

جداسازی، شناسایی و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی اسپاراژیناز خارج سلولی فاقد خاصیت گلوتامینازی جداشده از خاک

نسرین غلامی، غلامحسین ابراهیمی پور و محمد یعقوبی آوینی

ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۹

چکیده

آنزیم ال-اسپاراژیناز کاربردهای زیادی در صنایع مختلف اعم از دارویی، پزشکی، غذایی و ... دارد. هدف مطالعه حاضر بهینه‌سازی ویژگی‌های آنزیمی ال-اسپاراژیناز فاقد فعالیت گلوتامینازی می‌باشد. جداسازی اولیه با استفاده از محیط M9 تغییر یافته انجام شد. کلنی‌های دارای هاله صورتی و مولد ال-اسپاراژیناز برای مطالعه فعالیت اسپاراژینازی و فعالیت گلوتامینازی انتخاب گردیدند. فعالیت آنزیمی با روش نسلر اندازه‌گیری شد. تاثیر عوامل مختلف از جمله زمان انکوباسیون، دما، pH و اثر یونهای مختلف بر روی فعالیت اسپاراژینازی مورد سنجش قرار گرفت. در این مطالعه، یکی از ۱۷ جدایه که دارای فعالیت اسپاراژینازی بالا و فاقد فعالیت گلوتامینازی بود، برای ادامه پژوهش انتخاب شد. براساس توالی‌یابی 16SrDNA و خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی، باکتری جداسازی شده با ۹۹٫۹٪ شباهت با عنوان سویه *Bacillus subtilis* sbu-1 شناسایی شد. آنزیم اسپاراژیناز تولید شده توسط این باکتری در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، pH=۷ بالاترین میزان فعالیت آنزیمی (۸۸۰ U/ml) را داشته است، همچنین یون‌های کبالت و کلسیم بترتیب باعث افزایش فعالیت اسپاراژینازی تا حدود ۱۱۲٪ و ۱۰۷٪ شده است. با توجه به نتایج بدست آمده، این پژوهش می‌تواند به معرفی آنزیم اسپاراژیناز جدید بدون فعالیت گلوتامینازی، در جهت کاهش سمیت، حساسیت زایی و عوارض جانبی ناشی از مصرف دارو کمک کند.

واژه‌های کلیدی: ال-اسپاراژیناز، فعالیت گلوتامینازی، *Bacillus subtilis*

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: g-ebrahimi@sbu.ac.ir

مقدمه

با توجه به گسترش روزافزون انواع مختلفی از سرطان‌ها که از مهمترین بیماری‌های تهدیدکننده سلامت انسان و جهان می‌باشد، دستیابی به روش‌های موثرتر در درمان سرطان مخصوصاً انتخاب ترکیبات دارویی با عوارض جانبی کمتر، بیش از گذشته توجه دانشمندان را بخود مشغول کرده است (۸). آنزیم ال-اسپاراژیناز از جمله اصلی‌ترین آنزیم‌های درمانی در صنعت پزشکی و داروسازی و بعنوان یک داروی ضد سرطان محسوب می‌شود (۲۰). آنزیم ال-اسپاراژیناز، آنزیمی است که در تجزیه ال-اسپاراژین به ال-اسپارتیک اسید و آمونیاک نقش بازی می‌کند (۷). آنزیم ال-اسپاراژین با توقف سنتز پروتئین در سلول‌های سرطانی، باعث القای آپوپتوز و مرگ سلول سرطانی می‌شود (۱۶). بیشتر سلول‌های طبیعی انسانی، کمبود اسپاراژین را از مسیرهای سنتزی دیگری از جمله ترشح آنزیم اسپاراژین سنتتاز جبران می‌کنند، در حالیکه در سلول‌های سرطانی آنزیم اسپاراژیناز با از بین بردن اسپاراژین موجود در خون باعث کاهش دسترسی این سلول‌ها به این آمینواسید شده

و در نتیجه سلول‌های سرطانی بدلیل کمبود فعالیت آنزیم آسپاراژین سنتتاز و ناتوانی در ساخت آسپاراژین دچار مرگ سلولی شده و از بین می‌روند (۹).

براساس مطالعات انجام شده و بررسی‌های اخیر آنزیم آسپاراژیناز بطور قابل توجهی از تکثیر لنفوسیت‌ها جلوگیری می‌کند. ال-آسپاراژیناز تا حدود ۹۸٪ مانع از تکثیر لنفوسیت‌ها می‌شود. آنزیم آسپاراژیناز به شکل داروی ترکیبی شیمی درمانی برای درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد در بزرگسالان و کودکان و لنفوم غیرهوچکینی در کودکان استفاده می‌شود (۳). آسپاراژیناز حتی در صنایع غذایی به منظور حذف آکریل‌آمید و حفظ کیفیت غذا استفاده می‌شود. علاوه بر این کاربرد‌های بالینی، ال-آسپاراژیناز در فرآوری مواد غذایی نیز استفاده می‌شود. در طی گرم کردن غذا، اسید آمینه ال-آسپاراژینی که بطور طبیعی در غذاهای نشاسته‌ای وجود دارند، دچار واکنش‌های میلارد قهوه‌ای می‌شود. متاسفانه، در واکنش‌های میلارد عوامل پنهانی سرطان‌زایی در انسان مثل آکریل‌آمید شکل می‌گیرد. ال-آسپاراژیناز یک راه بالقوه برای کاهش میزان ال-آسپاراژین آزاد در مواد اولیه محصولات غذایی است (۱۷).

این آنزیم از منابع گوناگونی مانند سلول‌های جانوری، گیاهی، قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها جداسازی شده، در حالیکه در انسان این آنزیم گزارش نشده است. آنزیم‌های مشتق از منابع میکروبی مزیت‌های بیشتری نسبت به منابع حیوانی و گیاهی دارند که از آن جمله می‌توان به تنوع فعالیت‌های کاتابولیکی، منابع فراوان و مستمر، پایداری بالاتر و حتی هزینه ارزانتر آنها اشاره کرد (۱۱). همچنین منابع میکروبی که آنزیم آسپاراژیناز را بصورت برون سلولی ترشح می‌کنند مورد توجه دانشمندان قرار گرفته‌اند. زیرا در صورت ترشح آنزیم به بیرون از سلول روند تخلیص و خالص‌سازی آنزیم به سهولت انجام می‌پذیرد و از نظر اقتصادی مقرون‌بصرفه‌تر است (۶). امروزه در صنعت برای تولید انبوه این آنزیم از دو گونه باکتری *E. coli* و *Erwinia caratovora* استفاده می‌شود (۸).

گاه‌ها آنزیم آسپاراژیناز دارای فعالیت گلوتامینازی نیز می‌باشد که فعالیت گلوتامینازی تولیدشده توسط این آنزیم می‌تواند اثرات ثانویه‌ای جبران‌ناپذیری همانند واکنش‌های آلرژیک، آماس لوزالمعده، دیابت، تهوع و استفراغ و لخته شدن غیر نرمال داشته باشد (۱۲).

