



## جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی ایران مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز

رویا یزدانی<sup>۱\*</sup>، محسن مبینی دهکردی<sup>۲</sup>، علی اصغر رستگاری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی، <sup>۲</sup> استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، گروه ژنتیک، <sup>۳</sup> استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه بیوشیمی سلولی و مولکولی

### چکیده

**سابقه و هدف:** آنزیم ال-آسپاراژیناز می‌تواند به طور موثری در درمان بیماری لوسمی لنفوبلاستیک حاد و سلول‌های توموری و همچنین در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد. آنزیم آسپاراژیناز اولین آنزیم با فعالیت ضدتوموری است که به‌طور وسیع در انسان مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی ایران مولد آنزیم آسپاراژیناز و تعیین فعالیت آنزیم در این جدایه‌ها بود.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌های آب و خاک به طور تصادفی از شهرهای مختلف ایران جمع‌آوری گردید. به منظور غربال‌گری کیفی باکتری‌ها از نظر تولید آنزیم، سویه‌های مختلف روی محیط M9 آگار حاوی فنل رد به عنوان معرف pH کشت داده شدند. تولید آنزیم آسپاراژیناز در شرایط تخمیر غوطه‌ور انجام و میزان فعالیت آنزیم با استفاده از روش نسل‌ریزاسیون، اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** از بین ۶۱ سویه جداسازی شده، ۱۱ سویه مولد آنزیم بودند. از میان آن‌ها یک سویه بیشترین فعالیت آنزیم را نشان داد. این سویه ترموفیل بود و پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مشخص شد که به جنس *باسیلوس*‌ها تعلق دارد. فعالیت آنزیمی این سویه پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد ۱۶۱۳/۱۷۸ واحد بر میلی‌لیتر بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به کاربرد آسپاراژیناز در زمینه‌های مختلف، آنزیم تولید شده توسط این سویه پس از انجام مطالعات بیشتر، می‌تواند یک گزینه مناسب به منظور استفاده کاربردی باشد.

**واژگان کلیدی:** ال-آسپاراژیناز، فعالیت آنزیم، تخمیر غوطه‌ور، نسل‌ریزاسیون

دریافت مقاله: اسفند ۱۳۹۰ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ۱۳۹۱

### مقدمه

بیان و فعالیت آن موجب کنترل تعادل بین میزان اسیدهای آمینه بدن می‌شود (۲).

در سال ۱۹۵۳، کید (Kidd) مشاهده کرد که سرم خوکچه هندی از رشد تومور در موش‌ها جلوگیری می‌کند (۳) و جالب این که از میان پستانداران، تنها سرم خوکچه هندی دارای فعالیت قابل توجه ضدتوموری است (۲). پس از آن بروم (Broom) نشان داد که خاصیت ضدتوموری سرم خوکچه هندی به دلیل وجود آنزیم آسپاراژیناز است (۴). سپس در سال ۱۹۶۴، ماش‌بورن

آنزیم ال-آسپاراژیناز (ال-آسپاراژین آمیدوهیدرولاز، E.C.3.5.1.1) و واکنش هیدرولیز اسید آمینه آسپاراژین را به اسید آسپارتیک و آمونیاک کاتالیز می‌کند (۱). سوبسترا و محصول این آنزیم در متابولیسم تمامی موجودات نقش‌های مهمی را ایفا می‌کنند. از این‌رو این آنزیم نقش‌های فیزیولوژیک بسیاری داشته و کنترل

\*آدرس برای مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۳۲۳۰۷۸۵۸، پست الکترونیک: [r.yazdani2010@gmail.com](mailto:r.yazdani2010@gmail.com)

دنیای میکروب‌ها، سال پنجم، شماره اول و دوم تابستان ۱۳۹۱. جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی ایران مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز. رویا یزدانی و همکاران

می‌باشد. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی ایران مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز و بررسی مقدار تولید آنزیم توسط این باکتری‌ها در شرایط تخمیر غوطه‌ور بود.

