فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز از فلور باکتریایی روده ماهیان گاریز (*Liza klunzingeri* Day, 1888) و هوور (*Thunnus tonggol* Bleeker, 1851)

فاطمه ایزدپناه قشمی[۱]، احمد همایی[۲]*، خسرو خواجه[۳]، احسان کامرانی[۴]، پدرو فرناندز[۵]

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۱

چکیده

ال- آسپاراژیناز باکتریایی به عنوان داروی ضدتوموری در شیمی درمانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد و در فرآوری غذاهای پخته یا سرخ شده به منظور ممانعت از تشکیل آکریل‌آمید به کار می‌رود. در واقع این آنزیم اهمیت قابل ملاحظه‌ای در کنترل و ممانعت از سرطان دارد. هدف مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های بالقوه تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز از روده ماهی‌های گاریز و هوور است. بر این اساس، ابتدا ۴۴ جدایه باکتری از روده این ماهی‌ها با استفاده از محیط کشت نوترینت آگار جداسازی شد. سپس غربالگری باکتری‌های تولید کننده ال- آسپاراژیناز با استفاده از محیط کشت جامد اختصاصی M9 انجام شد که به شناسایی ۲۰ جدایه بالقوه تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز منجر شد. پس از آن، میزان تولید آنزیم جدایه‌ها اندازه‌گیری شد و بر اساس فعالیت آنزیمی از میان آنها دو جدایه که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بودند (۳۱۱ و ۲۸۴ میکرمول در دقیقه) انتخاب و با تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rRNA به ترتیب به عنوان *Pseudomonas aeruginosa* strain HR03 و *Pseudomonas stutzeri* strain HR04 شناسایی شدند. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که فلور باکتری‌های روده‌ای ماهی‌های گاریز و هوور مخزن زیستی مناسبی برای جداسازی باکتری‌های تولید کننده ال- آسپاراژیناز است. همچنین باکتری‌های دریایی *P. aeruginosa strain* HR03 و *P. stutzeri strain* HR04 احتمالا انتخاب بالقوه‌ای برای تولید ال- آسپاراژیناز به منظور به‌کارگیری در صنایع دارویی و غذایی در آینده هستند.

واژگان کلیدی: *ال- آسپاراژیناز*، Pseudomonas، *باکتری‌های روده‌ای، خلیج فارس.*

۱- دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۳- استاد گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۴- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۵- دانشیار گروه مهندسی زیستی، موسسه مهندسی زیستی و علوم زیستی، انستیتو Superior Tecnico، دانشگاه لیسبون، لیسبون، پرتغال.
* نویسنده مسئول: a.homaei@hormozgan.ac.ir
DOI: 10.22124/japb.2022.21395.1453

مقدمه

در طول دهه‌های گذشته هزاران محصول طبیعی زیست‌فعال از طبیعت برای صنایع متفاوت جداسازی و خالص‌سازی شده‌اند. تعداد زیادی از این ترکیبات طبیعی مولکول‌هایی با خواص جالب توجه هستند که به علت دسترسی آسان و اثرات سودمند آنها اهمیت دارند (Izadpanah Qeshmi et al., 2014). اقیانوس‌ها که تقریبا ۷۰ درصد سطح زمین را در بر می‌گیرند، منبع فوق العاده غنی از لحاظ تنوع شیمیایی و زیستی نسبت به خشکی هستند. محیط زیست دریایی نزدیک به یک میلیون جاندار پرسلولی (گیاهان و جانوارن) و یک میلیارد جاندار تک سلولی دارد. زندگی در چنین محیطی بسیار رقابتی است. در نتیجه جانداران دریایی مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ویژه‌ای دارند که شامل تولید متابولیت‌های ثانویه موثر در فرایندهای اکولوژیکی مانند تولیدمثل، ارتباطات، محافظت در برابر شکارچی، آلودگی و رقابت است (Beesoo et al., 2014). به طور کلی ترکیبات شیمیایی سازگار مشتق شده از دریا، محصولات طبیعی دریا (Marine Natural Product: MNP) نامیده می‌شوند که شامل گروه‌های متفاوت ترکیبات شیمیایی از جمله تروپنوئیدها، آلکالوئیدها، پلی‌پپتیدها، پپتیدها، قندها، استروئیدها و آنزیم‌ها هستند. بنابراین واضح است که محیط زیست دریایی منبع مهمی از ترکیبات طبیعی ناشناخته باشد و بویژه باید پتانسیل آنزیم‌های دریایی مورد ارزیابی قرار گیرد (Izadpanah Qeshmi et al., 2018).

روده، اندامی با چندین عملکرد است، از جمله مرکز جذب مواد غذایی، تشخیص عوامل بیماری‌زا و تنظیم میکروبیوم روده‌ای است (Rajan and Deivasigamani, 2018). همچنین دستگاه گوارش مهره‌داران با وجود یک لایه سلولی اپیتلیال بزرگ‌ترین و مهم‌ترین سد را در برابر محیط خارجی تشکیل می‌دهند. از آنجایی که ماهی‌ها نسبت به مهره‌داران غیرآبزی دیگر در معرض میکروارگانیسم‌های بیشتری شامل یک میلیون باکتری و ۱۰ میلیون ویروس به ازای هر میلی‌لیتر آب دریا هستند (Martin et al., 2016)، میکروفلور روده ماهی‌ها اغلب بسیار متغیر و وابسته به عوامل متعددی از جمله شرایط محیط زیست، دما و غیره است. اهمیت و تنوع میکروارگانیسم‌های وابسته به موجودات زنده بویژه روده ماهی‌ها امری بدیهی است (Sahu et al., 2007a; Migaw et al., 2014).

