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

فصل‌نامه زیست شناسی میکروارگانیسم ها
معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان
سال نهم، شماره ٣٤، تابستان ١٣٩٩، صص ٧١-٨٦
نوع مقاله: پژوهشی
تاریخ وصول: ١٣٩٨/١٢/٢٥ ، تاریخ پذیرش: ١٣٩٩/٣/١٨

بهینه‌سازی تولید آسپاراژیناز از سویهٔ *لاکتوباسیلوس* جداشده از محصولات لبنی سنتی

بهنـــوش دیناروننـــد: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران، biotechnush@yahoo.com
پریسا فتحی رضایی *: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران، parisafathirezaei@gmail.com
نـــــدا اکبـــــری: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران، akbari.ne@gmail.com

چکیده

مقدمه: آنزیم آسپاراژیناز تجزیهٔ آسپاراژین به آسپارتیک‌اسید و آمونیاک را کاتالیز می‌کند. به‌تازگی آنزیم آسپاراژیناز به‌شکل داروی شیمی‌درمانی مهم برای درمان سرطان‌های مختلف مانند لوسمی لنفوبلاستی، بیماری‌های بدخیم دستگاه لنفی و لنفوم غیرهوچکینی (NHL) استفاده می‌شود. آسپاراژیناز به‌علت داشتن پتانسیل جلوگیری از تولید آکریل‌آمید و حفظ کیفیت غذا، آنزیمی مفید در صنایع غذایی است. محصولات پروبیوتیکی حاوی باکتری‌های مفید هستند که آثار مفیدی بر سلامتی دارند. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های زیستی پروبیوتیک‌ها، خنثی‌سازی عوامل جهش‌زا و سرطان‌زاست. ریزموجودات بسیاری پتانسیل پروبیوتیکی دارند که گونه‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* از معمول‌ترین آنها به شمار می‌آیند. هدف مطالعهٔ حاضر، بهینه‌سازی تولید آسپاراژیناز از سویهٔ *لاکتوباسیل* جداشده از آب پنیر سنتی شهرستان مراغه است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی سویهٔ یادشده از آزمایش‌های تشخیصی ازجمله آزمایش‌های میکروبی و بیوشیمیایی شامل رنگ‌آمیزی گرم، فعالیت کاتالازی و اکسیدازی، تخمیر قندها و مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی استفاده شد. تولید آسپاراژیناز با استفاده از روش‌های کیفی و کمّی به‌ترتیب سنجش سریع با پلیت و ایمادا بررسی شد. تولید آنزیم آسپاراژیناز به روش پاسخ در سطح بهینه شد.

نتایج: نتایج بهینه‌سازی به روش پاسخ در سطح نشان دادند بیشترین فعالیت آسپاراژیناز در حضور گلوکز ۲ درصد، عصارهٔ مخمر ۱/۲۵ درصد و آسپاراژین ۱/۷۵ درصد به میزان ۱۳۱ واحدبرمیلی‌گرم است و میزان تولید ۱۱ درصد نسبت به شرایط غیربهینه بیشتر است. میزان پروتئین کل و زیست‌توده در محیط بهینه به‌ترتیب ۰/۸۹۳ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر و ۰/۳۴۵ گرم بود.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، احتمالاً سویهٔ *لاکتوباسیل* بررسی‌شده می‌تواند منبع مناسبی برای تولید آنزیم با ارزش دارویی آسپاراژیناز باشد.

واژه‌های کلیدی: آسپاراژین، آکریل‌آمید، آنزیم دارویی، لوسمی لنفوبلاستی حاد، متابولیسم نیتروژن

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.
Doi: 10.22108/bjm.2020.121143.1283