### مواد و روش‌ها

**الف) جمع آوری نمونه:** نمونه‌های آب و خاک از نقاط مختلف ایران از جمله اصفهان، تبریز، کاشان، چالوس، شیراز، رفسنجان، مشهد، یزد، بوشهر و قشم به صورت تصادفی جمع آوری شد. برای جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های خاک، ۵ گرم از نمونه خاک در ۴۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات استریل حل شد و پس از تهیه رقت‌های متوالی، مقدار ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به محیط‌های کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) تلقیح و کشت داده شد. همچنین برای جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های آب، مستقیماً از آن‌ها رقت تهیه شد و مقدار ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به محیط TSA تلقیح و کشت داده شد. از آنجایی که نمونه‌ها از محیط جمع آوری شده بودند، بنابراین به منظور جداسازی میکروارگانیسم‌ها تمامی محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط TSA از نظر مشخصات ظاهری بررسی شد و با انجام کشت مجدد و رنگ آمیزی گرم خالص گردیدند.

**ب) غربالگری کیفی باکتری‌ها برای تولید آنزیم:** برای این منظور از محیط M9 آگار استفاده شد. این محیط دارای: ۲ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۳ گرم بر لیتر گلوکز، ۶ گرم بر لیتر ال-آسپاراژین، ۱ گرم بر لیتر سولفات منیزیم، ۱ گرم بر لیتر کلسیم دی کلرید، ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۰/۰۱۲٪ فنل رد (ساخت شرکت Acrose آمریکا) به عنوان شناساگر pH بود. پس از تهیه و استریل کردن محیط، یک کلنی از هر باکتری روی محیط قرار داده شد و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. کلنی‌هایی که هاله قرمز مایل به رنگ صورتی بر روی محیط ایجاد کردند به عنوان سویه‌های مولد آنزیم انتخاب شدند (۹).

(Mashburn) و ریستون (Wriston) مشاهده کردند که آسپاراژیناز خالص شده از عصاره سلولی/شیرشیا کلی مشابه با سرم خوکچه هندی، فعالیت ضدتوموری دارد (۵). ال-آسپاراژیناز در بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، بافت‌های حیوانی و در سرم بعضی از جوندگان و مهرداران وجود دارد ولی در انسان یافت نمی‌شود (۱ و ۶). از جمله باکتری‌های مولد این آنزیم می‌توان به/شیرشیا کلی (۷)،/اروینیا کاراتوورا (۸) و سویه‌های باسیلوس (۹) اشاره کرد. گزارش‌هایی در مورد تولید آنزیم توسط قارچ‌های رشته‌ای (۱۰)، مخمرهای ساکارومایسس سرویزیه (۱۱) و کاندیدا (۱۲) نیز وجود دارد. دو نوع آسپاراژیناز باکتریایی شناسایی شده است: نوع I که در سیتوپلاسم بیان می‌شود و هیدرولیز هر دو نوع اسیدآمینه ال-آسپاراژین و ال-گلوتامین را انجام می‌دهد و نوع II که در شرایط بی‌هوازی و در فضای پری پلاسمیک غشاهای باکتریایی بیان می‌شود. آنزیم‌های نوع II اختصاصیت بالایی برای هیدرولیز ال-آسپاراژین دارند و فعالیت مهارکنندگی تومور را نشان می‌دهند (۱). آنزیم آسپاراژیناز به طور عمده به عنوان یک عامل ضدسرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم در درمان بیماری‌هایی مانند لوسمی لنفوبلاستیک حاد، بیماری هوچکین، لوسمی میلویتیک حاد، لیمفوسارکوما و ملانوسارکوما به کار می‌رود (۱ و ۱۳). آنزیم آسپاراژیناز در صنایع غذایی نیز برای کاهش مقادیر آکریل آمید استفاده می‌شود. آکریل آمید یک ماده سرطان‌زا است که در هنگام سرخ کردن یا پختن مواد غذایی نشاسته دار مانند سیب زمینی تولید می‌گردد (۱۴). از آنجایی که بیماری سرطان در انسان رو به افزایش است و هزینه زیادی برای درمان در پی دارد، لذا استفاده از روش‌هایی برای تولید دارو که باعث هزینه و عوارض جانبی کم‌تر برای بیمار شود ضروری است. بنابراین استفاده از فرآیندهای میکروبی و یافتن یک میکروارگانیسم مناسب برای تولید آنزیم آسپاراژیناز به علت مقرون به صرفه بودن و تولید مقادیر زیادی از آنزیم در زمان اندک، اهمیت دارد. همچنین زمینه برای انجام دست ورزی‌های ژنتیکی روی سویه‌های میکروبی جهت تولید حداکثر آنزیم امکان پذیر

