



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
13th Year, Vol. 13, No. 49, 2024 pp. 21-52
Received: 05.07.2023 Accepted: 25.09.2023

(Research Paper)

Identification and Isolation of L-asparaginase-producing Yeast from Soil Samples

Mansoorah Sadeghi

MSc, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
mansoor7070@gmail.com

Keivan Beheshti-Maal * 

Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
kbeheshtimaal@yahoo.com

Fereshteh Ghandehari

Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
fe_gh_2010@yahoo.com

Abstract

In recent years, the need for L-asparaginase in different industries has increased. L-asparaginase obtained from microorganisms is cost-effective, has no harmful effects on the environment, and improves the quality of products. In the present study, L-asparaginase-producing microorganisms were isolated and optimized from different sources, and selected strain enzymes were produced.

L-asparaginase-producing yeasts were randomly isolated and purified from different parts of Isfahan. Strains were screened for L-asparaginase production. Then, the superior yeast strain with the highest enzymatic activity was selected for optimization. Under suitable pH, temperature, time, carbon source, and nitrogen source, multi-factor optimization was performed using response-level statistical software to investigate the simultaneous effect of several factors on production and the highest enzyme activity.

In the present study, 5S2 yeast isolate led to the formation of the highest halo of L-asparaginase. This strain was first introduced as the L-asparaginase-producing strain and was registered in the NCBI database under *Diutina mesorugosa* strain SBG-IAUF-2 with access number MZ901211. Yeast 5S2 with enzyme activity equivalent to 1722.8 u / ml was selected as the selected strain for optimization. The results of multivariate optimization of enzyme activity showed that at pH 7, a concentration of 2% glucose as carbon source, the

* Corresponding Author

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



Sadeghi M., Beheshti-Maal K., and Ghandehari F. Identification and Isolation of L-asparaginase-producing Yeast from Soil Samples. *Journal of Microbial Biology*, 2024; 13 (49): 21-52.

<http://dx.doi.org/10.22108/bjm.2023.138198.1549>

attention of 10% L-asparagine, a temperature of 35°C, and a time of 120 hours, there is the highest enzyme production activity and curve RSM is located in the optimization area.

In the present study, after recording 5S2 yeast isolate for the first time as an L-asparaginase-producing strain in the NCBI database, extracellular L-asparaginase produced by the 5S2 yeast strain was introduced due to its high enzymatic activity as a potent strain in the production of L-asparaginase enzyme.

Keywords: L-asparaginase, Enzyme Activity Assay, Optimization, RSM, Yeast.

Introduction

L-asparaginase as a food processing aid, is capable of significantly reducing acrylamide formation in starchy foods by over 90% without altering their taste or appearance. L-asparaginase enzymes are produced by various microorganisms, including bacteria like *Streptomyces goulbarjensis*, *Enterobacter cloacae*, and *Serratia marcescens*, as well as fungi and yeasts. Different isoforms of L-asparaginase originating from plants, eukaryotes, and prokaryotes have been identified, with those isolated from microorganisms, especially bacteria, proving more effective. Microorganisms producing L-asparaginase are found across diverse ecological areas, showcasing desirable enzymatic activity. The most effective isoforms of L-asparaginase currently available as anticancer drugs and produced commercially are sourced from microbial origins like *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, and various *Bacillus* strains. Reports also mention the enzyme's production by filamentous fungi and yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida*. Like *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast is highlighted for its single-cell nature, rapid reproduction in cultivation environments, and its significance in various ecosystems like soil, swamps, and rivers due to its cellular processes post-translation and lack of endotoxins. *Saccharomyces cerevisiae* intricately regulates L-asparagine metabolism through complex pathways involving unrelated citrate products. The current study focuses on isolating, purifying, and identifying yeast strains producing L-asparaginase, optimizing its production under various environmental conditions to find an optimal method for generating these enzymes with reduced side effects and increased therapeutic potential.

Materials and Methods

Sampling and isolation of L-asparaginase-producing yeast: Soil samples were collected randomly from various points in Isfahan, particularly from agricultural fields, and diverse yeasts were isolated from these samples. For initial enrichment of the yeasts, 1 gram of collected soil samples was mixed in 100 milliliters of L-asparagine culture medium. This mixture was placed on a shaker for 3 days at 31 degrees Celsius and a speed of 130 rotations per minute, repeated thrice. Subsequently, 1 milliliter of the culture medium was taken and transferred to YPG agar medium.

Yeast screening based on L-asparagine enzyme production: A rapid assay method was employed using a minimum asparagine agar medium. Colonies were placed on this medium and incubated at 30 degrees Celsius for 24 to 72 hours. Changes in color and halo diameter were examined every 24 hours. Yeasts capable of producing the enzyme hydrolyze asparagine in the culture medium, releasing ammonia and alkalizing the medium. As a result, a shift in pH from acidic to alkaline changed the color of the medium from yellow to pink. Yeasts producing the enzyme caused an alkalinity shift, changing the medium color to a pinkish hue. Yeasts that did not produce this pink halo were eliminated.

Molecular Identification of Superior Yeast Species Producing L-Asparaginase Enzyme: For molecular identification, the selected strains were incubated in YPG culture medium for 72 hours at 37 degrees Celsius. The colony-PCR method was employed to identify the genus and species of the yeasts. The DNA of each sample was added to the respective vials, and after adding the required reaction components and the designed primers, they were placed inside the thermocycler. Consequently, a 655 base pair fragment resulting from amplifying the gene encoding 18S-rRNA (ITS4, ITS1) using the forward and reverse primer was amplified via a polymerase chain reaction.

Optimization of Enzyme Production via RSM Statistical Design: Multiple factors, including pH, carbon source, nitrogen source, temperature, time, and their various concentrations of carbon and nitrogen sources were examined in enzyme production. Based on the available sources in the culture medium, enzyme activity of Sizopek's Dax was subjected to various concentrations of glucose (from 1.5% to 2.5%) as a carbon source, a pH range from 5 to 9, L-asparagine as a nitrogen source (from 6% to 14%), temperature between 25 to 45 degrees Celsius, and time from 80 to 160 hours as factors in the optimization process using the Response Surface Methodology (RSM).

Research Findings

In this study, yeast 5S2 was examined for the first time to produce the L-asparaginase enzyme. After sequencing and obtaining the relevant file, the sequence underwent evaluation and editing using the Chromas software. Sequence comparison via the BLASTN server in the NCBI database revealed that the 18S-rDNA sequence of the 5S2 yeast strain bears the highest similarity and coverage with a strain of *Diutina mesorugosa*. Following assessments, this isolate was registered as a new strain for L-asparaginase production under the name *Diutina mesorugosa* strain SBG-IAUF-2 with accession number MZ901181 in the NCBI database. The highest enzyme activity during the optimization stage was achieved in test number 6, with 2% glucose, pH at 7, a duration of 120 hours, a temperature of 35 degrees Celsius, and 10% L-asparagine. This resulted in an enzyme activity of 1722.8 U/mL, indicating the maximum level of enzyme activity. In the optimization of L-asparaginase enzyme from the 5S2 strain, the highest activity was observed at pH 7, showing sensitivity to both acidic and alkaline conditions. Additionally, the enzyme was temperature-sensitive, exhibiting the highest activity at 35 degrees Celsius but decreasing notably at 45 degrees Celsius.

Discussion of Results and Conclusions

Glucose and L-asparagine levels influenced enzyme production, achieving optimal enzyme yields at their moderate levels. Time was also a significant factor affecting enzyme production. This research successfully produced L-asparaginase using the isolated yeast strain 5S2 from the soil, optimizing its activity through the response surface method. The increased enzyme activity suggests the potential application of these results in various industries, including food processing and nanotechnology. The enzyme production levels in the optimization process suggest the potential for enhanced enzyme yields through strain optimization.

شناسایی و جداسازی مخمر تولیدکننده آنزیم ال-آسپاراژیناز از نمونه خاک

منصوره صادقی: کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، mansoore7070@gmail.com
کیوان بهشتی مال*: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، kbeheshtimaal@yahoo.com
فرشته قندهاری: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، fe_gh_2010@yahoo.com

چکیده

در سال‌های اخیر، نیاز صنایع مختلف کشور به آنزیم ال-آسپاراژیناز افزایش یافته است. ال-آسپاراژیناز به دست آمده از ریزموجودات، مقرون به صرفه و بدون آثار زیان‌بار زیست‌محیطی است و سبب افزایش کیفیت محصولات می‌شود. در پژوهش حاضر، مخمرهای مولد ال-آسپاراژیناز از منابع مختلف خاک جداسازی و بهینه‌سازی شدند و میزان تولید آنزیم سویه منتخب بررسی شد.

مخمرهای مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز به طور تصادفی از خاک نقاط مختلف شهر اصفهان جداسازی و خالص‌سازی شدند. سویه‌ها از نظر میزان تولید ال-آسپاراژیناز در محیط کشت حداقل آسپاراژین آگار غربال‌گری شدند و سویه مخمر برتر که بیشترین فعالیت آنزیمی را داشت، برای بهینه‌سازی انتخاب شد. در شرایط مناسب اسیدیته، دما، زمان، منبع کربن و منبع نیتروژن، بهینه‌سازی چندفاکتوره با نرم‌افزار آماری سطح پاسخ به منظور بررسی تأثیر هم‌زمان چند فاکتور بر بیشترین میزان فعالیت آنزیمی انجام شد. در مطالعه حاضر، جدایه مخمری 5S2 سبب تشکیل بیشترین هاله ال-آسپاراژینازی شد. این سویه برای نخستین بار به عنوان سویه مولد ال-آسپاراژیناز معرفی و با نام سویه *Diutina mesorugosa* strain SBG-IAUF-2 به شماره دسترسی MZ901211 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد. مخمر 5S2 با فعالیت آنزیمی معادل ۱۷۲۲/۸ u/ml به عنوان سویه منتخب برای بهینه‌سازی تعیین شد. نتایج بهینه‌سازی چندفاکتوره فعالیت آنزیم نشان دادند در اسیدیته ۷، غلظت ۲ درصد گلوکز به عنوان منبع کربن، غلظت ۱۰ درصد ال-آسپاراژین، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۲۰ ساعت، بیشترین فعالیت آنزیمی وجود دارد و منحنی RSM در منطقه بهینه‌سازی قرار دارد.

در پژوهش حاضر برای نخستین بار، جدایه مخمر 5S2 به عنوان سویه مولد ال-آسپاراژیناز در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت و با توجه به فعالیت آنزیمی زیاد ال-آسپاراژیناز خارج سلولی تولیدشده توسط این سویه، سویه مخمر 5S2 به عنوان سویه‌ای قوی در تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: ال-آسپاراژیناز، سنجش فعالیت آنزیمی، بهینه‌سازی، RSM، مخمر

* نویسنده مسئول مکاتبات

صادقی، م؛ بهشتی مال، ک. و قندهاری، ف. شناسایی و جداسازی مخمر تولیدکننده آنزیم ال-آسپاراژیناز از نمونه خاک. زیست‌شناسی میکروبی ۱۴۰۳، ۱۳

(۴۹): ۲۱-۵۲ <http://dx.doi.org/10.22108/bjm.2023.138189.1549>

مقدمه

آنزیم‌های دارویی کاربردهای فراوانی در درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی دارند (۱). به‌کارگیری هدفمند آنزیم‌ها به‌منظور مداخله در مسیر واکنش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی همواره یکی از موضوع‌های درخور توجه صنعت و پزشکی بوده است (۲). پیش‌ماده (سوبسترا) و محصول این آنزیم‌ها نقش‌های مهمی را در سازوکار تمام موجودات ایفا می‌کنند؛ از این رو، این آنزیم‌ها نقش‌های فیزیولوژیک بسیاری دارند و کنترل بیان و فعالیت آنها سبب تعادل بین میزان آمینواسیدهای بدن می‌شود (۳).

ال-آسپاراژیناز، آنزیمی است که به دلیل درمان انواع مختلف سرطان و عمدتاً لوسمی لنفوبلاستی حاد در شیمی‌درمانی کاربرد فراوانی دارد (۴). عملکرد اختصاصی آنزیم ال-آسپاراژیناز (ال-آسپاراژیناز آمیدوهیدرولاز، E.C.3.5.1.1) سبب شده است این آنزیم به‌عنوان دارویی باارزش در درمان بیماری‌های مختلف مانند لوسمی لنفوبلاستی حاد دوران کودکی، لوسمی میلو مونوسیتیک، سارکوم رتیکولوم، سارکوم ملانوما، لنفوم غیرهوچکین، سرطان پانکراس و سارکوم لنفوم گاوی استفاده شود (۵). آنزیم ال-آسپاراژیناز، آمیدوهیدرولازی است که با دامیناسیون ال-آسپاراژین، آن را به ال-آسپارتیک‌اسید^۱ و آمونیاک^۲ تبدیل و به میزان کمتری نیز واکنش هیدرولیز گلوتامین به گلوتامیک‌اسید را کاتالیز می‌کند (۶).

سلول‌های توموری و سرطانی به دلیل نداشتن آنزیم ال-آسپاراژین سنتتاز، آمینواسید ال-آسپاراژین موردنیاز خود را از جریان خون تأمین می‌کنند؛ بنابراین، تزریق داخل وریدی آنزیم ال-آسپاراژیناز سبب کاهش غلظت آمینواسید ال-آسپاراژین در خون و جلوگیری از رشد

سلول‌های سرطانی می‌شود (۷). این آنزیم با فعالیت اختصاصی و انتخابی خود روی سلول‌های سرطانی، به‌شکل دارو یا عامل شیمی‌درمانی عمل می‌کند و سبب مرگ سلول‌های یادشده می‌شود. ال-آسپاراژینازها در بیوسنتز خانواده آسپارتیک‌آمینواسیدها نیز نقش حیاتی دارند (۸).

آسپاراژیناز به‌عنوان کمک‌کننده به فرآوری مواد غذایی می‌تواند میزان تشکیل اکریل‌آمید در مواد نشاسته‌دار را تا بیش از ۹۰ درصد کاهش دهد؛ بدون این که طعم و ظاهر ماده غذایی دستخوش تغییر شود (۹).

بسیاری از ریزموجودات شامل باکتری‌ها مانند *استرپتومایسس گولبارجنسیس*^۳، *انتروباکتر کلوآکه*^۴ و *سراشیا مارسنس*^۵، قارچ‌ها و مخمرها آنزیم‌های ال-آسپاراژیناز را تولید می‌کنند (۱۰-۱۲). تاکنون ایزوآنزیم‌های متفاوتی از این آنزیم با منشأ گیاهی، یوکاریوتی و پروکاریوتی شناسایی شده‌اند (۱۳)؛ باوجوداین، ایزوآنزیم‌های جداسازی شده از ریزموجودات به‌ویژه باکتری‌ها از سایر ال-آسپاراژینازها مؤثرترند (۱۴). ریزموجودات تولیدکننده ال-آسپاراژیناز در طیف وسیعی از مناطق اکولوژیک یافت می‌شوند و در این راستا، باکتری‌های متعددی از آب و خاک جدا شده‌اند که فعالیت ال-آسپاراژینازی مطلوبی از خود نشان می‌دهند (۱۵). مؤثرترین ایزوآنزیم‌های ال-آسپاراژیناز که امروزه به‌عنوان داروی ضدسرطان در دسترس هستند و به‌شکل تجاری تولید می‌شوند، از منابع میکروبی مانند *اشریشیا کلی*^۶، *اروینیا کاراتوورا*^۷ و سوبه‌های *باسیلوس*^۸ به دست می‌آیند (۱۶).