مقدمه

ریزموجودات محصولات باارزشی مانند ماکرومولکول‌ها یا مولکول‌های کوچک‌تر نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها و بسیاری از محصولات مهم را تولید می‌کنند (۱). آنزیم آسپاراژیناز (آسپاراژین آمیدوهیدرولاز، E.C. 3.5.1.1) ازجمله آنزیم‌های دارویی دارای خاصیت آنتی‌نئوپلاستیک است که سال‌هاست مدنظر دانشمندان قرار گرفته است. آنزیم یادشده به‌شکل داروی ترکیبی شیمی‌درمانی برای درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) در بزرگسالان و کودکان و لنفوم غیرهوچکینی (NHL) در کودکان استفاده می‌شود. آنزیم آسپاراژیناز واکنش هیدرولیز آمینواسید آسپاراژین به آسپارتیک‌اسید و آمونیاک را کاتالیز می‌کند (۲). آسپاراژیناز در صنایع غذایی به‌منظور حذف آکریل‌آمید و حفظ کیفیت غذا استفاده می‌شود. مواد غذایی غنی از مواد قندی و آمینواسید (به‌ویژه آن دسته که حاوی آسپاراژین هستند) در مراحل پخت، سرخ‌کردن و کباب‌کردن در دمای زیاد، محصول جانبی خطرناک و سرطان‌زایی به نام آکریل‌آمید را طی واکنش میلارد تولید می‌کنند (۳). آنزیم آسپاراژیناز به‌طور گسترده در گیاهان، حیوانات و ریزموجودات یافت می‌شود؛ درحالی‌که 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 آسپاراژیناز به‌طور طبیعی درون‌سلولی و مقدار کمی برون‌سلولی هستند. از دیدگاه صنعتی، ترشح آنزیم به بیرون از سلول بسیار مناسب‌تر، روند خالص‌سازی و تخلیص آنزیم آسان‌تر و ازنظر 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 برون‌سلولی مناسب‌تر هستند. در تولید صنعتی آنزیم آسپاراژیناز، 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 قرارگرفتن 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 تخمیرکنندهٔ متعلق به جنس‌ها و گونه‌های مختلف هستند که همگی لاکتیک‌اسید را تولید می‌کنند (۹).

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

پروبیوتیکی به‌کار می‌روند (۸). به‌تازگی، پروبیوتیک‌ها برای درمان ناهنجاری‌های روده‌ای مانند تحمل‌نداشتن نسبت به لاکتوز، التهاب معده‌ای- روده‌ای حاد، آلرژی غذایی، آرتریت 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 ازجمله فناوری‌های غشایی، ترکیبات تغلیظ‌شده‌ای مانند کنسانترهٔ 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 جداشده از آبدوغ در مقایسه با پنیر دارای اسفنگومیلین است (۱۳). پروتئین‌های آب پنیر سه نقش طعم‌دهندگی، عملکردی و تغذیه‌ای را دارند؛ ازنظر تغذیه‌ای، پروتئین‌های آب پنیر دارای کیفیت و ارزش زیستی زیاد و مقادیر زیادی از آمینواسیدهای دارای زنجیرهٔ جانبی شاخه‌دار مانند ایزولوسین، لوسین 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 تحت‌تأثیر چندین متغیر قرار دارد و هدف، بهینه‌شدن پاسخ است. برنامهٔ RSM، برنامهٔ کاربردی مهمی در طراحی، توسعه و فرموله‌کردن محصولات جدید و بررسی اثر متغیرهای مستقل به‌تنهایی یا به‌طور ترکیبی در بهبود طراحی محصول موجود است (۱۵).

مراغه در دامنهٔ جنوبی کوه سهند واقع شده است و امکان تولید شیر گوسفندی در مراتع این شهرستان وجود دارد؛ ازاین‌رو، تولید پنیر محلی در روستاهای شهرستان از دیرباز مرسوم بوده است و هیچ سویهٔ تجاری در تهیه آن استفاده نمی‌شود. این نوع پنیر به‌علت 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 سویهٔ *لاکتوباسیل* جداشده از آب پنیر سنتی شهرستان مراغه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

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

۱۹۴۵۹ «میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک- ویژگی‌ها و روش آزمون (برون تن)» انجام شد (۱۲). به‌منظور غنی‌سازی و جداسازی نمونه‌ها از محیط کشت MRS براث و MRS آگار استفاده شد که محیط اختصاصی برای رشد و جداسازی پروبیوتیک‌هاست. به‌منظور 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 به‌دست‌آمده ازنظر آزمون گرم، آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز، همولیز، مقاومت به اسید و نمک صفراوی بررسی شدند و از تمام سویه‌های بررسی‌شده، استوک تهیه شد.

بررسی مقاومت به اسید: اساس این روش بر بررسی مقاومت ریزموجود در شرایط اسیدی قرار دارد که با کشت ریزموجود در محیط MRS براث با اسیدیته‌های ۲ و ۳ انجام و پس‌از گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب، تعداد ریزموجود 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 ریزموجود 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 ۰/۳درصد نمک اگزالات‌سدیم 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 پس‌از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۲).

