

Optimization of L-asparaginase Production from a *Lactobacillus* sp. isolated from Traditional Dairy Products

Behnush Dinarvand

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran, biotechnush@yahoo.com

Parisa Fathi Rezaei*

Department of Biology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran, parisafathirezaei@gmail.com

Neda Akbari

Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran, akbari.ne@gmail.com

Abstract

Introduction: Asparaginase catalyzes the deamination of asparagine into aspartate and ammonia. Currently, it is used as an important chemotherapeutic agent for the treatment of different cancers such as acute lymphoblastic leukemia, malignant diseases of the lymphoid system, and Non-Hodgkin Lymphoma (NHL). Asparaginase is a useful enzyme for the food industry due to its potential to prevent acrylamide formation and to maintain the quality of the food. Probiotic products contain useful bacteria that have beneficial effects on health. The most important biological properties of probiotics include the elimination of mutagenic and carcinogenic agents. There are many microorganisms that could potentially function as the probiotic, the most common of which are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. The aim of this study was to optimize the production of L-asparaginase from isolated *Lactobacillus* sp. from the traditional whey of Maragheh.

Materials and methods: The isolate was investigated through microbial and biochemical tests including gram staining, catalase and oxidase activity, fermentation of carbohydrates, and acid and bile salts resistance. Asparaginase production was evaluated by qualitative and quantitative methods, rapid plate assay, and Imada method, respectively. Asparaginase production was optimized by the Response Surface Method (RSM).

Results: According to the RSM results, the highest activity of asparaginase was 131 U/mg, which was 11% more than the non-optimized condition. The optimized parameters composed of asparagine (1.75 %), glucose (2 %), and yeast extract (1.25 %). Furthermore, the total protein content and biomass of the optimized medium were 0.893 mg/ml and 0.345 g, respectively.

Discussion and conclusion: This isolated lactobacilli strain may be considered as a significant source for the production of the enzyme with the pharmacological value of asparaginase.

Key words: L-Asparagine, Acrylamide, Pharmaceutical Enzyme, Acute Lymphoblastic Leukemia, Nitrogen Metabolism.

* Corresponding author

Received: March 15, 2020 / **Accepted:** June 7, 2020

فصل نامه زیست شناسی میکروارگانیسم ها
معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان
سال نهم، شماره ۳۴، تابستان ۱۳۹۹، صص ۷۱-۸۶
نوع مقاله: پژوهشی
تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۸
doi: [10.22108/BJM.2020.121143.1283](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.121143.1283)

بهینه سازی تولید آسپاراژیناز از سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات لبنی سنتی

پهنوش دیناروند: کارشناس ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران، biotechnush@yahoo.com
پریسا فتحی رضایی*: استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران، parisafathirezai@gmail.com
ندا اکبری: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران، akbari.ne@gmail.com

چکیده

مقدمه: آنزیم آسپاراژیناز تجزیه آسپاراژین به آسپارتیک اسید و آمونیاک را کاتالیز می کند. به تازگی آنزیم آسپاراژیناز به شکل داروی شیمی درمانی مهم برای درمان سرطان های مختلف مانند لوسمی لنفوبلاستی، بیماری های بدخیم دستگاه لنفی و لنفوم غیر هوچکینی (NHL) استفاده می شود. آسپاراژیناز به علت داشتن پتانسیل جلوگیری از تولید آکریل آمید و حفظ کیفیت غذا، آنزیمی مفید در صنایع غذایی است. محصولات پروبیوتیکی حاوی باکتری های مفید هستند که آثار مفیدی بر سلامتی دارند. یکی از مهم ترین ویژگی های زیستی پروبیوتیک ها، خنثی سازی عوامل جهش زا و سرطان زاست. ریز موجودات بسیاری پتانسیل پروبیوتیکی دارند که گونه های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم از معمول ترین آنها به شمار می آیند. هدف مطالعه حاضر، بهینه سازی تولید آسپاراژیناز از سویه لاکتوباسیل جدا شده از آب پنیر سنتی شهرستان مراغه است.

مواد و روش ها: به منظور بررسی سویه یاد شده از آزمایش های تشخیصی از جمله آزمایش های میکروبی و بیوشیمیایی شامل رنگ آمیزی گرم، فعالیت کاتالازی و اکسیدازی، تخمیر قندها و مقاومت به اسید و نمک های صفراوی استفاده شد. تولید آسپاراژیناز با استفاده از روش های کیفی و کمی به ترتیب سنجش سریع با پلیت و ایمادا بررسی شد. تولید آنزیم آسپاراژیناز به روش پاسخ در سطح بهینه شد.

نتایج: نتایج بهینه سازی به روش پاسخ در سطح نشان دادند بیشترین فعالیت آسپاراژیناز در حضور گلوکز ۲ درصد، عصاره مخمر ۱/۲۵ درصد و آسپاراژین ۱/۷۵ درصد به میزان ۱۳۱ واحد بر میلی گرم است و میزان تولید ۱۱ درصد نسبت به شرایط غیر بهینه بیشتر است. میزان پروتئین کل و زیست توده در محیط بهینه به ترتیب ۰/۸۹۳ میلی گرم بر میلی لیتر و ۰/۳۴۵ گرم بود.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس نتایج، احتمالاً سویه لاکتوباسیل بررسی شده می تواند منبع مناسبی برای تولید آنزیم با ارزش دارویی آسپاراژیناز باشد.

واژه های کلیدی: آسپاراژین، آکریل آمید، آنزیم دارویی، لوسمی لنفوبلاستی حاد، متابولیسم نیتروژن

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

ریزموجودات محصولات باارزشی مانند ماکرومولکول‌ها یا مولکول‌های کوچک‌تر نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها و بسیاری از محصولات مهم را تولید می‌کنند (۱). آنزیم اسپاراژیناز (آسپاراژین آمیدو هیدرولاز، E.C. 3.5.1.1) از جمله آنزیم‌های دارویی دارای خاصیت آنتی‌نئوپلاستیک است که سال‌هاست مدنظر دانشمندان قرار گرفته است. آنزیم یادشده به شکل داروی ترکیبی شیمی‌درمانی برای درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) در بزرگسالان و کودکان و لنفوم غیرهوچکینی (NHL) در کودکان استفاده می‌شود. آنزیم اسپاراژیناز واکنش هیدرولیز آمینواسید اسپاراژین به آسپارتیک‌اسید و آمونیاک را کاتالیز می‌کند (۲). اسپاراژیناز در صنایع غذایی به منظور حذف آکریل‌آمید و حفظ کیفیت غذا استفاده می‌شود. مواد غذایی غنی از مواد قندی و آمینواسید (به‌ویژه آن دسته که حاوی اسپاراژین هستند) در مراحل پخت، سرخ کردن و کباب کردن در دمای زیاد، محصول جانبی خطرناک و سرطان‌زایی به نام آکریل‌آمید را طی واکنش میلارد تولید می‌کنند (۳). آنزیم اسپاراژیناز به‌طور گسترده در گیاهان، حیوانات و ریزموجودات یافت می‌شود؛ در حالی که انسان این آنزیم را ندارد (۴). آنزیم‌های جداشده از منابع میکروبی پایداری بیشتری نسبت به منابع حیوانی و گیاهی دارند (۵). بیشتر منابع میکروبی آنزیم اسپاراژیناز به‌طور طبیعی درون سلولی و مقدار کمی برون سلولی هستند. از دیدگاه صنعتی، ترشح آنزیم به بیرون از سلول بسیار مناسب‌تر، روند خالص‌سازی و

تخلیص آنزیم آسان‌تر و از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه است (۶). فضای پری‌پلاسمی در باکتری‌های گرم مثبت وجود ندارد و آنزیم‌ها را به‌طور چندگانه به محیط ترشح می‌کنند؛ بنابراین، باکتری‌های گرم مثبت برای استخراج آنزیم برون سلولی مناسب‌تر هستند. در تولید صنعتی آنزیم اسپاراژیناز، منابع باکتریایی برای درمان بیماری لوسمی لنفوبلاستی حاد و لنفوم غیرهوچکینی استفاده می‌شوند (۷).

طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) و سازمان خواربار جهانی (Food and Agriculture Organization of the United Nations)، پروبیوتیک‌ها عبارتند از: ریزموجودات زنده‌ای که وقتی به میزان کافی مصرف شوند، تأثیر مثبتی بر سلامت میزبان دارند. پروبیوتیک‌ها با قرار گرفتن در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آن تغییر دهند و با فعالیت خود مانع از فعالیت ریزموجودات غیرمفید و بیماری‌زا شوند (۸). سالیان متمادی است که باکتری‌های مولد لاکتیک‌اسید برای تولید غذاهای تخمیرشده و محصولات لبنی استفاده می‌شوند. محصولات تخمیرشده حاوی مقادیر متنوعی از ریزموجودات تخمیرکننده متعلق به جنس‌ها و گونه‌های مختلف هستند که همگی لاکتیک‌اسید را تولید می‌کنند (۹).

باکتری‌های لاکتیک‌اسید از مهم‌ترین پروبیوتیک‌ها به‌شمار می‌آیند که برخی گونه‌های آنها بی‌ضرر هستند و در فهرست استاندارد Generally Recognized as Safe قرار دارند (۱۰). امروزه، لاکتوباسیلوس‌ها متداول‌ترین موجوداتی هستند که در تولید محصولات

و والین هستند که کمتر در سایر محصولات غذایی یافت می‌شوند (۱۴).

روش پاسخ در سطح (RSM)، مجموعه‌ای از روش‌های آماری و ریاضی برای توسعه، بهبود و بهینه‌سازی فرایندهای مختلف است که در آن، پاسخ متقابل تحت تأثیر چندین متغیر قرار دارد و هدف، بهینه‌شدن پاسخ است. برنامه RSM، برنامه کاربردی مهمی در طراحی، توسعه و فرموله کردن محصولات جدید و بررسی اثر متغیرهای مستقل به تنهایی یا به طور ترکیبی در بهبود طراحی محصول موجود است (۱۵).

مراغه در دامنه جنوبی کوه سهند واقع شده است و امکان تولید شیر گوسفندی در مراتع این شهرستان وجود دارد؛ از این رو، تولید پنیر محلی در روستاهای شهرستان از دیرباز مرسوم بوده است و هیچ سویه تجاری در تهیه آن استفاده نمی‌شود. این نوع پنیر به علت داشتن طعم و قوام بهتر نسبت به انواع پاستوریزه و صنعتی، طرفداران زیادی دارد و مصرف آن در منطقه زیاد است.

در پژوهش حاضر، بهینه‌کردن تولید آسپاراژیناز از طریق سویه لاکتوباسیل جدا شده از آب پنیر سنتی شهرستان مراغه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، غنی‌سازی و جداسازی: سه نمونه آب پنیر محلی شهرستان مراغه خریداری و به آزمایشگاه منتقل شد؛ این محصولات کاملاً بومی بودند و هیچ سویه تجاری در تهیه آنها استفاده نشده بود. در پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی سویه‌های پروبیوتیک مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره

پروبیوتیکی به کار می‌روند (۸). به تازگی، پروبیوتیک‌ها برای درمان ناهنجاری‌های روده‌ای مانند تحمل‌نداشتن نسبت به لاکتوز، التهاب معده‌ای - روده‌ای حاد، آلرژی غذایی، آرتريت روماتوئید و سرطان کولون مطرح شده‌اند (۱۱). پروبیوتیک‌ها توانایی تحریک سیستم ایمنی و تقویت پاسخ ایمنی بدن را دارند (۱۲).

آب پنیر محصول جانبی تولید پنیر و دلمه است که محصولی زائد شناخته می‌شود. کشف آب پنیر با عنوان غذای کاربردی سبب افزایش تولید آب پنیر (محصول مشترک در فرایند تولید پنیر) شده است. امروزه، پروتئین‌های آب پنیر در سطح وسیعی برای بهبود کیفیت فیزیکی و حسی محصولات غذایی استفاده می‌شوند؛ بنابراین با استفاده از روش‌های مختلف از جمله فناوری‌های غشایی، ترکیبات تغلیظ‌شده‌ای مانند کنسانتره پروتئینی آب پنیر را از آب پنیر تولید می‌کنند که کاربرد پروتئین‌های آب پنیر را در محصولات غذایی تسهیل می‌کند. شیر دارای دو منبع اصلی پروتئین شامل کازئین و آب پنیر است که کازئین مسئول دلمه‌شدن است و آب پنیر در محیط باقی می‌ماند. ترکیبات آب پنیر عبارتند از: بتا-لاکتوگلوبولین، آلفا-لاکتوآلبومین، آلبومین سرم گاوی، لاکتوفرین، ایمونوگلوبولین‌ها، آنزیم لاکتوپراکسیداز، گلیکوماکروپپتید، لاکتوز و مواد معدنی. آب پنیر جدا شده از آبدوغ در مقایسه با پنیر دارای اسفنگومیلین است (۱۳). پروتئین‌های آب پنیر سه نقش طعم‌دهندگی، عملکردی و تغذیه‌ای را دارند؛ از نظر تغذیه‌ای، پروتئین‌های آب پنیر دارای کیفیت و ارزش زیستی زیاد و مقادیر زیادی از آمینواسیدهای دارای زنجیره جانبی شاخه‌دار مانند ایزولوسین، لوسین

اندازه‌گیری شد (۱۲).

بررسی تولید آنزیم آسپاراژیناز: به منظور بررسی تولید آنزیم آسپاراژیناز و غربال‌گری سویه تولیدکننده آنزیم از روش کیفی سنجش سریع با پلیت استفاده شد؛ به این ترتیب که پلیت‌ها حاوی محیط کشت MRS با گلوکز ۱ درصد و شناساگر فنل‌رد (۰/۰۰۵ گرم در لیتر) بودند و تغییر رنگ پلیت‌ها به سمت رنگ قرمز در هر روز ثبت شد. سنجش کمی به روش ایمادا^۱ و بر اساس اندازه‌گیری میزان محصول واکنش آنزیمی (آمونیاک) انجام شد. آمونیاک آزاد شده در محیط واکنش در مجاورت معرف نسلر و به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۶). میزان ۵۰ میکرولیتر آسپاراژین ۰/۰۴ مولار، ۵۰ میکرولیتر بافر تریس ۰/۱ مولار (اسیدیته ۸/۲)، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی (محلول رویی) و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد؛ سپس ۵۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۱/۵ مولار برای توقف واکنش به ترکیب اضافه شد. مقدار ۳۷۰ میکرولیتر آب مقطر و ۲۰ میکرولیتر معرف نسلر به ۱۰ میکرولیتر از محلول یادشده اضافه شد و پس از گرماگذاری در دمای محیط به مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام و سپس میزان جذب محلول رویی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محلول سولفات آمونیوم ۱۰ میلی‌مولار برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد (شکل ۱). یک واحد آنزیم آسپاراژیناز عبارتست از: مقدار آنزیم لازم برای آزاد کردن یک میکرومول آمونیاک در هر دقیقه در

۱۹۴۵۹ «میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک-ویژگی‌ها و روش آزمون (برون تن)» انجام شد (۱۲). به منظور غنی‌سازی و جداسازی نمونه‌ها از محیط کشت MRS براث و MRS آگار استفاده شد که محیط اختصاصی برای رشد و جداسازی پروبیوتیک‌هاست. به منظور جداسازی، ابتدا رقت‌های مختلف از کشت‌های اولیه تهیه و با بررسی پلیت‌های هر رقت، از کلنی‌های با ظاهر متفاوت تا دو بار پاساژ انجام شد. کلنی‌های به دست آمده از نظر آزمون گرم، آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز، همولیز، مقاومت به اسید و نمک صفراوی بررسی شدند و از تمام سویه‌های بررسی شده، استوک تهیه شد.

بررسی مقاومت به اسید: اساس این روش بر بررسی مقاومت ریز موجود در شرایط اسیدی قرار دارد که با کشت ریز موجود در محیط MRS براث با اسیدیته‌های ۲ و ۳ انجام و پس از گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب، تعداد ریز موجود باقیمانده روی محیط MRS آگار شمارش می‌شود (برای سویه‌های پروبیوتیک نباید میزان بقا کمتر از 10^6 باشد) (۱۲).