گزارش‌هایی نیز درباره تولید آنزیم توسط قارچ‌های رشته‌ای (۱۷) و مخمرهای ساکارومایسس سروریزیه^۹ (۱۸) و *کاندیدا*^{۱۰} (۱۹) وجود دارند. مخمرها در انواع

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی ریزموجودات مولد ال-آسپاراژیناز

به منظور جداسازی مخمرهای مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز، نمونه‌های خاک به‌طور تصادفی از نقاط مختلف شهر اصفهان و به‌ویژه مزارع کشاورزی جمع‌آوری و مخمرهای گوناگون از این نمونه‌ها جداسازی شدند. به‌منظور غنی‌سازی اولیه مخمرها، ۱ گرم از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ال-آسپاراژین‌براث [آسپاراژین (۳ گرم برلیتر)، دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات (۱ گرم برلیتر)، منیزیم‌سولفات‌هیدرات (۵ گرم برلیتر) و پتاسیم‌سولفات‌هیدرات (۱۰ گرم برلیتر) تکمیل شده با ۰/۰۵ درصد کلرامفنیکل] با اسیدیته ۴/۷ افزوده و نمونه به مدت ۳ روز در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه روی شیکر گرماگذاری شد؛ این آزمایش سه بار تکرار شد. در نهایت، ۱ میلی‌لیتر از محیط رویی برداشته و برای جداسازی مخمرها به محیط کشت YPG آگار [عصاره مخمر (۱۰ گرم برلیتر)، پیتون (۲۰ گرم برلیتر)، گلوکز (۲۰ گرم برلیتر) و آگار (۲۰ گرم برلیتر) تکمیل شده با ۰/۰۵ کلرامفنیکل] تلقیح و به‌شکل خطی کشت داده شد. پس از طی شدن زمان گرماگذاری، رنگ‌آمیزی ساده با رنگ متیلن‌بلو برای نمونه‌های رشد کرده انجام و هر کدام از کلن‌های متفاوت با روش کشت خطی روی محیط‌های YPG آگار خالص شد (۲۵).

غربال‌گری مخمرها از نظر تولید آنزیم

به منظور شناسایی مخمرهای تولیدکننده آنزیم آسپاراژیناز بر اساس روش سنجش سریع از محیط

محیط‌ها مانند خاک، تالاب‌ها و رودخانه‌ها یافت می‌شوند و بخشی از فلور میکروبی اکوسیستم‌های طبیعی را تشکیل می‌دهند (۵). مخمرها به دلیل قابلیت انجام فرایندهای سلولی پس از ترجمه و نداشتن اندوتوکسین، اهمیت فراوانی در صنعت دارند (۲۰).

مخمر ساکارومایسس سرویزیه، موجودی تک‌سلولی است که از طریق جوانه‌زدن هر سلول در محیط کشت به سرعت تکثیر می‌شود (۲۴-۲۱). در ساکارومایسس سرویزیه، تنظیم سازوکار آسپاراژین پیچیده است. سنتز ال-آسپاراژین در مسیری ناشناخته از طریق محصولات دو سیسترون غیرمرتبط (ASN1 و ASN2) تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در این گونه، مصرف ال-آسپاراژین توسط دو شکل متفاوت آسپاراژیناز انجام می‌شود: (۱) ال-آسپاراژیناز I که به‌طور ساختاری سنتز می‌شود و تنها روی ال-آسپاراژین درون‌سلولی فعال است و آن را دامینه می‌کند. (۲) ال-آسپاراژیناز II، گلیکوپروتئینی است که می‌تواند هر دو نوع ال و دی آسپاراژین را وقتی خارج از سلول هستند، دامینه کند.

باوجود اینکه آنزیم ال-آسپاراژیناز تیپ II در مقایسه با سایر داروهایی که در شیمی‌درمانی استفاده می‌شوند، سازگاری بسیار زیادی با بافت و سازوکارهای حیاتی بدن دارد، مانند داروهای دیگر ممکن است آثار جانبی نامطلوبی را نشان دهد؛ از این رو، پژوهشگران برای دستیابی به آسپاراژینازی که توان درمانی زیاد و عوارض جانبی کمی داشته باشد، در تلاشند. در پژوهش حاضر، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی مخمرهای مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز و سپس بهینه‌سازی تولید آنزیم با استفاده از شرایط محیطی مختلف به منظور یافتن روشی بهینه برای تولید آنزیم‌های آسپاراژینازی بررسی شد.

شیکردار (۱۳۰ دور در دقیقه) با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

محیط سیزپکس داکس، محیط تولید آنزیم آسپاراژیناز است که برای تولید آسپاراژیناز در ارلن استفاده شد. ۵۰ میلی لیتر محیط کشت سیزپکس داکس [گلوکز (۲ گرم برلیتر)، آسپاراژین (۱۰ گرم برلیتر)، فسفات هیدروژن دی پتاسیم (۱/۲۵ گرم برلیتر)، کلراید پتاسیم (۰/۵۲ گرم برلیتر)، سولفات آهن (۰/۰۳ گرم برلیتر) و سولفات روی (۰/۵۲ گرم برلیتر)] در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری تهیه و سپس در شرایط استریل، ۱ درصد (۱ میلی لیتر) مایع تلقیح به محیط کشت تولید شده منتقل و میزان رشد مخمرها پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه بررسی شد. میزان تولید آسپاراژیناز به روش رنگ سنجی بر پایه تغییر رنگ آمونیاک بر اساس روش ایمادا و با دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد (۲۵).

سنجش فعالیت آنزیمی

روش تیتراسیون برای سنجش فعالیت آسپاراژیناز به کار رفت. در مرحله نخست، ۱ میلی لیتر از محیط های کشت مخمر نمونه برداری شد و نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول رویی (محلول آنزیمی) به ۰/۹ میلی لیتر ال-آسپاراژین ۰/۰۱ مولار و ۱ میلی لیتر بافر تریس-HCL ۰/۵ مولار با اسیدیته ۶/۸ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در بنماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری و پس از این زمان، واکنش با اضافه کردن ۰/۱ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱/۵ مولار متوقف شد. به منظور حذف رسوبات، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه

حداقل آسپاراژین آگار [آسپاراژین (۱ گرم برلیتر)، سولفات منیزیم (۰/۰۵ گرم برلیتر)، کلراید پتاسیم (۰/۰۵ گرم برلیتر)، کلراید سدیم (۰/۰۲ گرم برلیتر)، فنل رد (۰/۰۱۲ گرم برلیتر) و آگار (۱/۵ گرم برلیتر)] استفاده شد. یک کلنی از هر نمونه روی محیط قرار داده شد و گرماگذاری به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انجام شد. هر ۲۴ ساعت یک بار، محیط ها از نظر تغییر رنگ و قطر هاله ایجاد شده بررسی شدند. آنزیم ال-آسپاراژیناز با هیدرولیز آسپاراژین موجود در محیط کشت سبب آزادسازی آمونیوم و قلیایی شدن محیط کشت می شود؛ در نتیجه با تغییر اسیدیته محیط از اسیدی به قلیایی، تغییر رنگ محیط از زرد به صورتی مشاهده می شود. در پژوهش حاضر، مخمرهایی که آنزیم تولید کردند، توانستند آمونیاک را در محیط آزاد کنند، اسیدیته را تغییر دهند و هاله ارغوانی رنگ ایجاد کنند. مخمرهایی که هاله ارغوانی ایجاد نکردند، حذف شدند (۲۵).

سنجش تولید آنزیم آسپاراژیناز

به منظور کشت مخمرها و تهیه مایع تلقیح، از هر مخمر به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط YPD برات [عصاره مخمر (۱۰ گرم برلیتر)، پپتون (۲۰ گرم برلیتر) و دکستروز (۲۰ گرم برلیتر)] تلقیح شد و نمونه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (۱۳۰ دور در دقیقه) با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. جذب مایع تلقیح در طول موج ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد و با رسیدن به جذب ۰/۵، مقدار ۱ درصد (۱ میلی لیتر) از مایه تلقیح به محیط تولید آنزیم (۵۰ میلی لیتر محیط سیزپکس داکس^{۱۱}) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور

۱۰ میکرولیتر آب مقطر حل و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (PCR) قرار داده شد. DNA هر نمونه به ویال‌های مربوطه افزوده و پس از اضافه کردن ترکیبات لازم برای واکنش و پرایمرهای طراحی شده، درون دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. قطعه ۶۵۵ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن کدکننده 18S-rRNA (ITS4)، ITS1) به وسیله پرایمر رفت (5'CCTTACTACTTGGATAACCGTGG3') و برگشت (5'CCCTATTATCATTACGATGGTCC3')

طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی تکثیر شد.

واکنش PCR با شرایط دمایی ۳۰ ثانیه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله گسترش نهایی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از بررسی کیفیت محصول PCR حاصل از تکثیر قطعه مربوط به ژن کدکننده 18S-rDNA (ITS4، ITS1) از نظر تک‌باند بودن، ۳۰ میکرولیتر محصول PCR برای تعیین توالی ارسال شد. نتایج با نرم‌افزار Chromas ۲/۱ بررسی و تصحیح و به کمک سرور BASTN در پایگاه NCBI ارزیابی و گونه مربوطه یا نزدیک شناسایی شد.

بهینه‌سازی تک‌فاکتوره و چندفاکتوره با طراحی آزمون آماری RSM

بر اساس مطالعه‌های پژوهشگران در زمینه بهینه‌سازی آنزیم ال-آسپاراژیناز، می‌توان گفت عوامل متعددی از جمله اسیدیته، منبع کربن، منبع نیتروژن، دما، زمان و

سانتریفیوژ و محلول رویی برای مرحله بعد استفاده شد. آمونیاک آزادشده در محلول رویی با اضافه کردن ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف نسلر^{۱۲} (سیگما) به لوله‌های حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت و ۱/۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر به روش رنگ‌سنجی شناسایی شد. پس از ورتکس، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر در برابر شاهد دارای ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر خوانده شد. هر واحد فعالیت آنزیم آسپاراژیناز معادل مقدار آنزیمی است که ۱ میکرومول آمونیاک را در مدت یک دقیقه از ال-آسپاراژین آزاد می‌کند. مقدار آمونیاک آزادشده در این آزمایش در ازای ۳۰ دقیقه گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آنزیم بود (۲۵).

به منظور تبدیل جذب نوری نمونه‌های نامشخص به واحد آنزیمی از منحنی استاندارد استفاده شد. محلول ۶ میلی‌مولار آمونیوم سولفات تهیه و حجم‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵، ۰/۴ و ۰/۴۵ میلی‌لیتر از این محلول به لوله‌های آزمایش اضافه و سپس مراحل سنجش فعالیت آنزیم انجام شد. آزمایش در ۳ تکرار انجام و میانگین جذب داده‌ها محاسبه شد.

شناسایی مولکولی گونه‌های مخمری برتر مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز

به منظور شناسایی مولکولی، ابتدا سویه‌های انتخاب شده به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت YPG و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. از روش کلنی-PCR برای شناسایی جنس و گونه مخمرها استفاده شد؛ به این منظور، پرایمر با نرم‌افزار طراحی شد. در این روش، مقداری از یک تک کلنی مخمر در

۵ تا ۹، ال-آسپاراژین به عنوان منبع نیتروژن (۶ تا ۱۴ درصد)، دما بین ۲۵ تا ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان بین ۸۰ تا ۱۶۰ ساعت به عنوان فاکتورهای مؤثر در فرایند بهینه‌سازی در روش سطح پاسخ (RSM) به کار برده شدند. آزمون شماره ۶ با شرایط ۲ گرم برلیتر گلوکز، ۱۰ گرم برلیتر ال-آسپاراژیناز، اسیدیته ۷، دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و زمان ۱۲۰ ساعت، برترین و نخستین آزمون با داشتن بیشترین اثر تعیین شد. آزمون‌های شماره ۱ و شماره ۱۸ به ترتیب آزمون‌های دوم و سوم بودند که بیشترین اثر را داشتند (جدول ۱).

غلظت‌های مختلف آنها روی فرایند بهینه‌سازی آنزیم تأثیر می‌گذارند؛ علاوه بر این عوامل که به طور مستقل تأثیر دارند، میان‌کنش آنها نیز در فرایند یادشده مهم و سبب ایجاد نتایج متفاوت می‌شود؛ از این رو، در آزمایش حاضر از آزمون مرکب مرکزی سطح پاسخ بهره گرفته شد تا ضمن به حداقل رساندن اثر عوامل محیطی، بتوان میان‌کنش متغیرهای مختلف را نیز بررسی کرد. در این آزمایش بر اساس منابع موجود در محیط کشت سیزپکس داکس، پنج متغیر غلظت‌های مختلف گلوکز (۱/۵ تا ۲/۵ درصد) به عنوان منبع کربن، محدوده اسیدیته

جدول ۱- طراحی بدون فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز طی ۴۹ آزمایش طراحی شده با RSM

Table 1 – RSM design experiments for L-asparaginase activity evaluation of isolated yeast

آزمون	فاکتور A 1: گلوکز (گرم بر لیتر)	فاکتور B 2: ال-آسپاراژین (گرم بر لیتر)	فاکتور C 3: زمان (ساعت)	فاکتور D 4: pH	فاکتور E 5: دما (سانتی‌گراد)
1	2	10	120	7	35
3	2.5	14	80	5	45
4	2	10	120	7	35
5	1.5	6	80	5	25
6	2	10	120	7	35
7	2	10	120	7	58.7841
8	2	19.5137	120	7	35
9	1.5	6	160	9	25
10	2.5	6	80	5	25
11	2.5	14	160	5	45
12	2	10	120	7	35
13	2.5	14	80	9	25
14	2.5	6	160	5	25
15	1.5	14	80	5	45
16	1.5	6	80	5	45
17	2.5	14	160	5	25
18	3.18921	10	120	7	35
19	2.5	14	80	5	25
20	2	10	120	7	11.2159

آزمون	فاکتور A 1: گلوکز (گرم بر لیتر)	فاکتور B 2: ال-آسپاراژین (گرم بر لیتر)	فاکتور C 3: زمان (ساعت)	فاکتور D 4: pH	فاکتور E 5: دما (سانتی‌گراد)
21	2.5	14	160	9	25
22	2.5	6	160	9	45
23	2.5	6	80	5	45
24	2.5	6	160	9	25
25	2	10	120	7	35
26	2	10	120	7	35
27	1.5	6	80	9	25
28	1.5	14	80	9	25
29	2.5	6	80	9	45
30	1.5	14	80	5	25
31	2	0.486343	120	7	35
32	1.5	6	160	5	25
33	2	10	120	7	35
34	1.5	14	160	9	45
35	2	10	120	11.7568	35
36	2	10	120	2.24317	35
37	1.5	14	160	5	25
38	1.5	14	160	5	45
39	2	10	120	7	35
40	2.5	6	80	9	25
41	1.5	6	80	9	45
42	1.5	14	80	9	45
43	2.5	6	160	5	45
44	1.5	6	160	9	45
46	2.5	14	80	9	45
47	2.5	14	160	9	45
48	1.5	6	160	5	45
49	0.810793	10	120	7	35

استفاده شد و پس از وارد کردن متغیرها و سطوح آنها در نرم‌افزار، فرایند بهینه‌سازی طی ۵۱ مرحله آزمون بررسی و در نهایت، تأثیر سطوح مختلف پارامترهای انتخاب شده بررسی شد.

