

تولید و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم ال-آسپاراژیناز توسط مخمر بومی جداشده از خاک‌های ایران

هدی نوری^۱ (M.Sc.)، حمید مقیمی^۱ (Ph.D.)، علی خالقیان^۲ (Ph.D.)

۱- بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۷

• نویسنده مسئول، تلفن 09122737075 khaleghian@semums.ac.ir

چکیده

هدف: استفاده از آنزیم ال-آسپاراژیناز به عنوان داروی شیمی‌درمانی، یکی از راه‌کارهای مؤثر در درمان لوکمی لنفوبلاستی است. از آن‌جا که ال-آسپاراژیناز باکتریایی، که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرد باعث ایجاد عوارض جانبی ناشی از واکنش‌های افزایش حساسیت می‌شود، جستجو برای یافتن منابع جدید، بسیار مورد توجه است. در این مطالعه، ویژگی‌های ال-آسپاراژیناز تولید شده توسط مخمرهای بومی جداشده از خاک‌های کشور مورد بررسی قرار گرفته است. مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۱۳۰ جدایه مخمری مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت جدایه AG90 با تولید ۰/۹۴ IU/ml طی ۵ روز به عنوان بهترین جدایه انتخاب شد. یافته‌ها: شناسایی مولکولی جدایه AG90 نشان داد که این جدایه با ۹۹٪ به *Sarocladium sp.* شباهت دارد و به عنوان AG90 *Sarocladium sp.* در نظر گرفته شد. بررسی مایع تخمیر سوپه منتخب نشان داد که ۸۶٪ آنزیم به صورت خارج سلولی تولید می‌شود. مقادیر Km و Vmax آنزیم تولید شده برای سوبسترای ال-آسپاراژیناز به ترتیب ۹/۷۴ میلی‌مولار و ۱۹/۱۹ میکرومول در دقیقه محاسبه گردید. نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌تواند به معرفی آنزیم جدید با منشأ یوکاریوتی در جهت کاهش سمیت، حساسیت‌زایی و عوارض جانبی ناشی از مصرف دارو کمک کند. واژه‌های کلیدی: آسپاراژیناز، مخمر، سرطان خون، ایران

مقدمه

از منابع گوناگون مانند سلول‌های گیاهی و حیوانی، قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها جداسازی شده است [۱، ۳، ۴]. آنزیم ال-آسپاراژیناز II یک عامل شیمی‌درمانی مهم می‌باشد که برای درمان نوعی از اختلالات لنفوپرولیفراتیو و لنفوما، به ویژه لوکمی لنفوبلاستی حاد یا ALL (Acute lymphoblastic leukemia) به کار برده می‌شود. این آنزیم بخش اصلی ترکیب روش‌های شیمی‌درمانی است که در درمان ALL اطفال به مدت تقریباً ۳۰ سال مورد استفاده قرار گرفته است [۵، ۶]. همچنین این آنزیم در جدیدترین رژیم‌های درمانی چندعاملی برای درمان ALL بالغین نیز مورد استفاده قرار گرفته است [۷-۹]. آنزیم ال-آسپاراژیناز به عنوان یک دارو، اثربخشی خود را در درمان و مراحل بعدی راه‌کارهای مختلف شیمی‌درمانی اثبات کرده است. بزرگ‌ترین محدودیت استفاده از این ترکیب حساسیت شدید بالینی در مقدار اثربخشی آن است، که در ۳-۷۸٪ بیماران تحت درمان ظاهر می‌شود [۱۰-۱۲].

با توجه به شیوع روزافزون انواع سرطان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تهدیدکننده سلامت انسان، دستیابی به روش‌های مؤثرتر در درمان سرطان به ویژه انتخاب ترکیبات دارویی با عوارض جانبی کم‌تر، بیش از گذشته مورد توجه محققین قرار گرفته است [۱، ۲]. آنزیم ال-آسپاراژیناز به صورت اختصاصی اسیدآمینو ال-آسپاراژین را به ال-آسپاراتات و آمونیاک تبدیل کرده و نقش مهمی را در متابولیسم همه ارگانسیم‌های زنده بازی می‌کند. دو نوع ترکیب ال-آسپاراژیناز معرفی شده است: آنزیم ال-آسپاراژیناز I، که یک آنزیم داخل سلولی، و آنزیم ال-آسپاراژیناز II، که به صورت آنزیم خارج سلولی می‌باشد. این دو آنزیم از لحاظ بیوشیمیایی و ساختار ژنتیکی متفاوت هستند. ال-آسپاراژیناز II به صورت گسترده در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی وجود دارد و بیش از پنج دهه مورد مطالعه فراوان قرار گرفته است. این آنزیم

مواد و روش‌ها

جداسازی مخمرها. سوبیه‌های مخمری از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران از جمله کرمانشاه و لرستان (Kermanshah, Iran 34° 18' 46.0" N 46° 11' 21.4" E and Lorestan, Iran 33° 25' 44.7" N 48° 10' 35.4" E) شدند. برای به دست آوردن تک کلونی خالص مخمری، کشت بر روی محیط کشت YPG شامل: عصاره مخمر 5 g/l، پیتون 1.0 g/l، گلوکز 2.0 g/l، آگار 2.0 g/l، کلرامفنیکل 100 mg/l، رزبنگال 100 mg/l در آب مقطر در دمای 28 °C انجام شد. در نهایت کلنی‌های خالص در دمای 4 °C ذخیره سازی شدند.

