جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده آسپاراژیناز از پساب فراوری سیب‌زمینی

ندا نقابی، الهه زاده حسینقلی*، محمد پاژنگ و نادر چاپارزاده

ایران تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۴

چکیده

L-آسپاراژیناز آنزیمی است که اسید آمینه ی آسپاراژین را به آسپارتیک‌اسید و آمونیاک هیدرولیز می‌کند. L-آسپاراژیناز داروئی برای درمان لوکمیا و لنفوما به‌طور اساسی از باکتری‌هایی مانند *Escherichia coli* و *Erwina chrysanthemi* تولید می‌شود و جستجو برای یافتن منابع جدید برای این آنزیم ادامه دارد. در این تحقیق جداسازی باکتری‌های تولید کننده آنزیم L-آسپاراژیناز از پساب حاصل از فرآوری سیب زمینی انجام شد. پساب حاصل از مرحله شستشو، حاوی تمام ترکیبات محلول در آب سیب‌زمینی نظیر مقادیر قابل توجهی از اسید آمینه ی آسپاراژین است. جداسازی و غربالگری باکتری‌ها بر روی محیط‌های نوترینت آگار و محیط M9 انجام شد. دو جدایه با نام‌های PW4 وPW5 قابلیت تولید آمونیوم در محیط M9 را دارا بودند. شناسایی مولکولی و آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که این جدایه‌ها بترتیب متعلق به جنس *Escherichia* و *Enterococcus* هستند. سنجش کمی و کیفی میزان تولید آنزیم این جدایه‌ها در شرایط مختلف انجام شد. بیشترین میزان تولید را جدایه‌ی PW4 در صورت رشد در محیط حاوی گلوتامین با میزان $IUml^{-1}$ ۱۰ نشان داد. بیشینه‌ی میزان تولید آنزیم توسط جدایه‌ی PW5 نیز در نتیجه تغلیظ مایع رویی حاصل از کشت باکتری در محیط کشت حاوی آسپاراژین به میزان $IUml^{-1}$ ۲/۳۳ مشاهده شد. دو آنزیم بررسی شده فعالیت گلوتامینازی از خود نشان ندادند. نتایج نشان داد، بیشینه‌ی فعالیت آنزیم تولیدی توسط جدایه‌ی PW4 در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بوده و فعالیت آنزیم در دماهای پائین‌تر و بالاتر از آن کاهش می یابد. این نتایج خاطرنشان می سازد که این آنزیم قابلیت مطالعات بیشتر جهت استفاده در طراحی دارو را دارا می باشد.

واژه های کلیدی: پساب، سیب‌زمینی، آسپاراژیناز، *Escherichia*، *Enterococcus*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۰۲۹۳۶۱، پست الکترونیکی: zhosseingholi@gmail.com

مقدمه

L-آسپاراژیناز (L-آسپاراژین آمیدوهیدرولاز E.C.3.5.1.1) یک آنزیم امیدبخش در درمان لنفوسیتیک لوکمیای حاد، بیماری هوجکین، میلوسیتیک لوکمیای حاد، کرونیک لنفوسیتیک لوکمیا، لنفوسارکوما، رتیکولوساربوم و ملانوسارکوما است. این آنزیماسیدآمینه آسپاراژین را به اسید آسپارتیک و آمونیاک هیدرولیز کرده و از طریق جلوگیری از سنتز پروتئین در سلولهای سرطانی و القاء آپاپتوز باعث مرگ سلول می‌شود. در اکثر سلول‌های طبیعی انسانی، کمبود آسپاراژین می‌تواند توسط مسیرهای سنتزی دیگر که توسط آنزیم آسپاراژین‌سنتتاز تسهیل می شود جبران شود، درحالی‌که سلول‌های سرطانی به خاطر کمبود فعالیت این آنزیم توانائی مذکور را ندارند (۱۷، ۸) فعالیت L-آسپاراژیناز به طور گسترده ای در گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم ها گزارش شده است اما تنها آسپاراژیناز تولید شده از *Escherichia coli* و *Erwinia chrysanthemi* به‌طور عمده برای درمان لوکمیا و لنفوما کاربرد دارد و در مقیاس صنعتی تولید می شوند. اگرچه هر دو داروی تولید شده مکانیسم های عمل مشابهی دارند، اما ویژگی‌های دارویی آنها متفاوت است (۱۳). فعالیت گلوتامینازی تولید شده توسط این آنزیم‌ها می‌تواند اثرات

ثانویه همچون واکنش آلرژیک، تهوع و استفراغ، دیابت، آماس لوزالمعده و لخته شدن غیرنرمال داشته باشد. اکثر آسپاراژینازها پایداری و فعالیت کاتالیزوری پایینی دارند (۴۶، ۱۵).

از لحاظ صنعتی نیز ازسال ۲۰۰۲، دانشمندان به این نتیجه رسیده‌اند که می‌توان با استفاده از این آنزیم موفق بهکاهشسطحآکریلآمیددرطی سرخ کردن غذاهای نشاسته دار در دمای بالا گردید (۳۴). سیب‌زمینی غذای مهمی در بسیاری از کشورها محسوب می‌شود. سیب‌زمینی منبع غنی از قندها، ویتامین‌ها، پتاسیم، فیبر، آمینواسیدها و پروتئین‌ها می‌باشد (۳۵). از سال ۲۰۰۵ صنعت سیب‌زمینی رشد سریعی را در سرتاسر دنیا داشته است. این پدیده با تولید ضایعات آلی و پساب‌های بسیار زیاد درنتیجه‌ی مراحل مختلف فراوری سیب‌زمینی از قبیل شستشو، پوست‌گیری و عملیات اضافی دیگر، همراه بوده است (۴۴). پساب حاصل از شستشو حاوی تمام ترکیبات محلول در آب سیب‌زمینی است. آب حاصل حاوی ۱ درصد مواد حل شونده است که ۶۰ درصد این مواد ترکیبات نیتروژنی هستند. دوسوم این ترکیبات نیتروژنی را اسیدهای آمینه ویک‌سوم باقیمانده را پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند. مطالعات کروماتوگرافیک نشان داده است که حدود ۲۳/۶ درصد اسید های آمینه متعلق به آمینواسید آسپاراژین است و میزان این اسید آمینه بعد از گلوتامین در جایگاه دوم قرار دارد (۲۶).