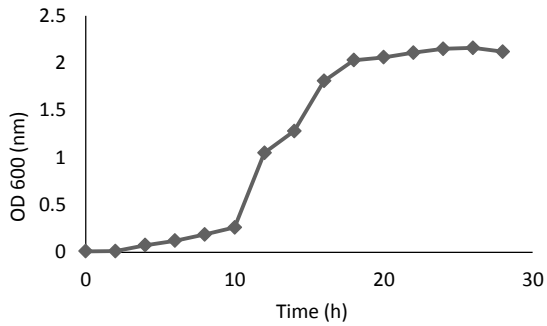
بررسی تولید آنزیم آسپاراژیناز: به‌منظور بررسی تولید آنزیم آسپاراژیناز و غربال‌گری سویهٔ تولیدکنندهٔ آنزیم از روش کیفی سنجش سریع با پلیت استفاده شد؛ به‌این‌ترتیب که پلیت‌ها حاوی محیط کشت MRS با گلوکز ۱ درصد و شناساگر فنل‌رد (۰/۰۰۵ گرم‌درلیتر) بودند و تغییر رنگ پلیت‌ها به‌سمت رنگ قرمز در هر روز ثبت شد. سنجش کمی به روش ایمادا[1] و بر اساس اندازه‌گیری میزان محصول واکنش آنزیمی (آمونیاک) انجام شد. آمونیاک آزادشده 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 (اسیدیتهٔ ۸/۲)، ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی (محلول رویی) و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد؛ سپس ۵۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید 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 پس‌از گرماگذاری در دمای محیط به‌مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دوردردقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انجام و سپس میزان جذب محلول رویی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محلول سولفات‌آمونیوم ۱۰ میلی‌مولار برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد (شکل ۱). یک واحد آنزیم آسپاراژیناز عبارتست از: مقدار آنزیم لازم برای آزادکردن یک میکرومول آمونیاک در هر دقیقه در

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

(رابطهٔ ۱)

$$\text{Units/ml enzyme}=(\text{mM } NH_3)(0.25)/(0.01)(30)(0.05)$$

که در این رابطه، آمونیاک آزادشده 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 استفاده‌شده بر حسب میلی‌لیتر است.



شکل ۱- نمودار رشد باکتری طی ۲۴ ساعت

بهینه‌سازی تولید آنزیم آسپاراژیناز: به‌منظور 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)، آسپاراژین (۱، ۲ و ۳ درصد)، سوکروز (۱ و ۲ درصد)، عصارهٔ مخمر (۰/۵، ۱ و ۲ درصد)، پپتون (۰/۵ و ۱ درصد) و دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات (۰/۳، ۰/۵ و ۱ درصد) به‌شکل تک‌متغیر در یک زمان بر میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز بررسی شد. اثر سه عامل آسپاراژین (۰/۳۲، ۱، ۱/۷۵، ۲ و ۲/۵ درصد)، عصارهٔ 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، عصارهٔ مخمر ۰/۵ درصد و ال-آسپاراژین ۱ درصد به‌طور هم‌زمان بر تولید آنزیم بررسی شد.

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

آزمایش	گلوکز	عصارهٔ مخمر	آسپاراژین	آزمایش	گلوکز	عصارهٔ مخمر	آسپاراژین
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 عصارهٔ 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 میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر) برای نمودار استاندارد استفاده شدند. میزان ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۷۵۰ میکرولیتر معرف بردفورد مخلوط و به‌مدت 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 اولیهٔ سویهٔ تولیدکنندهٔ آنزیم آسپاراژیناز در جدول ۲ آورده شده‌اند. این سویه از نمونهٔ آب پنیر سنتی شهرستان مراغه جداسازی شده و باتوجه‌به این اطلاعات، سویهٔ جداسازی‌شده *لاکتوباسیلوس* است و پتانسیل پروبیوتیکی دارد. ظاهر کلنی پس‌از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجهٔ 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 تولیدشده در این مسیر، رنگ محیط را از نارنجی به زرد تغییر داد. سیاه‌رنگ‌شدن محیط کشت SIM بیان‌کنندهٔ توان باکتری در تولید سولفیدهیدروژن از ترکیبات محیط کشت است؛ حلقهٔ تیره‌رنگ با اضافه‌کردن معرف کواکس نمایان شد که به معنای استفاده‌نکردن باکتری از تریپتوفان موجود در ترکیبات محیط کشت است (جدول ۳).

جدول ۲- نتایج جداسازی اولیهٔ سویه تولیدکنندهٔ آنزیم

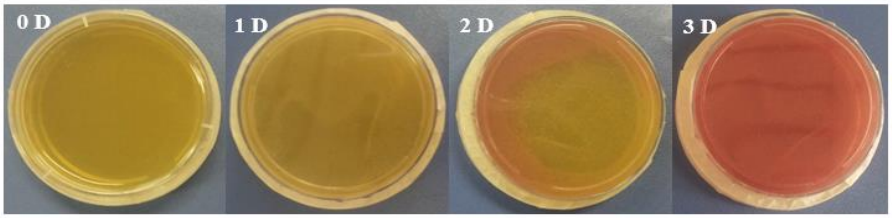
ریخت‌شناسی	رقت جداسازی‌شده	آزمون گرم	اکسیداز	کاتالاز	همولیز	مقاومت به اسید		مقاومت به صفرا
						اسیدیتهٔ ۲	اسیدیتهٔ ۳	
باسیل	10^{-10}	+	−	−	−	+	+	+

