تعلق سویه قارچی IBRC-M 30453 به گونه *S. kiliense* تأیید شد.

جدول ۱- نتایج BLAST توالی‌های به دست آمده با توالی‌های سویه‌های شاخص موجود در پایگاه‌های داده GenBank و CBS

Score	هم‌پوشانی (%)	تشابه (%)	شماره دسترسی	نزدیک‌ترین سویه‌های شاخص	طول توالی	قطعه ژنی
۱۰۸۱	۱۰۰	۹۹/۸۳	MH866490	<i>S. kiliense</i> CBS 122.29 ^T	۵۸۸	D1/D2
۱۰۴۸	۱۰۰	۹۸/۸۱	NG_067385	<i>S. zae</i> CBS 800.69 ^T		
۱۰۳۷	۱۰۰	۹۸/۴۷	MH871457	<i>S. strictum</i> CBS 346.70 ^T		
۹۷۴	۹۴	۹۹/۶۲	NR_130684	<i>S. kiliense</i> MUCL 9724 ^T	۵۶۷	ITS
۸۷۲	۱۰۰	۹۴/۲۶	AY138845	<i>S. strictum</i> CBS 346.70 ^T		
۸۶۳	۹۵	۹۵/۴۲	NR_155779	<i>S. hominis</i> UTHSC 04-1034 ^T		



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از آنالیز Neighbor-Joining برای توالی ناحیه LSU rDNA D1/D2 که موقعیت سویه مورد بررسی (◆) را در میان گونه‌های خویشاوند در جنس *Sarocladium* نشان می‌دهد. شماره دسترسی به توالی‌ها در GenBank در پرانتز نوشته شده است. قارچ *Acremonium varicolor* CBS 130361^T به عنوان گروه خارجی تعیین شد. میزان Bootstrap (۱۰۰۰ تکرار) در محل انشعابات درخت نشان داده شده است. خط مقیاس، ۰/۰۱ جایگزینی نوکلئوتیدی به ازای هر جایگاه نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از آنالیز Neighbor-Joining برای توالی ناحیه ITS که موقعیت سویه مورد بررسی (◆) را در میان گونه‌های خویشاوند در جنس *Sarocladium* نشان می‌دهد. شماره دسترسی به توالی‌ها در GenBank در پرانتز نوشته شده است. قارچ *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92 به عنوان گروه خارجی تعیین شد. میزان Bootstrap (۱۰۰۰ تکرار) در محل انشعابات درخت نشان داده شده است. خط مقیاس، ۰/۰۵ جایگزینی نوکلئوتیدی به ازای هر جایگاه نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد.

درجه سانتی‌گراد معنادار بود؛ اما نسبت به دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد تفاوت معناداری از لحاظ آماری نداشت (شکل ۷b).

اثر منابع کربن مختلف شامل گلوکز، سوکروز، گلاسیسین و گلیسرول با غلظت ۱ درصد بر میزان رشد و تولید آنزیم بررسی شد. میزان تولید آنزیم در حضور منابع کربن مختلف از لحاظ آماری تفاوت معناداری نداشت؛ اما با توجه به مقدار فعالیت آنزیمی بیشتر در حضور سوکروز و ارزان و در دسترس بودن این منبع کربن، سوکروز به‌عنوان منبع کربن منتخب برای آزمایش بعدی در نظر گرفته شد. میزان رشد سویه قارچی در حضور منابع کربن مختلف متفاوت بود و بیشترین میزان رشد به‌ترتیب در حضور گلوکز، سوکروز، گلیسرول و سیتریک‌اسید به دست آمد (شکل ۷c).

اثر سه منبع نیتروژن آلی شامل آسپاراژین، پرولین و عصاره مخمر و دو منبع نیتروژن معدنی شامل سدیم نترات و آمونیوم کلراید با غلظت ۱ درصد بر میزان رشد و تولید آنزیم بررسی شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی و بیشترین میزان رشد با تفاوت معنادار از لحاظ آماری، در حضور آمونیوم کلراید، مشاهده و به‌عنوان منبع نیتروژن بهینه در نظر گرفته شد. پس از آمونیوم کلراید، بیشترین تولید آنزیم به‌ترتیب در حضور L-آسپاراژین و عصاره مخمر به دست آمد. کمترین میزان تولید آنزیم نیز با L-پرولین و سدیم نترات به دست آمد (شکل ۷d).