ال- آسپاراژیناز (EC.3.5.1.1) از انواع آنزیم‌های هیدرولیتیک است که امروزه نقش بسزایی در پیشگیری از سرطان دارد و این نقش برجسته را از دو مسیر متفاوت و مکمل در صنعت غذایی و دارویی بر سلامت انسان‌ها ایفا می‌کند که شامل به‌کارگیری این آنزیم در شیمی درمانی به عنوان عامل ضدتوموری و دیگری از طریق کاهش میزان آکریل‌آمید غذاهای نشاسته‌دار فرآوری شده در درجه حرارت‌های بالا است (Izadpanah Qeshmi et al., 2018). به طور گسترده این آنزیم در همه موجودات زنده شامل میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران وجود دارد (Shi et al., 2017) بر اساس هومولوژی توالی و عملکرد، ال- آسپاراژینازهای باکتریایی به دو نوع تقسیم می‌شوند. نوع I در سیتوپلاسم یافت می‌شود و معمولا میل ترکیبی کمتری به ال- آسپاراژین دارد و نوع II که در فضای پری‌پلاسمی یافت می‌شود و میل ترکیبی بیشتری به ال- آسپاراژین دارد (Lopes et al., 2019; Jiao et al., 2020).

در دهه‌های اخیر به دلیل فعالیت آنتی‌نئوبلاستیک آنزیم ال-آسپاراژیناز توجه زیادی به خود جلب کرده است. این آنزیم چندین دهه است که به عنوان عامل شیمی درمانی برای درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia: ALL) با کارآیی بهبود ۸۰-۶۰ درصد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sahu et al., 2007b; Farag et al., 2015). سلول‌های طبیعی توانایی تولید ال- آسپاراژین مورد نیاز خود را با کمک آنزیم ال-آسپاراژین سنتتاز کسب می‌کنند در حالی که سلول‌های بدخیم فاقد این آنزیم، به منابع خارجی ال- آسپاراژین برای رشد و تکثیر نیاز دارند. در غیاب آنزیم ال- آسپاراژین سنتتاز، ال- آسپاراژین خارجی که منبع غذایی مهم سلول‌های سرطانی است، توسط ال- آسپاراژیناز به ال- آسپارتیک اسید و آمونیاک تجزیه می‌شود و منجر به مرگ سلول‌های بدخیم از طریق مهار سنتز پروتئین، تقسیم سلولی و رشد سلول‌های توموری می‌شود (Sahu et al., 2007b; Zuo et al., 2015). امروزه ال- آسپاراژینازهای باکتریایی تحت عناوین تجاری متفاوت شامل Oncaspar، Colaspase، Crasnitin، Kidrolase، Erwinase و Elspar در درمان سرطان بویژه لوسمی لنفوبلاستیک حاد به کار می‌روند (Ettinger et al., 1997; Geckil et al., 2004; Sun et al., 2016). اگرچه ال- آسپاراژینازهای جدا شده از *Escherichia*

coli و *Erwinia* sp. به فراوانی در درمان سرطان به کار می‌روند، اما در درازمدت منجر به واکنش‌های حساسیت مفرط می‌شوند که نهایتا واکنش‌های آلرژیک و آنافیلاکسی را ایجاد می‌کنند (Kishore et al., 2015). علاوه بر این، در سال‌های اخیر به دلیل پتانسیل ال- آسپاراژیناز برای کاهش آکریل‌آمید در فرایندهای غذایی توجه پژوهشگران زیادی را به خود جلب کرده است. آکریل‌آمید برای بعضی از جانوران و انسان‌ها سرطان‌زا است. این ترکیب شیمیایی به راحتی در غذاهای سرخ شده و پخته شده، در نتیجه واکنش بین آسپاراژین و قندهای احیا کننده از طریق واکنش میلارد تشکیل می‌شود (Kornbrust et al., 2010). بسیاری از راهکارهای کشاورزی و تکنولوژی برای کاهش میزان آکریل‌آمید در غذاهای فرآوری شده در دماهای بالا در حال گسترش هستند، اما در میان آنها روش مداخله آنزیمی بر اساس مصرف آسپاراژین توسط ال- آسپاراژیناز به عنوان روشی موثر برای کاهش آکریل‌آمید بدون تاثیر منفی بر ظاهر و طعم محصول در نظر گرفته شده است. در روش آنزیمی سوبسترای واکنش تشکیل آکریل‌آمید یعنی آسپاراژین حذف شده و نهایتا آکریل‌آمید تولید نمی‌شود (Shi et al., 2017; Doriya and Kumar Devarai, 2018). تاکنون برای کاهش آکریل‌آمید چندین ال- آسپاراژیناز از منابع متفاوت میکروبی مانند ال- آسپاراژینازهایی از *E. coli* (Zyzak et al., 2003)، *Aspergillus oryzae* (Hendriksen et al., 2009)، *Cladosporium* sp. (Kumar et al., 2014)، *Bacillus subtilis* (Sanghvi et al., 2016)، *Bacillus licheniformis* (Mahajan et al., 2012) و *Thermococcus zilligii* (Zuo et al., 2015) بررسی شده‌اند که منجر به کاهش ۹۷-۳۴ درصدی میزان آکریل‌آمید در طیف وسیعی از محصولات غذایی شامل بیسکویت، نان ترد، سیب زمینی سرخ شده و چیپس ورقه‌ای شده‌اند (Shi et al., 2017). با این حال فقط دو نوع ال- آسپاراژیناز تجاری به طور مستقیم برای مهار اثر آکریل‌آمید در صنعت غذایی به کار می‌رود که شامل ال- آسپاراژینازهای تجاری آماده، PreventASe (DSM، هلند) از *Aspergillus oryzae* (Hendriksen et al., 2009) و Acrylaway (Novozymes، دانمارک) از *Aspergillus niger* (Koster, 2007) است. با وجود کاربرد گسترده این آنزیم در صنایع غذایی یکی از مشکلات عمده