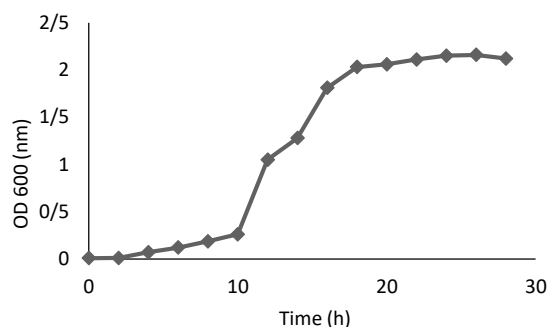
بررسی مقاومت به نمک صفراوی: اساس این روش بر بررسی مقاومت و میزان رشد ریز موجود در حضور نمک صفراوی قرار دارد. مطابق روش یادشده از دو سری محیط کشت MRS براث استفاده شد: محیط اول مطابق با دستور شرکت سازنده ساخته و محیط دوم حاوی ۰/۳ درصد نمک اگزالات سدیم بود. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر دو سری محیط کشت استریل اضافه و سپس جذب نوری هر دو محیط قبل و هشت ساعت پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۶۰۰ نانومتر

بهینه‌سازی تولید آنزیم اسپاراژیناز: به منظور تعیین سطوح عوامل بهینه‌سازی به روش پاسخ در سطح، ابتدا اثر چندین متغیر شامل میزان تلقیح (۱، ۲ و ۳ درصد)، گلوکز (۱، ۲ و ۳ درصد)، اسپاراژین (۱، ۲ و ۳ درصد)، سوکروز (۱ و ۲ درصد)، عصاره مخمر (۰/۵، ۱ و ۲ درصد)، پیتسون (۰/۵ و ۱ درصد) و دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات (۰/۳، ۰/۵ و ۱ درصد) به شکل تک‌متغیر در یک زمان بر میزان تولید آنزیم اسپاراژیناز بررسی شد. اثر سه عامل اسپاراژین (۰/۳۲، ۱، ۱/۷۵، ۲ و ۲/۵ درصد)، عصاره مخمر (صفر، ۰/۵، ۱/۲۵، ۲ و ۲/۵ درصد) و گلوکز (۰/۵، ۱، ۱/۷۵، ۲ و ۳ درصد) با استفاده از روش پاسخ در سطح روش تحلیلی Central Composite با نرم‌افزار Design-Expert 7.0.0 بررسی شد (جدول ۱)؛ سپس اثر متقابل عوامل گلوکز ۲ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد و ال-اسپاراژین ۱ درصد به‌طور هم‌زمان بر تولید آنزیم بررسی شد.

مدت زمان و شرایط آزمایش. رابطه ۱ برای محاسبه فعالیت آنزیم به کار رفت (۱۲):
(رابطه ۱)

$$\text{Units/ml enzyme} = (\text{mM NH}_3)(0.25) / (0.01)(30)(0.05)$$

که در این رابطه، آمونیاک آزاد شده بر حسب میلی‌مولار، ۰/۲۵ حجم آغازین واکنش بر حسب میلی‌لیتر، ۰/۰۱ حجم نهایی ترکیب واکنش بر حسب میلی‌لیتر، ۳۰ زمان گرماگذاری بر حسب دقیقه و ۰/۰۵ حجم آنزیم استفاده شده بر حسب میلی‌لیتر است.



شکل ۱- نمودار رشد باکتری طی ۲۴ ساعت

جدول ۱- آزمایش‌های پیشنهادی حاصل از نتایج تحلیل به روش پاسخ در سطح (مقادیر بر حسب درصد)

آزمایش	گلوکز	عصاره مخمر	اسپاراژین	آزمایش	گلوکز	عصاره مخمر	اسپاراژین
۱	۱/۰۰	۰/۵۰	۱/۰۰	۱۱	۱/۰۰	۲/۰۰	۱/۰۰
۲	۲/۰۰	۱/۲۵	۱/۷۵	۱۲	۱/۰۰	۲/۰۰	۲/۵۰
۳	۱/۷۵	۱/۲۵	۰/۳۲	۱۳	۲/۰۰	۱/۲۵	۱/۷۵
۴	۳/۰۰	۰/۵۰	۲/۵۰	۱۴	۱/۰۰	۰/۵۰	۲/۵۰
۵	۰/۴۹	۱/۲۵	۲/۰۰	۱۵	۲/۰۰	۲/۵۱	۱/۷۵
۶	۳/۰۰	۲/۰۰	۲/۵۰	۱۶	۲/۰۰	۱/۲۵	۱/۷۵
۷	۳/۰۱	۱/۲۵	۲/۰۰	۱۷	۳/۰۰	۰/۵۰	۱/۰۰
۸	۳/۶۸	۱/۲۵	۱/۷۵	۱۸	۲/۰۰	۱/۲۵	۱/۷۵
۹	۳/۰۰	۲/۰۰	۱/۰۰	۱۹	۲/۰۰	-۰/۰۱*	۱/۷۵
۱۰	۲/۰۰	۱/۲۵	۱/۷۵	۲۰	۲/۰۰	۱/۲۵	۱/۷۵

*: بدون عصاره مخمر

سنجش پروتئین کل: میزان پروتئین کل نمونه‌ها به روش بردفورد^۲ اندازه‌گیری شد (۱۷). غلظت‌های متفاوت سرم آلبومین گاوی (صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) برای نمودار استاندارد استفاده شدند. میزان ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۷۵۰ میکرولیتر معرف بردفورد مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شد؛ سپس میزان جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد.

نتایج

جداسازی اولیه: نتایج جداسازی اولیه سویه تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز در جدول ۲ آورده شده‌اند. این سویه از نمونه آب پنیر سنتی شهرستان مراغه

جداسازی شده و با توجه به این اطلاعات، سویه جداسازی شده لاکتوباسیلوس است و پتانسیل پروبیوتیکی دارد. ظاهر کلنی پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی محیط کشت MRS آگار، صاف، محدب و کرمی‌رنگ بود. این سویه توانایی تخمیر چهار قند (گلوکز ۱ درصد، لاکتوز ۱ درصد، فروکتوز ۱ درصد و سوکروز ۱ درصد) را داشت و اسید تولید شده در این مسیر، رنگ محیط را از نارنجی به زرد تغییر داد. سیاه‌رنگ شدن محیط کشت SIM بیان‌کننده توان باکتری در تولید سولفید هیدروژن از ترکیبات محیط کشت است؛ حلقه تیره‌رنگ با اضافه کردن معرف کواکس نمایان شد که به معنای استفاده نکردن باکتری از تریپتوفان موجود در ترکیبات محیط کشت است (جدول ۳).

جدول ۲- نتایج جداسازی اولیه سویه تولیدکننده آنزیم

مقاومت به صفرا	مقاومت به اسید		همولیز	کاتالاز	اکسیداز	آزمون گرم	رقت جداسازی شده	ریخت‌شناسی
	اسیدیته ۲	اسیدیته ۳						
+	+	+	-	-	-	+	۱۰ ^{-۱۰}	باسیل

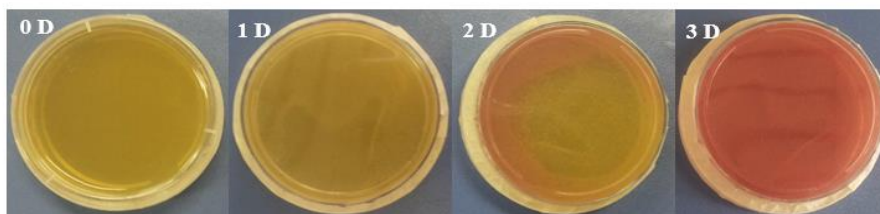
جدول ۳- آزمون‌های شناسایی میکروبی

نیترات	SIM			آزمون تخمیر قند				کد نمونه
	H ₂ S	اندول	حرکت	فروکتوز	لاکتوز	سوکروز	گلوکز	
+	+	-	-	+	+	+	+	W11

آسپاراژیناز، تغییر رنگ پلیت پس از کشت باکتری و گرماگذاری به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌طور روزانه بررسی شد. مطابق شکل ۲، تغییر رنگ محیط کشت پس از سه روز گرماگذاری در اطراف کلنی باکتری W11 مشاهده شد.

نمودار رشد باکتری: نمودار رشد باکتری طی ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شکل ۱ آمده است.