با توجه به اهمیت بالا و کاربرد روزافزون در حوزه دارویی و صنعتی آنزیم ال-آسپاراژیناز، اولین گام برای تولید انبوه آسپاراژیناز دستیابی به میکروارگانیسم‌های جدید با توان تولید بالا و عوارض جانبی و سمیت سلولی پایین است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز و تاثیر عوامل مختلف بر روی فعالیت آسپاراژینازی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

بیشتر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت Merck آلمان خریداری شدند؛ محیط کشت‌های TSI و SIM بترتیب از شرکت‌های Difco و Oxoid خریداری گردیدند. مواد شیمیایی CuSO_4 و $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ از شرکت RIEDEL-DEHAEN AG خریداری شدند. اسید آمینه‌های آسپاراژین و گلوتامین به ترتیب از شرکت‌های Fluka آلمان و Sinchem کره

تهیه شدند. آغازگر استفاده شده برای تکثیر قطعه ژن DNA 16Sr که شامل 27F و 1492 R که از شرکت پیشگام و نشانگر مولکولی DNA با اندازه یک کیلو بازی از شرکت فرمتناز تهیه شدند.

نمونه برداری

خاک مورد استفاده در این تحقیق از خاک‌های پساب کشتارگاه (غنی از پروتئین) مناطق آذربایجان تهیه شدند، دارای pH برابر ۷ و شوری آن در حدود ۰/۰۱ درصد بود. نمونه‌ها توسط یک قاشق استریل از ۱۰ سانتی متری سطح خاک برداشته شد و در ظروف پلاستیکی استریل به آزمایشگاه انتقال یافت.

جداسازی و غربالگری کیفی باکتری مولد آسپاراژیناز

بعد از انتقال نمونه خاک به آزمایشگاه، یک گرم از هر نمونه خاک توزین و در ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی حل گردید. بمنظور همگن شدن نمونه، مخلوط بمدت 6 ساعت در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۰۰ هم زده شد. سپس از سوسپانسیون ایجاد شده با سرم فیزیولوژی استریل تا میزان ۶-۱۰ سریال رقت تهیه شد و مقدار ۰/۱ میلی لیتر از ۳ رقت بالاتر (۴-۱۰، ۵-۱۰، ۶-۱۰) بوسیله میله شیشه‌ای سرکج دریگالسیکی و بروش کشت سطحی بر روی پلیت حاوی محیط M9 تغییر یافته (متشکل از گلوکز ۱ گرم، ۰/۰۰۱ MgSO₄. 5H₂O گرم، ۰/۰۰۱ CaCl₂. 2H₂O گرم، ۰/۰۵ K₂HPO₄ گرم، ۰/۰۰۱ FeSO₄. 7H₂O گرم، Trace Element ۰/۱ گرم، آسپاراژین ۰/۱ گرم و آب دیونیزه ۱۰۰ میلی لیتر) کشت داده شد و باکتری‌های تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز با چند کشت متوالی خالص گردیدند. باکتری‌های خالص شده بصورت نقطه‌ای بر روی محیط M9 تغییر یافته کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۴۸ ساعت گرماگذاری گردید. باکتری‌های تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز، با آزاد سازی آمونیوم، در حضور معرف فنل رد، باعث قلبایی شدن محیط و تغییر رنگ آن از زرد به صورتی می‌شوند (۲۰).

غربالگری کیفی باکتری از نظر دارا بودن خاصیت گلوتامینازی

به منظور بررسی فعالیت گلوتامینازی از محیط M9 تغییر یافته حاوی ۱ گرم گلوکز، ۰/۰۵ گرم K₂HPO₄، ۰/۱ گرم گلوتامین و ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه استفاده شد. در این محیط کشت از اسید آمینه گلوتامین بجای اسید آمینه آسپاراژین استفاده گردیده است. روش غربالگری باکتری از لحاظ دارا بودن خاصیت گلوتامینازی مشابه روش انجام شده برای سنجش فعالیت آسپاراژینازی بود. تغییر رنگ در محیط کشت نشان دهنده دارا بودن فعالیت گلوتامیناز-آسپاراژینازی آنزیم بود. باکتری با پتانسیل بالای تولید آنزیم آسپاراژینازی که خاصیت گلوتامینازی نداشت (آسپاراژیناز مثبت و گلوتامیناز منفی) برای مراحل بعد انتخاب شد.

شناسایی باکتری بروش فیلوژنتیکی و کلاسیک

شناسایی فیلوژنتیکی

بمنظور شناسایی مولکولی باکتری جداسازی شده از روش‌های توالی‌یابی DNA 16Sr استفاده شد. هر یک از گونه‌های باکتریایی دارای توالی DNA 16Sr منحصر بخود می‌باشند. ابتدا باکتری روی محیط نوترینت برات کشت داده شد پس از ۲۴

ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، ۱ میلی لیتر از محیط کشت در دمای ۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مراحل استخراج DNA طبق پروتکل کیت استخراج شرکت سیناژن انجام گرفت و جهت بررسی میزان خلوص آن، جذب DNA در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. در این پژوهش از پرایمرهای Universal (۵'- 3' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-27F، 5'- GGCTACCTTGTTACGACTT-1492R) که توانایی تکثیر 16S rDNA ریپوزومی را برای بیشتر باکتری‌های حقیقی دارند، استفاده شد.

واکنش PCR نیز مطابق برنامه زیر انجام شد: (۱) دمای اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد برای مدت ۵ دقیقه، (۲) ۳۰ سیکل که هر کدام شامل: ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، ۵۳ درجه سانتیگراد بمدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه. (۳) مرحله طولی شدن نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه. نهایتاً محصول PCR توسط ژل ۱٪ آگارز الکتروفورز گردید و تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول PCR توسط شرکت تکاپو زیست انجام گرفت. پس از جفت کردن توالی‌های نوکلئوتیدی با نرم افزار ChromasPro، این توالی‌ها به کمک نرم افزار Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفتند و شباهت آن‌ها با اطلاعات موجود در بانک ژنی مقایسه شد. جهت تحلیل فیلوژنتیکی، پس از یافتن توالی‌های مشابه و رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA5(42) و با الگوریتم Neighbour-joining انجام گردید. بررسی شاخه‌های درخت با استفاده از الگوریتم Bootstrap با ۱۰۰ بار نمونه‌گیری انجام شد (۲).

شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی

بدین منظور خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری انتخاب شده همچون تست‌هایی مانند رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، SIM و ... مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش کمی فعالیت آنزیمی ال-آسپاراژیناز

ارزیابی فعالیت آنزیمی ال-آسپاراژیناز طبق روش نسلریزاسیون با کمی تغییرات، انجام گرفت (۶). این روش بر اساس مقدار آمونیاک آزاد شده از ال-آسپاراژین در هنگام فعالیت آنزیم می‌باشد. برای این منظور ابتدا ۱ میلی لیتر بافر تریس آمینو متان ۰/۱ مولار و با pH ۸ را در لوله آزمایش تمیز و یا یک ویال ۲ میلی لیتری ریخته شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر آسپاراژین ۰/۰۴ مولار به آن اضافه نموده و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری نموده تا بافر و سوبسترا گرم شده و به دمای ایده‌آل فعالیت آنزیمی برسند. محلول رویی که از کشت ۴۸ ساعته در محیط کشت M9 تغییر یافته تهیه شده بود، به لوله اضافه نموده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ دقیقه گذاشته شد. پس از اتمام زمان مورد نظر، ۲۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ مولار به محتویات لوله آزمایش اضافه و بخوبی ورتکس شد. محتویات لوله را در ویال ۲ میلی لیتری ریخته و با دور ۱۳۰۰۰ g بمدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی لیتر از مایع رویی را در لوله آزمایش تمیز ریخته، ۳ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر معرف نسلر اضافه نموده و بمدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداشته شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. جهت بدست آوردن کنترل منفی محلول رویی و بافر و سوبسترا و تری-کلرواستیک اسید را از ابتدا در لوله ریخته و در بقیه موارد مانند پروتکل عمل شد. بدلیل صرفه جویی در هزینه‌ها و بالا بودن قیمت آمپول آسپاراژیناز کنترل مثبت برای این سنجش بکار برده نشد و سپس براساس منحنی استاندارد آمونیم سولفات فعالیت آنزیمی محاسبه شد.