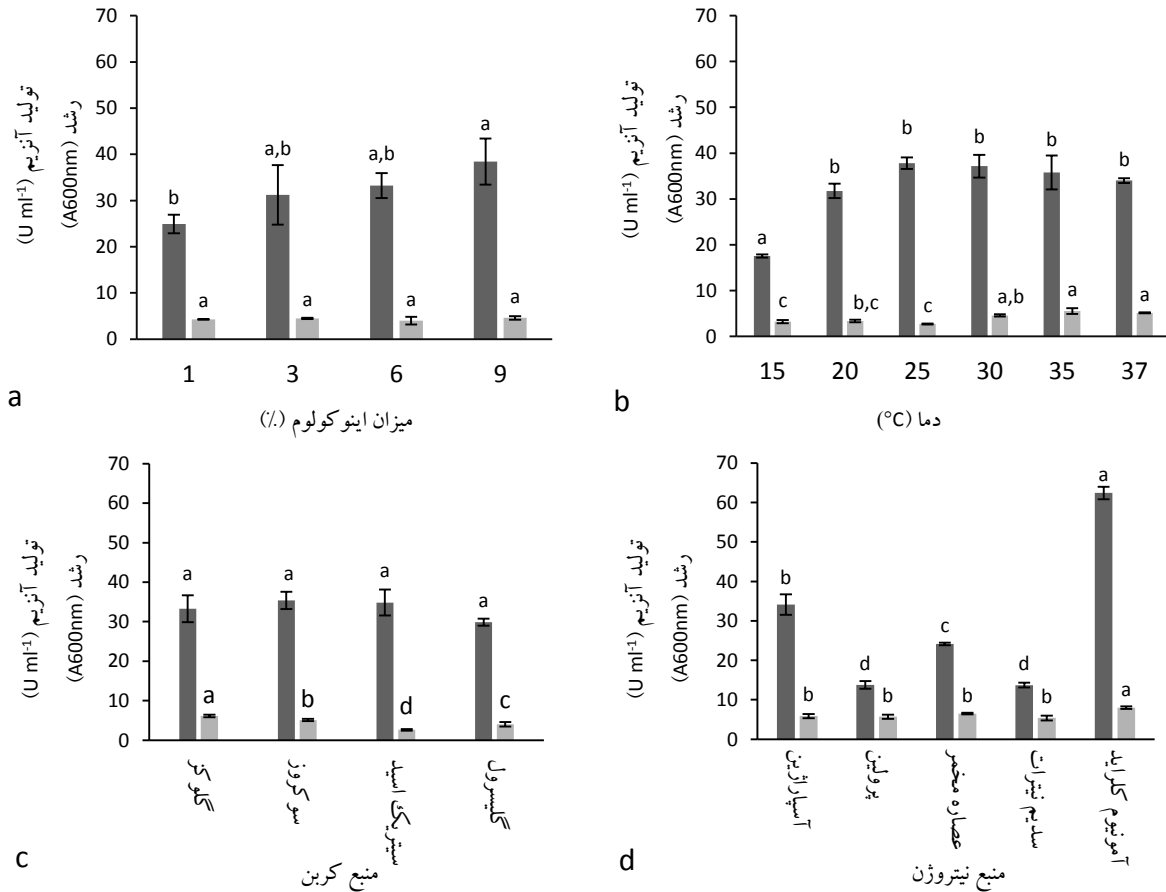
در پایان، بهینه‌سازی به روش یک عامل در هر زمان، میزان تولید آنزیم توسط سویه *Sarocladium kiliense* IBRC-M 30453 ml^{-1} $\pm 1/6$ U در شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و میزان مایه تلقیح ۹ درصد و

بهینه‌سازی تولید آنزیم آسپاراژیناز: برای تعیین عوامل مؤثر بر میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز، چهار عامل میزان مایه تلقیح یا اینوکولوم، دمای گرماگذاری، منبع کربن و منبع نیتروژن به‌ترتیب بررسی شدند. برای مقایسه شرایط مختلف، میزان فعالیت آنزیمی و میزان رشد براساس جذب نوری کشت پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری با دور همزنی ۱۵۰ rpm اندازه‌گیری شدند. برای بهینه‌سازی میزان اینوکولوم، پیش‌کشت با نسبت حجمی ۱، ۳، ۶ و ۹ درصد به محیط کشت تولید آنزیم تلقیح شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی با میزان اینوکولوم ۹ درصد مشاهده شد که تفاوت آن از لحاظ آماری نسبت به اینوکولوم ۱ درصد معنادار بود؛ اما با اینوکولوم‌های ۶ و ۳ درصد تفاوت معنی‌داری نشان نداد؛ بنابراین، اینوکولوم ۹ درصد که بالاترین میزان فعالیت آنزیمی با آن مشاهده شد، به‌عنوان اینوکولوم منتخب برای آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شد. بیشترین میزان رشد نیز با اینوکولوم ۹ درصد مشاهده شد؛ اگرچه تفاوت رشد در اینوکولوم‌های مختلف معنادار نبود (شکل ۷a).