به‌کارگیری آن در صنعت خاصیت ال-گلوتامینازی آنزیم‌های ال- آسپاراژیناز موجود است. در نتیجه یافتن آنزیم ال- آسپاراژیناز از منابع جدید با کارآیی کاتالیتیکی بالا و اختصاصیت بیشتر، بسیار حائز اهمیت است (Shi et al., 2017; Doriya and Kumar Devarai, 2018). میکروارگانیسم‌های روده‌ای تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز از جمله *Enterobacter cloacae* (Rajan and Deivasigamani, 2018) و *Streptomyces* sp. (Sahu et al., 2007a) از ماهی *Mugil cephalus* جداسازی شدند. از این رو هدف از مطالعه حاضر بررسی میکروفلور روده‌ای ماهی‌های گاریز (*Liza klunzingeri* Day, 1888) و هوور (*Thunnus tonggol* Bleeker, 1851) به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کننده ال-آسپاراژیناز جدید با خصوصیات مناسب و کاربردی‌تر برای به‌کارگیری در صنایع غذایی و درمانی در آینده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های ماهی

برای جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم ال- آسپاراژیناز، تعداد ۶ نمونه شامل ۳ نمونه ماهی هوور (*Thunnus tonggol*) و ۳ نمونه ماهی گاریز (*Liza klunzingeri*) از بازار ماهی فروشی بندرعباس و قشم تهیه شد. همه نمونه‌ها در فلاسک حاوی یخ، در دمای ۱۰-۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به آزمایشگاه زیست دریا دانشگاه هرمزگان منتقل شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های ماهی

ابتدا پوست ماهی با اتانول ۷۰ درصد تمیز و سپس شکم ماهی برش داده شد و روده ماهی یعنی منطقه بعد از معده (زواید پیلوری) تا انتهای آن در مجاورت مخرج جدا شد. روده با سرم فیزیولوژی استریل (NaCl ۰/۹ درصد) مخلوط و سپس هموژنیزه شد (Sahu et al., 2007a).

جداسازی باکتری‌ها از روده ماهی

به منظور کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های اولیه، از نمونه‌های جمع‌آوری شده روده ماهی رقت مورد نیاز تهیه شد که برای تهیه رقت لازم از نمونه‌های روده ماهی، ۱ گرم آن با ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد. از رقت 10^{-1} تا 10^{-4} به دست آمده، ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت نوترینت آگار به صورت خطی کشت شد و نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت

۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. برای خالص‌سازی، کلنی‌های جداسازی شده در محیط نوترینت آگار دوباره کشت داده شدند (Sahu et al., 2007a; Migaw et al., 2014).

غربالگری باکتری‌های تولید کننده ال- آسپاراژیناز

فعالیت ال- آسپاراژینازی باکتری‌های جدا شده به وسیله محیط کشت جامد اختصاصی M9 حاوی آسپاراژین، $Na_2HPo_4.2H_2O$، $MgSO_4.7H_2O$، KH_2PO_4، $CaCl_2.H_2O$، NaCl، مالتوز، آگار و فنل رد با استفاده از روش Gulati و همکارانش (۱۹۹۷)، مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های جدا شده از روده ماهی بر روی محیط کشت جامد اختصاصی M9 کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. فعالیت ال- آسپاراژینازی در این آزمون به وسیله ناحیه صورتی اطراف کلنی‌ها مشخص شد. در این آزمون دو پلیت شاهد به کار گرفته شد که یکی از آنها بدون شناساگر (فنل رد) و دیگری فاقد آسپاراژین، اما حاوی $NaNO_3$ به عنوان منبع نیتروژن بود (Gulati et al., 1997; Izadpanah Qeshmi et al., 2014).

سنجش فعالیت ال- آسپاراژینازی

جدایه‌های مولد آنزیم ال- آسپاراژیناز، در محیط براث M9 کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محیط کشت با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (Techne، انگستان) و در نهایت از مایع رویی به عنوان عصاره خام آنزیم استفاده شد (Izadpanah Qeshmi et al., 2014).

در این مطالعه به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم ال- آسپاراژیناز، از روش رنگ سنجی (Colorimetric) توصیف شده توسط Imada و همکارانش (۱۹۷۳) استفاده شد. فعالیت آنزیم ال- آسپاراژیناز بر اساس روش نسلریزاسیون (Nesslerization) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در حضور سوبسترای ال- آسپاراژین و معرف نسلر سنجش شد. به این ترتیب که ۳۷۰ میکرولیتر ال- آسپاراژین ۴۰ میلی‌مولار، ۳۷۰ میکرولیتر آنزیم و ۳۷۰ میکرولیتر بافر Tris-Hcl ۰/۰۵ مولار (با pH ۷/۵) با هم مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه درون بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت با افزودن ۳۷۰ میکرولیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱/۵ مولار واکنش پایان

یافت. مخلوط به دست آمده سانتریفیوژ شد. رویه با معرف نسلر و آب مقطر مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس مقدار آمونیاک آزاد شده با خوانش جذب محلول در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Pharmacia Biotech، آمریکا) اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از منحنی استاندارد کلرید آمونیوم محاسبه شد (Izadpanah Qeshmi et al., 2014, 2015).

شناسایی باکتری‌های تولید کننده ال-آسپاراژیناز با تجزیه و تحلیل ژن 16S rRNA

در این پژوهش برای استخراج DNA باکتری از روش Boiling استفاده شد (Abdelhai et al., 2016; Alimolaei and Golchin, 2016). هدف از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، ازدیاد قطعه ۱۵۰۰ جفت باز از ژن 16S rRNA با DNA الگوی استخراج شده جدایه‌های بالقوه تولید کننده ال- آسپاراژیناز (HR03 و HR04) با استفاده از آغازگرهای پیشرو (Fd1: 5´-AGAGTTT GA TCCTGG CTC AG-3´) و پیرو (Rd1: 5´-AAGGAGGTGATCCAGCC-3´) بود (Boulares et al., 2013). PCR طی ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد دناتوره شدن ابتدایی و ۳۰ چرخه شامل ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (دناتوره شدن)، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد (اتصال)، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (طویل شدن) و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (طویل شدن نهایی) در دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystem، آمریکا) انجام شد. محصولات PCR با روش Sanger Method DNA Sequencing توسط شرکت Stab Vida Co. (اسپانیا) تعیین توالی شدند.