منحنی استاندارد آمونیوم سولفات

برای تهیه منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلفی از آمونیوم سولفات ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر را در ۰/۵ میلی لیتر بافر تریس آمینومتان (۰/۱ مولار و pH ۸)، ۰/۲ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۹ مولار و ۲۰۰ میکرولیتر معرف نسلر حل نموده و جذب آنها در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجیده شد و با استفاده از نرم افزار SPSS منحنی استاندارد رسم گردید. تمام آزمایشات بعدی با استفاده از این منحنی استاندارد و معادل خط همبستگی آن صورت گرفته است (۱۷).

تعیین ویژگی آسپاراژیناز تولید شده توسط سویه جداسازی شده

بررسی تاثیر زمان انکوباسیون بر روی فعالیت آنزیمی

برای بررسی زمان انکوباسیون در فعالیت آنزیمی مایع رویی، از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط کشت M9 تغییر یافته حاوی ۱٪ گلوکز و ۰/۱٪ آسپاراژین استفاده شد. مقدار ۲ ml از محیط کشت گرفته شده، برداشته شد و با دور ۱۰۰۰۰X g بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۵ ml از محلول رویی برداشته شد و در لوله‌های آزمایش تمیز و شسته شده با آب مقطر ریخته شد، سپس ۰/۵ ml محلول L-آسپاراژین و ۰/۵ میلی لیتر بافر تریس آمینومتان اضافه و پس از طی زمان‌های متفاوت (۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰) دقیقه، به هر لوله ۰/۲ ml از محلول متوقف کننده تری کلرو استیک اسید ۰/۹ مولار ریخته شد. سپس محلول‌ها با دور ۱۳۰۰۰ x g بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. هر این مرحله آمونیوم آزاد شده از فعالیت آنزیم آسپاراژیناز با افزودن ۱ میلی لیتر معرف نسلر و ۷ میلی لیتر آب مقطر در طول موج ۴۵۰ نانومتر مورد محاسبه قرار گرفت. نمونه کنترل (شاهد) برای هر کدام شامل تمامی مراحل بالا، با این تفاوت که ابتدا محلول متوقف کننده و بعد بقیه مواد اضافه شد، ساخته شد. فعالیت آسپاراژینازی با تعیین مقدار آمونیوم آزاد شده در محلول سانتریفیوژ شده با سنجش میزان جذب نوری آن در طول موج ۴۵۰ nm اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده با منحنی استاندارد مقایسه و بصورت واحد آنزیمی گزارش شدند. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد (۱۱).

بررسی فعالیت آسپاراژینازی در دماهای مختلف

برای بررسی فعالیت کاتاکتیک آنزیم در دماهای مختلف از سوپرناتانت تهیه شده از کشت ۴۸ ساعته در محیط کشت M9 تغییر یافته، فعالیت آنزیمی در دماهای ۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد (با فاصله ۱۰ درجه سانتی‌گراد) سنجیده شد و نتایج بصورت نموداری نمایش داده شد. بالاترین فعالیت آنزیمی بعنوان ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد (۱۷).

بررسی فعالیت آسپاراژینازی در pH های مختلف

برای بررسی فعالیت آنزیمی در pH های مختلف از سوپرناتانت تهیه شده از کشت ۴۸ ساعته در محیط کشت M9 تغییر یافته، فعالیت آنزیمی در بافرهای با pH های مختلف شامل سدیم استات (pH = ۵)، سدیم کربنات (pH = ۶)، تریس-HCl (۸) و pH = ۷ و بافر بوراکس (۱۱ و ۱۰-۹) سنجیده شد و اطلاعات بصورت نموداری نمایش داده شد. بالاترین فعالیت آنزیمی بعنوان ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد (۱۷).

بررسی فعالیت اسپاراژینازی در حضور یون‌های مختلف

جهت پی بردن به تاثیر یون‌های مختلف در فعالیت آنزیمی، فعالیت آنزیمی مایع رویی در حضور یون‌های مختلف (Pb^{2+})، آزمایش، مخلوط واکنش حاوی $0/5$ میلی لیتر سوپرناتانت، $0/5$ میلی لیتر محلول ال-اسپاراژین و $0/5$ میلی لیتر بافر تریس آمینومتان همراه با غلظت 1 میلی مولار از یون‌های مختلف می‌باشد. در نهایت فعالیت آنزیمی بصورت نموداری نمایش داده شد. فعالیت آنزیمی در عدم حضور یون‌های گفته شده بعنوان 100 درصد در نظر گرفته شد (۳).

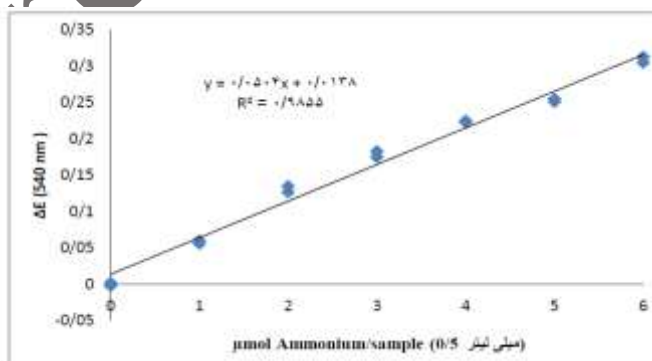
نرم افزارهای مورد استفاده در تجزیه و تحلیل نتایج

در این مطالعه برای تجزیه و تحلیل نتایج توالی یابی از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی Chromos LITE و BLAST (bl2seq) استفاده شد. برای پیدا کردن همولوژی توالی کامل بدست آمده با باکتری‌های موجود در GenBank از نرم افزار Blast در NCBI استفاده شد. نتایج بدست آمده از جذب نوری واکنش‌های آنزیمی در اکسل وارد شد و فعالیت آنزیمی برای هر آزمایش در سه تکرار در نرم افزار اکسل محاسبه گردید. برای رسم نمودارها و منحنی مربوط به تولید و فعالیت آنزیم در شرایط مختلف آزمایش و آنالیز آماری نتایج از نرم افزار GraphPad Prism 5.01 استفاده شد. جهت مقایسه میانگین دو گروه با یکدیگر از آزمون آماری Student's t-test و جهت مقایسه میانگین چندین گروه با یکدیگر (بیش از دو گروه) از آزمون آماری One-Way ANOVA و آزمون post-hoc Tukey test استفاده گردید. کلیه نتایج بصورت $mean \pm SEM$ نشان داده شده است.

نتایج:

منحنی استاندارد آمونیوم

بمنظور محاسبه فعالیت آنزیمی و تعیین میزان میکرومول آمونیوم آزاد شده در طی واکنش آنزیمی سویه جداسازی شده، منحنی استاندارد با معادله خطی ($R^2 = 0.9855$ ، $y = 0.0504x + 0.0138$) بدست آمد. در این رابطه Y برابر با میزان جذب خوانده شده با دستگاه الیزا ریدر در طول موج 450 نانومتر و X برابر با میزان میکرومول آمونیوم در میلی لیتر می باشد.