غریبال‌سازی جدایه‌های مخمری دارای فعالیت آنزیمی. برای غریبال‌گیری جدایه‌های مخمری از محیط تغییر یافته‌ی Czapek agar (10-L-asparagine/l، گلوکز 5 g/l، KH_2PO_4 5 g/l، FeSO_4 0.1 g/l، MgSO_4 0.52 g/l، KCl 0.52 g/l، آگار 2.0 g/l و 0.75 g/l فنل رد استفاده شد. در این محیط آسپاراژین به عنوان تنها منبع نیتروژن و فنل رد به منظور بررسی تغییر pH محیط بر اثر فعالیت آنزیم و تولید آمونیوم مورد استفاده قرار گرفت [14]. pH محیط کشت بر روی 6/8 تنظیم شد و محیط‌ها پس از کشت مخمر به مدت 3 روز در دمای 28 °C گرماگذاری شدند. بررسی روزانه محیط‌ها جهت تایید وجود هاله‌ی صورتی رنگ در اطراف کلنی مخمر انجام شد. در نهایت جدایه‌های مثبت در دمای 4 °C در محیط YPG برای بررسی‌های بعدی ذخیره شدند.

بررسی مقدار آمونیاک در نتیجه فعالیت آسپاراژیناز-تست **Nesslerization**. میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز بر حسب میزان هیدرولیز ال-آسپاراژین در محیط سنجیده می‌شود؛ و میزان هیدرولیز ال-آسپاراژین نیز از طریق اندازه‌گیری مقدار آمونیاک آزاد شده در واکنش مشخص می‌گردد. به این ترتیب مقدار آمونیاک آزاد شده توسط معرف نسلر تعیین مقدار می‌شود [15]. در این سنجش، از غلظت‌های مختلف محلول سولفات آمونیوم به عنوان استاندارد استفاده شد. برای این منظور ابتدا جدایه‌های مثبت تست غریبالگری در داخل محیط Czapek تلقیح و در دمای 28 °C به مدت 24 ساعت روی شیکر با دور rpm 120 گرماگذاری شدند. سپس از این محیط به عنوان پیش کشت استفاده شد. تا محیط‌های Czapek تغییر یافته (که حاوی L-asparagine به عنوان تنها منبع نیتروژن هستند) به نسبت 5٪ تلقیح شوند [15]. نهایتاً محیط‌های تلقیح شده به مدت 5 روز در دمای 28 °C روی شیکر با دور rpm 120 گرماگذاری شدند. بعد از گذشت 5 روز از کشت، 1/5 میلی‌لیتر از هر نمونه به داخل میکروتیوب منتقل شد و در دور rpm 10000 به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. در ادامه 100 میکرولیتر از محلول رویی به میکروتیوب‌های جدید منتقل شد و به هر کدام 100

اگر چه ال-آسپاراژیناز در گونه‌های مختلف گیاهی و حیوانی یافت شده است، اما به دلیل روش سخت استخراج این آنزیم، سایر منابع تولید آنزیم، نظیر میکروارگانیسم‌ها نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند [6]. میکروارگانیسم‌ها از جمله منابع مناسب و ارزان قیمت برای تولید این آنزیم هستند. سهولت کشت میکروب‌ها به تولید فراوان این آنزیم کمک می‌کند. دامنه وسیعی از میکروب‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، اکتینومیست‌ها و جلبک‌ها به عنوان تولیدکننده این آنزیم شناخته شده‌اند، اما خصوصیات آنزیمی از ارگانیسمی به ارگانیسم دیگر تغییر می‌کند [5،4]. در حال حاضر برای تولید مقادیر بالای این آنزیم در صنعت فقط از دو گونه باکتری شامل *E. Coli* و *Erwinia caratovora* [2،3،5،7] استفاده می‌شود.

در مان با استفاده از پروتئین‌های دارویی در انسان محدودیت‌هایی را به همراه دارد، زیرا برخی از انواع پروتئین‌های دارویی منجر به واکنش‌های ایمنی و افزایش حساسیت در بیمار می‌شود. واکنش‌های حساسیت شدید شامل ادم، ایجاد لخته، شوک آنافیلاکسی، راش‌های پوستی و غیره نسبت به ال-آسپاراژیناز *E. coli* و *E. caratovora* در بیش‌تر از 60٪ کودکان درمان شده با این دارو گزارش شده است [13]. بخشی از این واکنش‌های افزایش حساسیت در نتیجه تولید آنتی‌بادی بر علیه آنزیم ال-آسپاراژیناز توسط سیستم ایمنی بدن بیمار است که در نتیجه بالا رفتن غلظت آنزیم در خون اتفاق می‌افتد. این مشکلات باعث شده تولید این آنزیم در برخی از کشورها متوقف شود. با توجه به نیاز درمانی به این آنزیم و واکنش‌های حساسیتی آنزیم‌های باکتریایی، لزوم پیدا کردن منابع آنزیمی جدید، جهت به حداقل رسانیدن اثرات جانبی دارو کاملاً احساس می‌شود [5].

در میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی از جمله قارچ‌ها، انتظار می‌رود که هومولوژی و نزدیکی بیش‌تری بین آسپاراژیناز تولید شده توسط آن‌ها با سلول‌های انسانی وجود داشته باشد و به دنبال آن واکنش‌های حساسیتی کم‌تری را نسبت به انواع باکتریایی در بیماران مشاهده شود [5]. بر این اساس Souza و همکاران در سال 2017 آنزیم آسپاراژیناز از کپک *Aspergillus* معرفی کردند که قابلیت تولید در بستر مایع و جامد را داشته و فعالیت بالایی را در حضور سوسترای آسپاراژین نشان داد [4]. بر این اساس در این پژوهش، برای اولین بار توان تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز در مخمرهای بومی ایران به منظور پیدا کردن آنزیم با فعالیت بالا و قابلیت استفاده در برابر سلول‌های سرطانی مورد توجه قرار گرفته است.

شده در بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار (pH=۸) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ °C تیمار شد تا پروتئین‌های متصل به غشا جدا شوند. محلول شستشوی جدا شده در مرحله ۱ و عصاره‌ی حاصل از مرحله ۲ به منظور اندازه‌گیری مقدار آنزیم متصل به غشا مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت مقدار آنزیم درون سلولی از کم کردن فعالیت آنزیمی بخش متصل به غشا از فعالیت آنزیمی کل زیست توده به دست آمد [۱۸].

بررسی ویژگی‌های سینتیکی آنزیم تولیدشده. به منظور بررسی ویژگی‌های سینتیکی آنزیم، ابتدا خالص‌سازی نسبی بر روی آنزیم انجام گرفت. پس از کشت ۵ روزه سویه‌ی منتخب در محیط نمکی Czapek و جداسازی زیست توده با سانتریفیوژ، محلول رویی به عنوان آنزیم خام، برای خالص‌سازی نسبی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا به منظور خالص‌سازی نسبی با استفاده از روش رسوبدهی با سولفات آمونیوم، تغلیظ پروتئین صورت گرفت. به این منظور، درصد‌های مختلف از غلظت اشباع آمونیوم سولفات (۵۰-۹۰٪) در محلول آنزیم خام حل شده و هر کدام به مدت ۶ ساعت مخلوط گردیدند. پس از انحلال آمونیوم سولفات محلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه نگهداری شدند و سپس پروتئین تغلیظ شده با کمک سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد. در ادامه از دیالیز به منظور خارج نمودن مقدار اضافی نمک سولفات آمونیوم از نمونه تغلیظ شده آنزیم استفاده گردید [۱۹]. سپس فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین به منظور بررسی ویژگی‌های سینتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت.

کیسه دیالیز (شرکت سیگما شماره D9277) پس از شستشو با اتانول و سپس آب دیونیزه جهت کار آماده گردید. اندازه منافذ این کیسه دیالیز طبق کاتالوگ شرکت ۱۲/۴ کیلودالتون گزارش شده بود. بعد از پر نمودن کیسه با نمونه آنزیم، کیسه‌ها به کمک یک میله شیشه‌ای از بشر حاوی بافر دیالیز (۵۰ تا ۱۰۰ برابر حجم) آویزان گردید و در دمای یخچال قرار داده شد. محلول دیالیز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ °C بر روی هم‌زن هم زده شد. با اتمام این مرحله کیسه دیالیز بریده شد و نمونه از آن به داخل میکروتیوب انتقال داده شد. بعد از این مرحله فعالیت آنزیم در نمونه‌های تهیه شده تعیین و هم‌چنین درصد مناسب از سولفات آمونیوم جهت رسوب دادن پروتئین‌ها به دست آمد. پروتئین‌های رسوب‌کرده در داخل کیسه دیالیز در درصد مناسب تعیین شده به کمک سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند و در کم‌ترین مقدار ممکن از بافر Tris-HCl حل شدند [۱۹] و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

میکرولیتر از محلول Tris-HCl آسپاراژین و ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. مخلوط به خوبی هم زده شد و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. در نهایت به منظور توقف واکنش، ۱۰۰ میکرولیتر تری‌کلروآستیک اسید (TCA) به هر یک از میکروتیوب‌ها افزوده شد [۱۶]. در مرحله‌ی بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و هر کدام به طور جداگانه به داخل یک میکروتیوب جدید انتقال داده شد و به هر یک ۳۰۰ میکرولیتر معرف نسلر و ۷۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس محلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند تا واکنش معرف نسلر پایدار گردد. سپس برای تعیین میزان جذب نور توسط محلول‌ها، جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. محلول‌های استاندارد، از محلول‌های سولفات آمونیوم با غلظت‌های مختلف تهیه شد و سپس عدد جذب آن‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت.