سنجش کیفی فعالیت آنزیم: اساس این روش بر تغییر اسیدیته محیط کشت است. به‌منظور غربال‌گری اولیه و بررسی توانایی سویه جداسازی شده در تولید آنزیم



شکل ۲- سنجش کیفی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز سویه W11 (از چپ به راست: روزهای صفر، یک، دو و سه)

نتایج سنجش کمی

بهینه‌سازی تک‌متغیر در یک زمان: به منظور تعیین سطوح بهینه و دقیق‌تر بهینه‌سازی به روش پاسخ در سطح، ابتدا اثر چندین متغیر به شکل تک‌متغیر در یک زمان بر میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز بررسی شد. نتایج نشان دادند از میان عوامل بررسی شده، غلظت

گلوکز ۲ درصد مؤثرترین عامل در تولید آنزیم آسپاراژیناز با میزان فعالیت ۱۱/۶۹ واحد بر میلی‌گرم است. نتایج سنجش فعالیت آنزیم، پروتئین کل و میزان رشد باکتری در بهینه‌سازی تک‌متغیر در یک زمان عوامل بررسی شده حاصل از سه تکرار مستقل در جدول ۴ ارائه شده‌اند.

جدول ۴- نتایج تک‌متغیر در یک زمان محیط کشت تغییر یافته MRS بر میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز در دومین روز

وزن خشک (گرم)	وزن تر (گرم)	پروتئین کل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	فعالیت آنزیم (واحد بر میلی‌گرم)	متغیر
۰/۰۷۲۱ ± ۰/۰۰۲	۰/۲۸۹ ± ۰/۰۴	۰/۷۸۹ ± ۰/۰۲	۱۰/۶۱ ± ۰/۰۱۸	تلقیح ۱ درصد
۰/۰۸۱۲ ± ۰/۰۰۵	۰/۳۷۱ ± ۰/۰۲	۰/۸۰۹ ± ۰/۰۳	۱۰/۴۷ ± ۰/۰۲۱	تلقیح ۲ درصد
۰/۱۱۴ ± ۰/۰۴	۰/۳۵۰۱ ± ۰/۰۵	۰/۸۳۲ ± ۰/۰۲	۱۱/۵۸ ± ۰/۰۱۷	تلقیح ۳ درصد
۰/۰۷۰۵ ± ۰/۰۰۲	۰/۳۲۱ ± ۰/۰۳	۰/۶۹۲ ± ۰/۰۱	۱۱/۰۱ ± ۰/۰۰۶	گلوکز ۱ درصد
۰/۰۷۱۶ ± ۰/۰۰۵	۰/۳۴۲۸ ± ۰/۰۲	۰/۶۸۸ ± ۰/۰۲	۱۱/۶۹ ± ۰/۰۰۲	گلوکز ۲ درصد
۰/۰۷۲۱ ± ۰/۰۰۴	۰/۳۱۱ ± ۰/۰۴	۰/۷۱۷ ± ۰/۰۰۳	۵/۴۳ ± ۰/۰۰۵	گلوکز ۳ درصد
۰/۰۹۲۴ ± ۰/۰۰۲	۰/۳۲۲ ± ۰/۰۵	۰/۷۹۸ ± ۰/۰۱	۱۰/۴۱ ± ۰/۰۰۲	سوکروز ۱ درصد
۰/۰۸۸۶ ± ۰/۰۰۴	۰/۳۲۹ ± ۰/۰۳	۰/۷۷۲ ± ۰/۰۵	۶/۳۹ ± ۰/۰۰۳	سوکروز ۲ درصد
۰/۰۸۸۲ ± ۰/۰۰۲	۰/۲۸۹۳ ± ۰/۰۲	۰/۹۶۱ ± ۰/۰۲	۸/۶۸ ± ۰/۰۰۷	عصاره مخمر ۰/۵ درصد
۰/۰۷۲۶ ± ۰/۰۰۳	۰/۲۷۲۸ ± ۰/۰۲	۰/۸۹۷ ± ۰/۰۴	۷/۸۸ ± ۰/۰۱۹	عصاره مخمر ۱ درصد
۰/۰۷۷۲ ± ۰/۰۰۴	۰/۲۵۷۱ ± ۰/۰۴	۰/۸۲۷ ± ۰/۰۰۶	۸/۶ ± ۰/۰۰۷	عصاره مخمر ۲ درصد
۰/۰۹۹۳ ± ۰/۰۰۲	۰/۳۳۲۵ ± ۰/۰۲	۰/۸۰۰ ± ۰/۰۳	۱۰/۳ ± ۰/۰۰۵	پیتون ۰/۵ درصد
۰/۰۹۲۱ ± ۰/۰۰۲	۰/۳۲۴۱ ± ۰/۰۴	۰/۸۴۹ ± ۰/۰۴	۹/۳۳ ± ۰/۰۰۵	پیتون ۱ درصد
۰/۰۷۸۵ ± ۰/۰۰۲	۰/۳۲۱۲ ± ۰/۰۳	۰/۸۲۰ ± ۰/۰۱۲	۱۱/۰۴ ± ۰/۰۰۷	ال-آسپاراژین ۱ درصد
۰/۰۷۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۳۱۰۵ ± ۰/۰۳	۰/۷۹۸ ± ۰/۰۵	۱۰/۵۳ ± ۰/۰۰۶	ال-آسپاراژین ۲ درصد
۰/۰۷۶۲ ± ۰/۰۰۴	۰/۳۱۱۴ ± ۰/۰۳	۰/۷۷۲ ± ۰/۰۳	۱۰/۰۱ ± ۰/۰۰۶	ال-آسپاراژین ۳ درصد
۰/۰۷۲۱ ± ۰/۰۰۲	۰/۳۴۲۵ ± ۰/۰۳	۰/۷۵۸ ± ۰/۰۴	۹/۹۲ ± ۰/۰۰۳	دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۳ درصد
۰/۰۷۱۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۳۴۰۱ ± ۰/۰۳	۰/۷۸۰ ± ۰/۰۴	۷/۸۲ ± ۰/۰۰۵	دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۵ درصد
۰/۰۷۱۵ ± ۰/۰۰۴	۰/۳۳۸۹ ± ۰/۰۳	۰/۷۱۹ ± ۰/۰۱	۸/۷۱ ± ۰/۰۰۲	دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۱ درصد

نتایج ۲۰ آزمایش طراحی شده در شکل ۳ و جدول ۶ آورده شده‌اند. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در شرایط گلوکز ۲ درصد، عصاره مخمر ۱/۲۵ درصد و آسپاراژین ۱/۷۵ درصد (آزمایش شماره ۱۸) برابر ۱۳۰/۸۱ بود.

معادله نهایی فعالیت آنزیم کدشده نرم‌افزار عبارتست از:

$$\text{Enzyme activity (U/mg)} = +153.81 - 71.44 \times \text{glucose} + 72.35 \times \text{yeast extract} + 84.07 \times \text{asparagine} - 123.04 \times \text{glucose} \times \text{yeast extract} - 128.13 \times \text{glucose} \times \text{asparagine} + 124.70 \times \text{yeast extract} \times \text{asparagine}$$

معادله نهایی فعالیت آنزیم بر اساس مقادیر حقیقی

عوامل به شکل زیر است:

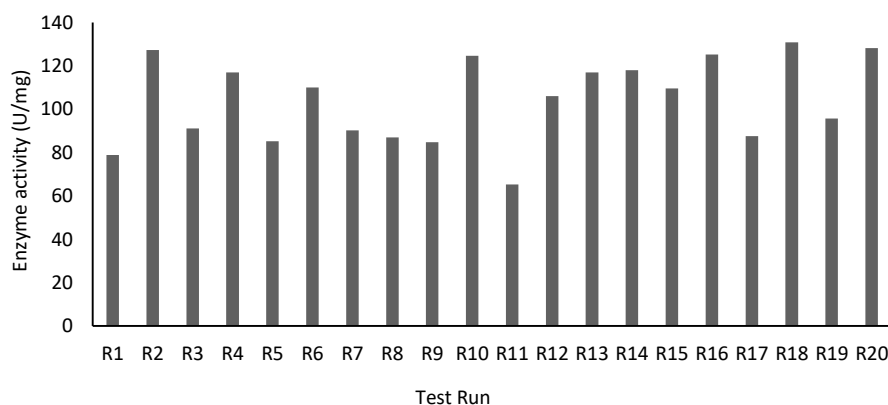
$$\text{Enzyme activity (U/mg)} = -543.17687 + 432.59069 \times \text{glucose} + 36.61934 \times \text{yeast extract} + 176.65775 \times \text{asparagine} - 164.05167 \times \text{glucose} \times \text{yeast extract} - 170.83833 \times \text{glucose} \times \text{asparagine} + 221.68667 \times \text{yeast extract} \times \text{asparagine}$$

بهینه‌سازی تولید آسپاراژیناز به روش پاسخ در سطح:

باتوجه به نتایج بهینه‌سازی تک‌متغیر در یک زمان و مطالعه‌های انجام‌شده، سه عامل گلوکز، عصاره مخمر و آسپاراژین عوامل مؤثر بر تولید آسپاراژیناز انتخاب و اثر این عوامل به کمک روش پاسخ در سطح در دو سطح تولید آنزیم و زیست‌توده باکتری با سه تکرار مستقل بررسی شد. مطابق اطلاعات جدول آنالیز واریانس (ANOVA)، مدل آزمایش مناسب دارای P Value کمتر از ۰/۰۵ است و P Value مدل آزمایش پاسخ در سطح تولید آنزیم برابر ۰/۰۲۰۱ و معنادار است. در بررسی درستی و دقت مدل ارائه‌شده برای تولید آنزیم، میزان F Value برابر ۳/۸۴ بود که نشان می‌دهد مدل معنادار است و تنها ۲/۰۱ درصد احتمال دارد این مدل تحت تأثیر خطا قرار گیرد؛ همچنین R^2 برابر ۰/۶۳ بود که خوب و رضایت‌بخش است (جدول ۵).