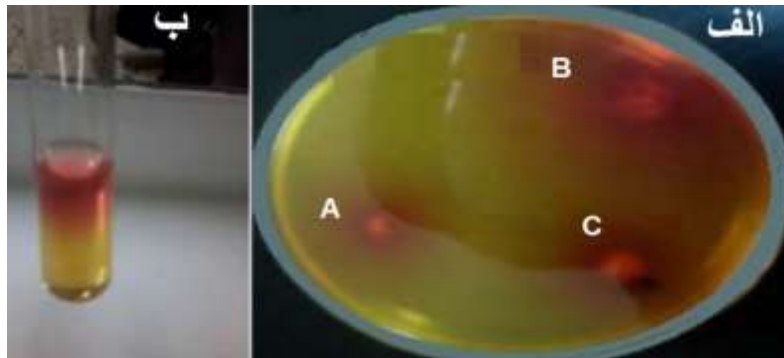


شکل ۱. منحنی استاندارد آمونیوم سولفات

(شکل ۱).

سنجش کیفی فعالیت آسپاراژینازی

اساس این روش بر تغییر اسیدیته محیط کشت است. بمنظور غربالگری اولیه و بررسی توانایی سویه جداسازی شده در تولید آنزیم آسپاراژیناز، تغییر رنگ پلیت پس از کشت باکتری و گرمخانه گذاری بمدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

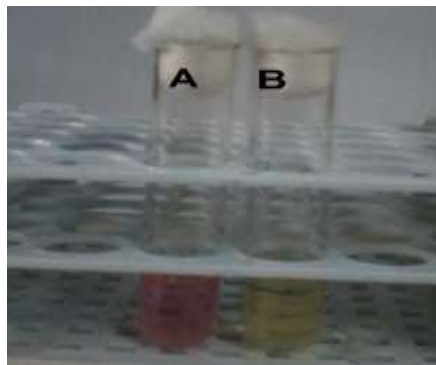


شکل ۲. غربالگری کیفی باکتری های تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز. (الف) ایزوله های غربالگری شده در مرحله اول بصورت نقطه ای در محیط M9 کشت داده شدند. ۳ ایزوله با بیشترین هاله قرمز رنگ برای مرحله بعد انتخاب شدند که در بین این ها ایزوله B دارای بالاترین قطر هاله (۸ میلیمتر) نسبت به بقیه بود. (ب) سوپرناتانت کشت ۳ ایزوله در محیط کشت پایه معدنی حاوی ۱٪ آگار، ۱٪ آسپاراژین، ۰/۰۰۹٪ فنل رد بمدت ۵ ساعت انکوبه شدند. تشکیل هاله قرمز در محیط مایع نشان دهنده وجود آنزیم ال-آسپاراژیناز بود که دلالت بر خارج سلولی بودن آنزیم در هر سه ایزوله می باشد.

بررسی شد. در مجموع ۱۷ باکتری با قابلیت تولید آنزیم آسپاراژیناز جداسازی شدند که ازین تعداد ۳ ایزوله با بیشترین هاله قرمز رنگ در محیط پایه معدنی M9 تغییر یافته برای ادامه تحقیق انتخاب شد. مطابق شکل ۲، تغییر رنگ محیط کشت پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در اطراف کلنی باکتری مشاهده شد.

غربالگری کیفی باکتری از نظر دارا بودن خاصیت گلوتامینازی

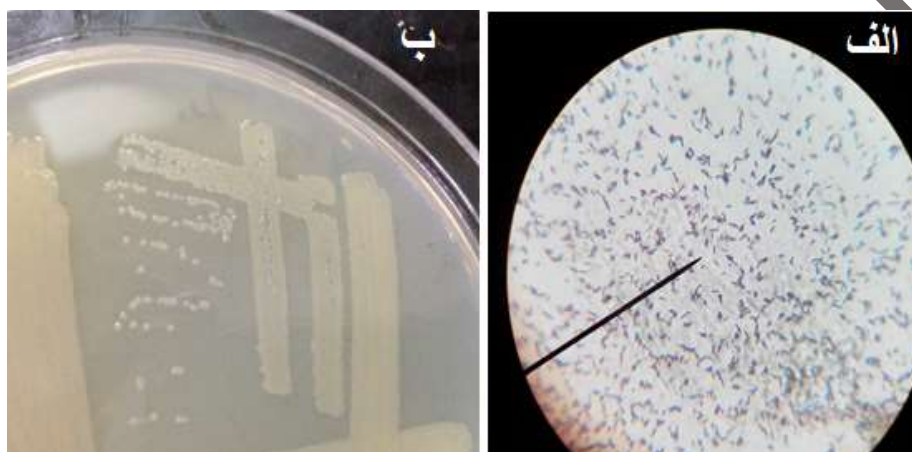
بمنظور بررسی فعالیت گلوتامینازی ۳ ایزوله غربالگری شده در مرحله قبل، باکتری های تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز پس از خالص سازی، در محیط کشت جامد سنتزی حاوی گلوکز و اسیدآمینه گلوتامین بعنوان تنها منبع نیتروژن کشت داده شد. از سه باکتری جداسازی شده تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز، دو باکتری فعالیت گلوتامینازی داشتند و فقط یکی از آنها فاقد فعالیت گلوتامینازی بود (شکل ۳) که برای ادامه پژوهش انتخاب شد.



شکل ۳. غربالگری کیفی باکتری های تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز از نظر دارا بودن خاصیت گلوتامینازی. (A) تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط ایزوله B در محیط M9 تغییر یافته حاوی آسپاراژین که باعث تغییر رنگ محیط کشت از زرد به صورتی شده است. (B) عدم تغییر رنگ محیط کشت M9 تغییر یافته حاوی گلوتامین در حضور باکتری B که نشان دهنده عدم تولید آنزیم گلوتامیناز در محیط کشت می باشد.

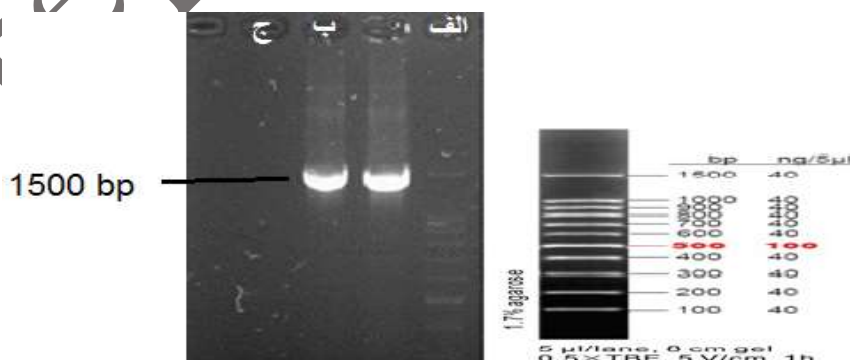
شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی

خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری جداسازی شده براساس *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* انجام‌گرفت که در جدول ۱ نشان داده شده است. در این جدول، ویژگی‌های ظاهری و متابولسمی باکتری مورد نظر با دو باکتری باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس تکوئیلنسیس که بیشترین همولوژی را از نظر فیلوژنی داشتند، مقایسه گردید. بررسی سویه منتخب در طی ۲۴ ساعت گرماگذاری در محیط نوترینت آگار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نشان داد که کلنی آن بصورت گرد، تورفته، گرمی رنگ و حاشیه صاف بود (شکل ۴). همینطور با رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده زیر میکروسکوپ نوری، سویه منتخب بصورت باسیل گرم مثبت مشاهده گردید.