دنیای میکروب‌ها، سال پنجم، شماره اول و دوم تابستان ۱۳۹۱. جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی ایران مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز. رویا یزدانی و همکاران

(۱۶). برای این منظور، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از نمونه مورد نظر برداشته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی (محلول آنزیمی) به ۰/۹ میلی‌لیتر ال-آسپاراژین ۰/۰۱ مولار و ۱ میلی‌لیتر بافر تریس- HCl ۰/۰۵ مولار با pH ۸/۶ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. پس از این زمان، واکنش با اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۱/۵ مولار متوقف شد. سپس به منظور حذف رسوبات، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی برای مرحله بعد استفاده شد. آمونیاک آزاد شده در مایع رویی با اضافه کردن ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف نسلر (مرک، آلمان) به لوله‌های حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت و ۱/۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر به روش رنگ سنجی شناسایی گردید. لوله‌ها پس از ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در برابر شاهد دارای ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر خوانده شد. فعالیت آنزیمی سویه‌های ترموفیل از نظر تولید آنزیم در دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و سویه‌های مزوفیل فقط در دمای ۳۵ درجه اندازه‌گیری گردید. هر واحد فعالیت آنزیم آسپاراژیناز به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که یک میکرومول آمونیاک را در مدت یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آزاد کند.

ه) منحنی استاندارد: محلول ۶ میلی‌مولار آمونیوم سولفات

ج) شناسایی باکتری‌های ترموفیل از نظر رشد و تولید آنزیم: به منظور شناسایی باکتری‌های ترموفیل، سویه‌های مولد آنزیم، هم‌زمان روی محیط‌های TSA و M9 کشت داده شده و در دماهای ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ درجه گرماگذاری شدند. سویه‌ها از نظر رشد روی محیط TSA و ایجاد هاله قرمز مایل به صورتی روی محیط M9 در دماهای یاد شده مورد بررسی قرار گرفتند.

د) تولید آنزیم و سنجش فعالیت آنزیمی: به منظور تهیه مایه تلقیح، ابتدا یک لوپ از هر باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر محیط MMY تلقیح شد. این محیط با pH ۷ حاوی ۰/۵ گرم بر لیتر سولفات منیزیم، ۰/۰۱ گرم بر لیتر سولفات آهن، ۰/۵ گرم بر لیتر پتاسیم کلرید، ۱ گرم بر لیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۱/۵ گرم بر لیتر ال-آسپاراژین و ۴ گرم بر لیتر گلوکز می‌باشد (۱۵). سپس محیط‌ها در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از این مدت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب توده زیستی نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. با رسیدن به جذب ۰/۵، مقدار ۱۰٪ (۵ میلی‌لیتر) از مایه تلقیح به محیط تولید (۵۰ میلی‌لیتر محیط MMY) اضافه و در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای مورد نظر گرماگذاری گردید.

فعالیت آنزیم طبق روش ریستون (Wriston) (۱۹۷۰) و بر اساس واکنش نسلریزاسیون و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. این روش بر اساس مقدار آمونیاک آزاد شده از ال-آسپاراژین در هنگام فعالیت آنزیم است

جدول ۱: مقادیر مورد نیاز برای منحنی استاندارد.