جدول ۳- آزمون‌های شناسایی میکروبی

کد نمونه	آزمون تخمیر قند				SIM			نیترات
	گلوکز	سوکروز	لاکتوز	فروکتوز	حرکت	اندول	H_2S	
W11	+	+	+	+	−	−	+	+

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

سنجش کیفی فعالیت آنزیم: اساس این روش بر تغییر اسیدیتهٔ محیط کشت است. به‌منظور غربال‌گری اولیه و بررسی توانایی سویهٔ جداسازی‌شده در تولید آنزیم آسپاراژیناز، تغییر رنگ پلیت پس‌از کشت باکتری و گرماگذاری به‌مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌طور روزانه بررسی شد. مطابق شکل ۲، تغییر رنگ محیط کشت پس‌از سه روز گرماگذاری در اطراف کلنی باکتری W11 مشاهده شد.



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

نتایج سنجش کمی

بهینه‌سازی تک‌متغیر در یک زمان: به‌منظور تعیین سطوح بهینه و دقیق‌تر بهینه‌سازی به روش پاسخ در سطح، ابتدا اثر چندین متغیر به‌شکل تک‌متغیر در یک زمان بر میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز بررسی شد. نتایج نشان دادند از میان عوامل بررسی‌شده، غلظت گلوکز ۲ درصد مؤثرترین عامل در تولید آنزیم آسپاراژیناز با میزان فعالیت ۱۱/۶۹ واحدبرمیلی‌گرم است. نتایج سنجش فعالیت آنزیم، پروتئین کل و میزان رشد باکتری در بهینه‌سازی تک‌متغیر در یک زمان عوامل بررسی‌شده حاصل از سه تکرار مستقل در جدول ۴ ارائه شده‌اند.

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

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

بهینه‌سازی تولید آسپاراژیناز به روش پاسخ در سطح:
باتوجه‌به نتایج بهینه‌سازی تک‌متغیر در یک زمان و مطالعه‌های انجام‌شده، سه عامل گلوکز، عصارهٔ 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 زیست‌تودهٔ 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 تحت‌تأثیر خطا قرار گیرد؛ همچنین R^2 برابر ۰/۶۳ بود که خوب و رضایت‌بخش است (جدول ۵).

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

معادلهٔ نهایی فعالیت آنزیم کدشدهٔ نرم‌افزار عبارتست از:

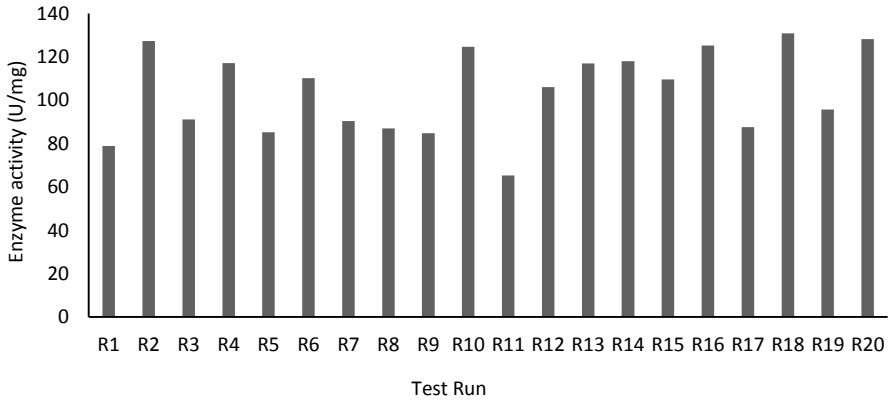
Enzyme activity (U/mg)= +153.81 – 71.44 × glucose + 72.35 × yeast extract + 84.07 × asparagine – 123.04 × glucose × yeast extract - 128.13 × glucose × asparagine + 124.70 × yeast extract × asparagine

معادلهٔ نهایی فعالیت آنزیم بر اساس مقادیر حقیقی عوامل به‌شکل زیر است:

Enzyme activity (U/mg)= -543.17687 +432.59069 × glucose + 36.61934 × yeast extract + 176.65775 × asparagine – 164.05167 × glucose × yeast extract -170.83833 × glucose × asparagine + 221.68667 × yeast extract × asparagine