برای بهینه‌سازی دما، کشت‌ها در محیط تولید آنزیم در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که تفاوت آن نسبت به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد معنادار بود؛ اما نسبت به سایر دماها از لحاظ آماری تفاوت معناداری نداشت. با توجه به اینکه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیمی بالاتری به دست آمد، این دما به‌عنوان دمای منتخب در آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شد. بیشترین میزان رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که تفاوت آن نسبت به دماهای ۱۵، ۲۰ و ۲۵

میزان تولید آنزیم فرایند بهینه‌سازی به افزایش ۲/۸ برابری تولید آنزیم منجر شد.

با استفاده از سوکروز به عنوان منبع کربن و آمونیوم کلراید به عنوان منبع نیتروژن به دست آمد؛ بنابراین،



شکل ۷- اثر عوامل مختلف بر میزان تولید آنزیم (ستون‌های خاکستری) و رشد (ستون‌های سفید) سویه قارچی *Sarocladium kiliense* IBRC-M 30453. شرایط ثابت آزمایش: گرماگذاری ۹۶ ساعت و دور همزنی ۱۵۰ rpm

متفاوت و سهولت و کاهش هزینه‌های فرایندهای فرودستی وجود دارد. امروزه از میان منابع میکروبی آنزیم L-آسپاراژیناز، قارچ‌ها به دلیل واکنش‌های آلرژیک کمتر، بازده تولید بالا و تولید آنزیم خارج سلولی درخور توجه قرار گرفته‌اند (۲ و ۹ و ۱۰ و ۲۸). هنوز محصول تجاری از آنزیم L-آسپاراژیناز قارچی برای کاربرد دارویی در بازار وجود ندارد؛ اما محصولات تجاری با نام‌های PreventASe® و

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم L-آسپاراژیناز، کاربردهای مختلفی در درمان سرطان‌ها و بیماری‌های خودایمنی و عفونی، فرآوری مواد غذایی و فناوری بیوسنسورها دارد (۳ و ۲۷). با توجه به کاربردهای گسترده این آنزیم و ویژگی‌های بیوشیمیایی، ساختاری و فارماکولوژیکی متنوع L-آسپاراژینازهای شناسایی شده، تمایل به یافتن منابع جدید تولید این آنزیم با بازده بالاتر و خواص عملکردی

تولید آنزیم L-آسپاراژیناز در بیشتر میکروارگانیسم‌ها به صورت درون سلولی است. در مقیاس صنعتی، ترشح خارج سلولی آنزیم‌ها به دلیل امکان تولید بیشتر در شرایط طبیعی، پایدارتر بودن محصول و آسان‌تر شدن خالص‌سازی و کاهش هزینه‌های تولید ارجحیت دارد (۳ و ۳۳). در این مطالعه نشان داده شد سویه شبه مخمری *Sarocladium kiliense* IBRC-M 30453 آنزیم L-آسپاراژیناز را به صورت خارج سلولی تولید می‌کند. تولید این آنزیم در بیشتر قارچ‌ها به صورت خارج سلولی است؛ اما تولید درون سلولی آن نیز در برخی قارچ‌های رشته‌ای مانند *Penicillium Aspergillus*، *P. funiculosum*، *brevicompectum*، *fumigatus* و *A. phoenicis* (۳۴) و برخی گونه‌های مخمری مانند *Saccharomyces cerevisiae*، *Leucosporidium* و *Schizosaccharomyces pombe* *scottii* گزارش شده است (۳۵ و ۳۶ و ۳۷).

برخی از انواع آنزیم L-آسپاراژیناز فعالیت ثانویه هیدرولیز و دامینه کردن آمینواسید گلوتامین نیز دارند (۳۸). برخی میکروارگانیسم‌ها علاوه بر تولید آنزیم L-آسپاراژیناز، آنزیم L-گلوتامیناز نیز تولید می‌کنند (۳۹). آنزیم L-گلوتامیناز نیز یکی از آنزیم‌هایی است که به دلیل فعالیت ضدتوموری و ضدویروسی در کاربردهای پزشکی اهمیت دارد (۴۰). در برخی مطالعات نشان داده شده است فعالیت ثانویه گلوتامینازی آنزیم L-آسپاراژیناز برای فعالیت ضدتوموری آن نیاز است (۴۱)؛ با وجود این، مطالعات دیگری بیان‌کننده بروز اثرات جانبی منفی مانند واکنش‌های آلرژیک، حالت تهوع و پانکراتیت به دلیل فعالیت گلوتامینازی غیراختصاصی این آنزیم است. از این رو، سویه‌های فاقد یا دارای مقادیر اندک این فعالیت آنزیمی برای تولید

[®]Acrylaway، به ترتیب تولید شده توسط قارچ‌های *Aspergillus niger* و *A. oryzae*، در صنایع غذایی استفاده می‌شوند (۲۷). این پژوهش با هدف شناسایی سویه قارچی مولد آنزیم L-آسپاراژیناز و بررسی اولیه شرایط تولید آنزیم در کشت غوطه‌ور انجام شد.