شنا سایی مولکولی جدایه‌های منتخب. به منظور شنا سایی مولکولی، ابتدا جدایه منتخب در محیط YPG به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲۸ °C گرماگذاری شد. سپس زیست توده مخمیری با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شد. در ادامه از طریق شکستن فیزیکی با کمک روش کوبیدن زیست‌توده منجمد شده با ازت مایع، سلول‌ها شکسته شد و DNA آن به روش استخراج با فنل-کلروفرم جداسازی شد [۱۷]. واکنش PCR برای توالی ناحیه فاصله‌ناز رونویسی‌شونده داخلی Internal Transcribed Spacer (ITS) با پرایمرهای ITS1 و ITS4 (ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' و ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') انجام شد. محصول PCR به دست آمده بعد از خالص‌سازی از روی ژل جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نتایج تعیین ترادف از طریق هم‌ردیفی توالی در بانک ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۷].

بررسی محل سلولی قرارگیری آنزیم تولید شده. به منظور بررسی محل قرارگیری آنزیم تولید شده توسط سویه‌ی منتخب، پس از رشد سویه در محیط کشت، محلول با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی برای اندازه‌گیری بخش خارج سلولی آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. بخش رسوب‌کرده نیز برای اندازه‌گیری بخش داخل سلولی و متصل به غشای آنزیم استفاده شد. برای جدا سازی آنزیم‌های متصل به غشا، ابتدا زیست توده جدا شده توسط بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار (pH=۸) سرد شسته شد و محلول شستشو ذخیره گردید. سپس زیست توده باقی‌مانده با محلول دی‌تیوتریول ۲ میلی‌مولار حل

جدایه‌های مورد بررسی ۵ جدایه ۱۸، ۴۳، ۶۲، ۶۹ و ۹۰ که دارای بیش‌ترین فعالیت آنزیمی در طی شش روز بودند برای بررسی‌های بعدی انتخاب شدند.

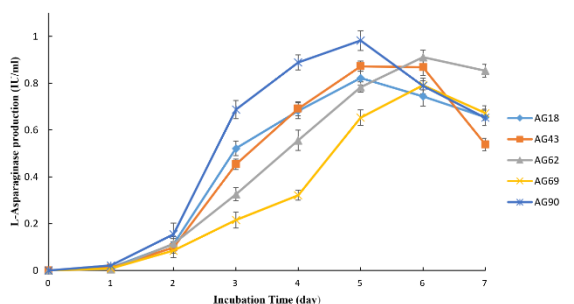
جدول ۲: میزان تولید آنزیم ال اسپاراژیناز تولید شده طی شش روز توسط جدایه‌های مثبت (IU/ml)

جدایه مخمری	جدایه فعالیت آنزیمی	جدایه مخمری	جدایه فعالیت آنزیمی	جدایه مخمری	جدایه فعالیت آنزیمی
AG05	۰,۳۵	AG51	۰,۲۲	AG90	۰,۸۰
AG12	۰,۲۱	AG55	۰,۳۴	AG98	۰,۲۳
AG18	۰,۷۳	AG62	۰,۸۶	AG102	۰,۱۷
AG22	۰,۴۲	AG69	۰,۷۷	AG112	۰,۳۶
AG31	۰,۱۷	AG76	۰,۱۱	AG123	۰,۴۵
AG39	۰,۲۵	AG81	۰,۳۴	AG127	۰,۲۳
AG43	۰,۸۳				

بررسی تولید آنزیم ال اسپاراژیناز در روزهای مختلف توسط جدایه‌های منتخب

بر اساس نتایج مرحله قبل ۵ جدایه ۱۸، ۴۳، ۶۲، ۶۹ و ۹۰ برای بررسی توان تولید آنزیم در طی روزهای مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۱ نشان‌دهنده فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده برای این ۵ جدایه در طی هفت روز می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده قبلی در انتهای روز شش، جدایه AG62 با تولید ۰/۸۶ IU/ml بیش‌ترین میزان تولید آنزیم را داشت. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود جدایه AG90 بیش‌ترین فعالیت آنزیمی را در طی هفت روز از خود نشان داد و به عنوان جدایه‌ی منتخب انتخاب شد.

بر اساس نتایج به دست آمده حداکثر تولید آنزیم در روز پنجم و از جدایه AG90 به مقدار ۰/۹۴ IU/ml به دست آمد. در حالی‌که سایر جدایه‌ها در روز ششم به حداکثر تولید خود رسیدند. با توجه به کوتاه‌تر بودن زمان تولید و همچنین بیش‌ترین میزان تولید آنزیم در جدایه AG90 این جدایه به عنوان جدایه منتخب برای ادامه مطالعه انتخاب شد.