فاکتورها و سطوح مختلف بهینه‌سازی در شکل ۱ آورده شده‌اند. متغیرهای عددی در دو سطح بالا (+۱) و یک سطح پایین (-۱) مطالعه شدند. به منظور طراحی آزمایش از نرم‌افزار Design-Expert، نسخه‌ی ۱۱

Central Composite Design

Each numeric factor is set to 5 levels: plus and minus alpha (axial points), plus and minus 1 (factorial points) and the center point. If categorical factors are added, the central composite design will be duplicated for every combination of the categorical factor levels.

Numeric factors: (2 to 50) Horizontal Enter factor ranges in terms of ± 1 levels

Categoric factors: (0 to 10) Vertical Enter factor ranges in terms of alphas

	Name	Units	Low	High	-alpha	+alpha
A [Numeric]	Glucose	g/L	1.5	2.5	0.810793	3.18921
B [Numeric]	L aspargin	g/L	6	14	0.486343	19.5137
C [Numeric]	Time	h	80	160	24.8634	215.137
D [Numeric]	pH		5	9	2.24317	11.7568
E [Numeric]	Temperature	c	25	45	11.2159	58.7841

Type: Blocks:

Points

Non-center points: 42

Center points: 8

alpha = 2.37841 50 Runs

شکل ۱- فاکتورهای عددی و سطوح بررسی شده بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ (RSM)

Fig 1 – Factors and levels of RSM in optimization test

صورتی پررنگ تر یا بزرگ تری داشتند (شکل‌های ۲ تا ۴) و فعالیت آنزیمی با استفاده از کشت مایع برای سوئیۀ 5S تعیین شد.

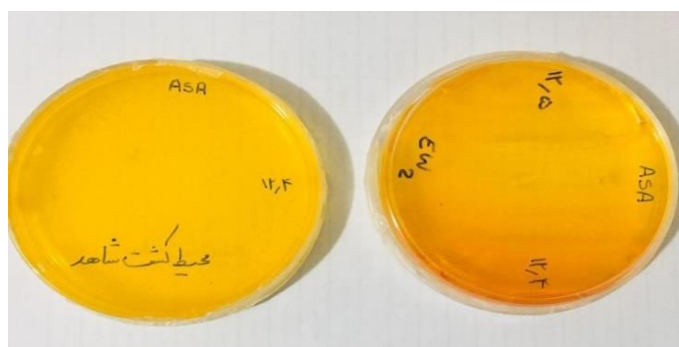
تجزیه و تحلیل داده‌ها

در مطالعه حاضر از نرم افزار RSM برای تجزیه و تحلیل آزمایش‌ها استفاده شد. اطلاعات با آنالیز واریانس ANOVA تحلیل شدند و تأثیر فاکتورها بررسی شد.

نتایج

جداسازی سوئیۀ اولیه

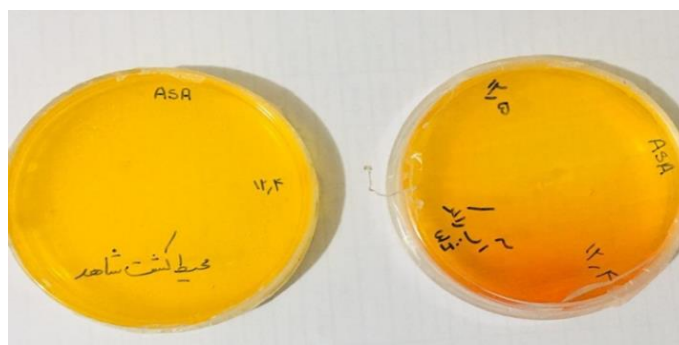
پس از جداسازی و خالص‌سازی نمونه‌های جمع‌آوری شده، سوئیۀ‌هایی انتخاب شدند که هاله



شکل ۲- تغییر رنگ محیط کشت مخمر EW2 از کنار پلیت پس از ۷۲ ساعت الف) پیش از ۲۴ ساعت، ب) پس از ۲۴ ساعت
 Fig 2 – Color changing in EW2 yeast culture medium after 72 hours incubation (a) before 24 hours (b) after 24 hours



شکل ۳- تغییر رنگ محیط کشت مخمر 5S2 پس از ۷۲ ساعت الف) پیش از ۲۴ ساعت، ب) پس از ۲۴ ساعت
 Fig 3 – Color changing in 5S2 yeast culture after 72 hours incubation (a) before 24 hours (b) after 24 hours



شکل ۴- تغییر رنگ محیط کشت آب راکد WJ پس از ۷۲ ساعت الف) پیش از ۲۴ ساعت، ب) پس از ۲۴ ساعت
 Fig 4 - Color changing in WJ yeast culture after 72 hours incubation (a) before 24 hours (b) after 24 hours

سویه را نشان می‌دهد. این سویه نسبت به سویه‌های دیگر، بیشترین تولید آنزیم را در کمترین زمان (چهاردهمین ساعت) از منحنی رشد خود نشان داد و بنابراین به‌عنوان سویه اصلی برگزیده شد. تمام مراحل بهینه‌سازی با توجه به بیشترین زمان تولید انجام شد.

جداسازی مخمرهای مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز

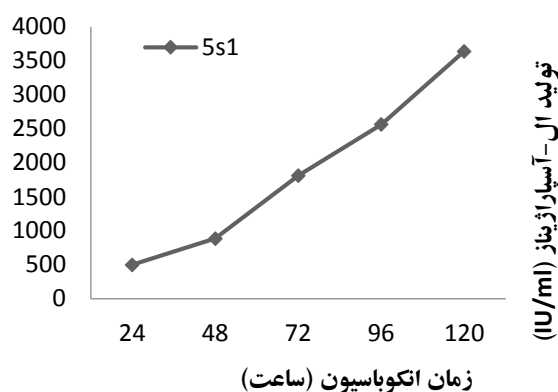
بر اساس مقدار آمونیوم آزادشده، مخمر 5S2 از بین سویه‌های جداشده به‌عنوان سویه اصلی برای ادامه کار انتخاب شد. شکل ۵، منحنی تولید آنزیم توسط این

فعالیت آنزیم در این مخمر پس از ۱۲۰ ساعت و معادل ۳۲۴۵/۹ u/ml اندازه گیری شد.

جدول ۲، میزان آسپاراژیناز تولیدشده توسط مخمر 5S2 و OD سنجیده شده با دستگاه اسپکتروفتومتر بر اساس زمان را نشان می دهد. با توجه به نتایج، بیشترین

جدول ۲- سنجش فعالیت ال-آسپاراژیناز برای مخمر 5S2
Table 2 – L-Asparaginase activity of 5S2 yeast isolate

ردیف	فعالیت آنزیم (u/ml)	زمان (ساعت)	غلظت ((Mm/L)	OD
1	95/9	24	68/5	0/042
2	487/9	48	348/5	0/098
3	1418/9	72	1013/5	0/231
4	2174/9	96	1553/5	0/339
5	3245/9	120	2318/5	0/492
6	2447/9	144	1748/5	0/378



شکل ۵- تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز توسط سویه مخمر در محیط کشت اختصاصی سیزپکس داکس در مدت زمان ۱۲۰- ساعت، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و سرعت هوادهی ۱۳۰ دور در دقیقه

Fig 5 – L-Asparaginase production by yeast isolate after 120 hours at 30°C and 130 RPM of aeration speed

تعیین توالی و ثبت نمونه ها

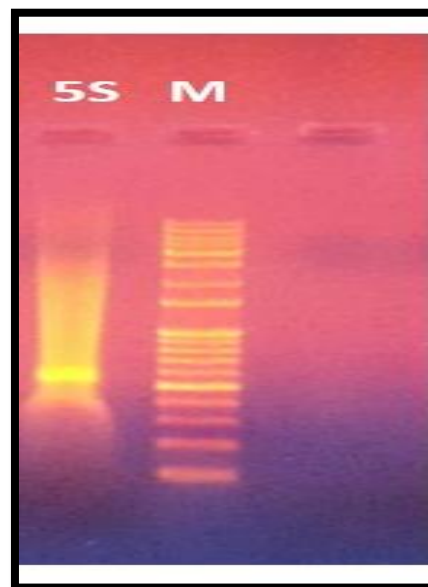
پس از انجام تعیین توالی و دریافت فایل مربوطه، توالی مدنظر با نرم افزار Choromas ارزیابی و ویرایش شد. قطعه 18S-rDNA تکثیرشده توسط سویه 5S2 در شکل ۶ آورده شده است.

شناسایی مخمر مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز

بررسی ویژگی های ظاهری و میکروسکوپی این سویه نشان داد کلنی های صاف بزرگ، گرد، سفید یا کرم دارد و نتیجه رنگ آمیزی گرم نیز سلول های ریز کروی، بیضی شکل را نشان داد.

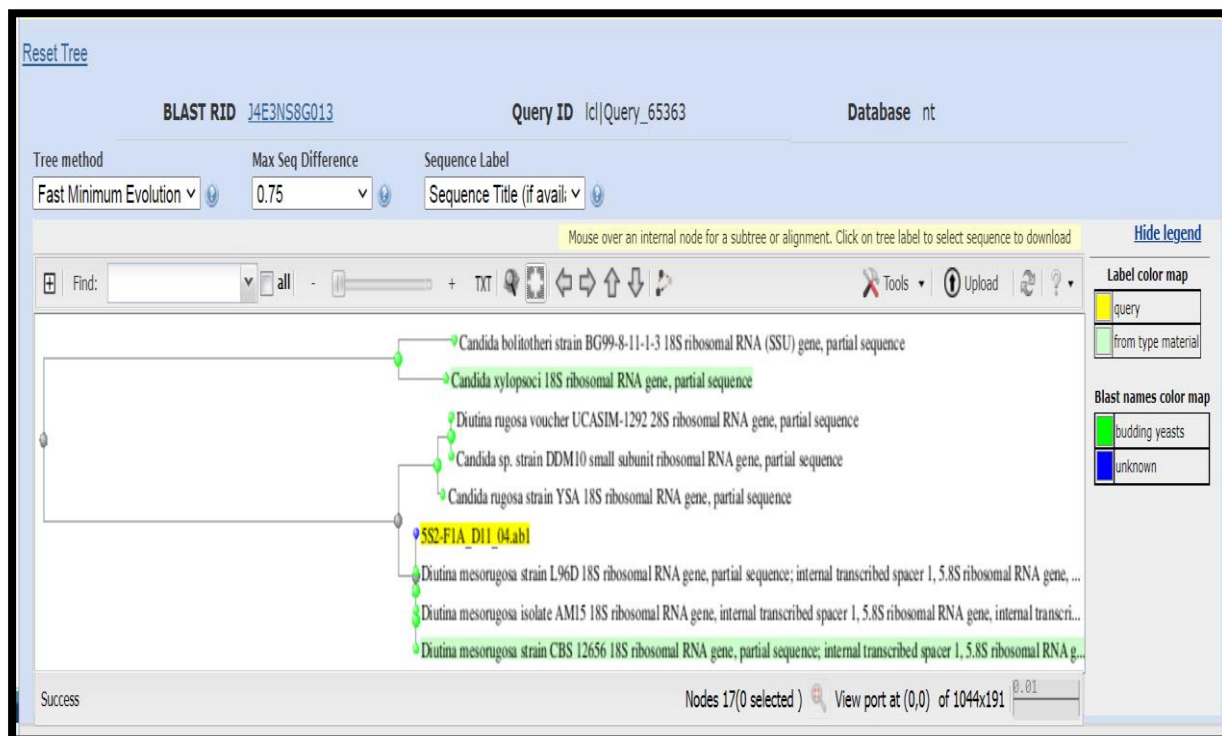
در پژوهش حاضر برای نخستین بار، مخمر 5S2 به‌منظور تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز بررسی شد. پس از خوانده‌شدن توالی و دریافت فایل مربوطه، توالی مدنظر با نرم‌افزار Chromas ارزیابی و ویرایش شد. مقایسه توالی‌ها با استفاده از سرور BASTN در پایگاه NCBI نشان داد توالی 18S-rDNA سویه مخمر 5S2 دارای بیشترین شباهت و پوشش با سویه‌ای از دیورتینا مسروگوسا^{۱۳} است. [شکل ۷](#)، درخت فیلوژنی قطعه ترادف‌یابی شده جدایه 5S2 را نشان می‌دهد.

پس از بررسی‌های انجام‌شده، این جدایه با نام سویه *Diutina mesorugosa strain SBG-IAUF-2* با شماره دسترسی MZ901181 در پایگاه اطلاعاتی NCBI به‌عنوان جدایه‌ای جدید در تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز ثبت شد ([شکل ۵](#)).



شکل ۶- الکتروفورز محصول قطعه ۶۵۵ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن کدکننده (ITS4, ITS1) برای سویه مخمر 5S2 روی ژل آگارز ۱ درصد (M: لدر 100 bp).

Fig 6 – Electrophoresis of the product of the 655 bp fragment resulting from amplification of the coding gene (ITS4, ITS1) for yeast strain 5S2 on 1% agarose gel (M: ladder bp 100).