قابلیت تولید آنزیم L-آسپاراژیناز در سویه‌های قارچی متعددی گزارش شده است. از مهم‌ترین قارچ‌های رشته‌ای می‌توان به جنس‌های *Aspergillus*، *Cladosporium*، *Fusarium*، *Penicillium*، *Trichoderma* و *Rhizomucor* اشاره کرد (۳). سویه‌های مخمری و شبه مخمری از جنس‌هایی مانند *Saccharomyces*، *Cryptococcus*، *Candida*، *Pichia*، *Rhodotorula*، *Yarrowia*، *Sporobolomyces*، *Aureobasidium*، *Fereydownia* و *Coniochaeta* نیز به عنوان قارچ‌های مولد این آنزیم گزارش شده‌اند (۳ و ۹). در این مطالعه، سویه شبه مخمری *Sarocladium kiliense* IBRC-M 30453 به عنوان سویه مولد آنزیم L-آسپاراژیناز معرفی شد. جنس *Sarocladium* از نظر تاکسونومی در شاخه Ascomycota، رده Sordariomycetes، راسته Hypocreales و خانواده Sarccladiaceae قرار دارد و از قارچ‌های دی‌مورفیک یا شبه مخمری به شمار می‌رود. قارچ‌های شبه مخمری به دلیل امکان تغییر بین دو حالت مخمری و رشته‌ای از نظر بیوتکنولوژی درخور توجه‌اند؛ زیرا می‌توان فرم مخمری را برای تکثیر سلولی و فرم رشته‌ای را برای تولید آنزیم‌های خارج سلولی به کار گرفت (۲۹ و ۳۰). تولید آنزیم L-آسپاراژیناز در این جنس در گونه‌های *S. kiliense*، *S. strictum* و *S. terricola* گزارش شده است (۲۸ و ۳۱ و ۳۲).

آنزیم L-آسپاراژیناز در خور توجه قرار گرفته‌اند (۳). در این پژوهش، فعالیت گلوتامینازی به روش سنجش کیفی روی محیط جامد حاوی L-گلوتامین در سویه مدنظر مشاهده شد؛ با وجود این، در شرایط تولید آنزیم L-آسپاراژیناز حضور همزمان این فعالیت‌های آنزیمی بررسی نشد. برای سویه‌های تجاری امکان حذف یا کاهش فعالیت گلوتامینازی با روش‌های مهندسی ژنتیک وجود دارد. در مطالعه بارگای^{۱۵} و مادهوری^{۱۶} (۲۰۲۱)، تولید آنزیم گلوتامیناز توسط سویه مولد L-آسپاراژیناز *S. kiliense* بررسی نشد (۳۲)؛ اما در سویه *S. strictum* مولد L-آسپاراژیناز گزارش شده توسط گلبائی^{۱۷} و همکاران (۲۰۲۰) فعالیت غیراختصاصی گلوتامینازی برای آنزیم L-آسپاراژیناز تولید شده شناسایی نشد (۲۸).

تولید صنعتی آنزیم L-آسپاراژیناز توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها بیشتر به روش کشت غوطه‌ور انجام می‌شود (۲۷). میزان تولید آنزیم تأثیر گرفته از ترکیب محیط کشت، به‌ویژه منابع کربن و نیتروژن و عوامل فیزیکی مانند دما، pH، همزنی، تراکم اینوکولوم و مدت زمان کشت است. هر میکروارگانیسم نیازمندی‌های خاص خود را برای بیشترین میزان تولید آنزیم دارد؛ بنابراین، بهینه‌سازی شرایط برای بررسی قابلیت تولید آنزیم سویه‌های میکروبی مختلف ضروری است (۴۲). در این پژوهش، اثر چهار عامل میزان اینوکولوم، دمای گرماگذاری و منابع کربن و نیتروژن بر تولید L-آسپاراژیناز توسط سویه مدنظر به روش یک عامل در هر زمان بررسی شد. میزان اینوکولوم یا تراکم اولیه سلولی یکی از فاکتورهای مهم در فرایندهای زیستی به شمار می‌رود (۴۳). در این مطالعه، بیشترین میزان تولید آنزیم