بنابراین با توجه به کاربردهای دارویی و صنعتی (صنایع غذایی) آنزیم L-آسپاراژیناز، به نظر می‌رسد بررسی و کشف باکتری‌های تولید کننده آنزیم L-آسپاراژینازبه ویژه آنزیم‌هایی با عوارض جانبی کم‌تر از منابع جدید هم به لحاظ علمی و هم به لحاظ پزشکی و صنعتی حائز اهمیت باشد. ازآنجا که احتمال جداسازی باکتری تولیدکننده‌ی یک آنزیم در محیط هایی که سوبسترای آن وجود دارد بیشتراست، مطالعه حاضر احتمال حضور باکتری‌های تولیدکننده‌ی آنزیم آسپاراژیناز را در پساب حاصل از فراوری سیب‌زمینی را مورد بررسی قرار داد.

مواد و روشها

محل و روش نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از پساب حاصل از شستشوی سیب‌زمینی بعد از کنده شدن پوست سیب‌زمینی از یک کارخانه‌ی تولید چیپس در شهرک صنعتی شبستر (با عرض جغرافیایی ۳۸، طول جغرافیایی ۴۵ و ارتفاع ۱۳۴۰ متر از سطح دریا) در ظرف‌های شیشه‌ای استریل و با رعایت شرایط استریل انجام شد و نمونه ها با حفظ دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی باکتری‌های موجود در پساب: درشرایط استریل به میزان یک‌دهم حجم نمونه‌ها محیط کشت Luria Broth (LB) روی نمونه‌ها ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند تا باکتری‌ها رشد کرده و میزان آن‌ها افزایش یابد. پس از تهیه سری رقت از باکتری‌ها چندین نمونه‌ی ۱۰۰ میکرولیتری از لوله‌ها برداشت شد و روی محیط نوترینت آگار تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. بررسی ویژگی‌های ماکروسکوپی شامل اندازهی کلنی، شکل ظاهری، رنگ، سطح، حاشیه و جنس کلنی باکتری‌های رشد کرده انجام گرفت و کلنی‌های دارای ظاهر متفاوت از طریق کشت چهار منطقه‌ای خالص‌سازی شدند.

شناسایی ویژگی های بیوشیمیایی جدایه ها: شناسایی اولیه جدایه‌ها بر اساس ویژگیهای میکروسکوپی شامل شکل میکروارگانیسم (میله ای، کروی، مارپیچی)، اندازه، و وجود اسپور انجام شد (۳۲، ۵) با آزمون های حرکت (۴۱)، کاتالاز (۳۷) و اکسیداز (۱۹) نیز برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی اولیه‌ی این جدایه‌ها تعیین گردید.

غربالگری و نگهداری جدایه‌های تولیدکننده‌ی آسپاراژیناز: برای تعیین باکتری کارآمد در تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده آسپاراژیناز محیط کشت M9 (۲۵) استفاده شد. محیط کشت بعد از تهیه اتوکلاو شد سپس گلوگز و اسید آمینه ی آسپاراژین در شرایط استریل به داخل محیط کشت اضافه گردید. باکتری ها به صورت خطی در پلیت های حاوی محیط کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت۲۴ ساعت در۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. کلنی‌هایی که در اطرافشان هاله‌ی صورتی رنگ ایجاد شده بود انتخاب و برای بقیه مراحل از آن‌ها استفاده شد. نگهداری جدایه‌های تولیدکننده‌ی آنزیم آسپاراژیناز نیز در محیط حاوی گلیسرول و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس انجام شد.

شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های منتخب: برای شناسایی مولکولی و تایید خصوصیات بیوشمیایی ابتدا استخراج DNA باکتری‌ها به روش فنل-کلروفرم انجام شد (۱۱). تکثیرتوالی 16S rDNA باکتری‌های منتخب با استفاده از آغازگرهای عمومی رفت 27F: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' و آغازگرهای عمومی برگشت 1492R: 5'TACGGCTACCTTGTTACGACTT3' انجام شد (۲۳). شرایط دمایی دستگاه ترموسایکلر نیز بدین صورت بود: واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، مرحله تکثیر شامل مرحله واسرشت ۳۰ ثانیه در °C ۹۴، مرحله اتصال پرایمرها ۴۰ ثانیه در°C ۶۰، مرحله طویل شدن ۴۰ ثانیه در °C ۷۲ و در نهایت مرحله گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در °C ۷۲ انجام گرفت. پس از انجام PCR، قطعات حاصل از تکثیر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید. محصولات PCR تخلیص شده جهت توالی‌یابی ارسال شد. ترادف بدست آمده توسط نرم‌افزار ChromasPro بازخوانی و ویرایش شده و سپس با استفاده از نرم‌افزارBLAST در بانک ژن با دیگر توالی‌های موجود در این پایگاه اطلاعاتی مقایسه شد و میزان شباهت آن با باکتری‌های مختلف ثبت شده، تعیین و برای بررسی‌های بعدی ذخیره گردید. تحلیل فیلوژنتیکی جدایه‌ها پس از یافتن توالی‌های مشابه ورسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 (۴۲) و با الگوریتم Neibour-joiningh انجام گردید. بررسی شاخه‌های درخت با استفاده از الگوریتم Bootstrap با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری انجام شد (۲۰).