پس از توالی‌یابی ژن‌های 16S rRNA جدایه‌های مورد مطالعه، نتایج تعیین توالی شده با استفاده از نرم‌افزار Chromas بررسی شد و با مراجعه به پایگاه داده‌های بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) و نرم‌افزار Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) میزان تشابه آنها با دیگر ژن‌های ثبت شده در این پایگاه مورد بررسی قرار گرفت و نهایتا توالی‌های ژن 16S rRNA باکتری‌های جدا شده در NCBI ثبت شد. ترسیم درخت فیلوژنتیک توالی ژن 16S rRNA باکتری‌های جدا شده در مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار MEGA X، پس از ویرایش و همترازی

توالی‌ها با استفاده از روش اتصال-همسایگی (Neighbor-Joining) انجام شد.

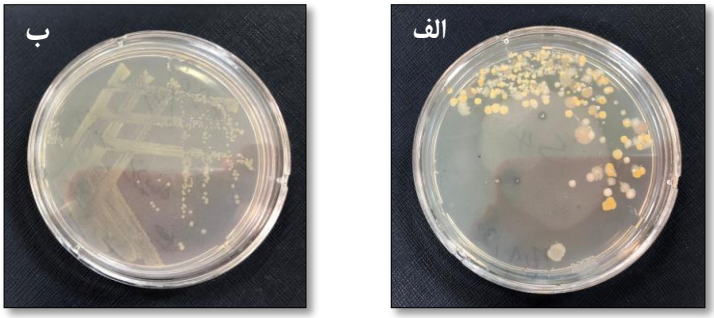
نتایج

جداسازی باکتری‌ها از روده ماهی

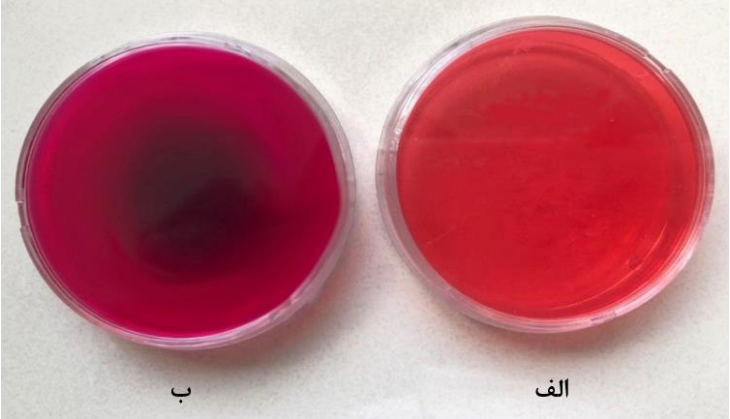
از میان نمونه‌هایی که به آزمایشگاه منتقل شده بودند تعداد ۴۴ کلنی جداسازی شد که به ترتیب ۲۱ کلنی از روده ماهی گاریز و ۲۳ کلنی از روده ماهی هوور به دست آمد (شکل ۱).

غربالگری باکتری‌های تولیدکننده آنزیم ال-آسپاراژیناز

از میان ۴۴ کلنی جداشده از روده ماهی‌های گاریز و هوور، ۲۴ جدایه بر روی محیط اختصاصی M9 هیچ گونه رشدی نشان ندادند، بنابراین آنها فاقد خاصیت ال- آسپاراژینازی بودند. ۲۰ جدایه بر روی محیط M9 رشد کردند که در واقع این جدایه‌ها به علت توانایی تولید آنزیم ال- آسپاراژیناز قادر بودند ال- آسپاراژین موجود در محیط کشت را به عنوان منبع نیتروژن تجزیه کنند و در اطراف کلنی هاله صورتی با قطر متفاوت (شدید، متوسط، ضعیف و خیلی ضعیف) ایجاد کردند (شکل ۲ و جدول ۱). باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز جدا شده از روده ماهی گاریز و هوور به ترتیب ۱۲ و ۸ جدایه بودند (شکل ۳).



شکل ۱: کلنی‌های جدا شده روده ماهی بر روی محیط کشت نوترینت آگار. الف) کلنی‌های جدا شده از روده ماهی گاریز. ب) جدایه خالص شده از روده ماهی هوور.

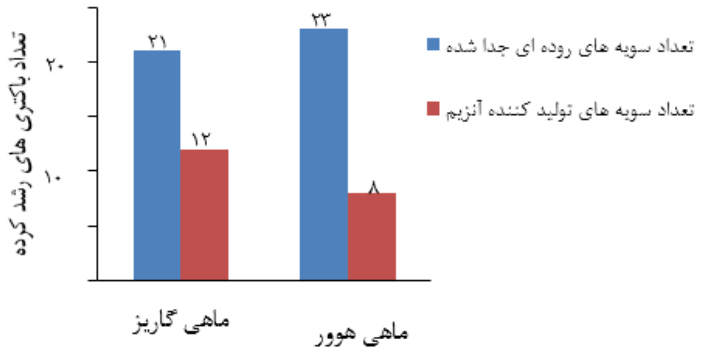


شکل ۲: پلیت‌های حاوی محیط کشت اختصاصی M9. الف) پلیت محیط کشت M9 بدون کشت باکتری. ب) هاله ایجاد شده اطراف کلنی باکتری تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز را نشان می‌دهد.

جدول ۱: قطر هاله و میزان فعالیت ده جدایه دارای بیشترین میزان تولید آنزیم ال- آسپاراژیناز

جدایه	قطر هاله*	فعالیت کل آنزیم (µmol/min)
(HR03) 2K.1	خیلی شدید	۳۱۱/۵
(HR04) 6T.2	شدید	۲۸۲/۸
1k.1	شدید	۲۴۸/۱
6T.1	شدید	۲۴۱/۵
1k.6	متوسط	۲۱۸/۱
5T.1	متوسط	۱۹۴/۸
1K.3	متوسط	۱۹۴/۸
1K.13	ضعیف	۱۶۴/۸
2K.2	ضعیف	۱۳۸/۱
6T.10	ضعیف	۹۴/۸

*: شدید ≈ ۶cm؛ متوسط ≈ ۴cm؛ ضعیف ≈ ۲cm.