با اینوکولوم $5/0 \pm 38/4$ Uml⁻¹) با اینوکولوم ۹ درصد و کمترین میزان تولید آنزیم ($2/0 \pm 24/9$ U ml⁻¹) با اینوکولوم ۱ درصد به دست آمد. افزایش نسبی تولید آنزیم در میزان اینوکولوم بیشتر که در این مطالعه مشاهده شد، با نتایج پژوهش‌های دیگر مطابقت دارد؛ برای مثال، موگل^{۱۸} و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند افزایش تراکم اولیه سلولی، به افزایش سرعت مصرف سوبسترا، افزایش سرعت و میزان تولید آنزیم L-آسپاراژیناز توسط مخمر *Leucosporidium scottii* منجر شد. تراکم اولیه بالای سلولی راهکاری برای تولید آنزیم با حداقل میزان رشد و حداقل میزان مواد مورد نیاز برای حفظ بقای سلول است و در طراحی فرایند تولید، به کاهش هزینه‌ها نیز منجر خواهد شد (۳۷).

دما یکی دیگر از عوامل مؤثر بر فرایندهای تولید محصولات زیستی است و بر رشد میکروبی، ترشح آنزیم، سرعت واکنش‌های شیمیایی و میزان فعالیت آنزیمی تأثیر می‌گذارد (۴۴). دمای بهینه برای تولید آنزیم L-آسپاراژیناز توسط بیشتر میکروارگانیسم‌ها در دامنه ۳۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (۳). در این مطالعه، تولید آنزیم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود؛ اما با وجود میانگین تولید آنزیم بیشتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ($1/2 \pm 37/8$ U ml⁻¹)، تفاوت معناداری در میزان تولید آنزیم در دامنه ۳۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده نشد؛ بنابراین، تولید آنزیم L-آسپاراژیناز توسط این سویه در دامنه دمایی نسبتاً گسترده‌ای انجام می‌شود. در مطالعه‌ای روی سویه دیگری از *S. kiliense* تولید آنزیم L-آسپاراژیناز در دماهای ۶۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد بررسی و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه گزارش شد (۳۲).

استفاده از گلیسرول می‌تواند هزینه تولید آنزیم توسط این سویه را کاهش دهد. در پژوهش انجام‌شده روی سویه دیگری از این گونه، یعنی *S. kiliense* BKJM2، از میان پنج منبع کربن بررسی شده با غلظت ۰/۱ درصد، بیشترین میزان تولید آنزیم L-آسپاراژیناز به ترتیب با گلوکز، مالتوز، سوکروز، فروکتوز و لاکتوز به دست آمد (۳۲) که با نتایج این مطالعه متفاوت است و می‌تواند به دلیل متفاوت بودن فیزیولوژی سویه‌های مختلف و شرایط آزمایش‌ها باشد.

منبع نیتروژن یکی از مؤثرترین عوامل بر میزان تولید آنزیم L-آسپاراژیناز است. در مطالعات متعددی L-آسپاراژین و L-پرولین به‌عنوان بهترین منابع نیتروژن برای تولید این آنزیم گزارش شده‌اند (۱۷ و ۴۲). اگرچه L-آسپاراژین الفاگر تولید این آنزیم است، می‌تواند به‌عنوان عامل محدودکننده تولید آنزیم نیز به شمار رود (۴۸). علاوه بر این آمینواسیدها، ترکیبات دیگری مانند اوره، عصاره مخمر، پیتون، آمونیوم نترات، آمونیوم سولفات و آمونیوم کلراید نیز عوامل مهمی در تولید آنزیم L-آسپاراژیناز هستند (۴۲). در این پژوهش، بیشترین میزان رشد و تولید آنزیم در حضور آمونیوم کلراید با تفاوت چشمگیری نسبت به دیگر منابع بررسی شده به دست آمد و L-آسپاراژین دومین منبع نیتروژن از نظر اثر مثبت بر تولید آنزیم بود. در پژوهش انجام‌شده روی *S. kiliense* BKJM2، از میان چهار منبع نیتروژن بررسی شده، بیشترین میزان تولید آنزیم به ترتیب در حضور پیتون، آمونیوم سولفات، عصاره گوشت و عصاره مخمر مشاهده شد (۳۲). اثر مثبت آمونیوم و اثر منفی عصاره مخمر بر تولید آنزیم، ویژگی مشترک به‌دست‌آمده از مطالعه روی این دو سویه متفاوت *S. kiliense* است. در پژوهش انجام‌شده روی شبه مخمر *S.*