محلول (میلی‌لیتر)	بلانک	استاندارد ۱	استاندارد ۲	استاندارد ۳	استاندارد ۴	استاندارد ۵	استاندارد ۶	استاندارد ۷	استاندارد ۸	استاندارد ۹
بافر تریس-HCl	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۰/۰۵ مولار										
سولفات آمونیوم	۰	۰/۰۵	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲۵	۰/۳	۰/۳۵	۰/۴	۰/۴۵
۶ میلی‌مولار										
آب مقطر	۱	۰/۹۵	۰/۹	۰/۸۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۷	۰/۶۵	۰/۶	۰/۵۵

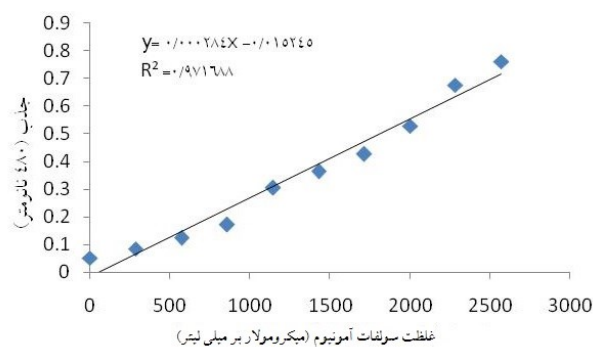
### نتایج

الف) جداسازی و خالص سازی باکتری‌ها: پس از انجام مراحل جداسازی و خالص سازی، ۶۱ باکتری جداسازی شد که ۱۷ باکتری از نمونه آب و ۴۴ باکتری از نمونه خاک بدست آمد.

ب) غربالگری کیفی باکتری‌ها جهت تولید آنزیم: از بین سویه‌های جداسازی شده، ۱۱ سویه هاله صورتی تا قرمز رنگ بر روی محیط ایجاد کردند و به عنوان سویه مولد آنزیم در نظر گرفته شدند.

ج) شناسایی باکتری‌های ترموفیل از نظر رشد و تولید آنزیم: بررسی محیط‌های TSA نشان داد که سویه‌های L<sub>۸</sub>، L<sub>۹</sub>، L<sub>۱۲</sub>، L<sub>۱۴</sub>، L<sub>۲۴</sub>، L<sub>۶۱</sub> و L<sub>۶۵</sub> در دمای ۴۵ درجه و سویه‌های L<sub>۸</sub>، L<sub>۹</sub>، L<sub>۱۲</sub>، L<sub>۱۴</sub> و L<sub>۲۴</sub> در دو دمای ۵۰ و ۵۵ درجه، قادر به رشد بر روی این محیط بودند. همچنین با بررسی محیط‌های M9 مشاهده شد که سویه‌های L<sub>۸</sub>، L<sub>۹</sub>، L<sub>۱۲</sub> و L<sub>۲۴</sub> در هر سه دمای ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه باعث تشکیل هاله و در نتیجه تولید آنزیم بر روی این محیط شدند. در دمای ۶۰ درجه، هیچ یک از سویه‌ها قادر به رشد و نیز تولید آنزیم نبودند. جدول ۲ قطر هاله تشکیل شده توسط سویه‌ها روی محیط M9 را بر حسب میلی‌متر نشان می‌دهد.

د) شناسایی سویه مولد حداکثر آنزیم: تولید آنزیم در شرایط تخمیر غوطه ور انجام شد. از بین سویه‌های مولد آنزیم، یک سویه (L<sub>۱۲</sub>) بیشترین تولید آنزیم را نشان داد. این باکتری ترموفیل بود و از خاک شهر یزد جداسازی گردید. این سویه حداکثر تولید آنزیم را پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای



شکل ۱: منحنی استاندارد سولفات آمونیوم.