شکل ۷- درخت فیلوژنی قطعه توالی‌یابی شده در سویه 5S2 گرفته‌شده از پایگاه اطلاعاتی NCBI
Fig 7 - Phylogeny tree of the sequenced fragment in strain 5S2 from NCBI

بهینه‌سازی با استفاده از آزمون آماری RSM

از آنجا که تمام بررسی‌های انجام‌شده نشان دادند مخمر 5S2 بهترین فعالیت آنزیمی را دارد، بهینه‌سازی برای نمونه 5S2 انجام شد. ۴۹ آزمایشی که با نرم‌افزار Design-Expert، نسخه ۱۱ (شرکت Stat-Ease, Inc شهر مینه‌سوتا آمریکا) طراحی شده بودند، انجام شدند و تأثیر ۵ فاکتور غلظت‌های مختلف گلوکز (۱/۵ تا ۲/۵ درصد) به‌عنوان منبع کربن، ال-آسپاراژین به‌عنوان منبع نیتروژن (۶ تا ۱۴ درصد)، دما بین ۲۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد، سطوح مختلف اسیدیته و زمان بین ۸۰ تا

۱۶۰ ساعت در فرایند بهینه‌سازی آنزیم ال-آسپاراژیناز سویه 5S2 بررسی شد. بیشترین فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز بهینه‌سازی‌شده با شماره آزمایش‌های مربوطه در **جدول ۳** آورده شده است. بر اساس نتایج، بیشترین فعالیت آنزیم (۱۷۲۲/۸ u/ml) در مرحله بهینه‌سازی در آزمون شماره ۶ با مقدار گلوکز ۲ درصد، اسیدیته ۷، زمان ۱۲۰ ساعت، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ال-آسپاراژین ۱۰ درصد به دست آمد که نشان‌دهنده بیشترین مقدار فعالیت آنزیم است.

جدول ۳- نتایج حداکثر میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در بهینه‌سازی طی ۴۹ آزمایش طراحی شده توسط RSM به ترتیب حداکثر میزان فعالیت آنزیمی

Table 3- The maximum L-asparaginase activity in optimization during 49 experiments designed by RSM

آزمون	فاکتور A 1: گلوکز (گرم بر لیتر)	فاکتور B 2: ال-آسپاراژین (گرم بر لیتر)	فاکتور C 3: زمان (ساعت)	فاکتور D 4: pH	فاکتور E 5: دما (سانتی‌گراد)	فعالیت آنزیمی (u/ml)
6	2	10	120	7	35	1722.8
1	2	10	120	7	35	1719.54
4	2	10	120	7	35	1719.54
26	2	10	120	7	35	1719.54
39	2	10	120	7	35	1719.54
33	2	10	120	7	35	1719.5
18	3.18921	10	120	7	35	1264.77

تحلیل آماری و آنالیز واریانس ANOVA نشان‌دهنده اثر هر متغیر در کنار ضریب همبستگی مربوطه یعنی P-value و F-value بودند.

داده‌های به دست آمده از طراحی Burman Plackett یا PBD روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز توسط سویه 5S2 در معرض تحلیل واریانس ANOVA قرار گرفتند و نرم افزار آماری Design Expert 11 (**جدول ۴**)،

جدول ۴- تحلیل آماری و آنالیز واریانس ANOVA در بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز توسط سویه 5S2

Table 4- Statistical analysis and analysis of variance ANOVA in optimization of L-asparaginase enzyme production by strain 5S2

عوامل	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value	p-value
مدل	1.323E+07	20	6.617E+05	15341.72	< 0.0001
A- گلوکز	250.48	1	250.48	5.81	0.0233
B- ال-آسپاراژین	1457.31	1	1457.31	33.79	< 0.0001
C- زمان	18.81	1	18.81	0.4361	0.5148
pH-D	725.65	1	725.65	16.83	0.0004
E- دما	557.37	1	557.37	12.92	0.0013
AB	91.77	1	91.77	2.13	0.1566
AC	1240.78	1	1240.78	28.77	< 0.0001
AD	3038.23	1	3038.23	70.45	< 0.0001
AE	1115.27	1	1115.27	25.86	< 0.0001
BC	1823.66	1	1823.66	42.28	< 0.0001
BD	152.84	1	152.84	3.54	0.0710
BE	1139.10	1	1139.10	26.41	< 0.0001
CD	1012.20	1	1012.20	23.47	< 0.0001
CE	168.81	1	168.81	3.91	0.0586
DE	366.47	1	366.47	8.50	0.0072
A ²	3.437E+05	1	3.437E+05	7969.44	< 0.0001
B ²	1.605E+06	1	1.605E+06	37215.09	< 0.0001
C ²	3.366E+06	1	3.366E+06	78038.01	< 0.0001
D ²	3.329E+06	1	3.329E+06	77191.61	< 0.0001
E ²	3.368E+06	1	3.368E+06	78082.49	< 0.0001
Residual	1121.34	26	43.13		
Lack of Fit	755.02	19	39.74	0.7594	0.7043
Pure Error	366.32	7	52.33		
Cor Total	1.323E+07	46			

مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار است. همچنین مقدار Lack of Fit بیشتر از ۰/۰۵ نشان داد عدم تناسب بین داده‌ها وجود ندارد.

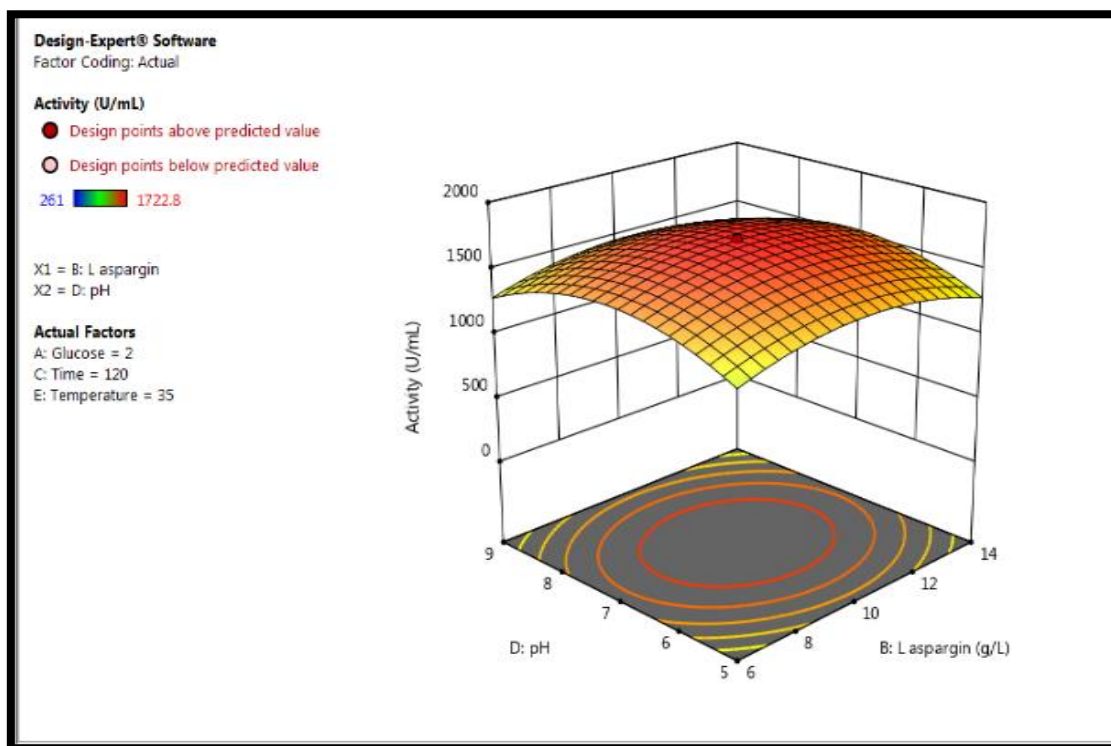
بیشترین میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز بهینه‌سازی شده با شماره آزمایش‌های مربوطه در **جدول ۳** آورده شده است. نتایج این بخش نشان دادند بیشترین فعالیت آنزیم طی مرحله بهینه‌سازی، در آزمون شماره ۶ با مقدار گلوکز ۲ درصد، اسیدیته ۷، زمان ۱۲۰ ساعت، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ال-آسپاراژین

بر اساس تحلیل رگرسیون (**جدول ۴**) مشخص شد غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین، سطوح مختلف اسیدیته و زمان‌های مختلف، فاکتورهای سیگنال مثبت هستند. مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ نشان داد فاکتورهای یادشده مدل معنادار هستند و به‌طور معناداری بر تولید آنزیم اثر می‌گذارند؛ بنابراین، ارتباط بین ال-آسپاراژین-دما (BE)، ال-آسپاراژین-زمان (BC)، دما-اسیدیته (DE)، گلوکز-دما (AE)، گلوکز-زمان (AC)، گلوکز-اسیدیته (AD) و زمان-اسیدیته (CD) با

(BE)، ال-آسپاراژین-زمان (BC)، دما-اسیدیته (DE)، گلوکز-دما (AE)، گلوکز-زمان (AC)، گلوکز-اسیدیته (AD) و زمان-اسیدیته (CD) با مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار هستند. همچنین مقدار Lack of Fit بیشتر از ۰/۰۵ نشان داد عدم تناسب بین داده‌ها وجود ندارد.

شکل ۸ (منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین و اسیدیته بر بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می‌دهد. ارتباط بین ال-آسپاراژین-اسیدیته (BD) با مقدار P-value بیشتر از ۰/۰۵ معنادار نیست (**جدول ۴**)؛ با وجود این، منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ‌دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می‌گیرد. باتوجه به منحنی ارتباط دویه‌دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند و باتوجه به اطلاعات **جدول ۴**، این اثر از نظر آماری معنادار نیست.

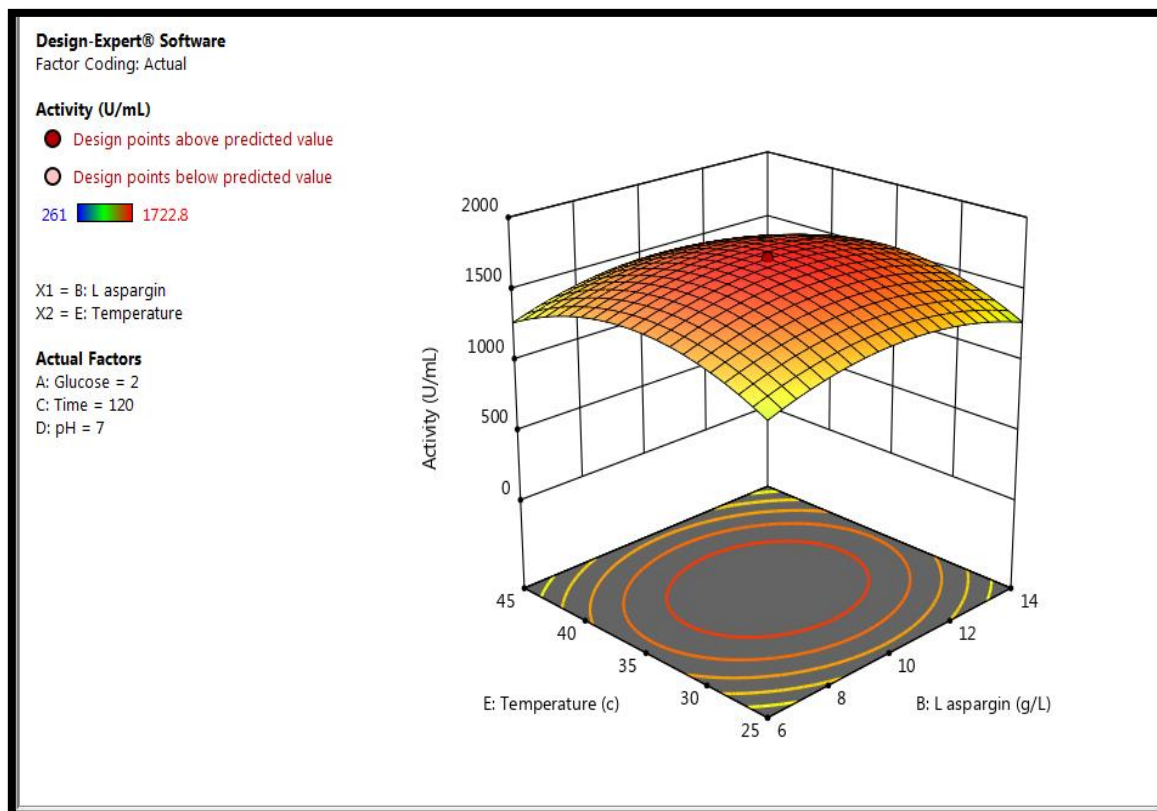
۱۰ درصد به دست می‌آید و فعالیت آنزیمی u/ml ۱۷۲۲/۸ حاصل شد که نشان‌دهنده بیشترین میزان فعالیت آنزیم است. داده‌های به‌دست‌آمده از طراحی Burman Plackett یا PBD روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز توسط سویه 5S2 در معرض تحلیل واریانسی ANOVA قرار گرفتند و نرم‌افزار آماری Design Expert 11 (**جدول ۴**)، تحلیل آماری و آنالیز واریانسی ANOVA نشان‌دهنده اثر هر متغیر در کنار ضریب همبستگی مربوطه یعنی P-value و F-value بودند. بر اساس تحلیل رگرسیون مشخص شد غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین، سطوح مختلف اسیدیته و زمان‌های مختلف، فاکتورهای سیگنال مثبت هستند. مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ نشان داد فاکتورهای یادشده مدل معنادار هستند و به‌طور معناداری بر تولید آنزیم اثر می‌گذارند؛ بنابراین، ارتباط بین ال-آسپاراژین-دما



شکل ۸- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان‌دهنده اثر غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین و اسیدیته بر بهینه‌سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
Fig 8 -The three-dimensional response surface curve showing the effect of different L-asparagine concentrations and acidity on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

و منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ‌دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می‌گیرد. باتوجه به منحنی ارتباط دوه‌دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند.

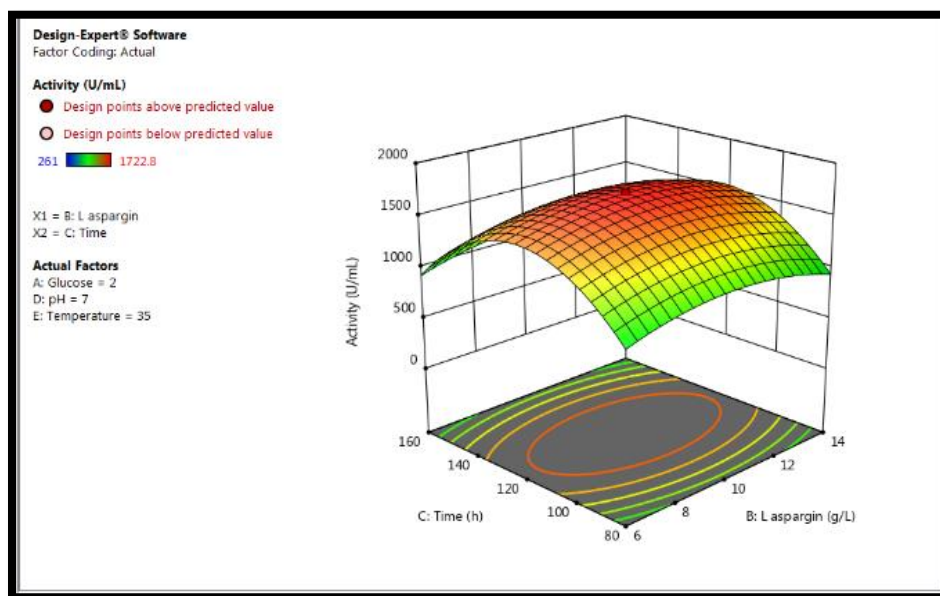
شکل ۹ (منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین و دما بر بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می‌دهد. ارتباط بین ال-آسپاراژین-دما (BE) با مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار است (جدول ۴)



شکل ۹- منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ نشان‌دهنده اثر غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین و دما بر بهینه‌سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
Fig 9 – The three-dimensional curve of the response surface showing the effect of different concentrations of L-asparagine and temperature on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

باوجود این، منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ‌دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می‌گیرد. باتوجه به منحنی ارتباط دوه‌دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند.