شکل ۳: نمودار فراوانی باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز جدا شده از ماهی‌های هوور و گاریز

سنجش فعالیت ال- آسپاراژینازی

فعالیت ال- آسپاراژینازی ۲۰ باکتری با استفاده از روش نسلریزاسیون آمونیاک بررسی شد. در این مرحله از میان ۱۰ باکتری بالقوه مولد آنزیم ال- آسپاراژیناز، دو جدایه HR03 و HR04 دارای بیشترین فعالیت آنزیمی به ترتیب ۳۱۱ و ۲۸۴ میکرومول در دقیقه بودند (جدول ۱).

ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های بالقوه تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز

نتایج بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی جدایه‌های انتخاب شده (HR03 و HR04) شامل ویژگی‌های کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون اکسیداز و کاتالاز و رنگ‌آمیزی اسپور در جدول ۲ آمده است.

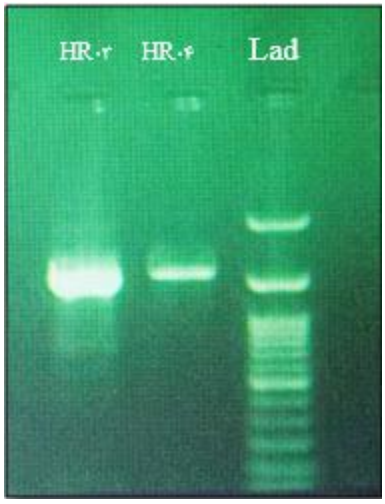
شناسایی مولکولی باکتری‌های بالقوه تولید کننده ال- آسپاراژیناز

دو جدایه که دارای بیشترین فعالیت ال- آسپاراژینازی بودند، توسط توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی‌شدند (شکل ۴). بررسی ژن 16S rRNA باکتری‌های جدا شده نشان داد هر دو جدایه بالقوه تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز بیشترین تشابه را به جنس *Pseudomonas* از خانواده Pseudomonadaceae داشتند. جدایه HR03 که دارای بیشترین فعالیت ال- آسپاراژینازی بود، بیشترین تشابه (۹۹/۱ درصد) را به *Pseudomonas aeruginosa* (AF417876) جدا شده از روده میانی *Culex quinquefasciatus* (Pidiyar Vyankatesh et al., 2004) و جدایه HR04 بیشترین تشابه

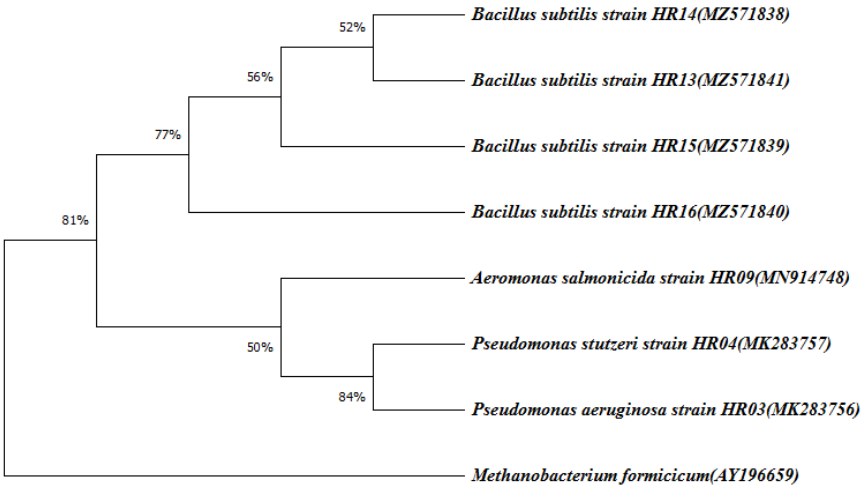
(۹۹/۳۲ درصد) را به *Pseudomonas stutzeri* strain SM12 (MT356167) جدا شده از روده گوسفند نشان داد. توالی‌های ژن 16S rRNA سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* strain HR03 و *Pseudomonas stutzeri* strain HR04 در NCBI به ترتیب با شماره‌های دسترسی MK283756 و MK283757 ثبت شدند. درخت فیلوژنیک روابط تکاملی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA جدایه‌های HR03 و HR04 جدا شده در این مطالعه را با ۵ توالی ژن 16S rRNA باکتری تولید کننده آنزیم جدا شده از روده ماهی‌های خلیج فارس موجود در NCBI شامل *Bacillus subtilis* strain HR16 (MZ571840)، *B. subtilis* strain HR13 (MZ571841)، *Aeromonas salmonicida* strain HR09 (MN914748)، *B. subtilis* strain HR14 (MZ571838) و *B. subtilis* strain HR15 (MZ571839) رسم شد (شکل۵).

جدول ۲: ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌های انتخاب شده

آزمون‌های شناسایی	HR03	HR04
ریخت‌شناسی کلنی	موکوئیدی، کرم، حاشیه صاف و دارای رنگدانه سبز	خشک و چروک، زرد، حاشیه نامنظم
رنگ‌آمیزی گرم	باسیل گرم منفی	باسیل گرم منفی
رنگ‌آمیزی اسپور	منفی	منفی
کاتالاز	مثبت	مثبت
اکسیداز	مثبت	مثبت



شکل ۴: بررسی باندهای ژن 16S rRNA باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز. باندها در راستای ۱۵۰۰ جفت بازی قرار دارند. Lad نشانگر مارکرمولکولی است.