انتخاب سوبسترای مناسب براساس ارزش غذایی، قابلیت دسترسی و هزینه نقش مهمی در تولید تجاری آنزیم‌ها دارد (۴۵). محیط کشت زاپک داکس تغییر یافته حاوی گلوکز و آسپاراژین رایج‌ترین محیط کشت گزارش شده برای تولید آنزیم L-آسپاراژیناز در کشت غوطه‌ور توسط قارچ‌ها است (۳ و ۴۲). منابع کربن مختلفی مانند گلوکز، سوکروز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، گلیسرول، نشاسته و سیتریک‌اسید برای تولید آنزیم L-آسپاراژیناز گزارش شده و مطالعات بسیاری گلوکز را به‌عنوان منبع کربن بهینه معرفی کرده‌اند (۲۷ و ۴۲). در این مطالعه، منابع کربن گلوکز، سوکروز، گلیسین و گلیسرول با غلظت ۱ درصد بررسی شدند. میزان تولید آنزیم در حضور این منابع کربن از لحاظ آماری تفاوت معناداری نداشت؛ اما بیشترین میزان تولید ($2/2 \text{ U ml}^{-1} \pm$) در سوکروز مشاهده شد. بیشترین میزان رشد نیز ابتدا در حضور گلوکز و سپس در حضور سوکروز انجام گرفت؛ بنابراین، با توجه به مقدار فعالیت آنزیمی بیشتر در حضور سوکروز و ارزان و در دسترس بودن این منبع کربن، سوکروز به‌عنوان منبع کربن برای آزمایش بعدی انتخاب شد. سوکروز دی‌سکاریدی است که توسط هیدرولازها به مونوساکاریدهای تشکیل‌دهنده شامل گلوکز و فروکتوز، تبدیل و توسط میکروارگانیسم مصرف می‌شود. این سوبسترا به دلیل توسعه یافتگی صنعت شکر به‌طور گسترده در فرایندهای زیست‌فناوری صنعتی استفاده می‌شود (۴۶). گلیسرول نیز منبع کربن ارزان قیمتی است که به‌عنوان محصول جانبی صنایع سوخت زیستی تولید می‌شود و تبدیل آن به فرآورده‌هایی با ارزش بالا شایان توجه پژوهشگران قرار دارد (۴۷). میزان چشمگیری از تولید آنزیم توسط سویه مدنظر در این پژوهش، در حضور گلیسرول به دست آمد؛ بنابراین،

- asparaginase: Bioprocessing, characterization and industrial applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2020; 67 (4): 619-647.
- (4) Ashok A, Doriya K, Rao JV, Qureshi A, Tiwari AK, Kumar DS. Microbes producing L-asparaginase free of glutaminase and urease isolated from extreme locations of antarctic soil and moss. *Scientific Report*. 2019; 9: 1423.
- (5) El-Naggar NE, El-Shweihy NM. Bioprocess development for L-asparaginase production by *Streptomyces rochei*, purification and *in-vitro* efficacy against various human carcinoma cell lines. *Scientific Report*. 2020; 10: 7942.
- (6) Abdelrazek NA, Elkhatib WF, Raafat MM, Aboulwafa MM. Experimental and bioinformatics study for production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis*: a promising enzyme for medical application. *AMB Express*. 2019; 9: 39.
- (7) Prihanto AA, Yanti I, Murtazam MA, Jatmiko YD. Optimization of glutaminase-free L-asparaginase production using mangrove endophytic *Lysinibacillus fusiformis* B27. *F1000Research* 2020; 8: 1938.
- (8) Husain I, Sharma A, Kumar S, Malik F. Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from *Enterobacter cloacae*: in-vitro evaluation of cytotoxic potential against human myeloid leukemia HL-60 cells. *PLoS One*. 2016; 11: e0148877.
- (9) Fazeli N, Alimadadi N, Nasr S. Screening and optimization of process parameters for the production of L-asparaginase by indigenous fungal-type strains. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*. 2021; 45: 409-416.
- (10) Hatamzadeh S, Rahnama K, Nasrollahnejad S, Fotouhifar BK, Hemmati K, White JF, et al. Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from the Asteraceae family plant species of Iran. *Peer Journal*. 2020; 8: e8309.
- strictum* AG90 نتایج متفاوتی به دست آمد و اثر مثبت برای عصاره مخمر و L-آسپاراژین و اثر منفی برای آمونیوم سولفات گزارش شد (۲۸).
- در این پژوهش، میزان تولید آنزیم L-آسپاراژیناز توسط سویه شبه مخمری *S. kiliense* IBRC-M 30453 پس از بهینه‌سازی به روش یک عامل در هر زمان به $1/6 \text{ ml}^{-1} \pm 62/4$ رسید. میزان تولید این آنزیم توسط *S. strictum* AG90 و *kiliense* BKJM2 به ترتیب $1/80 \text{ ml}^{-1}$ و $1/812 \text{ U ml}^{-1}$ گزارش شده است (۲۸) و (۳۲). از بیشترین میزان تولید L-آسپاراژیناز گزارش شده در سویه‌های وحشی قارچ‌ها می‌توان به تولید 160 U ml^{-1} توسط *Penicillium cyclopium* (۴۹) و تولید 185 U ml^{-1} توسط *Aspergillus* sp. (۵۰) اشاره کرد. در بهینه‌سازی ابتدایی در این مطالعه تولید آنزیم به‌طور چشمگیری افزایش یافت؛ اما رسیدن به شرایط بهینه به انجام آزمایش‌های بیشتر، بررسی عوامل مختلف و برهمکنش آنها و استفاده از روش‌های طراحی آزمایش نیازمند است. همچنین، مطالعات فراتر مانند بررسی سوبستراهای ارزان قیمت، کشت در بیوراکتور و خالص‌سازی و تعیین خصوصیات آنزیم امکان بررسی پتانسیل تجاری این سویه را فراهم می‌کند.