تهیه شد و حجم‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵، ۰/۴ و ۰/۴۵ میلی‌لیتر از این محلول مطابق با جدول ۱ به لوله‌های آزمایش اضافه گردید. سپس مراحل سنجش مطابق با آنچه که در بخش سنجش فعالیت آنزیم اشاره گردید انجام شد. در نهایت نمودار جذب نمونه‌های استاندارد بر حسب غلظت میکرومولار آمونیوم سولفات با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید و معادله خط بدست آمد (شکل ۱). سپس جذب نوری بدست آمده از سویه‌های مختلف در معادله خط قرار داده شد و میزان آمونیاک تولید شده توسط این سویه‌ها بر حسب میکرومول محاسبه گردید. در نهایت برای تعیین فعالیت آنزیم از فرمول زیر استفاده شد. در این فرمول ۲/۱، حجم مورد استفاده در مرحله اول (میلی‌لیتر)، ۰/۵ حجمی از مرحله اول است (میلی‌لیتر) که در مرحله دوم استفاده شده، ۳۰ زمان آزمایش (دقیقه) و ۰/۱ مقدار آنزیم مورد استفاده (میلی‌لیتر) است.

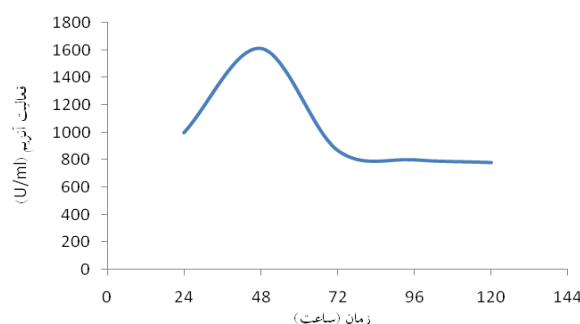
$$\text{فعالیت آنزیم} = \frac{(\mu\text{m of NH}_3) \cdot (2/1)}{(0/5) \cdot (30) \cdot (0/1)}$$

جدول ۲: قطر هاله تشکیل شده توسط سویه‌ها روی محیط M9 بر حسب میلی‌متر.

دمای/سویه	L <sub>8</sub>	L <sub>9</sub>	L <sub>12</sub>	L <sub>14</sub>	L <sub>19</sub>	L <sub>20</sub>	L <sub>21</sub>	L <sub>24</sub>	L <sub>27</sub>	L <sub>61</sub>	L <sub>65</sub>
۴۵	۱۹	۱۷	۳۶	۰	۰	۰	۰	۲۵	۰	۰	۰
۵۰	۱۱	۸	۲۱	۰	۰	۰	۰	۱۵	۰	۰	۰
۵۵	۸	۵	۹	۰	۰	۰	۰	۷	۰	۰	۰
۶۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

روش نسلیزاسیون و با استفاده از معرف نسلر و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید. آنزیم آسپاراژیناز با اثر بر روی سوبسترای خود (آسپاراژین)، اسید آسپارتیک و آمونیاک تولید می‌کند. معرف نسلر با یون‌های آمونیوم آزاد شده در محیط، واکنش داده و باعث زرد شدن رنگ محلول می‌شود. سپس جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۰ نانومتر خوانده شد. هر چند که روش‌های دیگری مثل روش HPLC ایزوکراتیک فلورسنس (۲۱)، روش مکانیزه (۲۲)، سنجش فلورومتريک (۲۳) و روش آنزیمی با استفاده از سنسورهای حساس به گاز آمونیاک (۲۴) وجود دارد، اما یکی از متداول‌ترین روش‌ها استفاده از واکنش نسلیزاسیون و اسپکتروفتومتري می‌باشد.