شکل ۱. بررسی میزان فعالیت آنزیمی جدایه‌های منتخب تولیدکننده ال اسپاراژیناز در هفت روز

اندازه‌گیری Km و Vmax آنزیم ال-اسپاراژیناز

به منظور اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آنزیم، از آنزیم نیمه خالص‌سازی شده در مرحله‌ی قبل استفاده شد. آنزیم استخراج‌شده در بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار (pH=8) محلول شده و فرآیند اندازه‌گیری در دمای ۳۷ °C انجام گرفت. ثابت میکائیلیس منتن (Km) و سرعت بیشینه آنزیم (Vmax) با استفاده از غلظت‌های مختلف آمینواسید ال-اسپاراژین در غلظت‌های مختلف در محدوده‌ی ۱/۶ تا ۱۲/۸ میلی‌مولار اندازه‌گیری شد.

بررسی‌های آماری. نتایج به دست آمده از آزمون‌های مختلف با استفاده از نسخه بیست و دوم نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند. در این مطالعه، مقادیر p کم‌تر از ۰/۰۵ اختلاف آماری معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

غربال‌سازی جدایه‌های دارای فعالیت آنزیمی در مجموع از بین ۱۳۰ جدایه‌ی مخمری به دست آمده، ۱۹ سویه بر روی محیط تغییر یافته‌ی Czapek هاله‌ی صورتی رنگ نشان دادند. در جدول ۱ لیست جدایه‌های مثبت با توانایی تشکیل هاله صورتی مشاهده می‌شود.

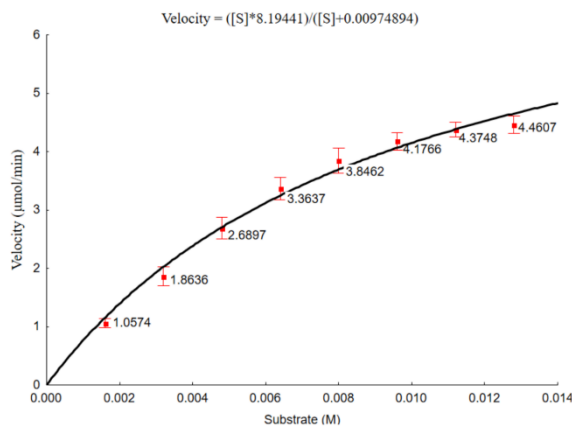
جدول ۱: بررسی نتایج جدایه‌های تشکیل‌دهنده هاله صورتی در محیط Czapek

جدایه مخمری	جدایه هاله صورتی*	جدایه مخمری	جدایه هاله صورتی	جدایه مخمری	جدایه هاله صورتی
AG05	++	AG51	+	AG90	++++
AG12	+++	AG55	+	AG98	+
AG18	++++	AG62	++	AG102	++
AG22	++	AG69	+++	AG112	++
AG31	+	AG76	++	AG123	+++
AG39	++	AG81	+++	AG127	+
AG43	++				

*هاله با قطر زیر ۰/۵ سانتی‌متر به عنوان +، ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر ++، ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر +++ و ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر و بالاتر به عنوان ++++.

بررسی مقدار آمونیاک آزاد شده در نتیجه فعالیت اسپاراژیناز

در مرحله قبل بر اساس توان تشکیل هاله و قطر آن، ۱۹ جدایه مخمری مثبت غربال شدند. در ادامه جدایه‌های مثبت بر اساس میزان تولید آنزیم اسپاراژیناز در طی شش روز در محیط Czapek تغییر یافته حاوی ال-اسپاراژین به عنوان تنها منبع نیتروژن مورد بررسی قرار گرفتند و میزان تولید آمونیاک توسط آن‌ها سنجیده شد. نتایج تولید آنزیم در جدول ۲ مشاهده می‌شود. بر اساس نتایج به دست آمده ۵ جدایه به عنوان جدایه‌های توانمند در تولید آنزیم انتخاب شدند. از میان



شکل ۲. نمودار فعالیت آنزیم تولید شده توسط *Sarocladium sp.* در غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات انجام شده و بررسی‌های اخیر، آنزیم آسپاراژیناز به طور قابل توجهی از تکثیر لئوسیت‌ها جلوگیری می‌کند. ال-آسپاراژیناز می‌تواند تا حدود ۹۸٪ مانع از تکثیر لئوسیت‌ها شود [۲۰]. ال-آسپاراژیناز از نظر درمانی یک پروتئین مهم به شمار می‌رود و در ترکیب با سایر داروها در درمان سرطان، به خصوص لوکمی لئوسیتیک حاد در بچه‌ها کاربرد دارد [۲۱، ۳، ۲]. تعداد زیادی از گونه‌های باکتریایی، جانوری، گیاهی و قارچی قادر به تولید این آنزیم هستند. از جمله حیوانات می‌توان به *Homo sapiens* و از جمله گیاهان به *Tamarindus indica* و *Capsicum annum* اشاره کرد. همچنین باکتری‌های جنس سودوموناس، مایکوباکتریوم، کوبنه باکتریوم، اشیریشیا و اروینیا از جمله مهم‌ترین باکتری‌های گرم مثبت و منفی تولیدکننده این آنزیم هستند [۴، ۲-۶]. استفاده از میکروب‌ها نسبت به گیاهان و حیوانات به عنوان منبع تولید آنزیم دارای مزایایی همچون رشد بالا، سهولت کشت، خالص‌سازی و کاهش قیمت تمام شده است که استفاده از منابع میکروبی را نسبت به منابع گیاهی و حیوانی دارای ارجحیت قرار می‌دهد [۲۲، ۵].