References

- (1) Barros T, Brumano L, Freitas M, Pessoa A, Parachin N, Magalhães PO. *Escherichia coli* B121 (De3): from shaker to bioreactors. *Pharmaceutics*. 2021; 13: 14.
- (2) Naser S, Saber W, El-Metwally M, Moustafa M, El-Kott A. Fungal assembly of L-asparaginase using solid-state fermentation: a review. *Biocell*. 2020; 44 (2): 147-155.
- (3) Chand S, Mahajan RV, Prasad JP, Sahoo DK, Mihooliya NK, Dhar MS, et al. A comprehensive review on microbial L-

- (11) Nasr S, Bien S, Soudi MR, Alimadadi N, Shahzadeh Fazeli SA, Damm U. Novel *Collophorina* and *Coniochaeta* species from *Euphorbia polycaulis*, an endemic plant in Iran. *Mycological Progress*. 2018; 17: 755-771.
- (12) Mihooliya KN, Nandal J, Swami L, Verma H, Chopra L. A new pH indicator dye-based method for rapid and efficient screening of L-asparaginase producing microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology*. 2017; 107: 72-81.
- (13) Mahajan RV, Saran S, Saxena RK, Srivastava AK. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 2013; 341 (2): 122-126.
- (14) Vimal, A, Kumar A. *In vitro* screening and *in silico* validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase. *Enzyme and Microbial Technology*. 2017; 98: 9-17.
- (15) Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editors. *The yeasts, a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2011: 87-110.
- (16) Thirunavukkarasu N, Suryanarayanan TS, Murali TS, Ravishankar JP, Gummadi SN. L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. *Mycosphere*. 2011; 2: 147-155.
- (17) Doriya K, Kumar DS. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3 *Biotech*. 2016; 6: 239.
- (18) El-Naggar NEA, Moawad H, El-Shweihy NM, El-Ewasy SM. Optimization of culture conditions for production of the anti-leukemic glutaminase free L-asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology. *BioMed Research International*. 2015; 627031.
- (19) Wriston J, Yellin T. L-asparaginase: a review. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 1973; 39: 185-248.
- (20) Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *Journal of General Microbiology*. 1973; 76 (1): 85-99.
- (21) Hanna M, Xiao W. Isolation of nucleic acids. In: Xiao W, editor. *Yeast Protocols (Methods in Molecular Biology)*. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2006: 15-20.
- (22) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, USA: Academic Press; 1990: 315-322.
- (23) Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998; 73: 331-371.
- (24) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research*. 1997; 24: 4876-4882.
- (25) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980; 16: 111-120.
- (26) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39: 783-791.
- (27) da Cunha MC, dos Santos Aguilar JG, de Melo RR, Nagamatsu ST, Ali F, de Castro RJS, et al. Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. *Food Research International*. 2019; 126 (1): 108658.