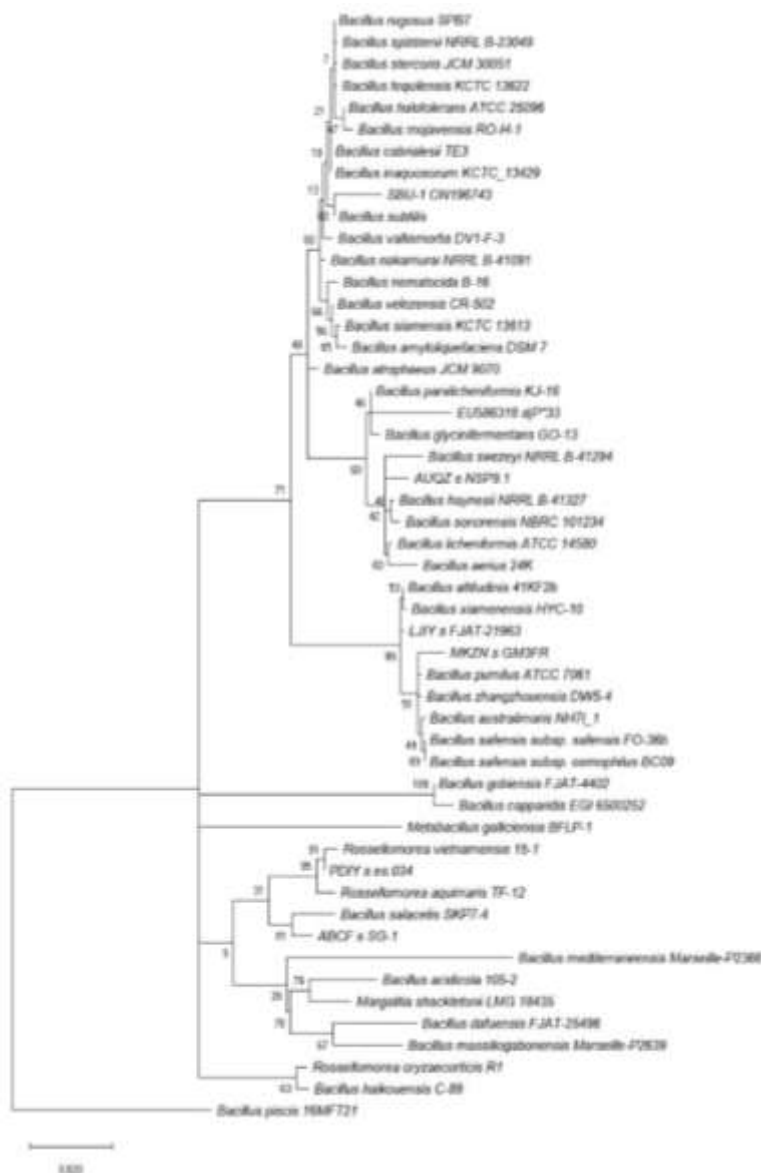


شکل ۴. الف) باسیل‌های گرم مثبت در رنگ‌آمیزی گرم با بزرگنمایی X ۱۰۰۰ (ب) کلنی باکتری جداسازی شده در محیط نوترینت آگار

براساس تست‌های بیوشیمیایی و خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی (شکل ۵) باکتری جداسازی شده (جدول ۱) و مقایسه آن با باکتری پیشنهاد شده در همولوژی، با عنوان باکتری *Bacillus subtilis sbu-1* با نام معرفی می‌گردد که با عدد دسترسی ON196743 در NCBI ثبت شد. این باکتری متعلق به رده Firmicutes خانواده Bacillaceae، جنس *Bacillus* و احتمالاً سویه‌ای از *Bacillus subtilis* می‌باشد.



شکل ۵. باند 16S rDNA حاصل از PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪. الف) نشانگر DNA (ب) باند نامبرده بطول ۱۵۰۰ جفت باز (ج) کنترل PCR بدون DNA الگو می‌باشد



شکل ۶. درخت فیلوژنی باکتری مولد اسپارازیناز برون سلولی فاقد خاصیت گلوتامینازی جدا شده

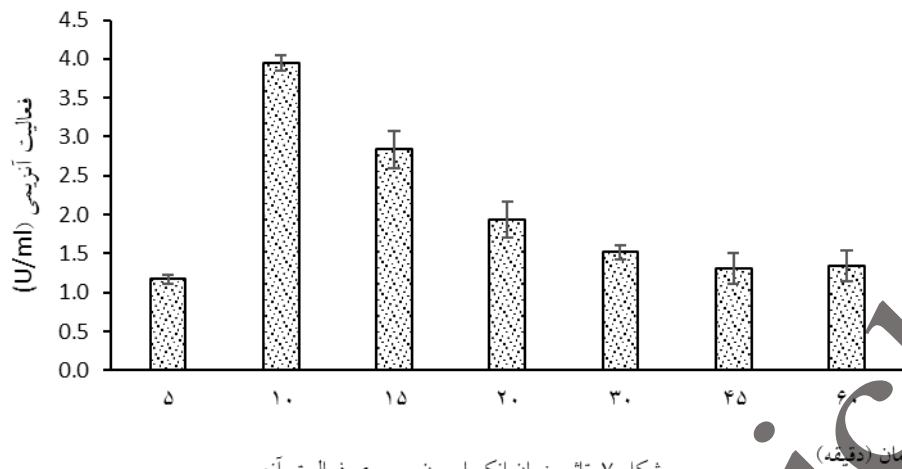
جدول ۱. مقایسه تست‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری جداسازی شده با باکتری‌های حاصل از همولوژی ۹۹ درصدی 16S rDNA در NCBI

نوع آزمایش	باکتری منتخب	باسیلوس سوئدیس	باسیلوس تکونینسیس
رنگ آمیزی گرم	+	+	+
شکل باکتری	میله ای	میله ای	رشته ای دراز
تست پتاس	-	-	-
تست کاتالاز	+	+	+
تست اکسیداز	+	-	-
اسپور	+	+	+
رشد در شرایط بی‌هوایی	-	-	-

-	-	-	تست احیای نیترات به نیتريت
-	-	-	نیتريفیکاسيون
-	-	-	دینیتريفیکاسيون
A/A	A/A	A/A	تست TSI
+	+	+	تست حرکت در SIM
-	-	-	H ₂ S
+	+	+	تست اوره آز
+	+	+	تست سترات
+	+	+	تست MR
-	-	-	تست VP
-	+	+	هیدرولیز ژلاتين
+	+	+	تست هیدرولیز نشاسته

بررسی زمان انکوباسيون بر روی فعاليت آنزيمي

زمان بهينه برای فعاليت آنزيمي سوپرناتانت، در ۷ pH و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل از این سنجش در شکل ۷ نشان داده شده است. بیشترین فعاليت آنزيمي (۳/۹۵ U/ml) پس از ۱۰ دقیقه مشاهده شده است و پس از آن تا ۳۰ دقیقه فعاليت آنزيمي کاهش یافت و به ۱/۵۲ U/ml رسید. پس از آن تغییری در افزایش یا کاهش فعاليت آنزيم مشاهده نمی‌شود. استفاده از تست Shapiro نشان داد که چون $p > 0/05$ بود، داده‌ها نرمال بودند. سپس تست ANOVA یک طرفه در ۳ تکرار نشان داد که بعلت $p > 0/05$ ، بین زمان‌های مختلف اختلاف معناداری وجود ندارد ($p=0/06$ ، $F= 1/541$). با توجه به کاربرد آنزيم در صنایع مختلف و ارزشمندی زمان در پروسه‌های صنعتی زمان ۱۰ دقیقه بعنوان بهينه فعاليت آنزيمي در نظر گرفته شد.