از بین سویه‌های مولد آنزیم، یک سویه (L12) حداکثر تولید آنزیم را نشان داد. این سویه ترموفیل از خاک شهر یزد جداسازی شده بود. این باکتری بیشترین تولید خود را (۱۶۱۳/۱۷۸ واحد بر میلی‌لیتر) پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد. ای-محرم (E-Moharam) و همکاران (۲۰۱۰) سویه باسیلوس R36 را از نمونه خاک جدا کردند که بیشترین تولید این سویه ۲۰/۱۵ واحد بر میلی‌لیتر در شرایط تخمیر غوطه‌ور و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری بود (۲۵). پراکاشام (Prakasham) و همکاران (۲۰۱۰) تولید آنزیم را توسط باسیلوس سیرکولانس جدا شده از خاک ساحل دریا بررسی کردند. بیشترین تولید آنزیم توسط این سویه با استفاده از روش تخمیر غوطه‌ور و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در شرایط بهینه، ۸۵ واحد بر میلی‌لیتر بود (۲۶). موریسی (Moorthy) و همکاران (۲۰۱۰) سویه‌ای را از نمونه خاک جدا کردند که با انجام رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی مشخص شد که به جنس باسیلوس تعلق دارد. مقدار تولید این آنزیم در شرایط تخمیر غوطه‌ور، ۰/۱ واحد بر میلی‌لیتر بود (۹). کوشواها (Kushwaha) و همکاران (۲۰۱۲) باسیلوس سوبتیلیس را از نمونه خاک جداسازی کردند. تولید آنزیم در شرایط تخمیر غوطه‌ور انجام شد و مقدار تولید آنزیم توسط این سویه ۰/۵۰۵ واحد بر میلی‌لیتر به دست آمد (۲۰). تفاوت در مقدار تولید



شکل ۲: نمودار حداکثر فعالیت آنزیمی باکتری L12 در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد.

۴۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد. مقدار تولید آنزیم توسط این سویه (U/ml) ۱۶۱۳/۱۷۸ بود. شکل ۲ نمودار فعالیت آنزیم بر حسب زمان توسط این سویه را نشان می‌دهد. سویه L12 روی محیط TSA کلنی‌های بزرگ، مسطح، بی‌قاعده، با حاشیه چین خورده، کدر و گرم رنگ را تشکیل داد. همچنین هاله قرمز مایل به صورتی روی محیط M9 نیز نشان دهنده تولید آنزیم توسط این سویه بود. در نهایت با انجام رنگ آمیزی گرم، اسپور و تست‌های بیوشیمیایی مشخص شد که این باکتری باسیل گرم مثبت، تولید کننده کاتالاز، اکسیداز، سترات و تولید کننده اسپور و مصرف کننده قندهای مانوز، سالیسین، مانیتول، سوربیتول، سوکروز، لاکتوز، ریبوز، گلوکز، سلوبیوز و ترهالوز است و این سویه به جنس باسیلوس تعلق دارد.

## بحث

در این پژوهش جهت غربالگری کیفی باکتری‌ها از نظر تولید آنزیم، سویه‌ها بر روی محیط M9 حاوی فنل رد کشت داده شدند. فنل رد در pH اسیدی زرد رنگ و در pH قلیایی قرمز رنگ می‌شود. اگر باکتری مولد آنزیم باشد با تبدیل آسپاراژین به آمونیاک باعث قلیایی شدن pH محیط و در نتیجه باعث قرمز شدن رنگ آن می‌شود. پورانی (Poorani) و همکاران (۱۷)، باشا (Basha) و همکاران (۱۸)، دارماراج (Dharmaraj) (۱۹) و کوشواها (Kushwaha) و همکاران (۲۰) نیز از محیط M9 جهت غربالگری اولیه میکروارگانیسم‌ها استفاده کردند. تولید آنزیم در شرایط تخمیر غوطه‌ور و با استفاده از محیط MMY صورت گرفت. مقدار آنزیم تولیدی در این پژوهش بر اساس

بودن و تولید ۱۶۱۳/۱۷۸ واحد بر میلی‌لیتر آنزیم در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌تواند یک گزینه مناسب برای کاربرد در صنایع غذایی باشد. امید است که در آینده بتوان با روش‌های بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک تولید آنزیم توسط این سویه را به مقادیر قابل توجهی افزایش داد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین و کارکنان دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به دلیل حمایت‌های اجرایی و همکاری در انجام این پژوهش کمال امتنان را دارند.