جدول ۵- تحلیل واریانس مدل پاسخ سطح برای تولید آسپاراژیناز

P-value	F-value	Mean of square	df	Sum of squares	Source
0.0201	3.84	1.024E+005	6	6.145E+005	Model
0.1302	2.61	69702.03	1	69702.03	A-glucose
0.1258	2.68	71488.61	1	71488.61	B-yeast extract
0.0797	3.61	96516.69	1	96516.96	c-asparagine
0.0529	4.54	1.211E+005	1	1.211E+005	AB
0.0450	4.92	1.313E+005	1	1.313E+005	AC
0.0502	4.66	1.244E+005	1	1.244E+005	BC



شکل ۳- نمودار نتایج آزمایش پاسخ در سطح برای بهینه‌سازی تولید ال-آسپاراژیناز

جدول ۶- نتایج آزمایش پاسخ در سطح برای بهینه‌سازی تولید آسپاراژیناز

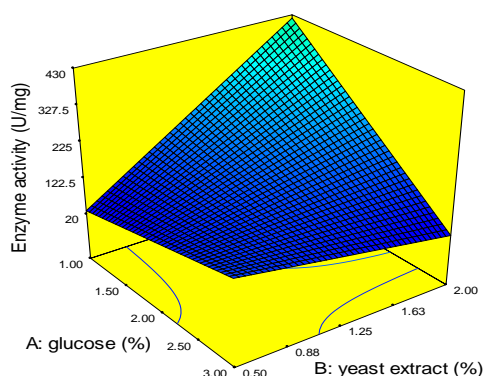
وزن خشک (گرم)	وزن تر (گرم)	پروتئین کل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	فعالیت آنزیم (واحد بر میلی‌گرم)	آزمایش پیشنهادی
۰/۰۵۲۱ ± ۰/۰۰۲	۰/۲۶۱۷ ± ۰/۰۳	۰/۸۶۸ ± ۰/۰۱	۷۸/۸۷ ± ۰/۰۱۲	شماره ۱
۰/۰۶۷۸ ± ۰/۰۳	۰/۳۲۳۵ ± ۰/۰۳	۰/۸۹۰ ± ۰/۰۲	۱۲۷/۲۱ ± ۰/۰۰۳	شماره ۲
۰/۰۴۲۵ ± ۰/۰۴	۰/۲۶۵۲ ± ۰/۰۴	۰/۷۸۷ ± ۰/۰۴	۹۱/۱۵ ± ۰/۰۰۲	شماره ۳
۰/۰۵۲۵ ± ۰/۰۴	۰/۱۷۷۷ ± ۰/۰۵	۰/۶۵۵ ± ۰/۰۰۵	۱۱۷/۰۱ ± ۰/۰۰۵	شماره ۴
۰/۰۳۸۵ ± ۰/۰۲	۰/۲۴۲۹ ± ۰/۰۳	۱/۱۳۵ ± ۰/۰۵	۸۲/۲۶ ± ۰/۰۰۲	شماره ۵
۰/۰۴۲۵ ± ۰/۰۴	۰/۳۵۳۳ ± ۰/۰۴	۰/۸۴۶ ± ۰/۰۲	۱۱۰/۰۶ ± ۰/۰۰۲	شماره ۶
۰/۰۳۲۷ ± ۰/۰۲	۰/۲۲۱ ± ۰/۰۴	۰/۹۴۵ ± ۰/۰۱	۹۰/۳۰ ± ۰/۰۰۵	شماره ۷
۰/۰۲۹۸ ± ۰/۰۴	۰/۲۷۶۳ ± ۰/۰۵	۰/۷۸۷ ± ۰/۰۳	۸۷/۰۳ ± ۰/۰۱۳	شماره ۸
۰/۰۹۵۳ ± ۰/۰۳	۰/۲۹۵۳ ± ۰/۰۲	۱/۱۴۶ ± ۰/۰۰۵	۸۴/۷۲ ± ۰/۰۰۵	شماره ۹
۰/۰۷۱۵ ± ۰/۰۲	۰/۴۰۳۲ ± ۰/۰۵	۰/۸۸۶ ± ۰/۰۲	۱۲۴/۵۵ ± ۰/۰۰۴	شماره ۱۰
۰/۰۸۰۷ ± ۰/۰۳	۰/۳۳۴۵ ± ۰/۰۶	۰/۹۵۰ ± ۰/۰۰۳	۶۵/۲۸ ± ۰/۰۰۴	شماره ۱۱
۰/۰۳۸۲ ± ۰/۰۲	۰/۲۹۹۵ ± ۰/۰۵	۱/۰۵۳ ± ۰/۰۴	۱۰۶/۰۲ ± ۰/۰۱۵	شماره ۱۲
۰/۰۶۵۹ ± ۰/۰۴	۰/۳۴۴۵ ± ۰/۰۵	۰/۹۵۰ ± ۰/۰۴	۱۱۶/۸۷ ± ۰/۰۰۸	شماره ۱۳
۰/۰۴۹۴ ± ۰/۰۳	۰/۳۰۹۲ ± ۰/۰۴	۰/۶۷۷ ± ۰/۰۲	۱۱۷/۹۳ ± ۰/۰۰۴	شماره ۱۴
۰/۰۳۹۸ ± ۰/۰۷	۰/۲۷۸۴ ± ۰/۰۳	۰/۹۹۸ ± ۰/۰۲	۱۰۹/۵۶ ± ۰/۰۰۶	شماره ۱۵
۰/۰۵۹۸ ± ۰/۰۳	۰/۳۲۸۳ ± ۰/۰۳	۰/۸۹۵ ± ۰/۰۴	۱۲۵/۱۴ ± ۰/۰۰۶	شماره ۱۶
۰/۰۵۱۲ ± ۰/۰۴	۰/۲۰۹۴ ± ۰/۰۴	۱/۰۳۸ ± ۰/۰۲	۸۷/۵۸ ± ۰/۰۰۳	شماره ۱۷
۰/۰۶۲۳ ± ۰/۰۲	۰/۳۳۶۱ ± ۰/۰۳	۰/۸۶۸ ± ۰/۰۴	۱۳۰/۸۱ ± ۰/۰۰۲	شماره ۱۸
۰/۰۲۹۴ ± ۰/۰۳	۰/۲۰۴ ± ۰/۰۵	۰/۴۹۹ ± ۰/۰۳	۹۵/۶۵ ± ۰/۰۰۷	شماره ۱۹
۰/۰۶۲۳ ± ۰/۰۴	۰/۳۳۸۱ ± ۰/۰۳	۰/۸۸۲ ± ۰/۰۲	۱۲۸/۱۲ ± ۰/۰۰۶	شماره ۲۰

بررسی اثر برهم‌کنش آسپاراژین، عصاره مخمر و گلوکز بر میزان فعالیت آنزیم آسپاراژیناز: منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و آسپاراژین بر تولید آنزیم آسپاراژیناز (شکل ۴، الف) در زمانی که اثر سایر متغیرها ثابت و در سطح صفر نگه داشته شده بود، نشان داد میزان تولید آنزیم با افزایش غلظت گلوکز به‌تنهایی از ۱ به ۳ درصد در حضور غلظت ۱ درصد آسپاراژین کاهش می‌یابد؛ در حالی که کاهش غلظت گلوکز در حضور افزایش غلظت آسپاراژین سبب افزایش چشمگیرتری در تولید آنزیم می‌شود. منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و عصاره مخمر بر تولید