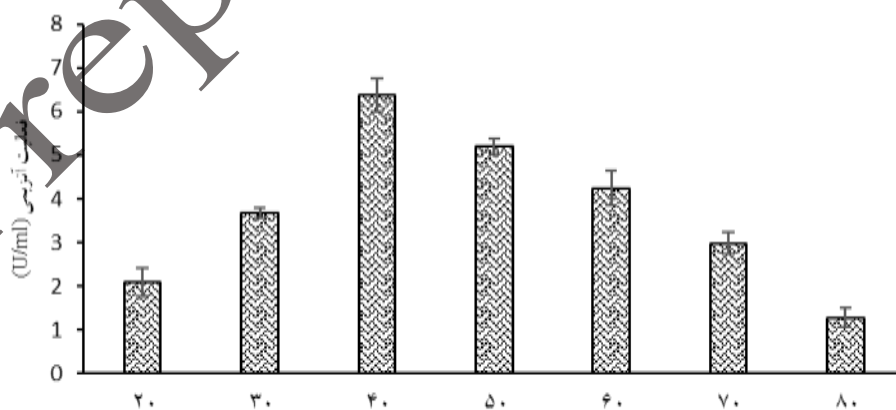


شکل ۷. تاثیر زمان انکوباسیون بر روی فعالیت آنزیمی

تاثیر عوامل مختلف در فعالیت آنزیمی

تاثیر دما بر فعالیت آسپاراژینازی

نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط سویه جاسازی شده، با اعمال دماهای مختلف بمدت ۱۰ دقیقه در شکل ۸ دیده میشود. همانطور که اعداد نمودار نشان می‌دهد، بالاترین فعالیت آنزیم پس از اعمال دمای ۴۰ درجه سانتیگراد (U/ml ۶/۳۷) می‌باشد. در دماهای بالاتر ۵۰ و ۶۰ درجه سانتیگراد فعالیت آنزیمی کاهش یافته و بترتیب ۵/۲۰ و ۴/۲۴ U/ml می‌باشد. کمترین فعالیت آسپاراژینازی در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد (U/ml ۱/۲۸) می‌باشد. استفاده از تست Shapiro نشان داد که چون $p > 0/05$ بود، داده‌ها نرمال بودند. سپس تست ANOVA Multi Variate یک طرفه در ۳ تکرار نشان داد که بعلت $p < 0/05$ ، پایداری و فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف اختلاف معناداری وجود دارد ($F= 151/1, p=0/01$).

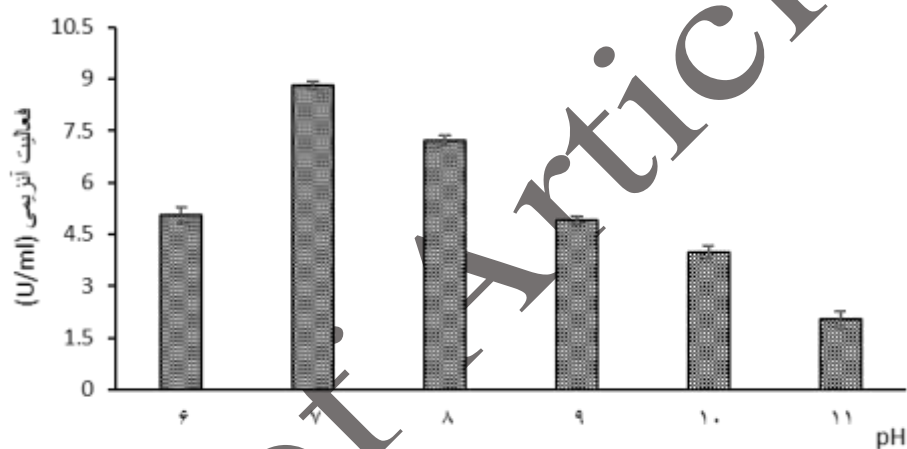


شکل ۸. تاثیر دما بر روی فعالیت آنزیمی

دما (درجه سانتیگراد)

تأثیر pH بر فعالیت آنزیمی

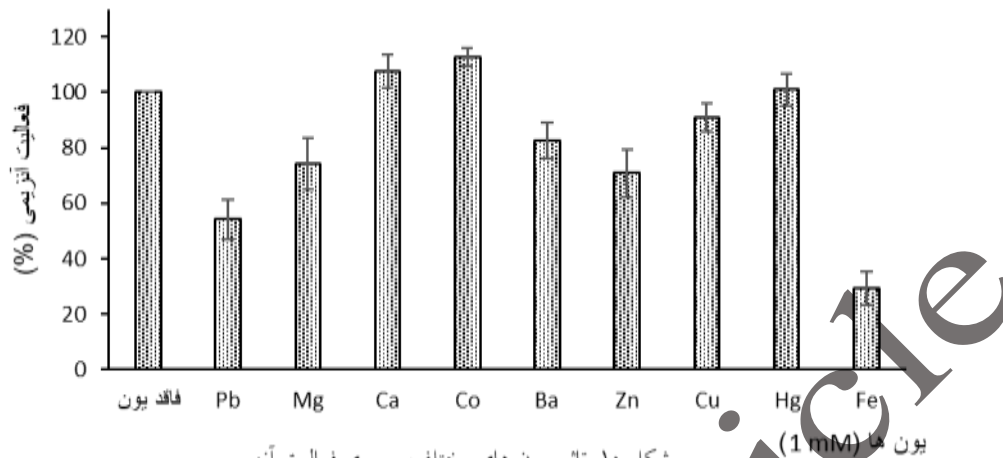
برای تعیین pH بهینه آسپاراژیناز، فعالیت آنزیم در محدوده pH ۶ تا ۱۱ اندازه‌گیری شد (شکل ۹). نتایج حاصل نشان داد که کمترین فعالیت آنزیمی در pH ۱۱ (۲/۰۲ U/ml) و بیشترین فعالیت آنزیم در pH ۷ (۸/۸۰ U/ml) دیده می‌شود. آنزیم در pH‌های قلیایی فعالیت پایینی دارد. استفاده از تست Shapiro نشان داد که چون $p > ۰/۰۵$ بود، داده‌ها نرمال بودند. سپس تست ANOVA Multi Variate یک طرفه در ۳ تکرار نشان داد که بعلا $p < ۰/۰۵$ ، بین pH‌های مختلف اختلاف معناداری وجود دارد (F= ۲۰۱/۲، p=۰).