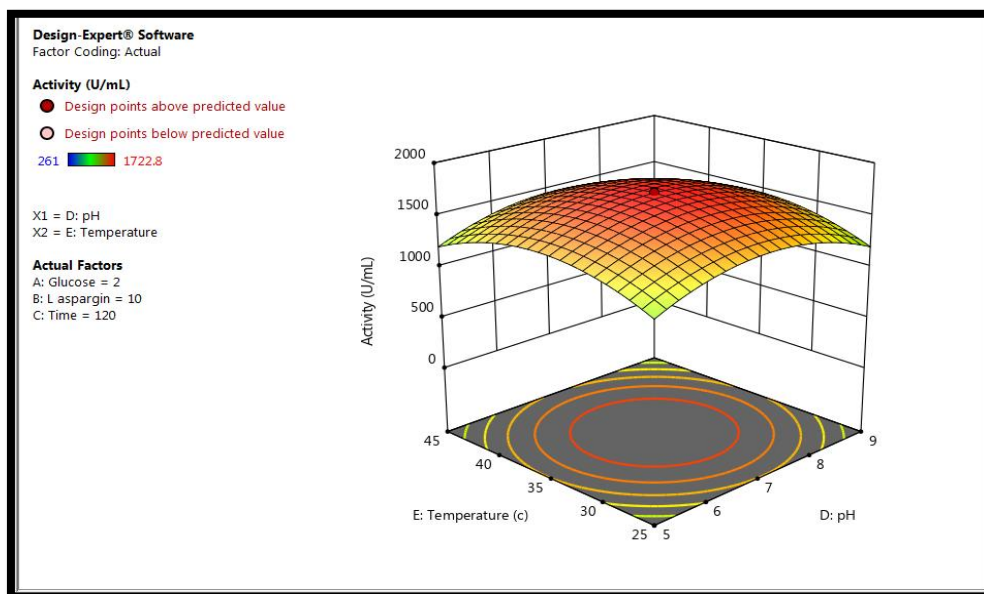
شکل ۱۰ (منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین و زمان بر بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می‌دهد. ارتباط بین ال-آسپاراژین-زمان (BC) با مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار است (جدول ۴)؛



شکل ۱۰- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان دهنده اثر غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین و زمان بر بهینه‌سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
 Fig 10 – Three-dimensional response surface curve showing the effect of different concentrations of L-asparagine and time on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

کمتر از ۰/۰۵ معنادار است (جدول ۴)؛ با وجود این، منحنی سه بعدی سطح پاسخ دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می‌گیرد. با توجه به منحنی ارتباط دوجه دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند.

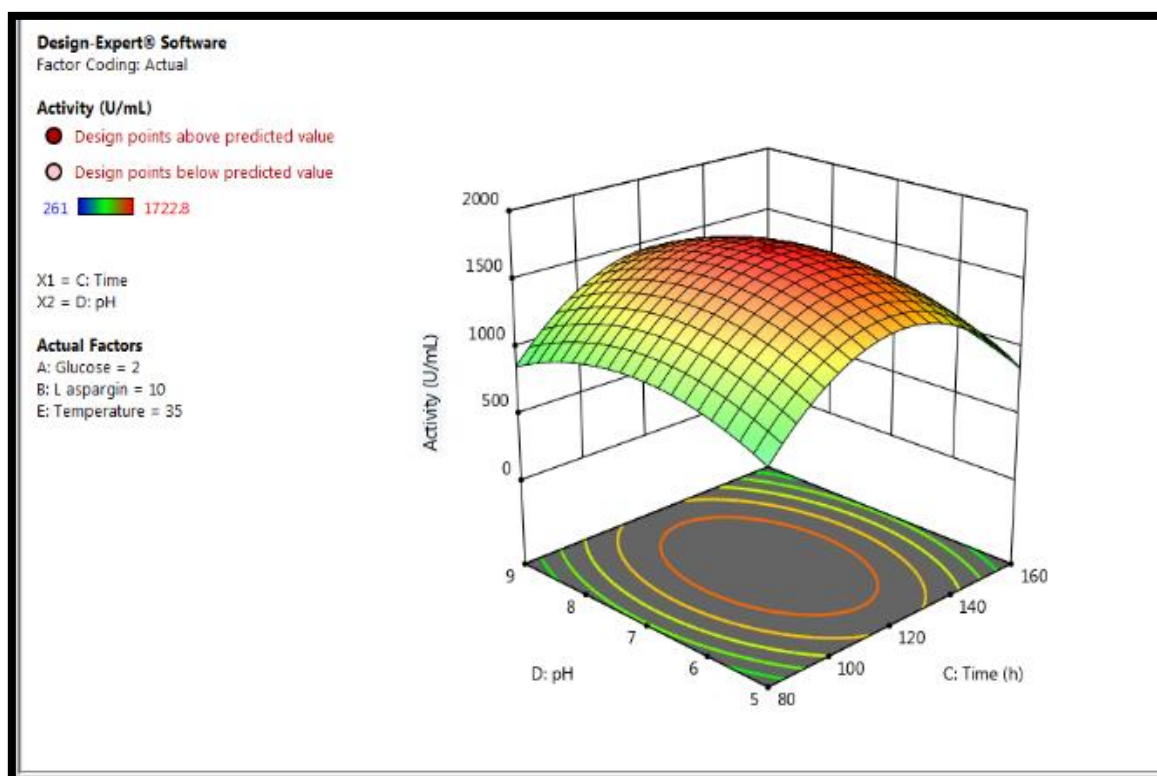
شکل ۱۱ (منحنی سه بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت‌های مختلف دما و اسیدیته در بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می‌دهد. ارتباط بین دما و اسیدیته (DE) با مقدار P-value



شکل ۱۱- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان دهنده اثر غلظت‌های مختلف دما و اسیدیته بر بهینه‌سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
 Fig 11 – The three-dimensional curve of the response surface showing the effect of different concentrations of temperature and acidity on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

با وجود این، منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ‌دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می‌گیرد. با توجه به منحنی ارتباط دوبره‌دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند.

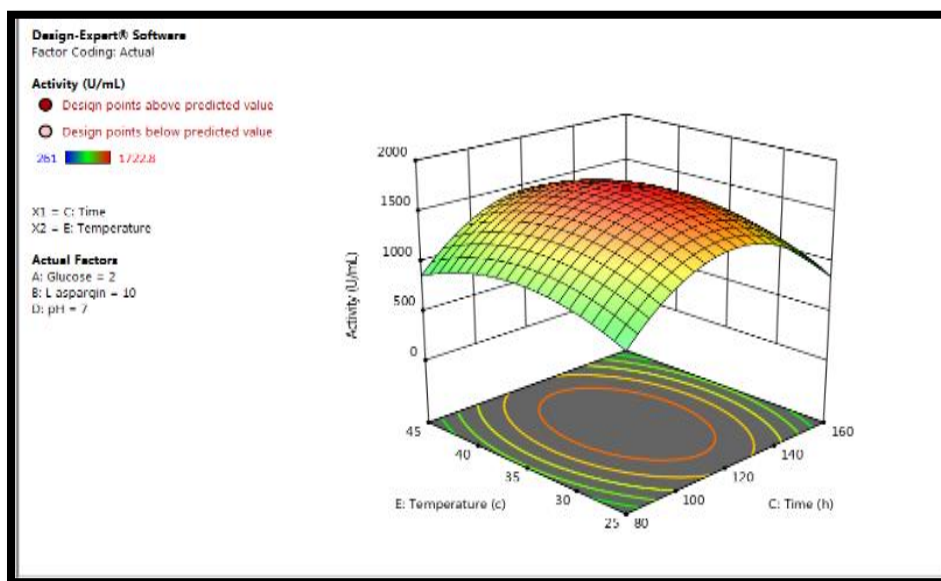
شکل ۱۲ (منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت‌های مختلف زمان و اسیدیته بر بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می‌دهد. ارتباط بین زمان و اسیدیته (CD) با مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار است (جدول ۴)؛



شکل ۱۲- منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ نشان‌دهنده اثر غلظت‌های مختلف زمان و اسیدیته بر بهینه‌سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
Fig 12 – The three-dimensional curve of the response surface showing the effect of different concentrations of time and acidity on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

با وجود این، منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ‌دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می‌گیرد. با توجه به منحنی ارتباط دوبره‌دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند و با توجه به اطلاعات **جدول ۴**، این اثر از نظر آماری معنادار نیست.

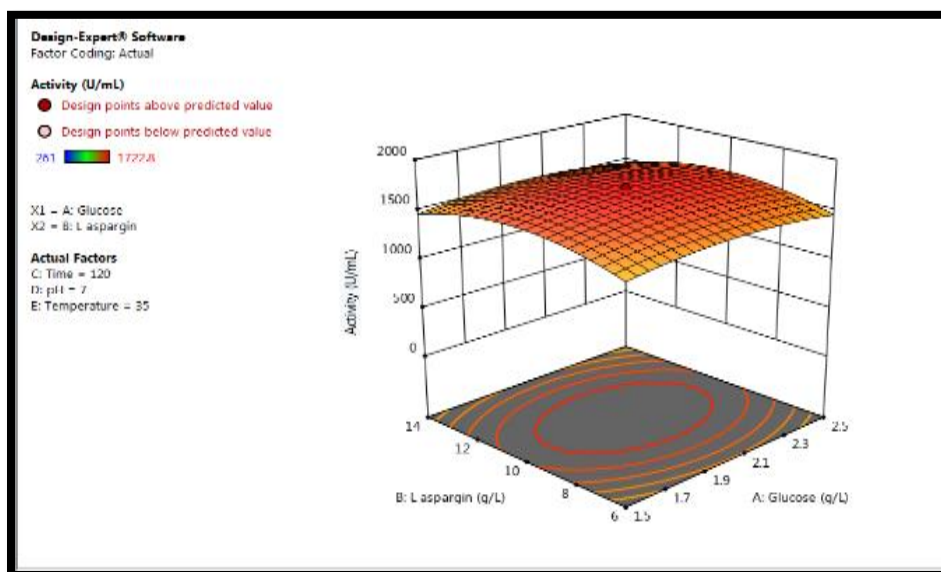
شکل ۱۳ (منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت‌های مختلف زمان و دما بر بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می‌دهد. ارتباط بین زمان و دما (CE) با مقدار P-value بیشتر از ۰/۰۵ معنادار نیست (جدول ۴)؛



شکل ۱۳- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان دهنده اثر غلظت های مختلف زمان و دما بر بهینه سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
 Fig 13 – The three-dimensional curve of the response surface showing the effect of different concentrations, time, and temperature on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

معنادار نیست (جدول ۴)؛ با وجود این، منحنی سه بعدی سطح پاسخ دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می گیرد. با توجه به منحنی ارتباط دوه دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند و با توجه به اطلاعات جدول ۴، این اثر از نظر آماری معنادار نیست.

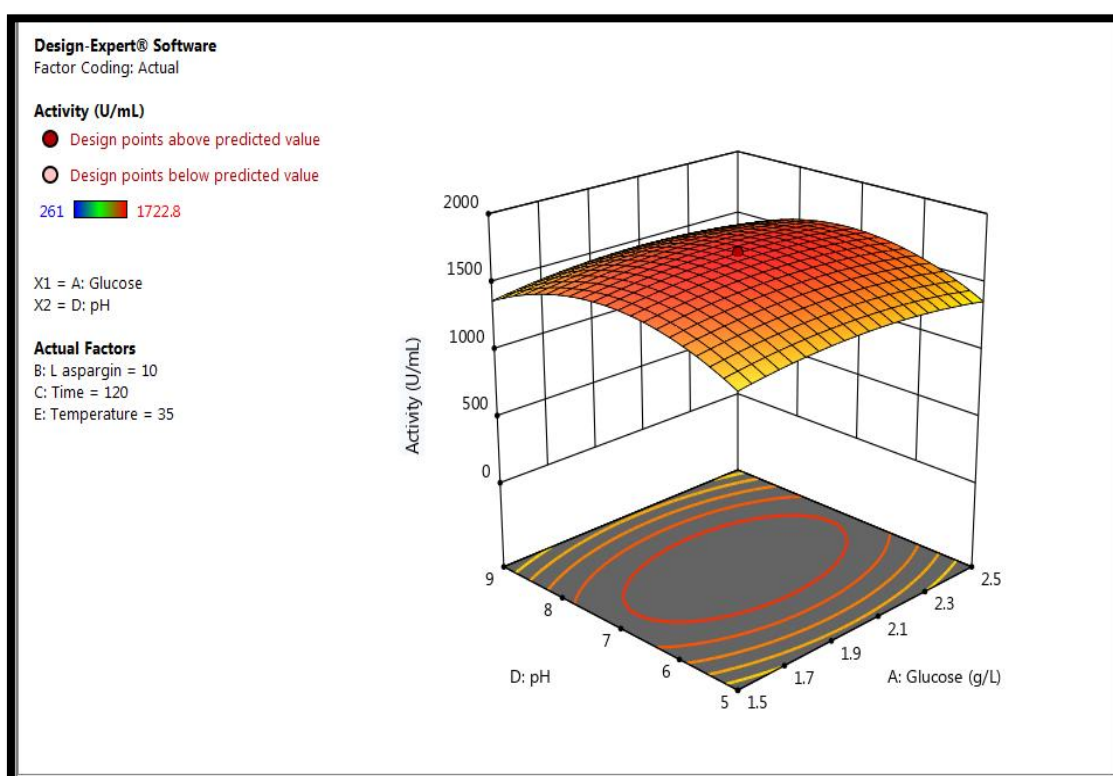
شکل ۱۴ (منحنی سه بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت های مختلف گلوکز و ال-آسپاراژین بر بهینه سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می دهد. ارتباط بین گلوکز و ال-آسپاراژین (AB) با مقدار P-value بیشتر از ۰/۰۵



شکل ۱۴- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان دهنده اثر غلظت های مختلف گلوکز و ال-آسپاراژین بر بهینه سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
 Fig 14 – The three-dimensional curve of the response surface showing the effect of different concentrations of glucose and L-asparagine on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

با وجود این، منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ‌دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می‌گیرد. با توجه به منحنی ارتباط دوجه‌دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند.