آنزیم در این گزارش‌ها می‌تواند مربوط به عوامل مختلفی همچون نوع سویه مولد آنزیم، نوع محیط تولید آنزیم، مقدار آنزیم مورد سنجش، زمان گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه، مقدار معرف نسلر، منحنی استاندارد و غیره باشد. از آنجایی که اعضای جنس *باسیلوس* به عنوان سویه‌های مهم صنعتی به شمار می‌روند، بنابراین یافتن سویه‌های مناسب *باسیلوس* با حداکثر تولید آنزیم می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد.

### نتیجه گیری

سویه *باسیلوس* جداسازی شده در این تحقیق به دلیل ترموفیل

## References

1. Ahmad N, Pandit NP, Maheshwari SK. L-asparaginase gene—a therapeutic approach towards drugs for cancer cell. *Int J Biosci.* 2012; 2(4): 1-11.
2. Ghane M, Bambaie B, Ghane M. Screening of *Escherichia coli* strains for asparaginase II production. *J Biol Sci.* 2009; 3(4): 49-56. [In Persian]
3. Kidd JG. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. *J Exp Med.* 1953; 98(6): 565-582.
4. Broom JD. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its anti lymphoma effects. *Nature.* 1961; 191: 1114-1115.
5. Mashburn LT, Wriston JC Jr. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia*. *Arch Biochem Biophys.* 1964; 105: 450-452.
6. El-Bessoumy AA, Sarhan M, Mansour J. Production, isolation and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa 50071* using solid-state fermentation. *J Biochem Mol Bio.* 2004; 37(4): 387-393.
7. Ehrman M, Cedar H, Schwartz J. L-asparaginase II of *Escherichia coli*: studies on the enzymatic mechanism of action. *J Biol Chem.* 1971; 246(1): 88-94.
8. Deokar VD, Vetral MD, Rodrigues L. Production of intracellular L-asparaginase from *Erwinia carotovora* and its statistical optimization using response surface methodology(RSM). *Int J Chem Sci Appl.* 2010; 1(1): 25-36.
9. Moorthy V, Ramalingam A, Sumantha A, Shankaranaya RT. Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus sp.* *Afr J Microbiol Res.* 2010; 4(18): 1862-1867.
10. Sarquis MIDM, Oliveira EMM, Santos AS, Costa GLD. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(5): 489-492.
11. Pauling KD, Hann JE, Jones GE. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of a mutation that affects expression in rapidly growing cells. *J Gen Microbiol.* 1980; 119(2): 539-542.
12. Kil JO, Kim GN, Park I. Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995; 59(4): 749-750.
13. Balasubramanian K, Ambikapathy V, Panneersevam A. Production, isolation and purification