- (28) Golbabaie A, Nouri H, Moghimi H, Khaleghian A. L-asparaginase production and enhancement by *Sarocladium strictum*: In vitro evaluation of anti-cancerous properties. *Journal of Applied Microbiology*. 2020; 129 (2): 356-366.
- (29) Doiphode N, Joshi C, Ghormade V, Deshpande MV. Biotechnological applications of dimorphic yeasts. In: Satyanarayana T, Kunze G, editor. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. 1st ed. Dordrecht: Springer; 2009: 635-650.
- (30) Goldbeck R, Andrade CCP, Pereira GAG, Maugeri Filho F. Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11 (53): 11595-11603.
- (31) Bhargavi M, Madhuri RJ. Optimization, production, purification and characterization of anti-cancer enzyme L-asparaginase from marine *Sarocladium kiliense*. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 2021; 13 (15): 93-102.
- (32) de Pádua APSL, de Sousa Freire KTL, de Oliveira TGL, da Silva LF, Araújo-Magalhães GR, Agamez-Montalvo GS, et al. Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. *Acta Botanica Brasílica*. 2019; 33 (1): 39-49.
- (33) Batool T, Makky EA, Jalal M, Yusoff MM. A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016; 178 (5): 900-923.
- (34) Elshafei AM, Hassan MM, Abouzeid MA, Mahmoud DA, Elghonemy DH. Screening and optimization of L-asparaginase and L-glutaminase production by some filamentous fungi. *British Microbiology Research Journal*. 2012; 2 (3): 158-174.
- (35) Bon EP. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. GLN3/URE2 regulation of periplasmic enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1997; 63-65: 203-212.
- (36) Borek D, Jaskólski M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica*. 2001; 484 (4): 893-902.
- (37) Moguel IS, Yamakawa CK, Pessoa, AJr, Mussatto SI. L-asparaginase production by *Leucosporidium scottii* in a bench-scale bioreactor with co-production of lipids. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020; 8: 576511.
- (38) Brumano LP, Santos da Silva FV, Costa-Silva TL, Apolinário AC, Madalena Santos JHP, Kleingesinds EK, et al. Development of L-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019; 6: 212.
- (39) Amobonye A, Singh S, Pillai S. Recent advances in microbial glutaminase production and applications—a concise review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2019; 39 (7): 944-963.
- (40) Orabi HM, El-Fakharany EM, Abdelkhalek ES, Sidkey NM. L-Asparaginase and L-glutaminase: Sources, production, and applications in medicine and industry. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2019; 9 (2): 179-190.
- (41) Chan WK, Horvath TD, Tan L, Link T, Harutyunyan KG, Pontikos MA, et al. Glutaminase activity of L-asparaginase contributes to durable preclinical activity against acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Cancer Therapy*. 2019; 18: 1587-1592.
- (42) Souza PM, Freitas MM, Cardoso SL, Pessoa A, Guerra ENS, Magalhães PO. Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017; 120: 194-202.

- (43) Serrano NFG, Rodrigues L, Hokka CO, Sousa CP, Teixeira JA, Mussatto SI. Optimal glucose and inoculum concentrations for production of bioactive molecules by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. *Chemical Papers*. 2012; 66: 1111-1117.
- (44) El-Hadi AA, Ahmed HM, Hamzawy RA. Optimization and characterization of L-asparaginase production by a novel isolated *Streptomyces* spp. strain. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2019; 18 (2): 111-122.
- (45) Ghosh S, Murthy S, Govindasamy S, Chandrasekaran M. Optimization of L-asparaginase production by *Serratia marcescens* (NCIM 2919) under solid state fermentation using coconut oil cake. *Sustainable Chemical Processes*. 2013; 1: 9.
- (46) Marques WL, Raghavendran V, Stambuk BU, Gombert AK. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. *FEMS Yeast Research*. 2015; 16 (1): fov107.
- (47) Klein M, Swinnen S, Thevelein JM, Nevoigt E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environmental Microbiology*. 2017; 19 (3): 878-893.
- (48) Baskar G, Renganathan S. Statistical and evolutionary optimisation of operating conditions for enhanced production of fungal L-asparaginase. *Chemical Papers*. 2011; 65 (6): 798-804.
- (49) El-Refai HA, El-Shafei MS, Mostafa H, El-Refai AMH, El-Beih FM, Awad GEA, et al. Statistical optimization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase production by *Penicillium cyclopium*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2014; 8 (2), 130-142.
- (50) Sanjotha G, Sudheer I. Isolation, screening, optimization and production of anti-tumor asparaginase by fungi from Karwar coastal region. *Research Journal of Recent Sciences*. 2017; 6 (3): 1-7.
- ¹- L-Asparagine aminohydrolase (EC 3.5.1.1)
²- Acute lymphoblastic leukemia (ALL)
³- Spread plate
⁴- Rose Bengal Chloramphenicol Agar
⁵- Yeast extract Peptone Dextrose Agar
⁶- Modified Czapek dox's agar
⁷- Sartorius
⁸- Wriston
⁹- Yellin
¹⁰- Imada
¹¹- Shimadzu
¹²- Kimura
¹³- One Factor at A Time
¹⁴- Type strains
¹⁵- Bhargavi
¹⁶- Madhuri
¹⁷- Golbabaie
¹⁸- Moguel