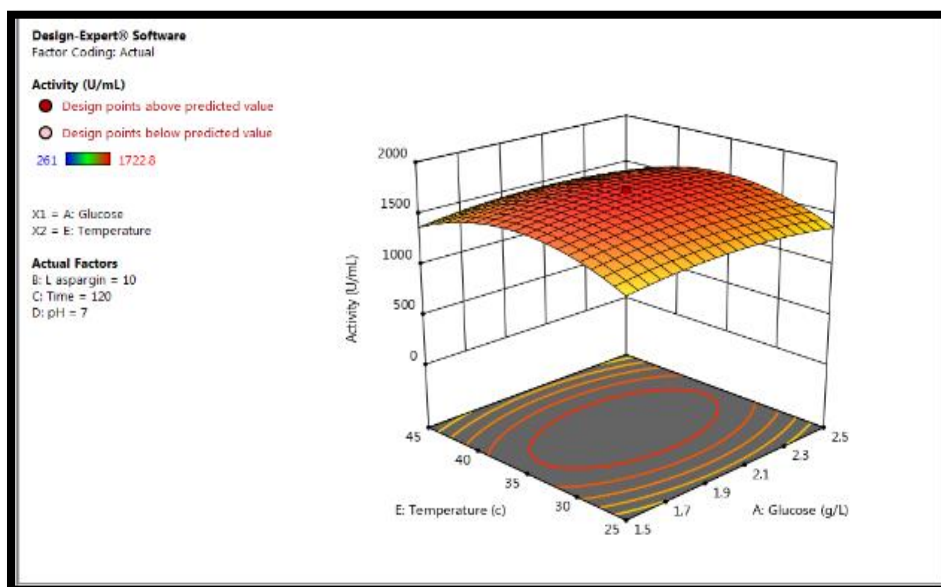
شکل ۱۵ (منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت‌های مختلف گلوکز و اسیدیته بر بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می‌دهد. ارتباط بین گلوکز و اسیدیته (AD) با مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار است (جدول ۴)؛



شکل ۱۵- منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ نشان‌دهنده اثر غلظت‌های مختلف گلوکز و اسیدیته بر بهینه‌سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
Fig 15 – Three-dimensional response surface curve showing the effect of different concentrations of glucose and acidity on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

با وجود این، منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ‌دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می‌گیرد. با توجه به منحنی ارتباط دوجه‌دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند.

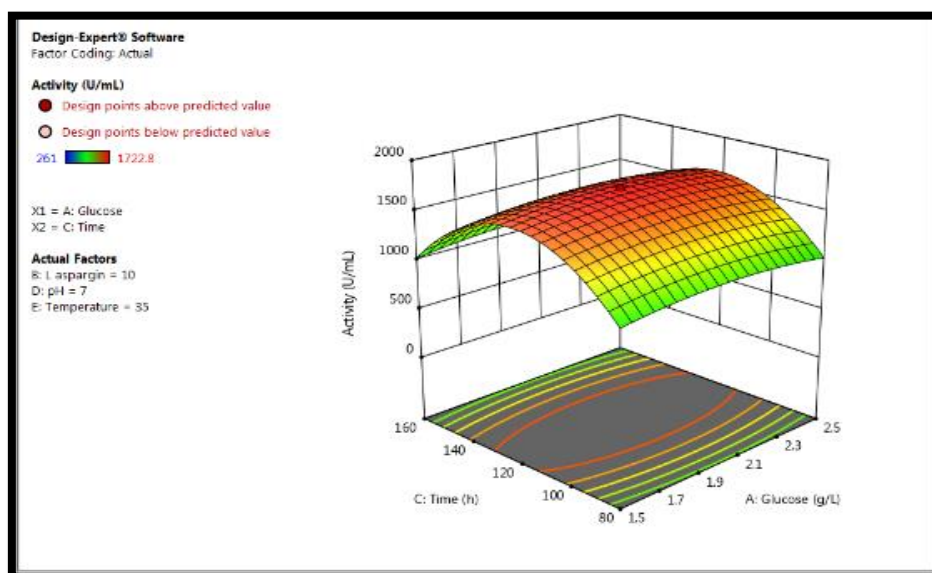
شکل ۱۶ (منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت‌های مختلف گلوکز و دما بر بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می‌دهد. ارتباط بین گلوکز و دما (AE) با مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار است (جدول ۴)؛



شکل ۱۶- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان دهنده اثر غلظت های مختلف گلوکز و دما بر بهینه سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
Fig 16 – The three-dimensional response surface curve showing the effect of different glucose concentrations and temperatures on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

(جدول ۴)؛ با وجود این، منحنی سه بعدی سطح پاسخ دهنده آنها در منطقه بهینه (منطقه قرمز رنگ) قرار می گیرد. با توجه به منحنی ارتباط دوه دو، این فاکتورها بر میزان بازده تولید آنزیم اثر مستقیم دارند.

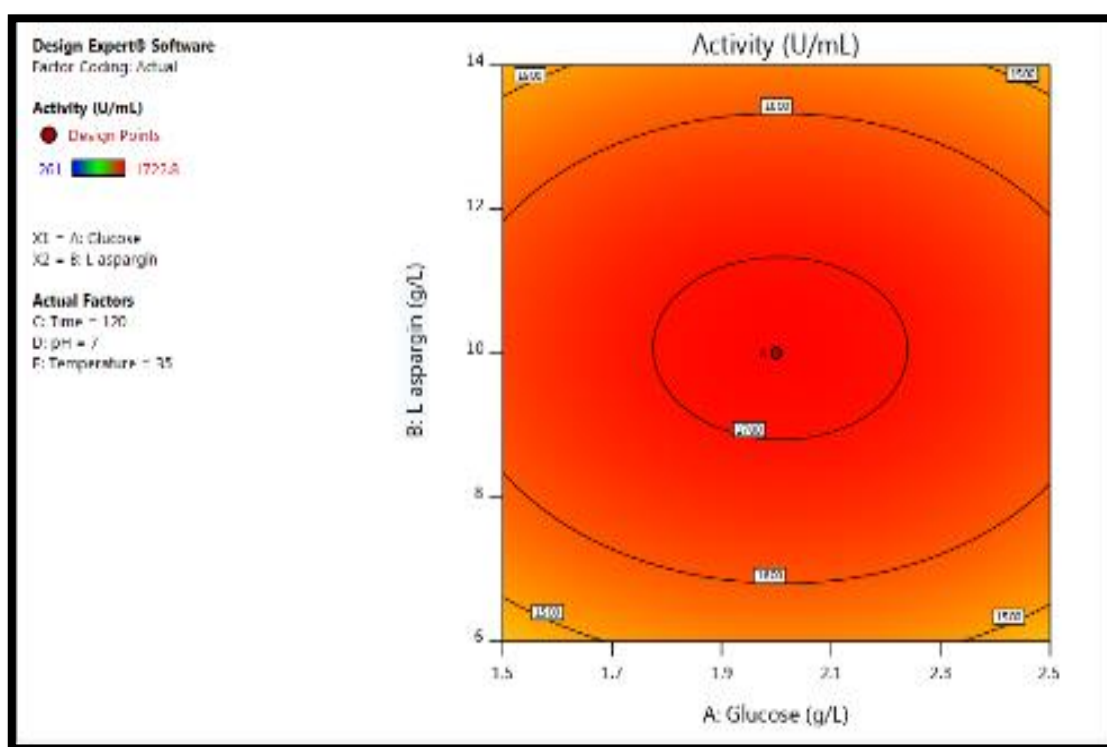
شکل ۱۷ (منحنی سه بعدی سطح پاسخ)، بررسی دوفاکتوری اثر غلظت های مختلف گلوکز و زمان در بهینه سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2 را نشان می دهد. ارتباط بین غلظت های مختلف گلوکز و زمان (AC) با مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار است



شکل ۱۷- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان دهنده اثر غلظت های مختلف گلوکز و زمان بر بهینه سازی تولید ال-آسپاراژیناز از سویه 5S2
Fig 17 – Three-dimensional response surface curve showing the effect of different glucose concentrations and time on the optimization of L-asparaginase production from strain 5S2

است، مخمر 5S2 در این بخش از بهینه‌سازی، بیشترین میزان فعالیت را در غلظت گلوکز ۲ درصد، ال-آسپاراژیناز ۱۰ گرم بر لیتر، زمان ۱۲۰ ساعت، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۷ نشان می‌دهد.

شکل ۱۸ (منحنی دوبعدی سطح پاسخ)، فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز را بر اساس سطوح مختلف فاکتورهای ال-آسپاراژیناز، دما، زمان، گلوکز و اسیدیته نشان می‌دهد. از آنجا که این منحنی در ناحیه بهینه (ناحیه قرمز رنگ) قرار گرفته

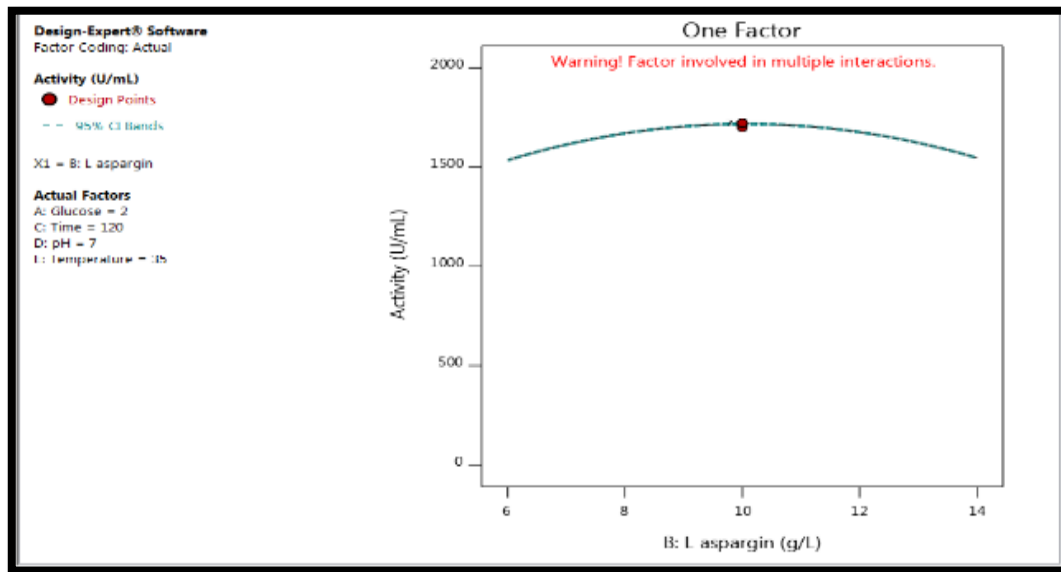


شکل ۱۸- منحنی دوبعدی سطح پاسخ نشان‌دهنده اثر غلظت‌های مختلف گلوکز، ال-آسپاراژین، دما، زمان و اسیدیته بر بهینه‌سازی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2

Fig 18 – Two-dimensional response surface curve showing the effect of different concentrations of glucose, L-asparagine, temperature, time and acidity on the optimization of L-asparaginase enzyme production from 5S2 yeast

فاکتور بر پاسخ است. در این آزمون، در شرایطی که غلظت گلوکز (۲ گرم بر لیتر)، دما (۳۵ درجه سانتی‌گراد)، اسیدیته ۷ و زمان (۱۲۰ ساعت) برابر مقادیر واقعی در نظر گرفته شود، بیشترین فعالیت آنزیمی در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر فاکتور ال-آسپاراژین مشاهده می‌شود؛ بنابراین، این غلظت می‌تواند غلظت بهینه برای تولید آنزیم توسط مخمر 5S2 معرفی شود.

بهینه‌سازی منبع نیتروژن روی فعالیت آنزیمی
شکل ۱۹ (منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ)، تأثیر غلظت‌های مختلف تک فاکتور ال-آسپاراژین بر تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2 را نشان می‌دهد. در این منحنی، هرچه شیب خط فاکتوری بیشتر باشد، تأثیر آن فاکتور بر پاسخ و تولید آنزیم بیشتر را نشان می‌دهد و هرچه شیب خط ملایم‌تر باشد، نشان‌دهنده تأثیر کمتر آن



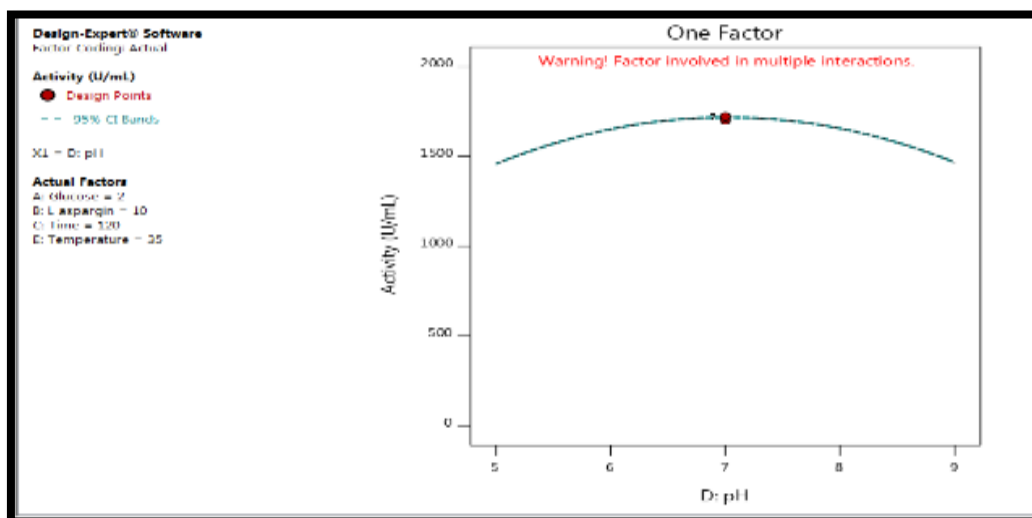
شکل ۱۹- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان دهنده اثر غلظت‌های مختلف ال-آسپاراژین در بهینه‌سازی روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2

Fig 19 – The three-dimensional curve of the response surface showing the effect of different concentrations of L-asparagine in optimizing the production of L-asparaginase enzyme from 5S2 yeast.

(۳۵ درجه سانتی‌گراد)، غلظت ال-آسپاراژین (۱۰ گرم بر لیتر) و زمان (۱۲۰ ساعت) برابر مقادیر واقعی در نظر گرفته شود، بیشترین فعالیت آنزیمی در اسیدیته ۷ مشاهده می‌شود؛ در نتیجه، این مقدار می‌تواند مقدار بهینه اسیدیته برای تولید آنزیم توسط مخمر 5S2 معرفی شود.