شکل ۹. تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم

تأثیر یون‌ها روی فعالیت آنزیمی

نتایج بدست آمده از تأثیر یون‌های مختلف بر فعالیت آنزیمی نشان داد که فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در حضور یون‌های Ca^{2+} و Co^{2+} افزایش یافته و به ترتیب برابر با ۱۱۲٪ و ۱۰۷٪ می‌باشد. یون Fe^{3+} با تأثیر بر آنزیم موجب کاهش فعالیت آن تا ۲۹٪ شده و یون Hg^{2+} تأثیر چندانی بر روی فعالیت آنزیم نشان نداد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰. تاثیر یون‌های مختلف بر روی فعالیت آهنی

بحث

ال-آسپاراژیناز آنزیمی است که برای درمان انواع سرطان‌ها و کاهش غلظت آکریل آمید در صنایع غذایی بکار می‌رود. ال-آسپاراژیناز آنزیمی است که اسید آمینه‌ی آسپاراژین را به آسپارتیک‌اسید و آمونیاک هیدرولیز می‌کند. ال-آسپاراژیناز دارویی برای درمان لوکمیا و لنفوما بطور اساسی از باکتری‌هایی مانند *Escherichia coli* و *hrysanthem Erwina* تولید می‌شود و جستجو برای یافتن منابع جدید برای این آنزیم ادامه دارد (۲). اگرچه این آنزیم در مقایسه با سایر داروهای استفاده شده در شیمی درمانی سازگاری بسیار زیادی با بافت و سازوکارهای حیاتی بدن دارد ممکن است مشابه هر داروی دیگری آثار جانبی نامطلوبی نشان دهد، از این رو، پژوهشگران در تلاش برای دستیابی به آسپاراژیناز دارای توان درمانی زیاد و عوارض جانبی کم و تولید ارزان و مقرون بصره آن هستند. این مهم ما را نیز به تلاش برای پیدا کردن منبع باکتریایی تولیدکننده آنزیم ال-آسپاراژیناز با خصوصیت گلوتامینازی کمتر یا فاقد فعالیت گلوتامینازی بمنظور کاهش عوارض جانبی این آنزیم، برانگیخت (۱۲). امروزه بدلیل خاصیت ضد سرطانی آن، جستجو برای یافتن آنزیم ال-آسپاراژیناز مناسب مورد توجه بیشتری قرار گرفته است و پژوهشگران بسیاری تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از ریز موجودات مختلف را گزارش کرده‌اند. در این مطالعه در میان ۳۰ ایزوله باکتریایی جداسازی شده، ۱۷ ایزوله قادر به تشکیل منطقه صورتی در پلیت‌های حاوی محیط کشت M9 تغییر یافته بودند که نشان دهنده سویه‌های تولیدکننده ال-آسپاراژیناز بودند. ال-آسپاراژیناز باکتریایی، ال-آسپاراژین را به ال-آسپاراتات و آمونیاک هیدرولیز می‌کند که بخاطر فنل رد رنگ شاخص اسید-باز در pH های قلیایی به رنگ صورتی تبدیل می‌شود. پورانی و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۹) و باشا و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۵) نیز از این محیط جهت غربالگری اولیه میکروارگانیسم‌ها استفاده کردند. بر اساس ویژگی‌های مختلف مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، همولوژی نوکلئوتیدی ایزوله جداسازی شده در این مطالعه متعلق به یکی از گونه‌های جنس باسیلوس و با شباهت بیشتر بگونه باسیلوس سوبتیلیس بود. فعالیت گلوتامینازی مسئول سمیت جدی از جمله سمیت کبدی، اختلالات هموستاتیک و قند خون بالاست. از این رو، ال-آسپاراژیناز فاقد فعالیت گلوتامینازی بسیار مطلوب است و بطور قابل توجهی می‌تواند نتیجه درمان را بهبود ببخشد. وجود ال-آسپاراژیناز در بسیاری از گونه‌های میکروبی گزارش شده است. ابراهیم نژاد و همکاران مطالعه‌ای را در سال ۲۰۱۱ روی باکتری *Bacillus sp. BCCS 034* انجام دادند که نشان داد این باکتری بالاترین میزان ال-آسپاراژیناز را بصورت برون سلولی

تولید می‌کند (۹). پرادهان و همکاران نشان دادند که *Bacillus subtilis hswx88* آنزیم ال-آسپاراژینازی با فعالیت آنزیمی ۲۳/۸ U/ml تولید می‌کند (۲۰).

از آنجایی که آنزیم آسپاراژیناز II حاوی پپتید نشانه بوده و وارد فضای پری پلاسمی می‌شود، در این پژوهش محتویات پری پلاسمی و نیز محیط کشت فاقد باکتری (محلول رویی) جهت بررسی آسپاراژیناز استفاده شد. فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در محلول رویی سویه مورد آزمایش با روش نسلر ۸/۸۰ U/ml بود. فعالیت آسپاراژینازی باکتری *Nocardiosis alba NIOT-VKMA08* جدا شده از رسوبات دریایی U/ml ۱۸/۴۷ گزارش شده است (۱۷).

بر اساس نتایج بدست آمده، بالاترین فعالیت آسپاراژینازی در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد گزارش شد. آنزیم تا دمای ۶۰ درجه سانتیگراد نیمی از فعالیت (۴/۲۴ U/ml) خود را حفظ کرده است ولی با افزایش دما از فعالیت آنزیمی کاسته شده است. نتایج مشابهی در آسپاراژینازهای جدا شده از باکتری‌های *E. carotovora* (۱۳) و *Cladosporium sp.* (۱۵) بدست آمد است که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بالاترین میزان فعالیت آسپاراژینازی گزارش شده است.

در این مطالعه تاثیر pHهای مختلف بر روی فعالیت آسپاراژینازی نیز سنجیده شد. شکل ۶ نشان می‌دهد که آنزیم در pH ۷ بالاترین میزان فعالیت خود را دارد و رفته رفته با قلیایی شدن محیط از فعالیت آسپاراژینازی کاسته می‌شود. بنابراین آنزیم در pHهای ۷ و نزدیک خنثی فعالیت خوبی از خود نشان می‌دهد. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۵ بر روی باکتری *P. arosina SN004* انجام گرفت، این باکتری آسپاراژینازی تولید می‌کند که بالاترین میزان فعالیت را در pH ۵ دارد (۳). بالاترین فعالیت آسپاراژینازی در مطالعات منا و همکاران در pH ۸ گزارش شده است (۱۷). مقایسه تاثیر تغییرات (۴-۱۰) pH بر فعالیت آنزیم نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم در pH ۷ است، و بررسی تغییرات دما بر فعالیت آنزیم نشان داد که بیشترین فعالیت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد می‌باشد. همچنین مقدار فاکتورهای کینتیک V_{max} و K_m در این آنزیم مشخص گردید (۱). اروا و همکاران در سال ۲۰۱۷ باکتری مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز شناسایی کردند که بالاترین فعالیت آنزیمی را در pH ۸ دارد (۱۱). ال-آسپاراژیناز تولید شده از *S. marcescens* در تمام pHها (۵ تا ۹) قادر به فعالیت می‌باشد (۱۴).