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

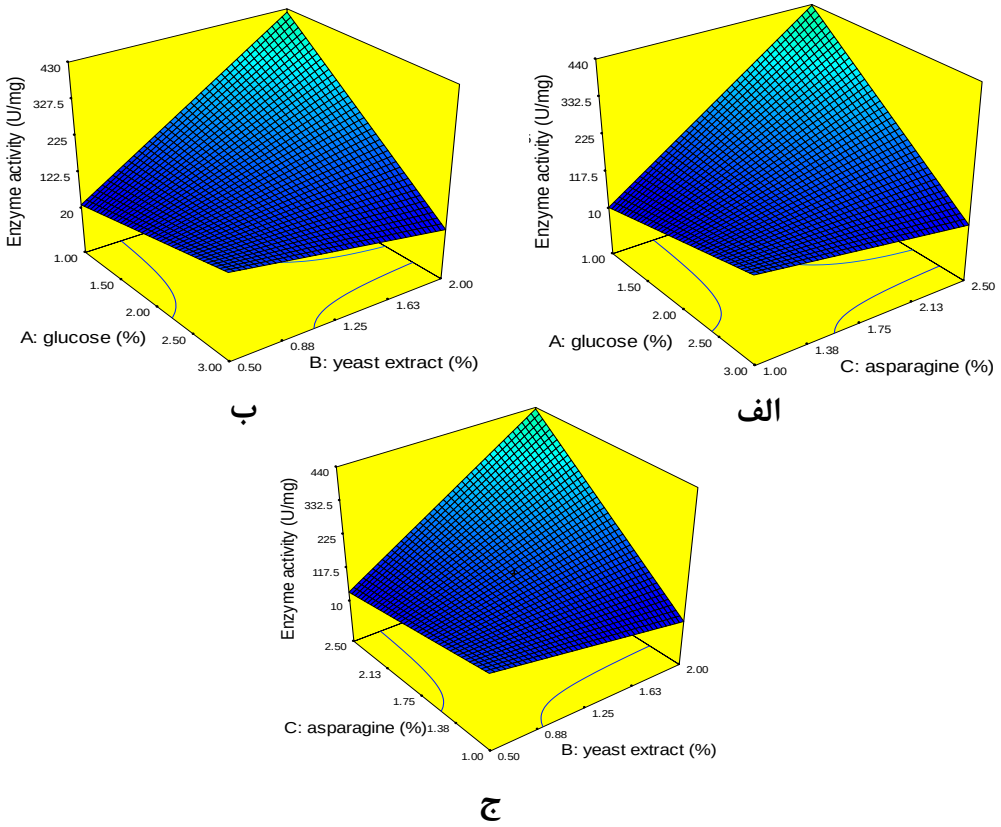
جدول ۶- نتایج آزمایش پاسخ در سطح برای بهینه‌سازی تولید آسپاراژیناز

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

بررسی اثر برهم‌کنش آسپاراژین، عصارهٔ 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 حالی‌که کاهش غلظت گلوکز در حضور افزایش غلظت آسپاراژین سبب افزایش چشمگیرتری در تولید آنزیم می‌شود.

منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و عصارهٔ 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 عصارهٔ مخمر ۰/۵ درصد تا حدودی سبب کاهش میزان تولید آنزیم در غلظت‌های زیاد گلوکز می‌شود؛ این درحالیست که افزایش غلظت عصارهٔ مخمر سبب افزایش میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز می‌شود. منحنی یادشده بیان می‌کند کاهش غلظت گلوکز در حضور افزایش غلظت عصارهٔ مخمر، اثر درخور توجهی بر تولید آنزیم دارد و میزان تولید آنزیم را افزایش می‌دهد.