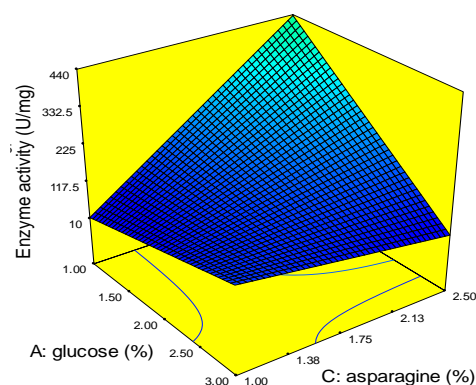
آنزیم آسپاراژیناز در شرایطی که اثر سایر متغیرها ثابت و در سطح صفر نگه داشته شده بود، در شکل ۴، ب نشان داده شده است. این منحنی بیان می‌کند افزایش غلظت گلوکز به‌تنهایی از ۱ به ۳ درصد در حضور عصاره مخمر ۰/۵ درصد تا حدودی سبب کاهش میزان تولید آنزیم در غلظت‌های زیاد گلوکز می‌شود؛ این درحالیست که افزایش غلظت عصاره مخمر سبب افزایش میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز می‌شود. منحنی یادشده بیان می‌کند کاهش غلظت گلوکز در حضور افزایش غلظت عصاره مخمر، اثر درخور توجهی بر تولید آنزیم دارد و میزان تولید آنزیم را افزایش می‌دهد.

می‌شود (شکل ۴، ج)؛ با وجود این، افزایش غلظت آسپاراژین در حضور افزایش غلظت عصاره مخمر سبب افزایش چشمگیر میزان تولید آنزیم می‌شود و بنابراین، آسپاراژین و عصاره مخمر در کنار هم، دو عامل تأثیرگذار بر تولید آنزیم هستند.

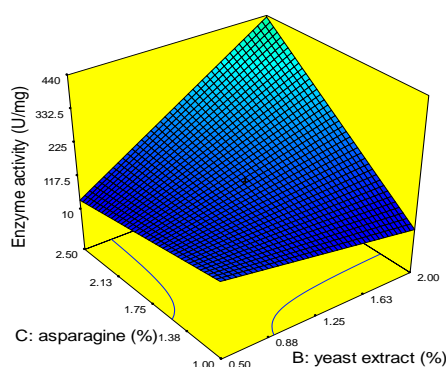
در بررسی اثر متقابل آسپاراژین و عصاره مخمر (الفاکننده اصلی و ماده مغذی مؤثر بر رشد باکتری)، منحنی سه‌بعدی پاسخ در سطح در زمانی که اثر سایر متغیرها ثابت و در سطح صفر نگه داشته شده بود، نشان داد اثر هر کدام از عوامل افزایش غلظت ال-آسپاراژین و عصاره مخمر به تنهایی سبب افزایش میزان تولید آنزیم



ب



الف



ج

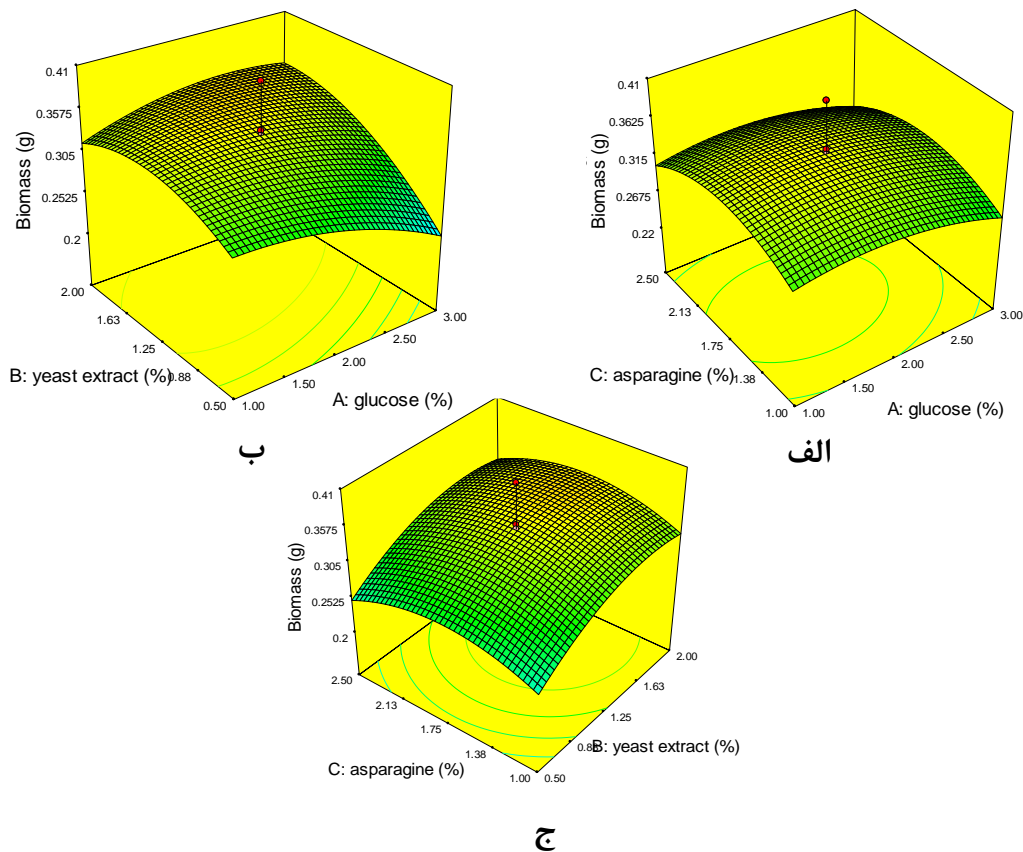
شکل ۴- منحنی سه‌بعدی نتایج بهینه‌سازی پاسخ در سطح تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز؛ الف. اثر برهم‌کنش گلوکز و ال-آسپاراژین بر میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز، ب. اثر برهم‌کنش گلوکز و عصاره مخمر بر میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز، ج. اثر برهم‌کنش عصاره مخمر و ال-آسپاراژین بر میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز

افزایش غلظت گلوکز از ۱ به ۳ درصد در حضور غلظت ۱ درصد آسپاراژین تأثیر چندانی بر میزان زیست‌توده باکتری نداشته باشد و این اثر در نتیجه افزایش غلظت آسپاراژین نیز تغییر نکند.

بررسی اثر برهم‌کنش آسپاراژین، عصاره مخمر و گلوکز بر میزان زیست‌توده: منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و آسپاراژین بر زیست‌توده باکتری در شکل ۵، الف نشان داده شده است؛ مطابق این منحنی، احتمال می‌رود

باکتری می‌شود؛ درحالی‌که در کاهش غلظت گلوکز در حضور افزایش عصاره مخمر احتمال می‌رود رشد باکتری به‌علت تأمین مواد غذایی و انرژی‌زا تا حدودی افزایش یابد.

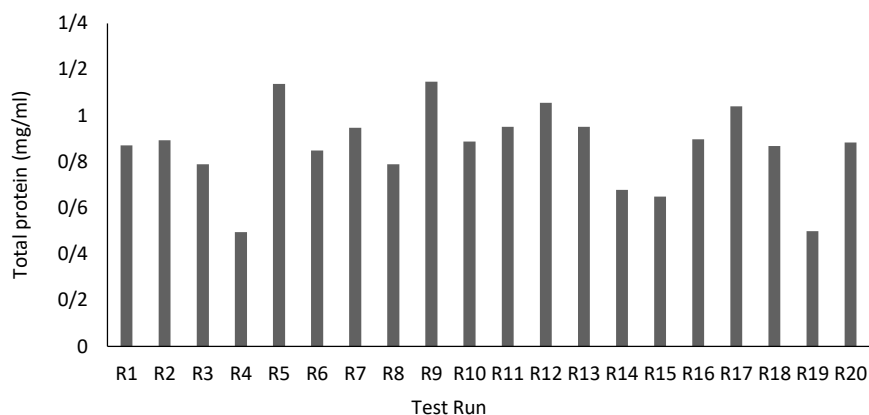
در بررسی اثر هم‌زمان دو عامل گلوکز و عصاره مخمر بر زیست‌توده باکتری و با توجه به منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و عصاره مخمر بر زیست‌توده باکتری (شکل ۵، ب)، افزایش غلظت گلوکز از ۰/۵ تا ۳ درصد در حضور عصاره مخمر ۰/۵ درصد سبب کاهش رشد



شکل ۵- منحنی سه‌بعدی نتایج پاسخ در سطح عوامل بهینه‌سازی بر میزان زیست‌توده باکتری؛ الف. اثر برهم‌کنش گلوکز و ال-آسپاراژین بر میزان زیست‌توده باکتری، ب. اثر برهم‌کنش گلوکز و عصاره مخمر بر میزان زیست‌توده باکتری، ج. اثر برهم‌کنش عصاره مخمر و ال-آسپاراژین بر میزان زیست‌توده باکتری

دارای ۳ درصد گلوکز، ۰/۵ درصد عصاره مخمر و ۲/۵ درصد آسپاراژین مربوط می‌شود؛ درحالی‌که میزان پروتئین کل در محیط کشت با بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز 0.1893 ± 0.02 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (شکل ۶).