سنجش کیفی میزان فعالیت آنزیم آسپاراژیناز: جدایه های انتخاب شده در محیط کشت LB به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. ۳۰ میکرولیتر از هر یک از سوسپانسیون‌های باکتریایی در چاهک‌های ایجادشده توسط پیپت پاستور در مرکز پلیت حاوی محیط کشت M9 ریخته شد. برای کنترل از پلیت‌های محیط کشت M9 بدون L-آسپاراژین و محیط کشت M9 حاوی $NaNO_3$ (به عنوان منبع نیتروژن به‌جای آسپاراژین) استفاده شد. سپس سنجش قطر هاله‌ی صورتی در اطراف کلنی و چاهک‌ها انجام گرفت (۲۹).

سنجش کمی فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در توده‌ی زیستی و مایع رویی حاصل از کشت جدایه‌ها: ابتدا از جدایه ی تولید کننده ی آنزیم پیش‌کشت تهیه شد و اجازه داده شد که باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه، در داخل انکوباتور شیکر هوادهی شده و رشد کند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، ۲/۵ میلی‌لیتر از پیش‌کشت به فلاسک‌های حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت M9 حاوی ۱٪ آسپاراژین، گلوتامین، $NaNO_3$ و فلاسک شاهد حاوی محیط کشت بدون هیچ منبع نیتروژنی اضافه گردید و ارلن ها مجدداً در انکوباتور شیکر به مدت۲روز در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. بعد از ۲ روز محتویات فلاسک، به فالکن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند (۴). پس از اتمام سانتریفیوژ، مایع رویی فالکون‌ها جمع‌آوری

گردید. رسوبات مربوط به توده‌ی زیستی نیز جداسازی شد. بر روی رسوبات مربوط به توده‌ی زیستی ۵ میلی‌لیتر بافر Tris ۰/۰۵ میلی مولار (pH=۷/۸) اضافه شد. سونیکاسیون ۳۰ پالس در ۶ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس اعمال شد و محصول سونیکاسیون مورد سانتریفیوژ یخچالدار با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند (۱۲). ۵۰۰ میکرولیتر از خود مایع‌رویی حاصل از سانتریفیوژ اولیه باکتری‌ها و یا مایع رویی حاصل از سونیکاسیون رسوبات توده‌ی زیستی با ۵۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار (pH=۸/۵) و ۵۰۰ میکرولیتر L-آسپاراژین ۰/۰۴ مولار مخلوط شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه گرماگذاری گردید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر(٪۱۰W/V) TCA جهت توقف واکنش آنزیمی افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای نمونه شاهد بدون فعالیت آنزیمی هم همین مراحل تکرار شد با این تفاوت که پس از توقف واکنش آنزیمی توسط TCA آنزیم به مخلوط بافر و سوبسترا اضافه شد. سپس سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. سنجش کمی تولید آنزیم آسپاراژیناز بر پایه‌ی روش رنگ سنجی و واکنش نسلریزاسیون انجام گرفت. در طی این واکنش نرخ هیدرولیز L-آسپاراژین با اندازه‌گیری انتشارآمونیاک با استفاده از واکنش نسلر و استفاده از معرف نسلر، تعیین می‌شود. بنابراین۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر معرف نسلر و ۳/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شد و در نهایت OD نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد و بر اساس اختلاف OD های حاصل، مقدارآمونیاک آزاد شده با استفاده از منحنی استاندارد آمونیوم محاسبه شد. یک واحد فعالیت آنزیم برابر با مقدار آنزیمی است که بتواند در عرض یک دقیقه ۱ میکرومول آمونیاک تولید نماید (۴).

سنجش فعالیت آنزیم پس از تغلیظ آنزیم تولیدشده توسط جدایه‌ها: پس ازجمع آوری مایع‌رویی حاصل از رشد جدایه‌ها، پروتئین‌های موجود در مایع رویی با استفاده از نمک آمونیوم سولفات۸۰ درصد در دمای ۴ درجه سلسیوس رسوب داده شد. محلول به مدت یک شب در یخچال نگهداری شد و در ادامه محلول رسوب داده شده را به درون فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و ۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردید، رسوب حاصل از آن جمع‌آوری و در بافر Tris-HCl (۵۰ Mm، pH=۸/۵) معلق شد (۳). برای حذف نمک از کیسه‌های دیالیز استفاده گردید. برای تعیین غلظت میزان پروتئین‌های مایع‌روئی و مایع‌روئی تغلیظ شده ابتدا نمودار استاندارد جذب نوری غلظت‌های معین سرم آلبومین گاوی، با استفاده از روش برادفورد ترسیم گردید و سپس رابطه‌ی خطی آن با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد. برای سنجش غلظت پروتئین تخلیص شده با روش برادفورد، ۱۰۰ میکرولیتر پروتئین تخلیص شده با ۹۰۰ میکرولیتر معرف برادفورد مخلوط شده و جذب در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (۶). سپس تعیین فعالیت آنزیمی انجام شد با این تفاوت که به جای استفاده از مایع رویی از مقادیر مساوی از پروتئین تغلیظ شده استفاده گردید.

سنجش کمی فعالیت L-گلوتامینازی آنزیم تولیدی توسط جدایه‌ها: برای بررسی فعالیت آنزیمی L-گلوتامیناز فقط در سنجش فعالیت به‌جای سوبسترای آسپاراژین از سوبسترای گلوتامین به میزان ۰/۰۴ مولار استفاده شد و سنجش در ۲۰ دقیقه انجام گرفت (۲۸).

سنجش دمای بهینه ی فعالیت آنزیم: برای بررسی تاثیر دما های مختلف بر روی فعالیت آنزیم، سنجش فعالبت آنزیم بعد از گرماگذاری مخلوط سنجش در دماهای ۲۵، ۳۷، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰ درجه سلسیوس و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد (۱۸).