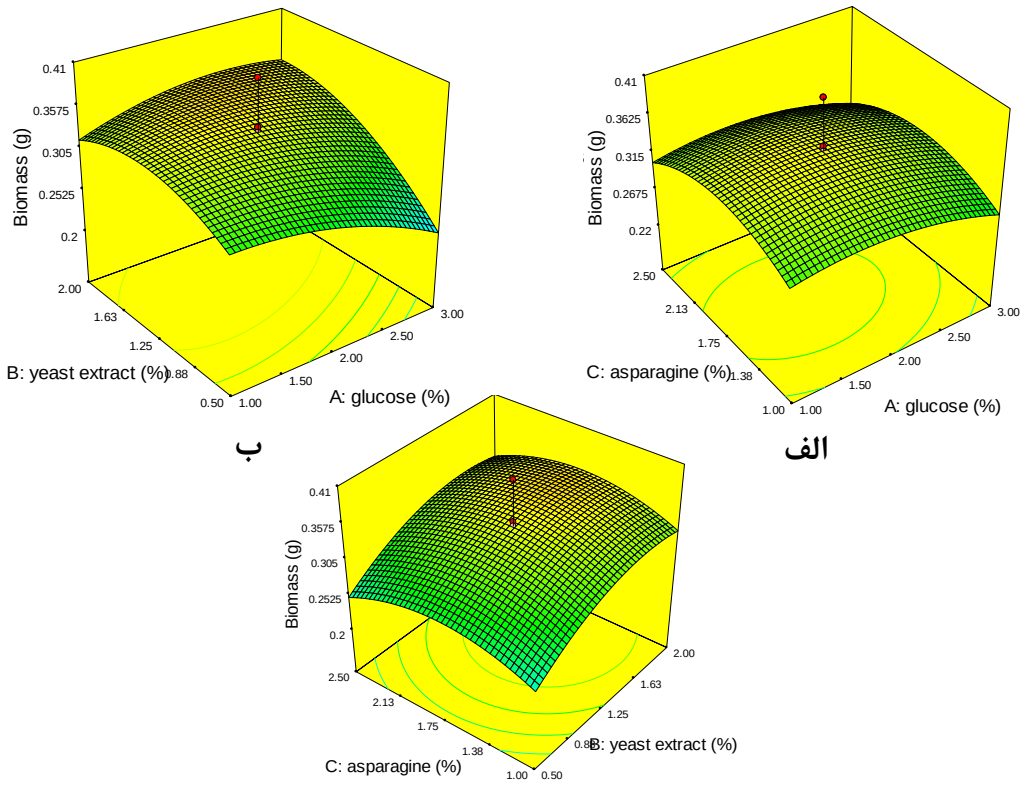
در بررسی اثر متقابل آسپاراژین و عصارهٔ مخمر (القاکنندهٔ اصلی و مادهٔ مغذی مؤثر بر رشد باکتری)، منحنی سه‌بعدی پاسخ در سطح در زمانی که اثر سایر متغیرها ثابت و در سطح صفر نگه داشته شده بود، نشان داد اثر هرکدام از عوامل افزایش غلظت ال- آسپاراژین و عصارهٔ مخمر به‌تنهایی سبب افزایش میزان تولید آنزیم می‌شود (شکل ۴، ج)؛ باوجوداین، افزایش غلظت آسپاراژین در حضور افزایش غلظت عصارهٔ مخمر سبب افزایش چشمگیر میزان تولید آنزیم می‌شود و بنابراین، آسپاراژین و عصارهٔ مخمر در کنار هم، دو عامل تأثیرگذار بر تولید آنزیم هستند.



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 عصارهٔ مخمر بر میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز، ج. اثر برهم‌کنش عصارهٔ مخمر و ال-آسپاراژین بر میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز

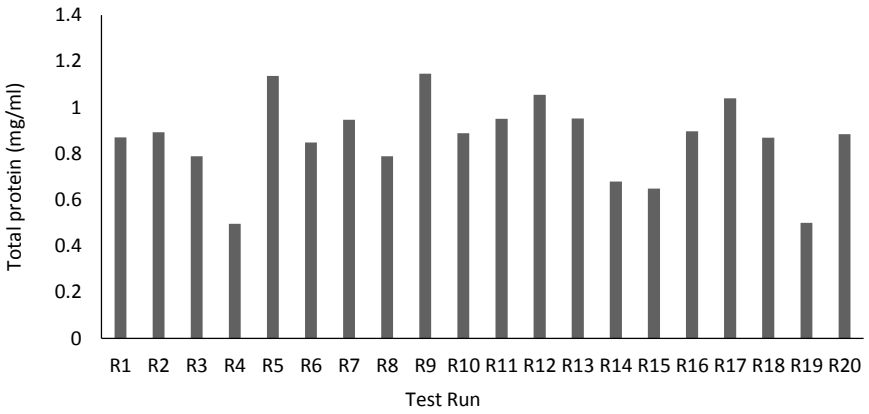
بررسی اثر برهم‌کنش آسپاراژین، عصارهٔ مخمر و گلوکز بر میزان زیست‌توده: منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و آسپاراژین بر زیست‌تودهٔ باکتری در شکل ۵، الف نشان داده شده است؛ مطابق این منحنی، احتمال می‌رود افزایش غلظت گلوکز از ۱ به ۳ درصد در حضور غلظت ۱ درصد آسپاراژین تأثیر چندانی بر میزان زیست‌تودهٔ باکتری نداشته باشد و این اثر درنتیجهٔ افزایش غلظت آسپاراژین نیز تغییر نکند.