سنجش پروتئین کل: بر اساس نتایج، بیشترین میزان تولید پروتئین (۱/۱۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به محیط کشت دارای ۳ درصد گلوکز، ۲ درصد عصاره مخمر و ۱ درصد آسپاراژین و کمترین میزان تولید پروتئین (۰/۴۷۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به محیط کشت



شکل ۶- میزان پروتئین کل، آزمایش‌های پیشنهادی نرم‌افزار پاسخ در سطح

بحث و نتیجه‌گیری

گلوکز یکی از منابع دردسترس، ضروری و مؤثر برای متابولیسم ریزموجودات است و بررسی اثر گلوکز بر رشد ریزموجودات مختلف بیان‌کننده افزایش رشد است؛ باوجود این در باکتری‌های لاکتیک‌اسید و به‌ویژه لاکتوباسیلوس‌ها، افزایش میزان قندها به‌ویژه گلوکز سبب فعال‌شدن مسیر سرکوب‌کننده کاتابولیک کربن می‌شود و نتیجه معکوس می‌دهد (۱۸). با توجه به اینکه سوئیه بررسی شده به خانواده باکتری‌های لاکتیک‌اسید تعلق دارد و این باکتری‌ها توانایی تخمیر منابع کربنی (گلوکز) را به اسید دارند، این اسید می‌تواند میزان رشد باکتری و در مقابل، میزان تولید آنزیم را کاهش دهد. وجود گلوکز در ترکیبات محیط‌کشت باکتری برای رشد باکتری لازم است و نمی‌توان آن را به‌طور کامل حذف کرد؛ در نتیجه، با توجه به سطح و میزان تولید تقریباً یکسان در دو روز متوالی، گلوکز ۱ درصد برای بهینه‌سازی تولید آنزیم نسبت به درصدهای دیگر مناسب‌تر است. گفتنی است باکتری در شرایط بحرانی و کمبود مواد مغذی و همیشه دردسترس، شروع به بیان آنزیم آسپاراژیناز می‌کند.

با توجه به ترکیبات محیط‌کشت، باکتری به‌منظور دستیابی به منبع انرژی جایگزین شروع به ترشح آنزیم آسپاراژیناز به بیرون از سلول (درون محیط‌کشت) می‌کند و با تجزیه آسپاراژین موجود در محیط‌کشت به آسپارتیک‌اسید و آمونیاک، سوکسینات از آسپارتیک‌اسید طی مسیر آنزیمی تولید و انرژی لازم برای بقای باکتری حاصل می‌شود؛ در این میان، آمونیاک در محیط‌کشت باقی می‌ماند و سبب افزایش اسیدیته و قلیایی‌شدن محیط‌کشت می‌شود (۱۹).

در سال ۱۹۷۰، بوک^۳ و همکاران با بررسی اثر گلوکز ۰/۵ درصد و تنش اکسیژن بر تولید آنزیم آسپاراژیناز در باکتری *شریشیا کلی* نشان دادند تولید آنزیم در شرایط هوازی کاهش می‌یابد؛ در حالی که در شرایط بی‌هوازی، میزان رشد باکتری در همین غلظت کاهش و تولید آنزیم آسپاراژیناز افزایش می‌یابد (۲۰). گاکیل^۴ و جنسر^۵ در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند غلظت‌های زیاد گلوکز دارای اثر مهاری بر تولید آنزیم آسپاراژیناز از *اتروباکتر آئروژنز*^۶ است. گلوکز ۱ درصد سبب مهار فعالیت آنزیم می‌شود؛ در حالی که تولید آنزیم در محیط‌کشت دارای گلوکز ۰/۱ درصد در مقایسه با

محیط کشت بدون گلوکز تحریک می‌شود (۲۱). عصاره مخمر، ترکیبی غنی از ویتامین‌ها، آمینواسیدها و مواد مغذی مناسب و کارآمد برای رشد ریزموجودات است؛ درحقیقت، مصرف این منبع برای ریزموجودات آسان است. گاهی در غیاب عصاره مخمر، تخمیر گلوکز از طریق استات به شکل درخور توجهی انجام می‌شود (۲۲). اثر عصاره مخمر بر میزان رشد و زیست‌توده باکتری‌های لاکتیک‌اسید (بدون تأثیر بر گلوکز و تولید لاکتیک‌اسید) تا حدودی افزایش‌دهنده است (۲۳). میکوکی^۷ و همکاران با بررسی محیط کشت و ترکیبات آن، میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز را در استافیلوکوک‌ها بررسی کردند؛ مطابق نتایج ارائه شده، گلوکز در غلظت ۳ درصد آنزیم را مهار می‌کند و بیشترین میزان آنزیم در حضور کازئین هیدرولیز شده و عصاره مخمر (منابع کربن و نیتروژن) تولید می‌شود (۲۴). در سال ۲۰۱۰، هداپسار^۸ با بررسی اثر دو منبع کربن و نیتروژن (۱ درصد گلوکز و ۱/۵ درصد عصاره مخمر)، فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در باکتری‌های کلیفرم را برابر ۶۵۸ واحد بر میلی‌لیتر گزارش کرد (۲۵). در پژوهش حاضر نیز اثر گلوکز و عصاره مخمر بر تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز (شکل ۴، ب) در شرایطی که اثر سایر متغیرها ثابت و در سطح صفر نگه داشته شده بود، نشان داد افزایش غلظت گلوکز به تنهایی از ۱ به ۳ درصد در حضور عصاره مخمر ۰/۵ درصد تا حدودی سبب کاهش میزان تولید آنزیم در غلظت‌های زیاد گلوکز می‌شود؛ این درحالیست که افزایش غلظت عصاره مخمر سبب افزایش میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز می‌شود. منحنی یادشده بیان می‌کند کاهش غلظت گلوکز در حضور افزایش غلظت عصاره مخمر اثر چشمگیری بر تولید آنزیم دارد و میزان تولید آنزیم را افزایش می‌دهد.

در بررسی اثر هم‌زمان دو عامل گلوکز و عصاره مخمر بر زیست‌توده باکتری نیز با توجه به منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و عصاره مخمر بر زیست‌توده باکتری (شکل ۵، ب)، افزایش غلظت گلوکز از ۰/۵ به ۳ درصد در حضور عصاره مخمر ۰/۵ درصد به کاهش رشد باکتری منجر شد؛ درحالی که با کاهش غلظت گلوکز و افزایش عصاره مخمر احتمال دارد رشد باکتری به علت تأمین مواد غذایی و انرژی‌زا تا حدودی افزایش یابد؛ بنابراین، احتمال دارد دو عامل عصاره مخمر و گلوکز به علت تأمین انرژی لازم برای رشد باکتری، عوامل مؤثر بر زیست‌توده باکتری باشند. در سال ۲۰۱۷، چو^۹ و همکاران با بررسی غلظت‌های مختلف گلوکز (صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد) و ال-آسپاراژین (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ میلی‌مولار) بر تولید آنزیم آسپاراژیناز قارچ‌های اندوفیت طی دوره بیست‌روزه نشان دادند اثر منبع نیتروژنی ال-آسپاراژین در تولید آنزیم آسپاراژیناز مؤثرتر از منبع کربنی گلوکز است (۲۶). در این پژوهش نیز از آمینواسید ال-آسپاراژین به شکل عامل القاکننده اصلی در تولید آنزیم آسپاراژیناز استفاده شد. منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و ال-آسپاراژین بر تولید آنزیم آسپاراژیناز (شکل ۴، الف) در زمانی که اثر سایر متغیرها ثابت و در سطح صفر نگه داشته شده بود، نشان داد میزان تولید آنزیم با افزایش غلظت گلوکز به تنهایی از ۱ به ۳ درصد در حضور غلظت ۱ درصد ال-آسپاراژین کاهش می‌یابد؛ درحالی که کاهش غلظت گلوکز با افزایش غلظت ال-آسپاراژین سبب افزایش درخور توجه تولید آنزیم می‌شود. منحنی سه‌بعدی اثر عصاره مخمر و ال-آسپاراژین بر زیست‌توده باکتری در شکل ۵، ج نشان داده شده است. افزایش غلظت عصاره مخمر از ۰/۵ تا ۲ درصد در حضور ال-آسپاراژین ۱

واحد بر میلی گرم به دست آمد که میزان تولید آنزیم نسبت به نتایج بهینه‌سازی تک‌متغیر در یک زمان تقریباً ۱۱ درصد افزایش نشان داد؛ در این شرایط، میزان پروتئین کل و زیست‌توده به ترتیب 0.893 ± 0.02 و 0.345 ± 0.05 گرم بر میلی لیتر و 0.345 ± 0.05 گرم به دست آمد. مطابق نتایج، مقدار زیست‌توده باکتری بر میزان تولید آنزیم تأثیری ندارد.