دیستا سبو (*Distasio*) و همکاران آنزیم ال-آسپاراژیناز را از باکتری بی‌هوازی *Vibrio succinogenes* روده گاو جداسازی و تخلیص کردند؛ این آنزیم فاقد فعالیت گلو تامینازی بود [۲۳، ۲۴]. تاکنون آنزیم ال-آسپاراژیناز از تعدادی باکتری از جنس *Pseudomonas sp.* یافت و در برخی موارد تخلیص شده است؛ مانند *Pseudomonas aeruginosa* [۲۵]، *Pseudomonas stutzeri* MB-405 [۲۶] و *acidovorans* [۲۷].

آلبانس (*Albanese*) و همکاران گزارش کردند که باکتری *Vibrio succinogenes* در طول مرحله رشد لگاریتمی و ابتدای فاز سکون آنزیم ال-آسپاراژیناز را تولید می‌کند [۲۸].

شناسایی مولکولی جدایه‌ی منتخب

در ادامه شناسایی مولکولی برای سویه‌ی منتخب بر روی ژن ITS انجام گرفت. محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز پس از رنگ‌آمیزی مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR برای توالی‌یابی به کشور کره ارسال گردید و نتیجه در پایگاه داده CBS (Centraal bureau voor Schimmel cultures) شد. توالی مورد بررسی با سویه‌ی *Sarocladium sp.* ۱۰۰٪ شباهت نشان داد و تحت عنوان *Sarocladium sp. AG9* نام‌گذاری گردید. هم‌چنین توالی مورد نظر با شماره دسترسی KY284627.1 در بانک ژنی NCBI ثبت گردید.

بررسی محل قرارگیری آنزیم تولید شده توسط *Sarocladium sp. AG9*

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، بیش‌تر آنزیم تولید شده به صورت خارج سلولی بوده و میزان ۰/۸۱ IU/ml از فعالیت آنزیمی را به خود اختصاص می‌دهد. از مقدار باقی‌مانده ۰/۱۳ IU/ml به صورت متصل به سطح بیرونی دیواره سلولی بوده و تنها ۰/۰۳ IU/ml از فعالیت آنزیمی مربوط به قسمت داخل سلولی است که بسیار ناچیز است. این نتایج حاکی از آن است که این آنزیم بیش‌تر به طور خارج سلولی فعالیت دارد که مزیت بسیار مهمی در بحث استخراج و خالص‌سازی آنزیم به شمار می‌آید.

جدول ۳: بررسی محل قرارگیری آنزیم ال-آسپاراژیناز تولید شده توسط

محل قرارگیری	فعالیت آنزیمی (IU/ml)	درصد (%)
خارج سلولی	۰/۸۱	۸۶/۱۷
متصل به دیواره	۰/۱۰	۱۰/۶۴
سیتوزولی	۰/۰۳	۳/۱۹
کل	۰/۹۴	۱۰۰

بررسی پارامترهای سینتیکی آنزیم تولید شده توسط

Sarocladium sp.

ویژگی‌های سینتیکی آنزیم در حالت پایه در غلظت‌های مختلف از سوبسترا مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این بررسی در قالب مدل میکائیلیس منتن در شکل ۲ نمایش داده شده است ($R^2=0/9429$). پارامترهای K_m و V_{max} نیز با استفاده از نمودار Lineweaver-Burk (نمودار $V/1$ علیه $1/[S]$) اندازه‌گیری شدند ($R^2=0/9899$) مقدار K_m محاسبه شده برای آنزیم برابر با ۹/۷۴ میلی‌مولار و مقدار V_{max} محاسبه شده برابر با ۸/۱۹ میکرومول بر دقیقه می‌باشد (p-value برای هر دو متغیر کم‌تر از ۰/۰۱ به دست آمد).

خالص سازی کامل آنزیم جهت مقایسه دقیق عوامل و همچنین بررسی پایداری و نیمه عمر آنزیم تولید شده است. بدیهی است آنزیم خالص شده مخمری می‌تواند جهت انجام آزمایش‌های ایمنی جهت بررسی مقدار آنتی‌بادی‌هایی که شاخص پاسخ‌های افزایش حساسیت هستند مورد استفاده قرار گیرد.