در بررسی اثر هم‌زمان دو عامل گلوکز و عصارهٔ مخمر بر زیست‌تودهٔ باکتری و باتوجه‌به منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و عصارهٔ مخمر بر زیست‌تودهٔ باکتری (شکل ۵، ب)، افزایش غلظت گلوکز از ۰/۵ تا ۳ درصد در حضور عصارهٔ مخمر ۰/۵ درصد سبب کاهش رشد باکتری می‌شود؛ درحالی‌که در کاهش غلظت گلوکز در حضور افزایش عصارهٔ مخمر احتمال می‌رود رشد باکتری به‌علت تأمین مواد غذایی و انرژی‌زا تا حدودی افزایش یابد.



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

سنجش پروتئین کل: بر اساس نتایج، بیشترین میزان تولید پروتئین (۱/۱۴۷ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر) به محیط‌کشت دارای ۳ درصد گلوکز، ۲ درصد عصارهٔ مخمر و ۱ درصد آسپاراژین و کمترین میزان تولید پروتئین (۰/۴۷۹ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر) به محیط‌کشت دارای ۳ درصد گلوکز، ۰/۵ درصد عصارهٔ مخمر و ۲/۵ درصد آسپاراژین مربوط می‌شود؛ درحالی‌که میزان پروتئین کل در محیط‌کشت با بیشترین میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز ۰/۰۲±۰/۸۹۳ میلی‌گرم‌برمیلی لیتر است (شکل ۶).



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 بیان‌کنندهٔ افزایش رشد است؛ باوجوداین در باکتری‌های لاکتیک‌اسید و به‌ویژه *لاکتوباسیلوس*ها، افزایش میزان قندها به‌ویژه گلوکز سبب فعال‌شدن مسیر سرکوب‌کنندهٔ کاتابولیک کربن می‌شود و نتیجهٔ معکوس می‌دهد (۱۸). باتوجه‌به اینکه سویهٔ بررسی‌شده به خانوادهٔ باکتری‌های لاکتیک‌اسید تعلق دارد و این باکتری‌ها توانایی تخمیر منابع کربنی (گلوکز) را به اسید دارند، این اسید می‌تواند میزان رشد باکتری و درمقابل، 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؛ درنتیجه، باتوجه‌به سطح و میزان تولید تقریبا 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.

باتوجه‌به ترکیبات محیط‌کشت، باکتری به‌منظور دستیابی به منبع انرژی جایگزین شروع به ترشح آنزیم آسپاراژیناز به بیرون از سلول (درون محیط‌کشت) می‌کند و با تجزیهٔ 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 ۰/۵درصد و تنش اکسیژن بر تولید آنزیم آسپاراژیناز در باکتری *اشریشیا کلی* نشان دادند تولید آنزیم در شرایط هوازی کاهش می‌یابد؛ درحالی‌که 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 *انتروباکتر آئروژنز*[۶] است. گلوکز ۱ درصد سبب مهار فعالیت آنزیم می‌شود؛ درحالی‌که تولید آنزیم در محیط‌کشت دارای گلوکز ۰/۱ درصد در مقایسه با

محیط‌کشت بدون گلوکز تحریک می‌شود (۲۱). عصارهٔ 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 عصارهٔ مخمر، تخمیر گلوکز از طریق استات به‌شکل درخور توجهی انجام می‌شود (۲۲). اثر عصارهٔ مخمر بر میزان رشد و زیست‌تودهٔ باکتری‌های لاکتیک‌اسید(بدون تأثیر بر گلوکز و تولید لاکتیک‌اسید) تا حدودی افزایش‌دهنده است (۲۳). میکوکی[۷] و همکاران با بررسی محیط‌کشت و ترکیبات آن، میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز را در استافیلوکوک‌ها بررسی کردند؛ مطابق نتایج ارائه‌شده، گلوکز در غلظت ۳ درصد آنزیم را مهار می‌کند و بیشترین میزان آنزیم در حضور کازئین هیدرولیزشده و عصارهٔ 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 عصارهٔ مخمر)، فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در باکتری‌های کلیفرم را برابر ۶۵۸ واحدبرمیلی‌لیتر گزارش کرد (۲۵). در پژوهش حاضر نیز اثر گلوکز و عصارهٔ 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 به‌تنهایی از ۱ به ۳ درصد در حضور عصارهٔ مخمر ۰/۵ درصد تا حدودی سبب کاهش میزان تولید آنزیم در غلظت‌های زیاد گلوکز می‌شود؛ این درحالیست که افزایش غلظت عصارهٔ مخمر سبب افزایش میزان تولید آنزیم آسپاراژیناز می‌شود. منحنی یادشده بیان می‌کند کاهش غلظت گلوکز در حضور افزایش غلظت عصارهٔ مخمر اثر چشمگیری بر تولید آنزیم دارد و میزان تولید آنزیم را افزایش می‌دهد.