- of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* using submerged fermentation. *Int J Adv Pharm Res.* 2012; 3(2): 778-783.
14. Ciesarova Z, Kiss E, Boegl P. Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. *J Food Nutr Res.* 2006; 45(4): 141-146.
  15. Geckil H, Gencer S, Uckun M. Vitreoscilla hemoglobin expressing *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of L-asparaginase, an Enzyme used in cancer therapy. *Enzyme Microb Technol.* 2004; 35(2-3): 182-189.
  16. Wriston JC Jr. Asparaginase. *Method Enzymol.* 1970; 17: 732-742.
  17. Poorani E, Saseetharan MK, Dhevagi P. Production and molecular identification of marine *Streptomyces sp strain EPD27*. *Int J Integ Biol* 2009; 7(3): 150-155.
  18. Basha NS, Rekha R, Komala M, Ruby S. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: purification and characterization. *Tropical J Pharm Res.* 2009; 8(4): 353-360.
  19. Dharmaraj S. Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei MTCC 10469*, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. *Iran J Biotechnol.* 2011; 9(2): 102-108.
  20. Kushwaha A, Ahmed F, Singh P. Production and purification of L-asparaginase from bacterial source. *Int J Universal Pharm Life Sci.* 2012; 2(2): 39-62.
  21. Nath CE, Dallapozza L, Eslick AE, Misra A, Carr D, Earl JW. An isocratic fluorescence HPLC assay for the monitoring of L-asparaginase activity and L-asparagine depletion in children receiving *E. coli*-asparaginase for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Bio-med Chromatogr.* 2009; 23(2): 152-159.
  22. Toncic PF, Tibbetts DL. An automated assay for the determination of asparaginase activity. *J Biol Stand.* 1982; 10(4): 297-301.
  23. Ylikangas P, Mononen LA. Fluorometric assay for L-Asparaginase activity and monitoring of L-Asparaginase therapy. *Anal Biochem.* 2000; 280(1): 42-45.
  24. Tagami S, Matsuda K. An enzymatic method for the kinetic measurement of L-asparaginase activity and L-asparagine with an ammonia gas-sensing electrode. *Chem Pharm Bull.* 1990; 38(1): 153-155.
  25. E-Moharam M, Gamal-Eldeen AM, El-sayed ST. Production, immobilization and Anti-tumour activity of L-asparaginase of *Bacillus sp R36*. *J American Sci.* 2010; 6(8): 157-165.
  26. Prakasham RS, Hymavathi M, Subba Rao Ch. Arepalli SK, Venkateswara Rao J, Kavin Kennedy P, Nasaruddin K, Vijayakumar JB, Sarma PN. Evaluation of antineoplastic activity of extracellular Asparaginase produced by isolated *Bacillus circulans*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010; 160(1): 72-80.
  27. Wakayama M, Onishi Y, Yano S, Thongsanit J, Boontim N, Rattanakit-Chandet N, Sanpa S, Pathom-aree W, Matsumiya Y, Tachiki T, Kubo M. Characterization of the type II L-asparaginase from *Bacillus subtilis* and its application to the process of food production. The 4<sup>th</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand , August 29<sup>th</sup> - 31<sup>st</sup>, 2011.



## Isolation and identification of native Iranian L-asparaginase producing bacteria

**Roya Yazdani<sup>1</sup>, Mohsen Mobini-Dehkordi<sup>2</sup>, Ali Asghar Rastegari<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>M.Sc., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professors, Department of Genetics, Faculty of Sciences, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Molecular and Biochemistry, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran.

### Abstract

**Background and Objectives:** L-asparaginase can be effectively used for the treatment of acute lymphoblastic leukemia and tumor cells as well as in food industries. The L-asparaginase is the first enzyme with antitumor activity that is intensively studied in different human cancers. Purpose of this study was isolation and identification of Iranian native L-asparaginase producing bacteria and determination of their enzyme activities.

**Material and Methods:** The soil and water samples were collected from various cities of Iran. For screening of asparaginase producing bacteria, species were cultivated on M9 agar media containing phenol red as pH indicator. Enzyme production and assay were performed by submerged fermentation and Nesslerization method respectively.

**Results:** 11 out of 61 isolated species could produce the enzyme and one of them showed maximum enzyme productivity. This thermophilic species was belonged to *Bacillus* genus based on biochemical test results. This species could produce 1613.178 (U/ml) enzymes after 48 hours incubation in 45°C.

**Conclusion:** Because of application of L-asparaginase in various fields, the enzyme produced by this species can be suitable for utilization after more investigations.

**Keywords:** L-asparaginase, Enzyme activity, Submerged fermentation, Nesslerization

---

Correspondance to: Roya Yazdani

Tel: +989132307858

E-mail: [r.yazdani2010@gmail.com](mailto:r.yazdani2010@gmail.com)

Journal of Microbial World 2012, 5(1&2): 39-46.