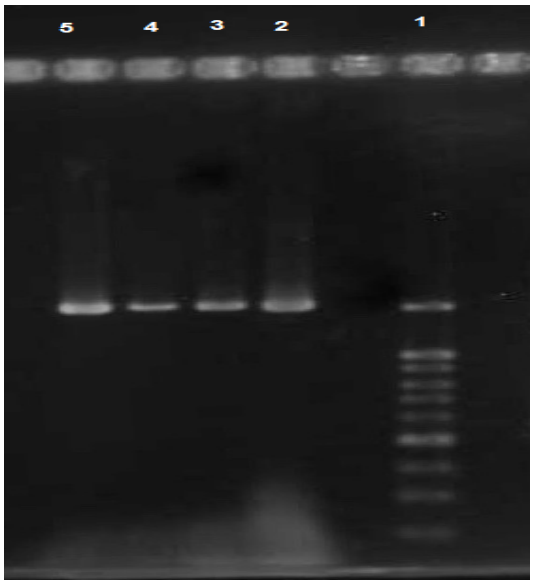
نتایج

جداسازی و غربالگری و شناسایی اولیه‌ی جدایه‌ها: پس از جداسازی باکتری‌ها بر روی پلیت‌های نوترینت آگار ۵ کلونی انتخاب و خالص‌سازی شدندو ویژگی‌های بیوشیمیایی اولیه آن‌ها تعیین شد. سپس کشت آن‌ها بر روی محیط M9 نشان داد که ۲ جدایه قابلیت تغییر رنگ پلیت‌ها به رنگ صورتی را داشتند. این تغییر رنگ نشان‌دهنده شرایط قلیایی در محیط و تولید آمونیاک در اثر شکستن آسپاراژین توسط فعالیت آنزیم آسپاراژیناز است. نتایج تست‌های ظاهری، میکروسکوپی، بیوشیمیایی و ایجاد هاله در محیط M9 در جدول ۱ آمده است.

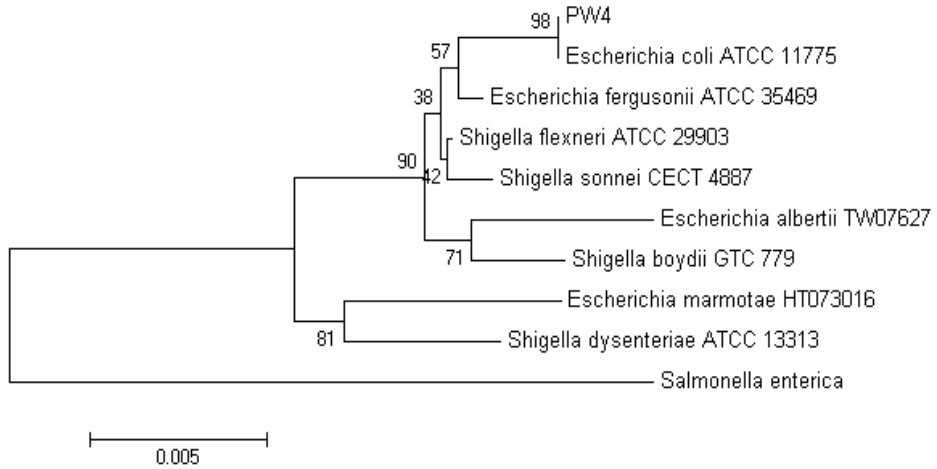
جدول ۱- ویژگی‌های ظاهری و کلنی‌های منتخب

نام انتخابی برای جدایه	ویژگی کلنی	ایجاد هاله‌ی صورتی در M9	نوع گرم	تولید اسپور	تست اکسیداز	تست کاتالاز	حرکت	شکل میکروسکوپی
PW1	سفید رنگ مواج با حاشیه‌های غیر منظم	-	-	-	_	+	+	میله‌ای کوتاه
PW2	زرد رنگ موکوئیدی گرد و محدب	_	+	+	+	+	+	میله‌ای
PW3	زرد رنگ، شفاف، کمی محدب	_	_	-	_	+	+	میله‌ای
PW4	سفید، گرد، شفاف صاف با حاشیه‌ی منظم	+	-	-	-	+	+	میله‌ای کوتاه
PW5	سفید مایل به کرم، کوچک صاف	+	+	-	-	-	_	کوکسی

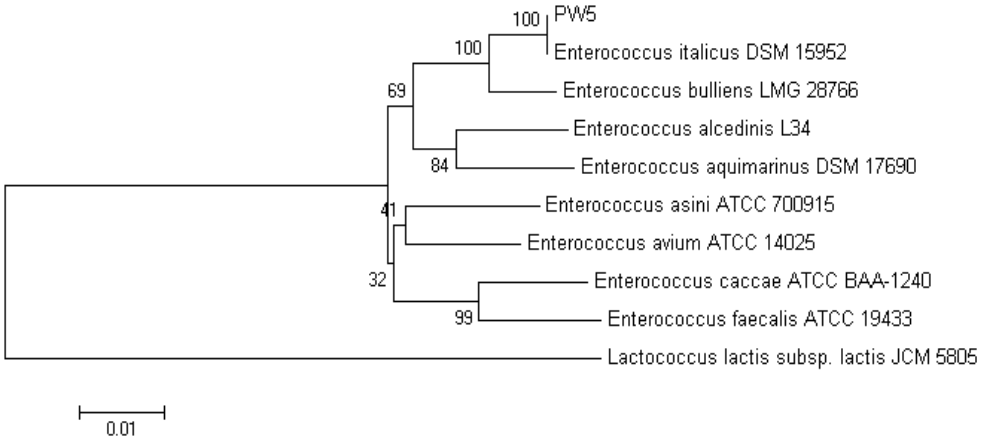
شناسایی مولکولی جدایه‌های تولیدکننده‌ی آنزیم و نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی تائیدی: نتایج ژل الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر توالی ۱۶S rDNAجدایه‌ها در شکل ۱ آورده شده است. مقایسه نتایج توالی یابی قطعات تکثیر یافته‌ی جدایه‌های منتخب با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص گردید که جدایه یPW4، ۹۹/۸ ٪ به باکتری *E. coli* و جدایه یPW5 ۹۷/۲۵٪ به باکتری *Enterococcus italicus* شباهت دارد. درخت فیلوژنتیک رسم شده برای نشان دادن روابط جدایه ها نیز در شکل ۲و ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱-باندهای (۱۵۰۰bp) مربوط به تکثیر توالی ۱۶S rDNA جدایه ها. ستون۱: نشانگر اندازه DNA (۱۰۰ bp) ستون۲ تا ۵: محصولات PCR.