شکل ۵: درخت فیلوژنتیک توالی‌های نوکلئوتیدی ژن 16S rRNAدر جدایه‌های مورد بررسی (۰/۰۲ نرخ جایگزینی نوکلئوتیدها در هر جایگاه) با استفاده از *Methanobacterium formicicum* (AY196659) به عنوان Out Group

بحث

با توجه به به‌کارگیری آنزیم ال- آسپاراژیناز در درمان ALL و تولید غذاهای ایمن‌تر در صنایع غذایی، این آنزیم از اهمیت ویژه‌ای در بین آنزیم‌های تجاری برخوردار است. البته آنزیم‌های تجاری ال- آسپاراژیناز در دسترس دارای ایراداتی هستند که منجر به جستجوی منبع جدید ال- آسپاراژیناز به دلایل متعدد، از جمله آنزیمی با کمترین فعالیت گلوتامینازی به منظور غلبه بر عوارض جانبی نامطلوب و واکنش‌های حساسیت مفرط، ضروری است. متاسفانه امروزه اطلاعات کمی در مورد آنزیم ال- آسپاراژیناز باکتری‌های همزیست روده ماهی‌های دریایی وجود دارد و همچنین گزارشی از ال- آسپاراژیناز باکتری‌های جدا شده از روده ماهی گاریز وجود ندارد. در مطالعه حاضر، باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز از روده ماهی‌های گاریز و هوور جداسازی شده و توسط آنالیز ژن 16S rRNA شناسایی شدند. در این مطالعه به منظور غربالگری باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز از محیط کشت اختصاصی M9 استفاده شد. از آنجایی که ال- آسپاراژین تنها منبع نیتروژن این محیط کشت است، تنها باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز در این محیط رشد می‌کنند. تعداد ۲۴ کلنی جدا شده از روده ماهی بر روی محیط اختصاصی M9 هیچ گونه رشدی نشان ندادند، به این معنی که این باکتری‌ها توانایی تولید آنزیم ال- آسپاراژیناز را نداشتند. اما تعداد ۲۰ باکتری بر روی محیط M9 رشد کردند، به این علت که این جدایه‌ها با ترشح آنزیم ال- آسپاراژیناز، ال- آسپاراژین موجود در محیط کشت را به آمونیاک و ال-آسپارتات تجزیه کردند و در نتیجه اطراف کلنی به دلیل تغییر pH محیط و حضور معرف فنل رد هاله صورتی رنگی ایجاد شد (Gulati et al., 1997; Narayana et al., 2008; Izadpanah Qeshmi et al., 2014). در مطالعه حاضر، باکتری‌های تولیدکننده ال- آسپاژیناز به ترتیب شامل ۱۲ و ۸ جدایه از ماهی‌های گاریز و هوور بودند. این نتایج حاکی از این است که با وجود جداسازی تعداد بیشتر جدایه‌های باکتری از روده ماهی‌های هوور، جدایه‌های به دست آمده از ماهی گاریز دارای ظرفیت تولید ال- آسپاراژیناز بیشتری بودند. ماهی گاریز متعلق به خانواده کفال‌ماهیان (Mugilidae) است که در مناطق ساحلی به فراوانی یافت می‌شود. این ماهیان در انواع گسترده‌ای از موقعیت‌های تغذیه‌ای از جمله گیاهان و به طور عمده از زئوپلانکتون‌ها و دتریتوس تغذیه

می‌کنند (Rajan and Deivasigamani, 2018). اما ماهی هوور جز تن ماهیان (Scombrinae) است که از جمله ماهیان وابسته به سطح دریا (Pelagic) محسوب می‌شوند و رژیم غذایی آنها شامل ماهیان، سرپایان و سخت‌پوستان است (Mohammed et al., 2018). با توجه به این که میکروفلور روده‌ای ماهی متاثر از رژیم غذایی آنها است (Martin et al., 2016). گوناگونی و فراوانی میکروارگانیسم‌های تولید کننده ال- آسپاراژیناز در ماهیان متفاوت امری طبیعی است.

سویه‌های *Pseudomonas aeruginosa* strain HR03 و *Pseudomonas stutzeri* strain HR04 به عنوان باکتری‌های بالقوه تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز در مطالعه حاضر شناسایی شدند. درخت فیلوژنی به دو Clade اصلی شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تقسیم می‌شود که به ترتیب Clade1 شامل گونه‌های *Bacillus* و Clade2 شامل جنس‌های *Pseudomonas* و *Aeromonas* است که هر دو متعلق به رده گاماپروتئوباکتر (Gammaproteobacteria) هستند. هر دو سویه HR04 و HR03 متعلق به شاخه پروتئوباکتر (Proteobacteria)، رده گاماپروتئوباکتر، راسته سودوموناداالس (Pseudomonadales)، خانواده سودوموناداسه و جنس *Pseudomonas* یکسان اما متعلق به دو گونه متفاوت هستند. جالب توجه است که هر دو جدایه بالقوه تولید کننده ال- آسپاراژیناز جدا شده از روده ماهی در این پژوهش، بیشترین تشابه را با سویه‌های جدا شده از روده دو موجود متفاوت، نوعی پشه به نام *Culex quinquefasciatus* و گوسفند، داشتند. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد جدایه‌های متعلق به جنس *Pseudomonas* پتانسیل بالایی را برای تولید آنزیم ال- آسپاراژیناز دارند. Badoei-Dalfard در سال ۲۰۱۶ باکتری‌های تولید کننده ال- آسپاراژیناز را از چشمه آب گرم جداسازی کردند و مشاهده کردند که همه جدایه‌های تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز متعلق به جنس *Pseudomonas* بودند. همچنین Izadpanah Qeshmi و همکارانش در سال ۲۰۱۴، باکتری‌های تولید کننده ال- آسپاراژیناز را از آب دریا و رسوب خلیج فارس جداسازی کردند که بیشترین جدایه‌ها متعلق به جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* بودند. این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر پتانسیل بالای جنس *Pseudomonas* برای تولید آنزیم ال- آسپاراژیناز همخوانی دارد.

در مطالعات قبلی میکروارگانیسم‌های روده‌ای تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز از جمله *Enterobacter cloacae* S1 (Rajan and Deivasigamani, 2018) و *Streptomyces* sp. (Sahu et al., 2007a) و *Streptomyces canus* (Sahu et al., 2007b) از روده ماهی *Mugil cephalus* جداسازی شده بودند.