در این پژوهش پس از غربال‌سازی سویه‌های مخمری، انتخاب و شناسایی سویه‌ی برتر، *Sarocladium sp.* به عنوان سویه‌ی تولیدکننده‌ی ال-آسپاراژیناز معرفی شد و ویژگی‌های آنزیم تولید شده توسط آن مورد بررسی قرار گرفت. در بین ویژگی‌های مورد بررسی، تمایل مناسب آنزیم به آمینو اسید ال-آسپاراژین و خارج سلولی بودن قسمت بیش‌تر آنزیم تولید شده، که باعث ساده شدن مراحل استخراج و خالص سازی می‌گردد، قابل اشاره هستند.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور با شماره طرح ۹۵۸۲۷۶۱۸ و معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی سمنان با شماره طرح ۸۹۶ صورت گرفته است.

منابع

- [1] Wang Y, Qian S, Meng G, Zhang S. Cloning and expression of L-asparaginase gene in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 2001; 95: 93-101.
- [2] Abshire T, Pollock B, Billett A, Bradley P, Buchanan G. Weekly polyethylene glycol conjugated (PEG) L-asparaginase (ASP) produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia (rALL): a Pediatric Oncology Group (POG) study 9310. in *Proc Am Soc Clin Oncol* 1995; 14: 344.
- [3] Aljewari HS, Nader MI, Alfaisal AH. High efficiency, selectivity against cancer cell line of purified L-Asparaginase from pathogenic *Escherichia coli*. *World Acad Sci Engin Technol* 2010; 4: 199-204.
- [4] Souza PM, de Freitas MM, Cardoso SL, Pessoa A, Guerra EN, Magalhaes PO. Optimization and purification of l-asparaginase from fungi: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; 120: 194-202.
- [5] Vimal A, Kumar A. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2017; 33: 40-61.
- [6] Appel IM, van Kessel-Bakvis C, Stigter R, Pieters R. Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 2377.
- [7] Ashihara Y, Kono T, Yamazaki S, Inada Y. Modification of *E. coli* L-asparaginase with polyethylene glycol: disappearance of binding ability to anti-asparaginase serum. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 83: 385-391.
- [8] Lanvers-Kaminsky C. Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017; 79: 439-450.
- [9] Hosamani R, Kaliwal BB. L-asparaginase an anti-tumor agent production by *Fusarium equiseti* using solid state fermentation. *Int J Drug Discover* 2011; 3: 88-99.
- [10] Boos J, Werber G, Ahlke E, Schulze-Westhoff P, Nowak-Göttl U, Würthwein G, et al. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 1544-1550.
- [11] Baskar G, Renganathan S. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response

در این پژوهش نیز تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه مورد بررسی، در طی فاز لگاریتمی افزایش یافته و در فاز سکون به حداکثر میزان تولید خود رسید.

در باکتری‌های *E. coli* و *Erwinia* مقدار ال-آسپاراژیناز کم‌تر از حد مطلوب تولید می‌شود ولی به خاطر میل ترکیبی زیاد آن‌ها با سوبسترا و به خاطر عوامل اثرگذار بر میزان آزادسازی این آنزیم‌ها، فقط ال-آسپاراژینازهای این دو باکتری به صورت گسترده و به صورت تجاری در درمان سرطان استفاده می‌شوند [۲۹].

در میان قارچ‌ها حضور ژن تولیدکننده این آنزیم بیش‌تر در کپک‌ها گزارش شده است. از جمله مهم‌ترین کپک‌هایی تولیدکننده ال-آسپاراژیناز می‌توان به *Fusarium equiseti*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus*, *Fusarium oxysporum*, *nidulans*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus albus* و قارچ‌های *Agaricus bisporous*, *Serpula lacrymans*, *Volvariella volvacea* اشاره کرد.

با توجه به اهمیت ال-آسپاراژیناز این پژوهش به دنبال سویه‌های قارچی تولیدکننده این آنزیم انجام شد. علت انتخاب قارچ‌ها پتانسیل بالای آن‌ها در تولید آنزیم‌های خارج سلولی بوده است. همین‌طور قرابت تکاملی بیش‌تر این موجودات یوکاریوتی به انسان نسبت به سویه‌های پروکاریوتی کاهش احتمال ایجاد واکنش‌های حساسیت‌زا را پیشنهاد می‌کند. در بین سویه‌های قارچی نیز مخمرها به علت کشت راحت‌تر و سهولت در استخراج آنزیم در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله‌ی اول در بین سویه‌های بومی جداسازی شده، تست کیفی تولید ال-آسپاراژیناز بر روی محیط جامد انجام گرفت و سویه‌های مثبت در محیط مایع با استفاده از محلول نسلر برای تولید آمونیوم مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های تولیدکننده در طی هفت روز بررسی شدند و سویه AG90 به عنوان سویه‌ی برتر، بهینه برای تولید، مشخص گردید. Souza و همکاران در سال ۲۰۱۷ کپک *Aspegillus* را به عنوان یک منبع مناسب با قابلیت تخمیر در بستر جامد و مایع معرفی کردند و عنوان کردند که آنزیم تولید شده توسط این کپک می‌تواند به عنوان جایگزین مناسب برای آنزیم‌های باکتریایی مطرح باشد [۴]. در این پژوهش به غربالگری آنزیم آسپاراژیناز در جدایه‌های مخمری پرداخته شده است. با توجه به این‌که مخمرها به صورت تک‌سلولی بوده و سرعت رشد بالاتری نسبت به کپک‌ها دارند و همچنین دست‌ورزی ژنتیکی آن‌ها ساده‌تر و فرآیندهای تخمیری آن‌ها بیش‌تر مورد مطالعه قرار گرفته است، به نظر می‌رسد انتخاب و معرفی جدایه‌های مخمری گزینه مناسب‌تری نسبت به کپک‌ها باشد. یکی از مشکلات مورد نظر در این مطالعه نیاز به