شکل ۲–درخت فیلوژنتیک جدایه‌ی PW4. روابط فیلوژنتیک بر اساس روش Neighbor-joining نمایش داده شده‌اند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. باکتری *Salmonella enterica* به عنوان outgroup قرار داده شده است.



شکل ۳–درخت فیلوژنتیک جدایه ی PW5. روابط فیلوژنتیک بر اساس روش Neighbor-joining نمایش داده شده‌اند. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. باکتری *Lactococus lactis* به عنوان outgroup قرار داده شده است.

سنجش فعالیت آنزیمی: سنجش کیفی تولید آنزیم از طریق سنجش قطر هاله‌ی صورتی رنگ در اطراف کلنی نشان داد که قطر هاله‌ی ایجاد شده در مورد جدایه ی PW4 ۱۵ میلی‌متر و در مورد جدایه‌ی PW5 ۸ میلی‌متر بود. در سنجش کمی نیز مقادیر اختلاف OD در رابطه خطی حاصل از رسم منحنی استاندارد گنجانده شد و میزان آمونیوم آزادشده برحسب میکرومول محاسبه و سپس میزان واحد فعالیت آنزیم تعیین گردید. میزان اختلاف OD حاصل از سنجش فعالیت آنزیم در مایع رویی حاصل از کشت باکتری‌ها، سونیکاسیون توده‌ی زیستی و تغلیظ پروتئین در جدول ۲ آمده است. فعالیت ویژه‌ی آنزیم، میزان پروتئین، میزان خالص‌سازی و بازده آنزیم در مورد بیشترین فعالیت آنزیم در مایع‌رویی و پس از تغلیظ آن نیز در جدول ۳ آورده شده است. میزان فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در صورت استفاده از گلوتامین در کشت باکتری و سنجش فعالیت آنزیم در مایع‌رویی حاصل از کشت باکتری در جدایه‌ی PW4 از همه بالاتر و برابر باIU ۱۰ است. میزان تولید آنزیم توسط PW5 در شرایط مشابه برابر با ۲IU است. سنجش فعالیت گلوتامینازی آنزیم تولیدی در مورد هر دو جدایه ی ناچیز و نزدیک به صفر

بود (جدول ۴). میزان فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در صورت استفاده از آسپاراژین در کشت باکتری و سنجش فعالیت آنزیم در مایع‌رویی حاصل از کشت باکتری در جدایه‌ی PW4 برابر با IU ۶/۶۶ است. میزان تولید آنزیم توسط PW5 در شرایط مشابه برابر با IU ۲/۳۳ بود.

جدول ۲-میزان فعالیت آسپاراژینازی ($IUml^{-1}$) در مایع‌رویی(A) وزیست‌توده‌ی سونیکه شده (B) و مایع‌رویی تغلیظ شده (C) در مورد جدایه‌های PW4 و PW5

نوع محیط کشت / جدایه		PW4	PW5
محیط کشت شاهد	A	۰/۰۳۳	۰
	B	۰/۰۳۳	۰/۰۶۶
	C	۰	۰
محیط کشت حاوی NaNO3	A	۰/۰۶۶	۰/۰۳۳
	B	۰/۱	۰/۱
	C	۰	۰/۰۳۳
محیط کشت حاوی آسپاراژین	A	۲/۳۳	۶/۶
	B	۰/۱	۰/۳
	C	۲	۵
محیط کشت حاوی گلوتامین	A	۲	۱۰
	B	۰/۱	۰/۲
	C	۱/۶۵	۹

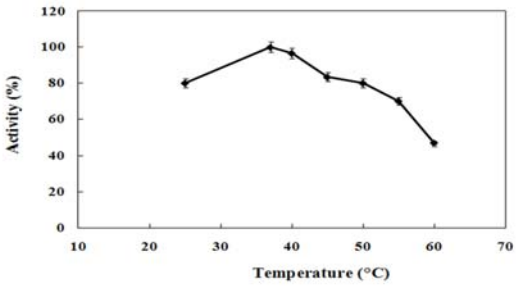
جدول ۳- محاسبه ی میزان پروتئین، فعالیت ویژه‌ی آنزیم، بازده و میزان خالص‌سازی آنزیم در مورد بیشینه‌ی فعالیت آنزیم در مایع‌رویی و مایع‌رویی تغلیظ شده در مورد جدایه‌هایPW4 و PW5

نمونه	فعالیت آنزیم ($IUml^{-1}$)	میزان پروتئین ($mg\ ml^{-1}$)	فعالیت ویژه ($IUmg^{-1}$)	بازده (٪)	جدایه
مایع‌رویی	۱۰	۱/۲۳۳	۸/۱۱	۱۰۰	PW4
	۲/۳۳	۰/۴۳	۵/۴۱	۱۰۰	PW5
مایع‌رویی تغلیظ شده	۹	۰/۷۰۶	۱۲/۸۵	۹۰	PW4
	۲	۰/۲۸	۷/۱۴	۸۵	PW5

جدول ۴- میزان فعالیت گلوتامینازی ($IUml^{-1}$) آنزیم تولیدشده توسط جدایه‌ی PW4 وPW5

نوع محیط کشت / جدایه	PW4	PW5
محیط کشت شاهد	۰	۰
محیط کشت حاوی NaNO3	۰	۰
محیط کشت حاوی آسپاراژین	۰/۰۶۶	۰
محیط کشت حاوی گلوتامین	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳

سنجش دمای بهینه ی فعالیت آنزیم: نتایج مربوط به سنجش میزان فعالیت آنزیم تولیدی توسط جدایه‌ی PW4 در شرایط اعمال دماهای مختلف به مدت ۳۰ دقیقه در شکل ۴ دیده می‌شود. همانطور که اعداد نمودار نشان می‌دهد بهینه‌ی فعالیت آنزیم پس از اعمال دمای ۳۷ تا ۴۰ درجه سلسیوس مشاهده می شود. فعالیت آنزیم در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس کمتر از ۳۷ درجه‌ی سلسیوس است. در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس فعالیت آنزیم به نصف کاهش می‌یابد.