بهینه‌سازی اسیدیته اولیه محیط تولید آنزیم

شکل ۲۰ (منحنی سه بعدی سطح پاسخ)، تأثیر مقادیر مختلف تک فاکتور اسیدیته بر تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2 را نشان می‌دهد. در این آزمون، در شرایطی که غلظت گلوکز (۲ گرم بر لیتر)، دما



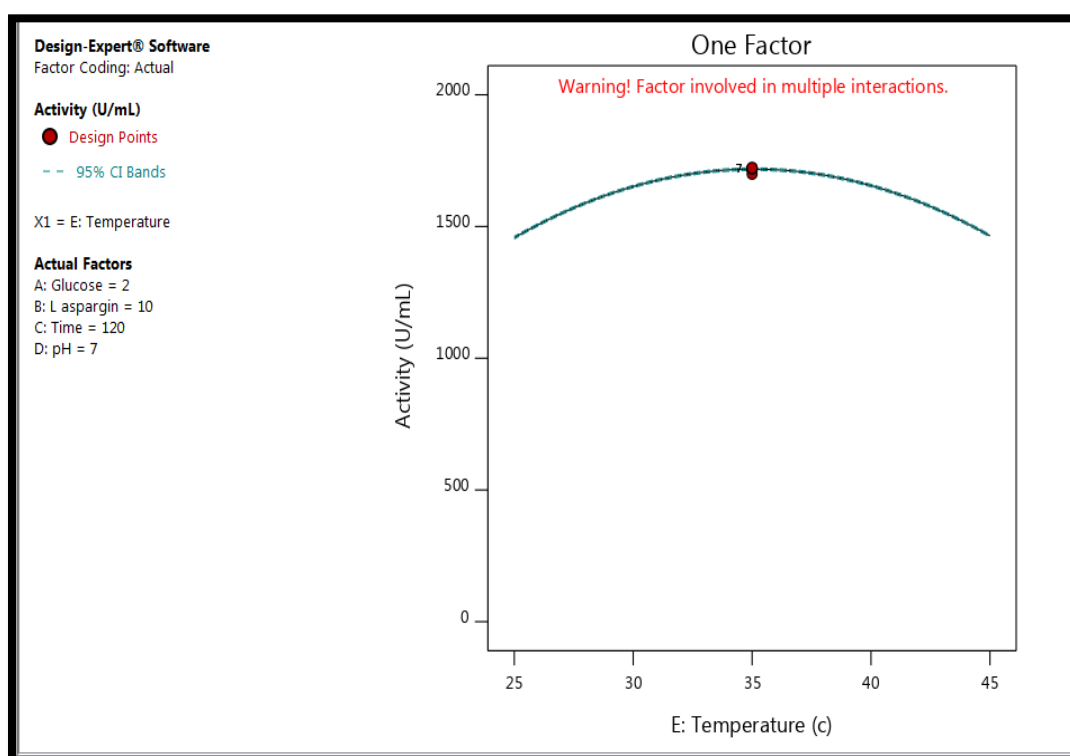
شکل ۲۰- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان دهنده اثر مقادیر مختلف اسیدیته در بهینه‌سازی روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2

Fig 20 – The three-dimensional curve of the response surface showing the effect of different amounts of acidity in optimization on the production of L-asparaginase enzyme from 5S2 yeast.

بهینه‌سازی دما روی فعالیت آنزیمی

منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ [شکل ۲۱](#) تأثیر مقادیر مختلف تک‌فاکتور دما بر تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2 را نشان می‌دهد. در این آزمون، در شرایطی که غلظت گلوکز (۲ گرم بر لیتر)، اسیدیته ۷، غلظت

ال-آسپاراژین (۱۰ گرم بر لیتر) و زمان (۱۲۰ ساعت) برابر مقادیر واقعی در نظر گرفته شود، بیشترین فعالیت آنزیمی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده می‌شود؛ در نتیجه، این مقدار می‌تواند مقدار بهینه دما برای تولید آنزیم توسط مخمر 5S2 معرفی شود.

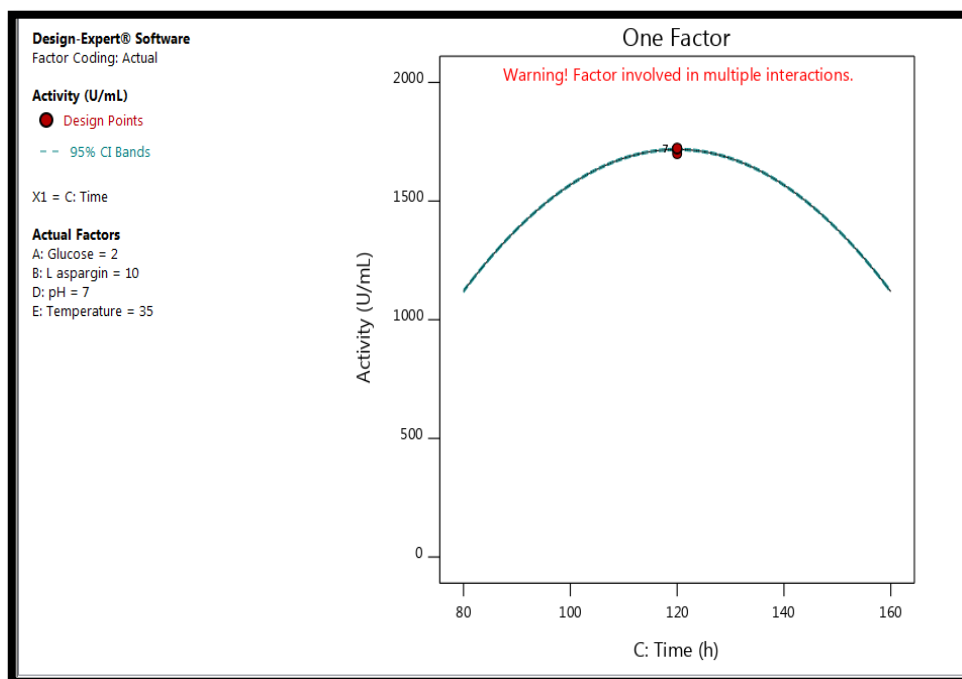


شکل ۲۱- منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ نشان‌دهنده اثر مقادیر مختلف دما در بهینه‌سازی روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2
Fig 21 – Three-dimensional response surface curve showing the effect of different temperature values in optimization on the production of L-asparaginase enzyme from 5S2 yeast.

بهینه‌سازی زمان روی فعالیت آنزیمی

[شکل ۲۲](#) (منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ)، تأثیر مقادیر مختلف تک‌فاکتور زمان بر تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2 را نشان می‌دهد. در این آزمون، در شرایطی که غلظت گلوکز (۲ گرم بر لیتر)، دما (۳۵ درجه سانتی‌گراد)، اسیدیته ۷، غلظت ال-آسپاراژین

(۱۰ گرم بر لیتر) و زمان (۱۲۰ ساعت) برابر مقادیر واقعی در نظر گرفته می‌شود، بیشترین فعالیت آنزیمی در زمان برابر ۱۲۰ ساعت مشاهده می‌شود؛ بنابراین، مقدار یادشده می‌تواند مقدار بهینه زمان برای تولید آنزیم توسط مخمر 5S2 معرفی شود.

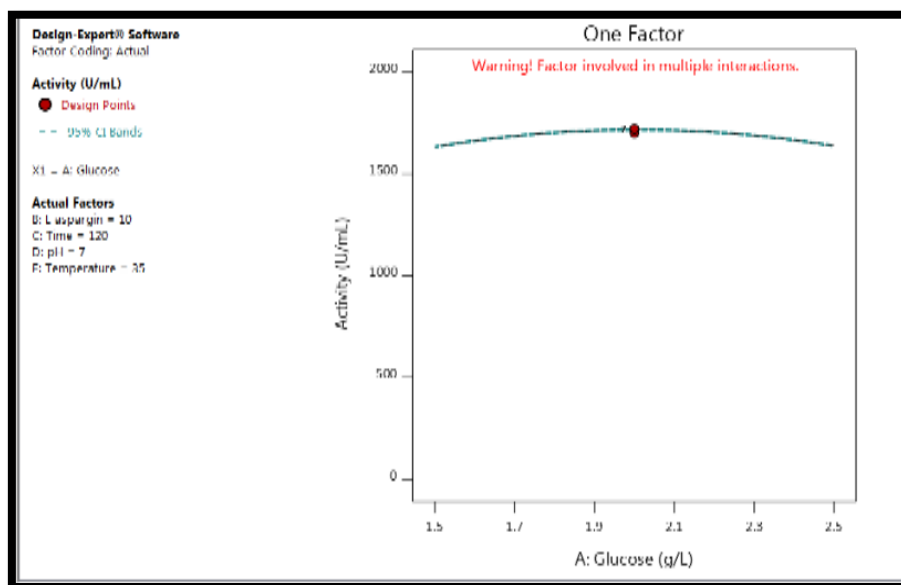


شکل ۲۲- منحنی سه بعدی سطح پاسخ نشان دهنده اثر مقادیر مختلف زمان در بهینه سازی روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2
 Fig 22 – Three-dimensional curve of the response surface showing the effect of different amounts of time in optimization on the production of L-asparaginase enzyme from 5S2 yeast.

بهینه سازی منبع کربن برای بررسی تولید آنزیم

نتایج نشان دادند این سویه در تمام منابع کربنی آزمایش شده قادر به رشد است و فعالیت آنزیمی دارد، اما بیشترین فعالیت آنزیمی در محیط حاوی نشاسته و کمترین فعالیت آنزیمی در حضور مالتوز مشاهده می شود. بهترین درصد نشاسته برای بیشترین فعالیت آنزیمی در مقدار ۱/۹ درصد نشاسته به دست آمد و میزان فعالیت آنزیمی اختصاصی ۷/۵۶۷ واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. شکل های ۳ و ۴ به ترتیب بهینه سازی منابع مختلف کربنی و بهینه سازی درصد های مختلف بهترین منبع کربنی (نشاسته) را نشان می دهند.

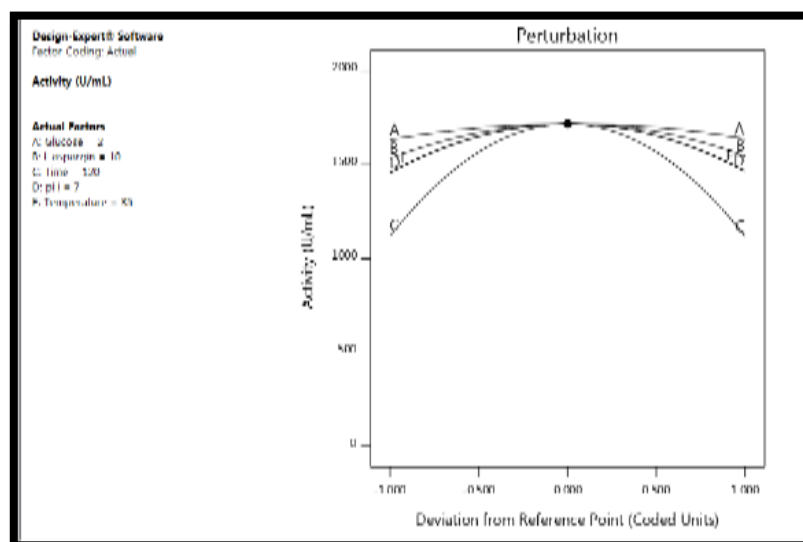
شکل ۲۳ (منحنی سه بعدی سطح پاسخ)، تأثیر غلظت های مختلف تک فاکتور گلوکز روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2 را نشان می دهد. در این آزمون، در شرایطی که زمان (۱۲۰ ساعت)، دما (۳۵ درجه سانتی گراد)، اسیدیته ۷، غلظت ال-آسپاراژین (۱۰ گرم بر لیتر) برابر مقادیر واقعی در نظر گرفته می شود، بیشترین فعالیت آنزیمی در غلظت گلوکز برابر با ۲ گرم بر لیتر مشاهده می شود؛ بنابراین، غلظت یاد شده می تواند غلظت بهینه گلوکز برای تولید آنزیم توسط مخمر 5S2 معرفی شود.



شکل ۲۳- منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ نشان‌دهنده اثر غلظت‌های مختلف گلوکز در بهینه‌سازی روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2
 Fig 23 – Three-dimensional response surface curve showing the effect of different glucose concentrations in optimization on the production of L-asparaginase enzyme from 5S2 yeast.

در این آزمایش، فاکتور C که نشان‌دهنده زمان است، شیب خط بیشتری نسبت به سایر فاکتورها داشت؛ بنابراین، فاکتور زمان تأثیرگذاری بیشتری روی تولید آنزیم دارد.

منحنی سه‌بعدی سطح پاسخ تأثیر فاکتورهای مختلف روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز در شکل ۲۴ آورده شده است. هرچه شیب خط فاکتوری بیشتر باشد، تأثیر آن فاکتور بر پاسخ و تولید آنزیم بیشتر و هرچه شیب خط



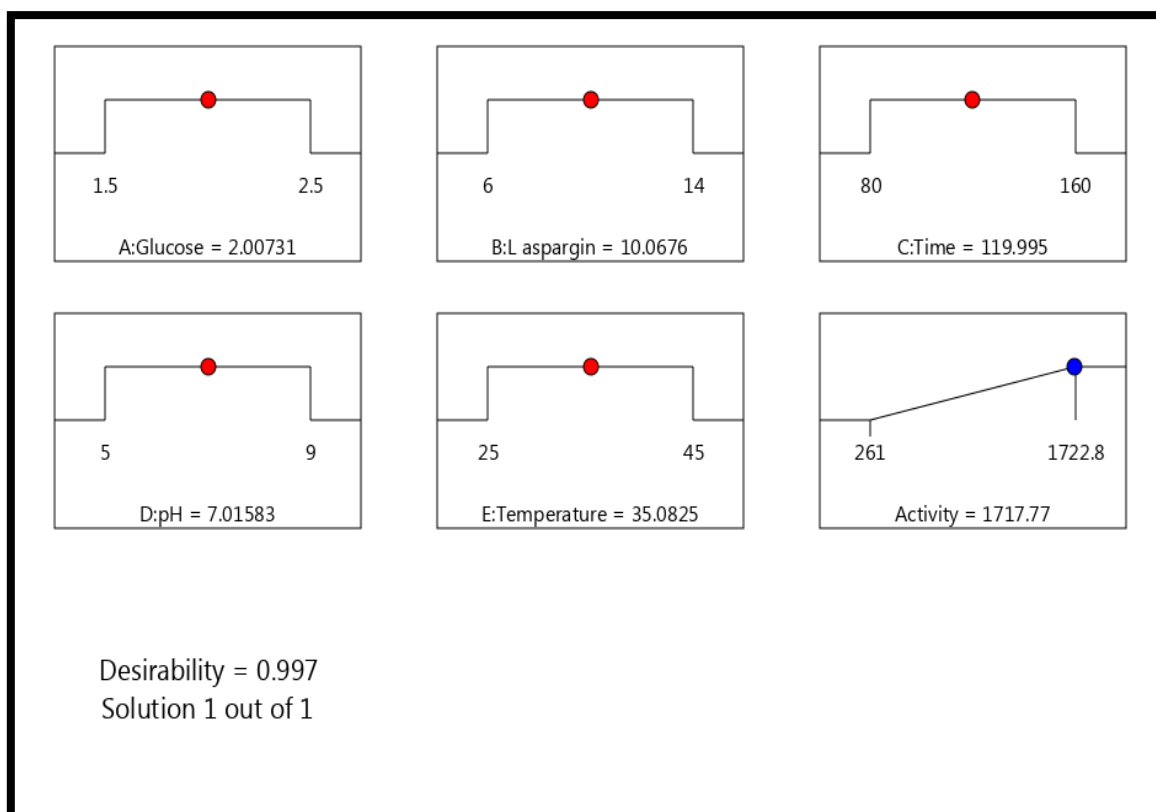
شکل ۲۴- منحنی سه‌بعدی تأثیر فاکتورهای نشان‌دهنده اثر غلظت‌های مختلف گلوکز، ال-آسپاراژین، دما، زمان و اسیدیته در بهینه‌سازی روی تولید آنزیم ال-آسپاراژیناز از مخمر 5S2