یون‌های فلزی نقش مهمی در تحریک یا مهار فعالیت آنزیمی دارند. یون‌های فلزی همانند کوفاکتور برای آنزیم می‌باشند. یون‌های فلزی نقش حیاتی در حفظ ساختار جایگاه فعال آنزیم در دمای بالا و افزایش فعالیت آنزیمی ایفا می‌کنند. ترکیبی از یون‌های فلزی دو ظرفیتی ممکن است برای افزایش فعالیت آنزیم نیاز باشد، همچنین یون‌های فلزی آنزیم را در مقابل دناتوره شدن حفاظت می‌کنند (۱۰). تاثیر یون‌ها روی فعالیت آنزیمی در مطالعات مختلفی گزارش شده است. در مطالعه حاضر، بیشینه فعالیت آسپاراژینازی در حضور یون Ca^{2+} و Co^{2+} ، بترتیب ۱۱۲٪ و ۱۰۷٪ می‌باشد. یون Fe^{3+} با تاثیر بر آنزیم موجب کاهش فعالیت آن تا ۲۹٪ شده و یون Hg^{2+} تاثیر چندانی بر روی فعالیت آنزیم نشان نداد. بر اساس یافته‌های بدوئی و همکاران یون Hg^{2+} باعث کاهش فعالیت آسپاراژینازی در باکتری *Pseudomonas aeruginosa SN004* شده است (۳). طبق یافته‌های منا و همکاران L-آسپاراژیناز تولید شده توسط باکتری *Nocardiosis alba NIOT-VKMA08* در حضور یون‌های Fe^{3+} و K^+ فعالیتش افزایش یافته و بترتیب تا حدود ۲۳۱٪ و ۱۲۳٪ می‌رسد ولی در حضور یون Hg^{2+} فعالیتش کاهش یافته است (۱۷). یون Co^{2+} باعث افزایش فعالیت آسپاراژیناز تولید شده توسط *Pseudomonas JHS-71* می‌شود (۴).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش پس از غربالگری جدایه‌های باکتریایی، انتخاب و شناسایی سویه برتر، *Bacillus subtilis sbu-1* عنوان سویه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز معرفی شد و ویژگی‌های آنزیم تولید شده توسط آن مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده از جمله فعالیت در شرایط فیزیولوژی بدن از جمله دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و pH ۷ و همچنین عدم وجود خاصیت گلوتامینازی، می‌توان تا حدودی این اطمینان را داد که آنزیم تولید شده یک آنزیم با خواص درمانی خوب و اثرات جانبی کم بوده و می‌تواند بعنوان یک گزینه مهم و کاربردی در صنایع دارویی مورد استفاده قرار گیرد. باکتری جدا شده بلحاظ صنعتی نیز دارای مزایایی می‌باشد که امید است بتوان در صنعت بعنوان یک باکتری کاربردی استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از کلیه کسانی که در انجام این مطالعه یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

۱. آب‌خویی، لیلا، مینابی‌تهرانی، داریوش، کلاهدوز محمدی، مینا، افتخار، فرشته، کرجی، نیلوفر، میرفخار، فرزانه، وزیری تبار، نازنین. (۱۳۹۴). خالص‌سازی و تعیین خصوصیات کینتیک آنزیم آسپاراژیناز در باکتری *Serratia marcescens* مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۱۴۵-۱۵۳: (۲) ۲۸.
۲. نقابی، ندا، زاده حسینقلی، الهه، پاژنگ، محمد، چاپارزاده، نادر. (۱۳۹۹). جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده آسپاراژیناز از پساب فرآوری سیب زمینی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۴۰-۲۴۶: (۲) ۳۳.
3. Badoei-Dalfard A. 2015. Purification and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4(3), pp. 388-97.
4. Badoei-Dalfard A. 2016. L-asparaginase production in the *pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. *Molecular Biology Research Communications*. (1), pp. 1
5. Basha NS, Rekha R, Komala M, Ruby S. 2009. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme lasparaginase from marine actinomycetes by solidstate and submerged fermentation: Purification and characterisation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8(4).
6. Bhargavi M, Jayamadhuri R. 2016. Isolation and screening of marine bacteria producing anti-cancer enzyme L-asparaginase. *Am J Mar Sci*. 4(1), pp. 1-3.
7. Cachumba JJ, Antunes FA, Peres GF, Brumano LP, Santos JC, Silva SS. 2016. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *brazilian journal of microbiology*. 47, pp. 77-85.
8. Doriya K, Kumar DS. 2018. Optimization of solid substrate mixture and process parameters for the production of L-asparaginase and scale-up using tray bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 13, pp. 244-50.
9. Ebrahimezhad A, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. 2011. l-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. *Indian journal of microbiology*. 51(3), pp. 307-11.
10. Ekpenyong M, Asitok A, Antigha R, Ogarekpe N, Ekong U, Asuquo M, Essien J, Antai S. 2021. Bioprocess optimization of nutritional parameters for enhanced anti-leukemic L-asparaginase production by *Aspergillus candidus* UCCM 00117: a sequential statistical approach. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 27(2), pp. 1501-27.

11. Erva RR, Goswami AN, Suman P, Vedanabhatla R, Rajulapati SB. 2017. Optimization of L-asparaginase production from novel *Enterobacter* sp., by submerged fermentation using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 47(3), pp. 219-28.
12. Freire RK, Mendonça CM, Ferraro RB, Moguel IS, Tonso A, Lourenco FR, Santos JH, Sette LD, Pessoa Junior A. 2021. Glutaminase-free L-asparaginase production by *Leucosporidium muscorum* isolated from Antarctic marine-sediment. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 51(3), pp. 277-88.
13. Kamble VP, Rao RS, Borkar PS. 2006. Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of a dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters.
14. Khamna S, Yokota A, Lumyong S. 2009. L-asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *International Journal of Integrative Biology*. 6(1), pp. 22-6.
15. Kumar NM, Manonmani HK. 2013. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(4), pp. 577-87.
16. Lim H, Oh S, Yu S, Kim M. 2021. Isolation and Characterization of Probiotic *Bacillus subtilis* MKHJ 1-1 Possessing L-Asparaginase Activity. *Applied Sciences*. 11(10), pp. 4466.
17. Meena B, Anburajan L, Dheenana PS, Begum M, Vinithkumar NV, Dharani G, Kirubakaran R. 2015. Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. *Bioprocess and biosystems engineering*. 38(2), pp. 373-88.
18. Narayana KJ, Kumar KG, Vijayalakshmi M. 2008. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian Journal of Microbiology*. 48(3), pp. 331-6.
19. Poorani E, Saseetharan M, Dhevagi P. 2009. L-asparaginase production and molecular identification of marine *Streptomyces* sp. strain EPD 27. *Int. J. Integr. Biol.* 7(3), pp. 150-5.
20. Pradhan B, Dash SK, Sahoo S. 2013. Screening and characterization of extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha, India. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 3(12), pp. 936-41.

Preproof

Isolation, identification and studies on biochemical characterization of extracellular free-glutaminase asparaginase isolated from the soil

Nasrin Gholami

M.Sc, Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. ngholami94@yahoo.com

Gholam Hossein Ebrahimipour *

Associate Professor, Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. g-ebrahimi@sbu.ac.ir

Mohammad Yaghoubi Avini

Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. m_yaghoubi@sbu.ac.ir

* Correspondent author

Abstract

Introduction: L-asparaginase enzyme has various applications, particularly in medicine, pharmaceutical fields and food industries. The aim of this study was to optimization and characterization of free-glutaminase L-asparaginase activity.

Material and method: The primary isolation was performed on modified M9 medium. The colonies with pink color zone were selected for asparaginase and glutaminase activity study. Enzyme activity was determined using Nessler's method. The effect of some factors such as incubation time, temperature, pH and metal ions on asparaginase activity were assayed.

Results: In the present study, 17 isolates were obtained that shown asparaginase production. One of them was selected as superior because of high asparaginase activity without L-glutaminase activity. The 16SrRNA sequencing showed that the isolated strain was similar 99.9% to *Bacillus subtilis* sbu-1. The asparaginase enzyme produced by this has the highest enzyme activity (8.80 U/ml) at pH 7, 40 °C. Also Co^{2+} and Ca^{2+} increase the asparaginase activity to 112% and 107%, respectively.

Discussion and conclusion: The obtained results in this study can help to introduce a new free-glutaminase L-asparaginase with reduction in toxicity, sensitivity and side effects of drug consumption.

Keywords: L-asparaginase, glutaminase activity, *Bacillus subtilis*