شکل ۴-نمودار تاثیر دما های مختلف بر روی فعالیت آنزیم حاصل از جدایه‌ی PW4

بحث

اخیراً مطالعات در مورد آنزیم L–آسپاراژیناز به دلیل خاصیت ضدسرطانی آن مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. آسپاراژیناز در بسیاری از گیاهان، پستانداران و گونه-های باکتری یافت شده است (۱). در این مطالعه جهت جداسازی باکتری‌های تولیدکننده آسپاراژیناز از روش غربالگری در پلیت استفاده شد. دو جدایه باکتریایی با قابلیت تولید آنزیم L–آسپاراژیناز خالص‌سازی گردید یکی از جدایه‌ها (PW4) به عنوان باکتری *E. coli* شناسایی شد. این باکتری گرم منفی از رده‌ی *Gammaproteobacteria*، راسته‌ی *Enterobacterials* و خانواده‌ی *Enterobacteriaceae* است. حضور بسیاری از باکتری‌ها در سیب‌زمینی فرآوری نشده، نیمه فراوری شده و کاملاً فرآوری شده گزارش شده است. نوع باکتری‌های موجود در کارخانجات فرآوری و محصولات تحت تاثیر خاک بستر رشد سیب‌زمینی، تیمارهای پرورشی کشاورزان، روش‌های برداشت، نحوه‌ی نگهداری و وضعیت هوای کارخانه دارد و باکتری *E. coli* یکی از شایعترین باکتری-های موجود در این کارخانجات است (۱۴). محتوای میکروبی آب مورد استفاده برای شستشوی سیب‌زمینی نیز یک فاکتور تاثیرگذار در محتوای میکروبی پساب کارخانجات فراوری سیب‌زمینی است (۲۱). باکتری *E. coli* یک باکتری همه جائی است و عضو فلور نرمال روده-ی انسان نیز است (۴۵). با توجه به نکات ذکر شده حضور این نوع باکتری در پساب فراوری سیب زمینی کاملاً قابل قبول است. تولید آسپاراژیناز توسط این باکتری در منابع مختلفی گزارش‌شده است. اصلی‌ترین باکتری تولیدکننده‌ی آنزیم آسپاراژیناز به عنوان مصارف داروئی نیز این باکتری می‌باشد (۷). در سال ۲۰۱۵ Syed Sajitha و همکارانش ژن کدکننده L–آسپاراژیناز (ansB) را از باکتری *E. coli* جداسازی کردند. کلون و بیان ژن کد کننده آنزیم در میزبان یوکاریوتی (مخمر) و سنجش میزان تولید آنزیم نوترکیب خارج‌سلولی میزان ۲/۵IU/ml را نشان داد (۳۹). جدایه‌ی دوم (PW5) به‌عنوان *Enterococcus italicus* شناسائی شد. این باکتری‌های گرم مثبت از رده‌ی *Bacilli*، راسته‌ی Lactic acid bacteria و خانواده‌ی *Enterococaceae* است (۴۳). حضور اعضای جنس *Enterococcus* قبلاً در کارخانجات مختلف غذایی و سطوح گیاهان مختلف به اثبات رسیده است (۳۸، ۳۱، ۹، ۲). وجود اعضای جنس *Enterococcus* در خاک‌ها و روده‌ی انسان نیز به اثبات رسیده است (۲۷،۲۴). باکتری *E. italicus* نیز اولین بار از پنیر جداسازی شده است (۲۲). تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط اعضای این جنس به سبب وجود ژن آسپاراژیناز در آنها قابل پیش‌بینی است (۱۶). هیچ گزارشی مبنی بر جداسازی این باکتری از کارخانجات مرتبط با فراوری سیب زمینی و یا سنجش میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط این باکتری وجود ندارد. سنجش مقادیر تولید آنزیم (جدول ۲) در مایع‌رویی و زیست توده‌ی سونیکه‌شده