Fig 24 – The three-dimensional curve of the effect of factors showing the effect of different concentrations of glucose, L-asparagine, temperature, time, and acidity in optimizing the production of L-asparaginase enzyme from 5S2 yeast

در **شکل ۲۵**، حداکثر مقادیر پیش‌بینی شده تولید آنزیم در بهینه‌سازی توسط نرم‌افزار آورده شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در مرحله بهینه‌سازی که نرم‌افزار پیش‌بینی کرد، در غلظت گلوکز ۲/۰۷ گرم بر لیتر، ال-آسپاراژین ۱۰/۰۶ گرم بر لیتر، زمان ۱۱۹/۹۹ ساعت، اسیدیته ۷ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برابر با ۱۷۱۷/۷۷ u/ml بود؛ از سویی، حداکثر میزان فعالیت آنزیم در آزمایش‌های طراحی شده در شرایط مشابه طی آزمایش‌های شماره ۶ و ۱ به ترتیب برابر با

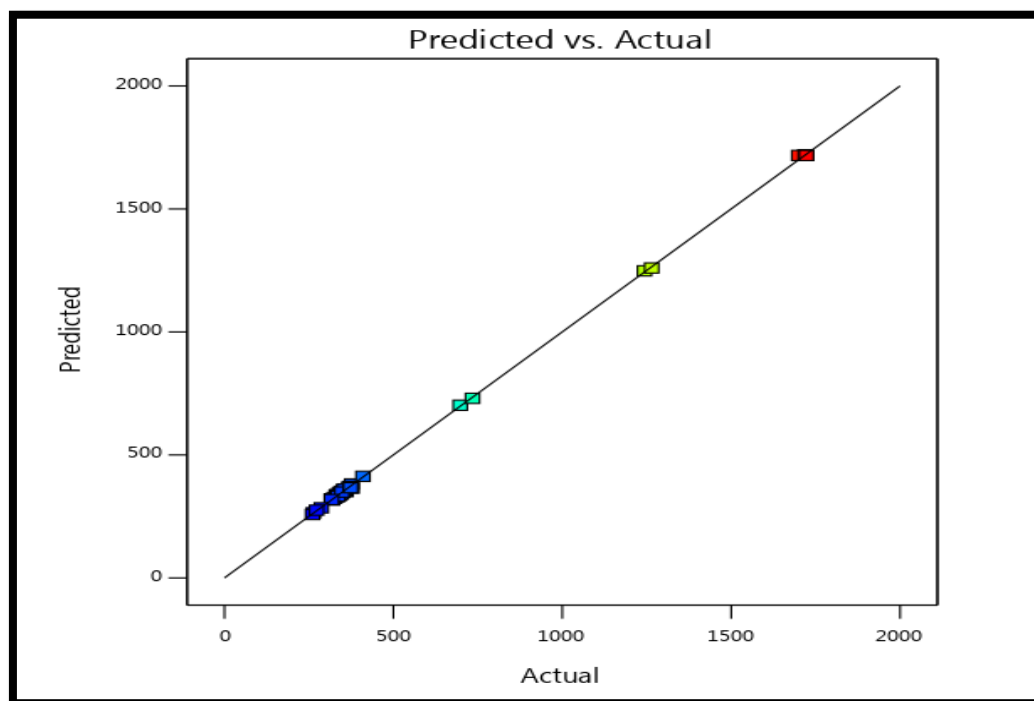
۱۷۲۲/۸ u/ml و ۱۷۱۹/۵۴ u/ml بود (**جدول ۳**)؛ در نتیجه، این نتایج و نتایج پیش‌بینی شده توسط RSM به‌طور تقریبی با یکدیگر مطابقت دارند.

در **شکل ۲۶**، بررسی مقایسه‌ای مقادیر واقعی و مقادیر پیش‌بینی شده با نرم‌افزار نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، هرچه قدر نتایج آزمایش‌ها و مقادیر پیش‌بینی شده با نرم‌افزار روی خط مورب قرار گرفته باشند و با یکدیگر مطابقت داشته باشند، نشان‌دهنده درستی آزمایش‌های انجام شده است.



شکل ۲۵- پیش‌بینی‌های انجام شده توسط نرم‌افزار RSM برای میزان فعالیت آنزیم در بهینه‌سازی

Fig 25 – Predictions made by RSM software for the amount of enzyme activity in optimization



شکل ۲۶- بررسی مقادیر واقعی در برابر مقادیر پیش‌بینی شده در بهینه‌سازی

Fig 26 – Checking the actual values against the predicted values in the optimization

بحث و نتیجه‌گیری

پارامترهای بسیاری بر تولید و فعالیت آنزیم تأثیر می‌گذارند. در آزمایش حاضر، بر اساس منابع موجود در محیط کشت تشخیص کمی فعالیت آنزیم ۵ متغیر غلظت‌های مختلف گلوکز (۱/۵ تا ۲/۵ درصد) به عنوان منبع کربن، محدوده‌ی pH بین ۵ تا ۹، ال-آسپاراژین به عنوان منبع نیتروژن (۶ تا ۱۴ درصد)، دما بین ۲۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد و زمان بین ۸۰ تا ۱۶۰ ساعت به عنوان فاکتورها در فرآیند بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ (RSM) به کار برده شدند.

در بررسی حاضر با استفاده از نتایج بهینه‌سازی تک‌فاکتوره، به منظور افزایش فعالیت آنزیم سوئیچ 5S2، ۴۹ آزمایش با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) طراحی شد و غلظت‌های مختلف ۵ فاکتور یادشده بررسی و بهینه‌سازی شدند. نتایج نشان دادند بیشترین فعالیت آنزیم در آزمایش شماره ۶ (جدول ۳) به دست می‌آید.

مطابق شکل ۶، منحنی سطح پاسخ فعالیت آنزیم در ناحیه

قرمز رنگ قرار دارد و به نقطه بهینه‌سازی رسیده است. در این بخش از بهینه‌سازی، بیشترین میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز به دست آمده از سوئیچ 5S2 در اسیدیته ۷ مشاهده شد. در اسیدیته‌های قلیایی یا اسیدی، فعالیت آن کاهش یافت و نسبت به شرایط قلیایی و اسیدی حساس بود. آنزیم تولیدشده توسط سوئیچ یادشده نسبت به حرارت حساس بود؛ به طوری که در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، بیشترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم کاهش چشم‌گیری داشت. میزان گلوکز و ال-آسپاراژیناز نیز بر تولید آنزیم تأثیر داشتند، به طوری که در میزان متوسط آنها، بهترین تولید آنزیم انجام شد. زمان نیز از دیگر فاکتورهایی است که در تولید آنزیم تأثیر داشت و طبق شکل ۱۲ و شیب خط، زمان مهم‌ترین و تأثیرگذارترین فاکتور روی تولید آنزیم بود.

- 2007 Jan 1; 27(1): 45-62. <https://doi.org/10.1080/07388550601173926>
- (5) Chen YS, Yanagida F, Chen LY. Isolation of marine yeasts from coastal waters of northeastern Taiwan. *Aquatic Biology*, 2009 Dec 28;8(1):55-60. <https://doi.org/10.3354/ab00207>
- (6) Aghaiypour K, Wlodawer A, Lubkowski J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochemistry*, 2001 May 15;40(19):5655-64. <https://doi.org/10.1021/bi0029595>
- (7) Gholamian S, Gholamian S, Nazemi A, Nargesi M. Isolation and characterization of a novel *Bacillus* sp. strain that produces L-asparaginase, an antileukemic drug. *Asian J. Biolog. Sci*, 2013;6:106-15. <https://scialert.net/abstract/?doi=ajbs.2013.106.115>
- (8) Ahmad N, Pandit NP, Maheshwari SK. L-asparaginase gene-a therapeutic approach towards drugs for cancer cell. *Int J Biosci*, 2012; 2(4): 1-11. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20123167014>
- (9) Hendriksen HV, Kornbrust BA, Østergaard PR, Stringer MA. 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*, 2009 May 27;57(10):4168-76. <https://doi.org/10.1021/jf900174q>
- (10) Pisarewicz K, Mora D, Pflueger FC, Fields GB, Marí F. Polypeptide chains containing d- γ -hydroxyvaline. *Journal of the american chemical society*, 2005 May 4;127(17):6207-15. <https://doi.org/10.1021/ja050088m>
- (11) Broome JD. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: I. properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *The Journal of experimental medicine*, 1963 Jul 1;118(1):99-120. <https://doi.org/10.1084/jem.118.1.99>
- (12) Mahajan RV, Saran S, Kameswaran K, Kumar V, Saxena RK. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: optimization, scale up and acrylamide

بنابراین سویه قارچی 5S2 جداسازی شده بیشترین میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز را در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، مدت زمان گرماگذاری ۱۲۰ ساعت، اسیدیته ۷، ۱۰ درصد ال-آسپاراژین و ۲ درصد گلوکز به عنوان منبع کربن داشت و فعالیت آنزیم ۱۷۲۲/۸ u/ml تعیین شد.

در پژوهش حاضر با استفاده از سویه مخمري 5S2 جداسازی شده از خاک بازار ماهی، آنزیم ال-آسپاراژیناز تولید و آنزیم به روش سطح پاسخ بهینه و فعالیت آن افزایش یافت. با توجه به استقبال روزافزون صنایع مختلف از جمله صنایع فراورده های مواد غذایی و نانوائی، نتایج پژوهش حاضر کاربردهای گوناگونی خواهد داشت. نتایج پژوهش حاضر در بخش میزان فعالیت آنزیم تولید شده قابل مقایسه با پژوهش های پیشین است. با توجه به اینکه میزان تولید آنزیم در فرایند بهینه سازی افزایش یافت، پیشنهاد می شود با بهینه سازی شرایط تولید آنزیم، میزان تولید آنزیم توسط سویه مخمري افزایش یابد.

References

- (1) Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH. L-asparaginase and PEG asparaginase—past, present, and future. *Leukemia & lymphoma*, 1993 Jan 1;10(sup1):153-7. <https://doi.org/10.3109/10428199309149129>
- (2) Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 1999 Jul 1;23(4):411-56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x>
- (3) Ghane M, Bambiaei B, GHANE M. Screening of *Esherichia coli* strains for asparaginase ii production. *Biological Sciences (DANISH-I ZISTI-I IRAN)*, 2009;3(4):47-54. <https://www.sid.ir/paper/183740/en> [In Persian].
- (4) Verma N, Kumar K, Kaur G, Anand S. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Critical reviews in biotechnology*,

- degradation studies. *Bioresource technology*, 2012 Dec 1;125:11-6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.086>
- (13) El Shora HE, Ali AS. Enhancement the activity of L-asparaginase and antioxidant enzymes in Cicer arietium L cotyledons under stress conditions. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 2013; 4 (Special Issue): 3724-35. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20143088471>
- (14) Shukla D, Shrivastav VK, Jana AM, Shrivastav A, Asparagines EL. Exploration of the potential L-asparaginase producing bacteria from the soil of Gwalior (India). *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 2014; 3:665-72. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20143201440>
- (15) Yazdani R, Mobini-Dehkordi M, Rastegari AA. Isolation and identification of native Iranian L-asparaginase producing bacteria. *Journal of Microbial World*, 2012 Jun 1;5(1&2):39-46. https://jmw.jahrom.iau.ir/m/article_631696.html?lang=en [InPersian].
- (16) Ghasemi Y, Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Zarrini G, Ghoshoon MB, Raei MJ, Morowvat MH, Kafilzadeh F, Kazemi A. An optimized medium for screening of L-asparaginase production by *Escherichia coli*. *Am J Biochem Biotechnol*, 2008; 4(4): 422-4. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2008.422.424>
- (17) Sarquis MI, Oliveira EM, Santos AS, Costa GL. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2004;99:489-92. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000500005>
- (18) Paulling KD, Hann JE, Jones GE. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of a mutation that affects expression in rapidly growing cells. *Microbiology*, 1980 Aug;119(2):539-42. <https://doi.org/10.1099/00221287-119-2-539>
- (19) Kil JO, Kim GN, Park I. Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1995 Jan 1;59(4):749-50. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.749>
- (20) Dominguez Á, Fermiñán E, Sánchez M, González FM, Pérez-Campo FM, García S, Herrero AB, San Vicente A, Cabello J, Prado M, Iglesias FJ. Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *International Microbiology*, 1998(Jun; 1 (2)):131-42. <http://hdl.handle.net/10198/10929>
- (21) Rhishipal R, Philip R. Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. *Bioresource technology*, 1998 Sep 1;65(3):255-6. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00179-X)
- (22) Galvez A, Ramirez MD, Garcia-Garibay M. Chemical composition of a mixture of single-cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 1990;40(2):252-62. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19911436158>
- (23) Asthana N, Azmi W. Microbial Lasparaginase: A potent antitumour enzyme. *IJBT*, 2003;2(2):184-94. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/11297>
- (24) Unger MW, Hartwell LH. Control of cell division in *Saccharomyces cerevisiae* by methionyl-tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1976 May;73(5):1664-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.5.1664>
- (25) Darvishi F, Shamsi F. Investigating the L-asparaginase Production in the Yeast *Yarrowia Lipolytica*. *Biological Journal of Microorganism*, 2018 Sep 23; 7(27): 73-9. [10.22108/BJM.2018.111339.1133](https://doi.org/10.22108/BJM.2018.111339.1133) [In Persian].

¹ Aspartic acid² Ammonia³ *Streptomyces gulbargensis*⁴ *Enterobacter cloacae*⁵ *Serratia marcescens*⁶ *Escherichia coli*⁷ *Erwinia caratovora*⁸ *Bacillus*⁹ *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰ *Candida*¹¹ Czapek Dox's medium¹² Nessler's reagent¹³ *Diutina mesorugosa*