در بررسی اثر هم‌زمان دو عامل گلوکز و عصارهٔ مخمر بر زیست‌تودهٔ باکتری نیز باتوجه‌به منحنی سه‌بعدی اثر گلوکز و عصارهٔ مخمر بر زیست‌تودهٔ باکتری (شکل ۵، ب)، افزایش غلظت گلوکز از ۰/۵ به ۳ درصد در حضور عصارهٔ مخمر ۰/۵ درصد به کاهش رشد باکتری منجر شد؛ درحالی‌که با کاهش غلظت گلوکز و افزایش عصارهٔ مخمر احتمال دارد رشد باکتری به‌علت تأمین مواد غذایی و انرژی‌زا تا حدودی افزایش یابد؛ بنابراین، احتمال دارد دو عامل عصارهٔ مخمر و گلوکز به‌علت تأمین انرژی لازم برای رشد باکتری، عوامل مؤثر بر زیست‌تودهٔ 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 دورهٔ 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 به‌شکل عامل القاکنندهٔ 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 به‌تنهایی از ۱ به ۳ درصد در حضور غلظت ۱ درصد ال-آسپاراژین کاهش می‌یابد؛ درحالی‌که کاهش غلظت گلوکز با افزایش غلظت ال-آسپاراژین سبب افزایش درخور توجه تولید آنزیم می‌شود. منحنی سه‌بعدی اثر عصارهٔ مخمر و ال-آسپاراژین بر زیست‌تودهٔ باکتری در شکل ۵، ج نشان داده شده است. افزایش غلظت عصارهٔ مخمر از ۰/۵ تا ۲ درصد در حضور ال-آسپاراژین ۱

درصد تا حدودی سبب افزایش میزان زیست‌توده شد و با افزایش غلظت ال-آسپاراژین و عصارهٔ مخمر، رشد باکتری به میزان جزئی افزایش یافت؛ درنتیجه، احتمال دارد دو عامل عصارهٔ مخمر و گلوکز به‌علت تأمین انرژی لازم برای رشد باکتری، عوامل مؤثر بر زیست‌تودهٔ باکتری باشند. آمینواسید ال-آسپاراژین تأثیر چندانی بر میزان زیست‌تودهٔ باکتری نداشت و با افزایش غلظت ال-آسپاراژین، تغییری در زیست‌تودهٔ باکتری مشاهده نشد. در سال ۲۰۱۱، کناری[10] و همکاران با بهینه‌سازی تولید آنزیم آسپاراژیناز به روش پاسخ سطح در باکتری *اشریشیا کلی* ATCC 11303، بیشترین میزان فعالیت اختصاصی آنزیم را برابر ۱/۰۳ واحدبرمیلی‌لیتر در شرایط ۱/۰۸ درصد لاکتوز، ۱/۷۹ درصد تریپتون، ۱/۶ درصد عصارهٔ مخمر، ۲ درصد پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات و ۰/۱۹ درصد آمینواسید ال-آسپاراژین گزارش کردند (۲۷). در سال ۱۹۹۵، اوه[11] و همکاران شرایط رشد باکتری *Lactobacillus casei* YIT 9018 را به کمک روش پاسخ در سطح با مقادیر ۰/۸۹۲ درصد عصارهٔ مخمر، ۱/۵۸ درصد گلوکز و ۳/۰۴ درصد تریپتون بهینه‌سازی کردند (۲۸).

در پژوهش حاضر، باکتری پروبیوتیک W11 که از آب پنیر سنتی شهرستان مراغه جدا شده بود، منبع جدید تولیدکنندهٔ آنزیم آسپاراژیناز معرفی شد. به‌منظور برآورد میزان تولید آنزیم در شرایط بررسی‌شده، مقایسه‌ای میان نتایج عوامل تک‌متغیر، محیط‌کشت پایهٔ 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 ۲ درصد، عصارهٔ مخمر ۱/۲۵ درصد و ال-آسپاراژین ۱/۷۵ درصد با فعالیت ۱۳۱ واحدبرمیلی‌گرم به دست آمد که میزان تولید آنزیم نسبت به نتایج بهینه‌سازی تک‌متغیر در یک زمان تقریبا ۱۱ درصد افزایش نشان داد؛ در این شرایط، میزان پروتئین کل و زیست‌توده به‌ترتیب ۰/۰۲±۰/۸۹۳ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر و ۰/۰۵±۰/۳۴۵ گرم به دست آمد. مطابق نتایج، مقدار زیست‌تودهٔ 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.

(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., Borror 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 Communication*s 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 Environmenral 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 H 2-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 Bioproducts 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