نشان می دهد که آنزیم خارج‌سلولی است. سنجش مقادیر تولید آنزیم در مایع‌رویی نیز نشان می‌دهد که بالاترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناژ توسط باکتری *E. coli* ۱۰ واحد و بالاترین میزان تولید آنزیم توسط *E. italicus* ۲/۳۳ واحد است. طبق نتایج بدست آمده به نظر می رسد استفاده از سوبسترای اولیه گلوتامین در مورد جدایه‌ی PW4 اثرات تحریکی برای تولید آنزیم آسپاراژیناز دارد. پدیده‌ی مشابهی در سال ۲۰۰۴ گزارش شده است (۳۳). سنجش میزان فعالیت گلوتامینازی آنزیم نیز نشان (جدول ۴) داد که آنزیم تولیدی هیچ یک از جدایه‌ها فعالیت گلوتامینازی قابل توجهی را نشان نمی‌دهند و این امر در مقاصد استفاده از آنزیم در مصارف داروی ضدسرطانی مزیت محسوب می شود؛ چرا که نشان داده شده است که نه تنها این فعالیت برای اثرات ضدسرطانی آسپاراژیناز لازم نیست، بلکه فعالیت آسپاراژینازی در کنار فعالیت گلوتامینازی کاهش نیز می‌یابد و فعالیت گلوتامینازی باعث ایجاد اثرات جانبی در بیماران می‌شود (۱۰). در سال ۲۰۱۷ Anjana و همکارانش به جداسازی باکتری‌های تولید کننده‌ی آنزیم آسپاراژیناز بدون فعالیت گلوتامینازی از ریزوسفر گیاهان مختلف و آب رودخانه‌ها پرداختند. نتایج حاکی از آن بود که تنها ۴ جدایه‌ی *Pseudomonas otitidis*، *Enterobacter cloacae*، *Ochrobactrum anthropic* و *Ecsherichia fergusoni* فاقد فعالیت گلوتامینازی بودند (۴۰). سنجش بهینه ی دمائی آنزیم تولیدی توسط جدایه ی PW4 (شکل ۵) نیز نشان داد که بالاترین فعالیت آنزیم در ۳۷ درجه سلسیوس بوده است. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۶ توسط Zeinat K.Mohamed و همکارانش انجام شد، ۱۵۰ باکتری جدا شده از رود نیل از نظر توانایی تولید آنزیم L-آسپاراژیناز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت تولید آسپاراژیناز مربوط به باکتری *E. coli* و دمای بهینه برای تولید آنزیم ۳۷ درجه سلسیوس است (۳۰). در مطالعه‌ای دیگری در همان سال Remya Radha و همکارانش بررسی‌هایی بر روی L-آسپاراژیناز نوترکیب تولید شده توسط *Vibrio cholera* انجام داده اند که نتایج نشان داده است که این آنزیم حداکثر فعالیت خود را در دمای بهینه ۳۷ درجه سلسیوس نشان می‌دهد (۳۶).

منابع

۱- آب خویی، لیلا ، مینایی تهرانی، داریوش، کلاهدوز محمدی، مینا، افتخار، فرشته، کرجی، نیلوفر، میر فخار، فرزانه، وزیری تبار، نازنین. (۱۳۹۴). خالص سازی وتعیین خصوصیات کینتیکی آنزیم آسپاراژیناز در باکتری *Serratia marcescens*. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی.. ۱۵۳-۱۴۵: (۲) ۲۸

۲- طالبی، سارا، مخدومی، علی، بحرینی، معصومه. (۱۳۹۸). جداسازی باکتری *Enterococcus* sp. 7C 37 با توانمندی پروبیوتیکی بالا از پنیر قاینی به عنوان یک محصول تخمیری لبنی در استان خراسان جنوبی. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی. (۴)۳۲.

3- Abd El Baky, H. H., El Baroty, G. S., 2016. Optimization of growth conditions for purification and production of L-asparaginase by Spirulina maxima. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

4- Badoei-Dalfard, A., 2016. L-asparaginase production in the pseudomonas pseudoalcaligenes strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. Molecular Biology Research Communications. 5 (1), 1-10.

5- Bartholomew, J. W., Mittwer, T., 1950. A simplified bacterial spore stain. Stain technology. 25(3), 153-156.

6- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72, 248-254.

7- Brumano, L. P., Vitor Santos da Silva1, F., Costa-Silva, T. A., Apolinário, A. C., Santos J. H. M. Kleingesinds, E. K., Monteiro, G., Rangel-Yagui, C. O., Benyahia, B., Junior A. P., 2018. Development of L-Asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 6(212).

8- Cachumba, J. J .M., Fernandes Antunes, F. A., Dias Peres, G. F., Brumano, L. P., Santos, J. C.,

Silva, S. S, 2016. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. brazilian journal of microbiology. 47, 77-85.

9- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Laniewska-Trokenheim L., 2017. Virulence factors of Enterococcus spp. presented in food. LWT- Food Science and Technology. 75, 670-676.

10- Chan, W. K., Lorenzi, P. L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D. M., Sukharev, S., Rempe, S. B., Weinstein, J. N., 2014. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. Blood. 123(23), 3596-3606.

11- Cheng, H. R., Jiang, N., 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnology letters. 28(1), 55-59.

12- Deshpande, N., Choubey, P., Agashe, M., 2014. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by Streptomyces ginsengisoli. The Scientific World Journal.

13- Dhanam, J., Kannan, S., 2013. l-Asparaginase-types, perspectives and applications. Advanced BioTech. 13(1), 1-5.

14- Doan, C. H., Davidson P. M., 2000. Microbiology of potatoes and potato products: a review. Journal of food protection. 63(5), 668-683.

15- Duval, M., Suciu, S., Ferster, A., Rialland, X., Nelken, B., Lutz, P., Benoit, Y., Robert, A., Manel, A. M., Vilmer, E., Otten, J., Philippe, N., 2002. Comparison of Escherichia coli–asparaginase withErwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children's Leukemia Group phase 3 trial. Blood. 99(8), 2734-2739.

16- Dwivedi, V. D., Mishra, S. K., 2014. In silico analysis of L-asparaginase from different source organisms. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences. 6(2), 93-99.

17- El-Ghonemy, D. H., 2015. Microbial amidases and their industrial applications: a review. Journal of Medical Microbiology & Diagnosis. 4(1).

18- El-Naggar, N. E. A., Deraz, S. F., El-Ewasy, S. M., Suddek, G. M., 2018. Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from Streptomyces brollosae NEAE-115. BMC Pharmacology and Toxicology. 19(1), 51-79.

19- Faller, A., Schleifer, K. H., 1981. Modified oxidase and benzidine tests for separation of staphylococci from micrococci. Journal of Clinical Microbiology. 13(6),1031-1035.

20- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 39(4), 783-791.

21- Forslund, A., Ensink, J. H. J., Battilani, A., Kljujev, I., Gola, S., Raicevic, V., Jovanovic, Z., Stikic, R., Sandeie. L., Fletcherg, A., Dalsgaarda, T., 2010. Faecal contamination and hygiene aspect associated with the use of treated wastewater and canal water for irrigation of potatoes (Solanum tuberosum). Agricultural Water Management. 98(3), 440-450.

22- Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D., Manachini, P. L., 2004. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals Enterococcus italicus sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54(5), 1717-1721.

23- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., Olsen, G. J., 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 74(8), 2461-2470.

24- Fujioka, R., Sian-Denton, C., Borja, M., Castro, J., Morphew, K., 1998. Soil: the environmental source of Escherichia coli and enterococci in Guam's streams. Journal of Applied Microbiology. 85(S1), 83S-89S.

25- Ghoshoon, M. B., Raee, M. J., 2008. An optimized medium for screening of L-asparaginase production by Escherichia coli. Am J Biochem Biotechnol. 4(4), 422-424.

26- Heisler, E., Siciliano J., Treadway, R. H., Woodward, C. F., 1959. Recovery of free amino compounds from potato starch processing water by use of ion exchange. American Journal of Potato Research. 36(1), 1-11.

27- Hui, Y. H., Chandan, R. C., 2007. Handbook of food products manufacturing: Health, meat, milk, poultry, seafood, and vegetables. John Wiley & Sons, Inc.

28- Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K., Isono, M., 1973. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. Microbiology. 76(1), 85-99.

29- Kaur, P., Saxena, S. G., 2014. Screening of endophytic fungi for production of Asparaginase enzyme. Dissertation.

30- Mohamed, Z. K., Elnagdy, Sh. M., Seufi, A. E., Gamal, M., 2016. Production and optimization

of L-asparaginase in Escherichia coli. Egyptian Journal of Botany. 56(1), 203-224.

31- Müller, T., Ulrich, A., Ott, E. M., Müller, M., 2001. Identification of plant-associated enterococci. Journal of Applied Microbiology. 91(2), 268-278.

32- Norris, J., Swain, H., 1971. Staining bacteria. Methods in microbiology. 5, 105-134.

33- Panosyan, E. H., Grigoryan, R. S., Avramis, I. A., Seibel, N. L., Gaynon, P. S., Siegel, S. E., Fingert, H. J, Avramis, V. I., 2004. Deamination of glutamine is a prerequisite for optimal asparagine deamination by asparaginases in vivo (CCG-1961). Anticancer research. 24(2C),1121-1126.

34- Pedreschi, F., Mariotti, M. S., Granby, K., 2014. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. Journal of the Science of Food and Agriculture. 94(1), 9-20.

35- Plata-Guerrero, R., Guerra-Hernandez, E., Garcia-Villanova B., 2009. Determination of reducing sugar and asparagine in potatoes. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 32(17), 2556-2568.

36- Radha, R., Arumugam, N. Gummadi, S. N., 2018. Glutaminase free L-asparaginase from Vibrio cholerae: heterologous expression, purification and biochemical characterization. International journal of biological macromolecules. 111, 129-138.

37- Reiner, K., 2010. Catalase test protocol. Wasinghton, DC: American Society for Microbiology, ASMMicrobeLibrary, http://www.microbelibrary.org.

38- Riboldi, G. P., Frazzon, J., Alves d'Azevedo, P., Guedes Frazzon, A. P., 2009. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus spp isolated from food in Southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 40(1),125-128.

39- Sajitha, S., Karunakaran, V., Parameswaran, B., Ashok, P., 2015. Cloning and expression of l-asparaginase from E. coli in eukaryotic expression system. Biochemical engineering journal. 102, 14-17.

40- Sharma, A., Husain, I., 2017. Evaluation of antitumor activity of glutaminase-free periplasmic asparaginase from indigenous bacterial isolates as candidates for cancer therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. 87(3), 997-1004.

41- Shields, P., Cathcart, L., 2011. Motility test medium protocol. Wasinghton, DC: American Society for Microbiology; http://www.microbelibrary.org.

42- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution. 28(10), 2731-2739.

43- Vu, J., Carvalho, J., 2011. Enterococcus: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. Frontiers in Biology. 6(5), 357.

44- Wang, L. K., Hung, Y. T., Yapijakis, C., Lo, H. H., 2005. Waste treatment in the food processing industry. CRC Press.

45- Wanke, C.A., 2001. To know Escherichia coli is to know bacterial diarrheal disease. Clinical Infectious Diseases. 32(12), 1710-1712.

46- Zuo, S., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W., 2015. Recent research progress on microbial L-asparaginases. Applied microbiology and biotechnology. 99(3), 1069-1079.

Isolation and Identification of asparaginase-producing bacteria from potato processing wastewater

Neghabi N., Zadeh Hosseingholi E., Pazhang M. and Chaparzadeh N.

Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

L-asparaginase is an enzyme which hydrolyzes the amino acid asparagine into aspartic acid and ammonia. L-asparaginase used for leukemia and lymphoma treatment is produced mainly from bacteria such as *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* and search continues to find new sources for this enzyme. In this study, isolation of bacteria producing L-asparaginase from wastewater of potato processing was performed.The wastewater containing all the soluble compounds in potato juice, such as significant amounts of asparagine amino acids. Bacterial isolation and screening were performed on nitrogen agar and M9 media. Two isolates, called PW4 and PW5, were able to produce ammonium in the M9 medium. The results of molecular identification and biochemical tests showed that these isolates belong to the genus *Escherichia* and *Enterococcus*, respectively. Quantitative and qualitative measurements of the enzyme production of these isolates were carried out in different conditions. The highest enzyme activity of 10 $IUml^{-1}$ was seen in PW4 isolate growth in the in a medium containing glutamine. The maximum amount of enzyme activity of PW5 isolate, 2.33 $IUml^{-1}$ was observed as a result of bacterial culture in a culture medium containing asparagine. The enzymes produced by both isolates did not show glutaminase activity. The maximum activity of the enzyme produced by PW4 isolate was evaluated at 37 °C and enzyme activity decreased at lower and higher temperatures. These results suggest that this enzyme has a potential to be further studies for use in drug design.

Key word: Wastewater, Potato, Asparaginase, *Escherichia*, *Enterococcus*