در مطالعه حاضر میزان فعالیت ال-آسپاراژینازی *P. aeruginosa* strain HR03 و *P. stutzeri* strain HR04 به ترتیب ۳۱۱ و ۲۸۴ میکرومول در دقیقه تعیین شد. Badoei-Dalfard در سال ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ بیشترین میزان فعالیت *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004 جدا شده از فاضلاب شهری و *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JHS-71 جدا شده از چشمه‌های آب گرم را به ترتیب ۷۸۵ و ۲۴۰ واحد در میلی‌لیتر تعیین کردند. Rajan و Deivasigamani در سال ۲۰۱۸ باکتری *Enterobacter cloacae* strain S1 را از روده ماهی *M. cephalus* جداسازی کردند که این جدایه دارای فعالیت آنزیمی ۳۹/۵۳ واحد در میلی‌گرم بود. بنابراین جدایه‌های روده ماهیان تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز در مطالعه حاضر می‌توانند انتخاب مناسبی برای مطالعات آینده به منظور به‌کارگیری در صنایع دارویی و غذایی باشند.

در مجموع، ال- آسپاراژیناز درمیان آنزیم‌های تجاری به دلیل فعالیت ضدتوموری آن در درمان ALL و تولید غذاهای ایمن‌تر در صنایع غذایی اهمیت ویژه‌ای دارد. در نتیجه جستجو برای یافتن منبع جدید آن به چند دلیل از جمله آنزیمی با کمترین فعالیت گلوتامینازی، پایداری بیشتر، عوارض جانبی نامطلوب کمتر و عدم واکنش‌های حساسیت، امری ضروری است. با توجه به این که اطلاعات کمی در مورد ال- آسپاراژیناز باکتری‌های دریایی گزارش شده است و گزارشی مبنی بر ال- آسپاراژیناز باکتری‌های همزیست روده ماهی گاریز وجود نداشت، در مطالعه حاضر باکتری‌های روده‌ای ماهی‌های گاریز و هوور جداسازی شدند و پس از غربالگری باکتری‌های تولید کننده آنزیم ال- آسپاراژیناز، جدایه‌های بالقوه تولید کننده آنزیم با استفاده از تجزیه و تحلیل ژن 16S rRNA شناسایی مولکولی شدند. نتایج این پژوهش نشان دهنده پتانسیل بالقوه محیط دریایی به عنوان منبع غنی سویه‌های باکتریایی متنوع به منظور جداسازی آنزیم‌های کاربردی است. ال- آسپاراژیناز جدایه‌های *Pseudomonas* میکروفلور ماهی‌های گاریز و

هوور می‌تواند انتخابی مناسبی برای مقیاس صنعتی باشند. در نتیجه ارزیابی پتانسیل ضدتوموری و ضد آکریل‌آمیدی آنزیم ال-آسپاراژیناز جدایه‌های *Pseudomonas aeruginosa* strain HR03 و *Pseudomonas stutzeri* strain HR04 به منظور به‌کارگیری در صنایع غذایی و دارویی در آینده امری ضروری است و امید است که در آینده به توسعه صنعتی برسد.

منابع

Abdelhai M.H., Hassanin H.A. and Sun X. 2016. Comparative study of rapid DNA extraction methods of pathogenic bacteria. American Journal of Bioscience and Bioengineering, 4(1): 1–8.

Alimolaei M. and Golchin M. 2016. An efficient DNA extraction method for *Lactobacillus casei*, a difficult-to-lyse bacterium. International Journal of Enteric Pathogens, 4(1): 35–40.

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): 388–397.

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.

Beesoo R., Neergheen-Bhujun V., Bhagooli R. and Bahorun T. 2014. Apoptosis inducing lead compounds isolated from marine organisms of potential relevance in cancer treatment. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 768: 84–97.

Boulares M., Mankai M., Aouadhi C. and Hassouna M. 2013. Characterisation and identification of spoilage psychotrophic Gram-negative bacteria originating from Tunisian fresh fish. Annals of Microbiology, 63(2): 733–744.

Doriya K. and Kumar Devarai S. 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: 244–250.

Ettinger L., Ettinger A., Avramis W. and Gaynon P. 1997. Acute lymphoblastic leukaemia. BioDrugs, 7(1): 30–39.

Farag A., Hassan S., Beltagy E. and El-Shenawy M. 2015. Optimization of production of anti-tumor l-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 41(4): 295–302.

Geckil H., Gencer S. and Uckun M. 2004. 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 and Microbial Technology, 35(2-3): 182–189.

Gulati R., Saxena R. and Gupta R. 1997. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. Letters in Applied Microbiology, 24(1): 23–26.

Hendriksen H., Kornbrust B., Ostergaard P. and Stringer M. 2009. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(10): 4168–4176.

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

Izadpanah Qeshmi F., Homaei A., Fernandes P. and Javadpour S. 2018. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. Microbiological Research, 208: 99–112.

Izadpanah Qeshmi F., Javadpour S., Malekzadeh K., Tamadoni Jahromi S. and Rahimzadeh M. 2014. Persian Gulf is a bioresource of potent L-asparaginase producing bacteria: Isolation and molecular differentiating. International Journal of Environmental Research, 8(3): 813–818.

Izadpanah Qeshmi F., Rahimzadeh M., Javadpour S. and Poodat M. 2015. Intracellular L-asparaginase from *Bacillus* sp. PG02: Purification, biochemical characterization and evaluation of optimum pH and temperature. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 12(1): 12–19.

Jiao L., Chi H., Lu Z., Zhang C., Chia Shir R., Show Pau L., Tao Y. and Lu F. 2020. Characterization of a novel type I l-asparaginase from *Acinetobacter* soli and its ability to inhibit acrylamide formation in potato chips. Journal of Bioscience and Bioengineering, 129(6): 672–678.

Kishore V., Nishita K. and Manonmani H. 2015. Cloning, expression and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* for large scale production in *E. coli* BL21. Biotechnology, 5(6): 975–981.

Kornbrust A., Stringer A., Lange K., Hendriksen H., Whitehurst R. and Oort M. 2010. Asparaginase- an enzyme for acrylamide reduction in food products. Enzymes in Food Technology, 2: 59–87.