References

- (1) Gebreyohannes M., Chekol C., Kebede E. Review on the application and current trends of biotechnology. *Research and Reviews: Austin Journal of Biotechnology and Bioengineering* 2018; 3(3): 19-31.
 - (2) Kumar DS., Sobha K. L-Asparaginase from microbes: A comprehensive review. *Advances in Bioresearch* 2012; 3(4): 137-157.
 - (3) Aishwarya SS., Iyappan S., Lakshmi KV., Rajnish KN. In silico analysis, molecular cloning, expression and characterization of L-asparaginase gene from *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. *3 Biotech* 2017; 7(5): 348.
 - (4) Piatkowska-Jakubas B., Krawczyk-Kulis M., Giebel S., Adamczyk-Cioch M., Czyz A., Lech-Maranda E., et al. Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: recommendations of the Polish Adult Leukemia Group. *Polish Archives of Internal Medicine* 2008; 118(11): 664-669.
 - (5) Balakrishnan K., Nair A., Kumar R. Screening of microbial isolates for the fermentative production of L-asparaginase in submerged fermentation. *Research and Review Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 2013; 2: 95-100.
 - (6) Hosamani R., Kaliwal B. L-asparaginase an anti-tumor agent production by *Fusarium equiseti* using solid state fermentation. *International Journal of Drug Discovery* 2011; 3(2): 88-99.
- درصد تا حدودی سبب افزایش میزان زیست‌توده شد و با افزایش غلظت ال-آسپاراژین و عصاره مخمر، رشد باکتری به میزان جزئی افزایش یافت؛ در نتیجه، احتمال دارد دو عامل عصاره مخمر و گلوکز به علت تأمین انرژی لازم برای رشد باکتری، عوامل مؤثر بر زیست‌توده باکتری باشند. آمینواسید ال-آسپاراژین تأثیر چندانی بر میزان زیست‌توده باکتری نداشت و با افزایش غلظت ال-آسپاراژین، تغییری در زیست‌توده باکتری مشاهده نشد. در سال ۲۰۱۱، کناری^۱ و همکاران با بهینه‌سازی تولید آنزیم آسپاراژیناز به روش پاسخ سطح در باکتری *شریشیا کلی* ATCC 11303، بیشترین میزان فعالیت اختصاصی آنزیم را برابر $1/0.3$ واحد بر میلی لیتر در شرایط $1/0.8$ درصد لاکتوز، $1/0.79$ درصد تریپتون، $1/6$ درصد عصاره مخمر، 2 درصد پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و $0/19$ درصد آمینواسید ال-آسپاراژین گزارش کردند (۲۷). در سال ۱۹۹۵، اوه^{۱۱} و همکاران شرایط رشد باکتری *Lactobacillus casei* YIT 9018 را به کمک روش پاسخ در سطح با مقادیر $0/892$ درصد عصاره مخمر، $1/58$ درصد گلوکز و $3/04$ درصد تریپتون بهینه‌سازی کردند (۲۸).
- در پژوهش حاضر، باکتری پروبیوتیک W11 که از آب پنیر سنتی شهرستان مراغه جدا شده بود، منبع جدید تولید‌کننده آنزیم آسپاراژیناز معرفی شد. به منظور برآورد میزان تولید آنزیم در شرایط بررسی شده، مقایسه‌ای میان نتایج عوامل تک‌متغیر، محیط کشت پایه MRS (شاهد) و نتایج محیط‌های پیشنهادی نرم‌افزار پاسخ در سطح انجام شد و مطابق با این بررسی، بهینه‌سازی تولید آنزیم آسپاراژیناز به روش پاسخ در سطح در غلظت‌های گلوکز 2 درصد، عصاره مخمر $1/25$ درصد و ال-آسپاراژین $1/75$ درصد با فعالیت 131

- (7) Singh Y., Srivastava S. Screening and characterization of microorganisms capable of producing antineoplastic drug, L-asparaginase. *International Journal of Biological and Medical Research* 2012; 3(4): 2548-2554.
- (8) Klaenhammer TR. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *The Journal of Nutrition* 2000; 130(2): 415S-416S.
- (9) Meydani SN., Ha W-K. Immunologic effects of yogurt. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 71(4): 861-872.
- (10) Holzapfel WH., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 73(2): 365s-373s.
- (11) Lee Y-K., Puong K-Y., Ouwehand AC., Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52(10): 925-30.
- (12) Sanders ME. Probiotics: Considerations for human health. *Nutrition Reviews* 2003; 61(3): 91-99.
- (13) Walzem R., Dillard C., German JB. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2002; 42(4): 353-375.
- (14) Luhovyy BL., Akhavan T., Anderson GH. Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *Journal of the American College of Nutrition* 2007; 26(6): 704S-712S.
- (15) Myers RH., Montgomery DC., Vining GG., Borrer CM., Kowalski SM. Response surface methodology: a retrospective and literature survey. *Journal of Quality Technology* 2004; 36(1): 53-77.
- (16) Imada A., Igarasi S., Nakahama K., Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *Microbiology* 1973; 76(1): 85-99.
- (17) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72(1-2): 248-54.
- (18) Deutscher J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 2008; 11(2): 87-93.
- (19) Srikhanta YN., Atack JM., Beacham IR., Jennings MP. Distinct physiological roles for the two L-asparaginase isozymes of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; 436(3): 362-365.
- (20) Boeck L., Squires R., Wilson M., Ho P. Effect of glucose and low oxygen tension on L-asparaginase production by a strain of *Escherichia coli* B. *Applied Environmental Microbiology* 1970; 20(6): 964-969.
- (21) Geckil H., Gencer S. Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla hemoglobin* for efficient oxygen uptake. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004; 63(6): 691-697.
- (22) Leclerc M., Elfoul-Bensaid L., Bernalier A. Effect of yeast extract on growth and metabolism of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the human colon. *Current Microbiology* 1998; 37(3): 166-171.
- (23) Olmos-Dichara A., Ampe F., Uribelarrea J-L., Pareilleux A., Goma G. Growth and lactic acid production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in batch and membrane bioreactor: influence of yeast extract and tryptone enrichment. *Biotechnology Letters* 1997; 19(8): 709-714.
- (24) Mikucki J., Szarapińska-Kwaszewska J., Krzemiński Z. Factors influencing L-asparaginase production by Staphylococci. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche*

- und Technische Mikrobiologie* 1977; 132(2): 135-142.
- (25) Hadapsar P. Isolation, optimization and production of L-asparaginase from coliform bacteria. *Asian Journal of Biotechnology* 2010; 2(3): 169-177.
- (26) Chow YY., Su Yien Ting A. Influence of glucose and L-asparagine concentrations on L-asparaginase production by endophytic fungi. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2017; 7(2): 186-189.
- (27) Kenari SLD., Alemzadeh I., Maghsodi V. Production of l-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. *Food and Bioprocess Processing* 2011; 89(4): 315-321.
- (28) Oh S., Rheem S., Sim J., Kim S., Baek Y. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. *Applied Environmental Microbiology* 1995; 61(11): 3809-3814.

-
- ¹- Imada
 - ²- Bradford
 - ³- Boeck
 - ⁴- Geckil
 - ⁵- Gencer
 - ⁶- *Enterobacter aerogenes*
 - ⁷- Mikucki
 - ⁸- Hadapsar
 - ⁹- Chow
 - ¹⁰- Kenari
 - ¹¹- Oh