- [22] Azizi SO, Tarinejad AL. Isolation, cloning and analysis of the glucose transporter gene 7 from Iranian strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Koomesh* 2015; 16: 356-365.
- [23] Distasio JA, Niederman RA, Kafkewitz D, Goodman D. Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. *J Biol Chem* 1976; 251: 6929-6933.
- [24] Doriya K, Kumar DS. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3 *Biotech*. 2016; 6: 239.
- [25] El-Bessoumy AA, Sarhan M, Mansour J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. *BMB Reports* 2004; 37: 387-393.
- [26] Krishnapura PR, Belur PD, Subramanya S. A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42: 720-737.
- [27] Shrivastava A, Khan AA, Khurshid M, Kalam MA, Jain SK, Singhal PK. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 100: 1-10.
- [28] Albanese ER, Kafkewitz K. Effect of medium composition on the growth and asparaginase production of *Vibrio succinogenes*. *Appl Environ Microbiol* 1978; 36: 25-30.
- [29] Kumar NM, Ramasamy R, Manonmani HK. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial Crops Products* 2013; 43: 150-158.
- surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. *Asia-Pacific J Chem Engin* 2012; 7: 212-220.
- [12] Batool T, Makky EA, Jalal M, Yusoff MM. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. *Appl Biochem Biotechnol* 2016; 178: 900-923.
- [13] Eijsink VG, Gåseidnes S, Borchert TV, van den Burg B. Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecul Engin* 2005; 22: 21-30.
- [14] Chow Y, Ting AS. Endophytic l-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *J Adv Res* 2015; 6: 869-876.
- [15] Deshpande N, Choubey P, Agashe M. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. *Scientific World Journal* 2014; 2014: 895167.
- [16] Erva RR, Goswami AN, Suman P, Vedanabhatla R, Rajulapati SB. Optimization of L-asparaginase production from novel *Enterobacter* sp., by submerged fermentation using response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol* 2017; 47: 219-228.
- [17] Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001, New York: Cold spring harbor laboratory press.
- [18] Klis FM, de Jong M, Brul S, de Groot PW. Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. *Yeast* 2007; 24: 253-258.
- [19] Cachumba JJ, Antunes FA, Peres GF, Brumano LP, Dos Santos JC, Da Silva SS. Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. *Braz J Microbiol* 2016; 47: 77-85.
- [20] Kotzia GA, Labrou NE. Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *J Biotechnol* 2005; 119: 309-323.
- [21] Shakerimoghadam F, Dejamfekar M, Ghaffari SH, Ahmadian S, Khaleghian A. Arsenic trioxide induction autophagy in human acute promyelocytic leukemia. *Koomesh* 2018; 20: 764-771.

Production and characterization of biochemical properties of L-Asparaginase by indigenous yeast isolated from soil of Iran

Hoda Nouri (M.Sc)¹, Hamid Moghimi (Ph.D)^{*1}, Ali khaleghian (Ph.D)^{*2}

1 - Dept. of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

2 - Dept. of Biochemistry, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

* Corresponding author. +98 9122737075 khaleghian.ali@gmail.com

Received: 16 Dec 2018 ; Accepted: 17 Jun 2019

Introduction: The use of L-asparaginase as a chemotherapeutic agent is an effective strategy for the treatment of leukemic lymphoblasts. Since the use of bacterial L-asparaginase causes side effects due to hypersensitivity reactions, search for new enzyme sources is one of the active research areas. In this study, the characterization of produced L-asparaginase by indigenous yeast strains was investigated.

Material and methods: In this study, 130 yeast strains were evaluated. Remarkably, AG90 isolate with 0.94 IU/ml enzyme production was selected as the superior strain.

Results: The molecular identification of the AG90 showed that this strain exhibited a high level of similarity (99%) with *Sarocladium* sp. and introduced as a *Sarocladium* sp. AG90. The fermentation broth of the superior strain showed that 86% of the enzyme was produced extracellularly. The K_m and V_{max} values of the produced enzyme for the L-Asparagine substrate were calculated as 9.74 mM and 19.19 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectively.

Discussion: The obtained results in this study can help to introduce a new enzyme with eukaryotic origin to reduce the toxicity, sensitivity and side effects associated of drug consumption.

Keywords: Asparaginase, Yeast, Leukemia, Iran.