Koster F. 2007. Development and application of *Aspergillus niger* asparaginase to prevent the formation of acrylamide in food products. Annuals of Nutrition and Metabolism, 5(1): 393–398.

Kumar M., Shimray C., Indrani D. and Manonmani H. 2014. Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-asparaginase treatment. Food and Bioprocess Technology, 7(3): 741–748.

Lopes W., Santos F., Sampaio Andre F.G.A., Fontao P., Nascimento J., Jurgilas B., Torres G., Da Silva Bon P., Almeida R. and Ferrara M. 2019. Expression, purification, and characterization of asparaginase II from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 159: 21–26.

Mahajan R., Saran S., Kameswaran K., Kumar V. and Saxena R. 2012. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. Bioresource Technology, 125: 11–16.

Martin S., Dehler C. and Krol E. 2016. Transcriptomic responses in the fish intestine. Developmental and Comparative Immunology, 64: 103–117.

Migaw S., Ghrairi T., Belguesmia Y., Choiset Y., Berjeaud J., Chobert J., Hani K. and Haertle T. 2014. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. World Journal Microbiology Biotechnology, 30(4): 1207–1217.

Mohammed K., Rohit P., Abdussamad E., Abdul A., Vase Vinay K. and Bharadiya Sangita A. 2018. Reproductive biology, diet and feeding pattern of longtail tuna *Thunnus tonggol* (Bleeker, 1851) in the north-eastern Arabian Sea off Gujarat, India. Indian Journal of Fisheries, 65(2): 16–25.

Narayana K., Kumar K. and Vijayalakshmi M. 2008. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. Indian Journal of Microbiology, 48(3): 331–336.

Pidiyar Vyankatesh J., Jangid K., Patole Milind S. and Shouche Yogesh S. 2004. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16S ribosomal RNA gene analysis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 70(6): 597–603.

Rajan S. and Deivasigamani B. 2018. Screening, production and characterization of extracellular glutaminase free L-asparaginase producing endo-symbiontic bacteria from the gut of *Mugil cephalus* (mullet fish). Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology, 4(3): 288–292.

Sahu M.K., Sivakumar K., Poorani E., Thangaradjou T. and

Kannan L. 2007a. Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. Journal of Environmental Biology, 28(2): 465–474.

Sahu M.K., Poorani E., Sivakumar K., Thangaradjou T. and Kannan L. 2007b. Partial purification and anti-leukemic activity of L-asparaginase enzyme of the actinomycete strain LA-29 isolated from the estuarine fish, *Mugil cephalus* (Linn.). Journal of Environmental Biology, 28(3): 645–650.

Sanghvi G., Bhimani K., Vaishnav D., Oza T., Dave G., Kunjadia P. and Sheth N. 2016. Mitigation of acrylamide by l-asparaginase from *Bacillus subtilis* KDPS1 and analysis of degradation products by HPLC and HPTLC. SpringerPlus, 5(1): 1–11 (533).

Shi R., Liu Y., Mu Q., Jiang Z. and Yang S. 2017. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes. International Journal of Biological Macromolecules, 96: 93–99.

Sun Z., Qin R., Li D., Ji K., Wang T., Cui Z. and Huang Y. 2016. A novel bacterial type II l-asparaginase and evaluation of its enzymatic acrylamide reduction in French fries. International Journal of Biological Macromolecules, 92: 232–239.

Zuo S., Zhang T., Jiang B. and Mu W. 2015. Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable L-asparaginase during French fries processing. Extremophiles, 19(4): 841–851.

Zyzak D., Sanders R., Stojanovic M., Tallmadge D., Eberhart B., Ewald D., Gruber D., Morsch T., Strothers M. and Rizzi G. 2003. Acrylamide formation mechanism in heated foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(16): 4782–4787.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 10, No. 4, Winter 2023

Research Paper

Isolation and identification of L-asparaginase producing bacteria from intestinal bacterial flora of *Liza klunzingeri* (Day, 1888) and *Thunnus tonggol* (Bleeker, 1851)

Fatemeh Izadpanah Qeshmi[1], Ahmad Homaei[2]*, Khosro Khajeh[3], Ehsan Kamrani[4], Pedro Fernandes[5]

Received: January 2021 Accepted: May 2022

Abstract

Bacterial L-asparaginase is used as an anti-neoplastic drug for chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia and to process cooked or fried foods for prevention of acrylamide formation. Therefore, this enzyme is utilized for controlling and preventing cancer wildly. The aim of the present study was the isolation and identification of potential bacteria producing L-asparaginase from the intestines of *Liza klunzingeri* and *Thunnus tonggol*. Accordingly, 44 bacterial strains were initially isolated from those fishes' intestines using nutrient agar medium. Then, L-asparaginase-producing bacteria were screened using M9 specific solid culture medium, which led to the identification of 20 potential L-asparaginase producing strains. Enzyme production by the isolated bacteria was afterwards evaluated, using as reference enzyme activity. Two strains that displayed the higher enzyme activities, 311 and 284 µmol/min, were selected and identified as *Pseudomonas aeruginosa* strain HR03 and *Pseudomonas stutzeri* strain HR04, respectively, by 16S rRNA gene sequence analysis. Overall, the results of this study showed that the intestinal bacterial flora *of L. klunzingeri* and *T. tonggol* are promising biological reservoir for the isolation of L-asparaginase producing bacteria. Additionally, marine bacteria *P. aeruginosa* strain HR03 and *P. stutzeri* strain HR04 are foreseen as potential bacterial producers of L-asparaginase with application in the pharmaceutical and food industries.

Key words: *L-asparaginase*, Pseudomonas, *Intestinal Bacterial*, *Persian Gulf*.

1- Ph.D. in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.
2- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.
3- Professor in Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4- Professor in Fisheries Department, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
5- Associate Professor in Department of Bioengineering, Institute for Bioengineering and Biosciences (IBB), Instituto Superior Tecnico, University of Lisbon, Lisbon, Portugal.

*Corresponding Author: a.homaei@hormozgan.ac.ir
DOI: 10.22124/japb.2022.21395.1453