

## بررسی تولید و فعالیت آنزیم پری پلاسمیک آلکالین فسفاتاز در سویه‌های بومی *E. coli* جدا شده از آب‌های منطقه رودسر

رحمان فرخنده زیبا\*<sup>۱</sup>، ناصر قائمی<sup>۲</sup>، مهدی آسمار<sup>۳</sup>

<sup>۱\*</sup> ۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

<sup>۲</sup> دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۵۳

rahmanfarkhondeziba@yahoo.com

### چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی عوامل مؤثر (تعیین فاکتورهای القاء کننده و مهار کننده) در بیوسنتز و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سویه‌های بومی *E. coli* بود. در این پژوهش از ۵۰ چاه مختلف شهرستان رودسر نمونه‌گیری انجام و از نظر وجود *E. coli* بررسی گردید. بعد از مرحله Screening test یک سویه با توانایی تولید آنزیم به عنوان سویه مناسب انتخاب شد. برای سنجش فعالیت آنزیم از سویسترای اختصاصی (نمک دی سدیم ۴ نیتروفتیل فسفات ۶ آبه) استفاده گردید. در این تحقیق بیشترین تولید آنزیم در محیط کشت پایه بعد از ۶۴ ساعت و در محیط کشت بهینه بعد از ۴۰ ساعت رشد در اوایل فاز رکود مشاهده گردید. از بین منابع کربنی و نیتروژنی مختلف به ترتیب گلوکز ۰/۵٪ و باکتوپیتون ۰/۵٪ و از میان غلظت‌های مختلف NaCl، غلظت ۰/۶٪ و از بین تلقیح‌های انجام شده، تلقیح ۶٪ و از میان pH و دماهای آزمایش شده، pH = ۷/۵ و دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس بیشترین تأثیر را در میزان بیوسنتز آنزیم داشتند. از بین عوامل مورد بررسی فسفات غیر آلی به عنوان عامل مهار کننده معرفی گردید. شرایط هوایی بهترین شرایط برای تولید آنزیم و ماکزیمم فعالیت آنزیم این سویه بومی در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس و pH = ۸/۵ بود. برای خارج کردن آنزیم از فضای پری پلاسمیک شوک حرارتی بهترین نتایج را به همراه داشت. زمان ماندگاری آنزیم بدست آمده توسط شوک حرارتی هفت روز در دمای ۸-۲ درجه یخچال بود. ماکزیمم میزان تولید آنزیم در محیط کشت بهینه و محیط کشت پایه به ترتیب ۳۲/۹۷ و ۷/۶۲ یونیت به ازای میلی‌لیتر در دقیقه بود.

**کلمات کلیدی:** *E. coli*، آلکالین فسفاتاز، بیوسنتز و فعالیت.

## مقدمه

آنزیم آلکالین فسفاتاز (EC3.1.3.1) یکی از چندین آنزیم‌های هیدرولازی است که در باکتری‌های گرم منفی در فضای پری پلاسمی قرار دارد. در باکتری‌های گرم مثبت به نظر می‌رسد که به غشاء متصل باشد. سنتز آلکالین فسفاتاز با یک سیگنال پپتیدی آغاز می‌شود. بعد از انتقال به فضای پری پلاسمی این سیگنال ناپدید شده، در نتیجه آن دو منومر به فرم دایمر تکامل می‌یابند. این آنزیم بوسیله ژن *phoA* در *E. coli* کد می‌شود و با یک منومر پیشرو که در ناحیه انتهایی آمین قرار دارد سنتز می‌شود. حضور چهار یون  $Zn^{2+}$  و دو یون  $Mg^{2+}$  منجر به شکل‌گیری فرم فعال آنزیم می‌شود. آنزیم آلکالین فسفاتاز *E. coli* دو سایت فعال دارد. هر منومر آن دارای دو زنجیره داخلی با باند دی سولفیدی است. پروتئین‌های آن دارای اسید آمینه سیستئین هستند. در هر سایت فعال سه فلز به این سایت متصل می‌شوند. این فلزات می‌توانند  $M_1$ ،  $M_2$ ،  $M_3$  باشند. یک سایت بوسیله روی و سایت دیگر توسط منیزیم اشغال می‌شوند. نتایج سنتیکی نشان می‌دهد که سایت روی در خاصیت کاتالیتیکی آنزیم نقش بسیار مهمی داشته باشد (۷ و ۶). آنزیم آلکالین فسفاتاز، یک متالوآنزیم و هر منومر آن به عنوان یک کاتالیزور عمل هیدرولیز غیر اختصاصی استرهای فسفات را انجام می‌دهد. این آنزیم دارای وزن مولکولی ۹۴ کیلو دالتن است و از دو زیر واحد A و B ساخته شده، وزن مولکولی هر زیر واحد ۴۷ کیلو دالتن می‌باشد (۱، ۲، ۳ و ۴). جداسازی فرم‌های مختلف آنزیم آلکالین فسفاتاز از سویه وحشی *E. coli* K-10 اولین بار در سال ۱۹۸۱ توسط Marina و همکارانش گزارش گردید (۱۷). اکثر آلکالین

فسفاتازهای ایزوله شده داخل سلولی هستند. این آنزیم عموماً در ارگانسیم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی تولید می‌شود. ماکزیمم فعالیت آنزیم در pH قلیایی است. علاوه بر *E. coli* باکتری‌های دیگری نظیر *Aerobacter*، *Pseudomonas* و جنس‌هایی از *Bacillus* ها قادر به تولید آنزیم هستند. سه نوع آلکالین فسفاتاز از کبد، کلیه، استخوان، روده و جفت انسان جداسازی شده است (۲۱ و ۲۲). تاکنون چهار فرم آنزیم آلکالین فسفاتاز جداسازی گردیده‌اند فرم‌های مختلف آنزیم دارای pH ایتیمم و مقاومت حرارتی یکسان می‌باشند. سرعت هیدرولیز سوبسترای اختصاصی توسط این چهار نوع آنزیم یکسان است. اما سرعت هیدرولیز سوبستراهای مختلف توسط این چهار نوع آنزیم متفاوت می‌باشد (۱۷). به علت مقاومت بالای این آنزیم در برابر دناتوره شدن و غیر فعال شدن و همچنین فعالیت بسیار بالای این آنزیم نسبت به آنزیم آلکالین فسفاتاز یوکاریوتی باعث شده که از آن در کارهای تحقیقاتی بیشتر استفاده نمایند. از آنزیم آلکالین فسفاتاز به عنوان یک ابزار مهم در کلونینگ، تعیین ترادف DNA و ELISA استفاده می‌شود. از جمله کاربردهای دیگر آن آنزیم در مهندسی ژنتیک، سنجش رسوب آب‌های شیرین (جهت پاکسازی آب) و ترمیم سیستم‌های رسوبی که دچار آسیب شده‌اند را می‌توان اشاره نمود (۲۰، ۲۳ و ۲۴). هدف از انجام این مطالعه بررسی عوامل مؤثر (تعیین فاکتورهای القاء کننده و مهارکننده) در بیوسنتز و فعالیت آنزیم در سویه‌های بومی *E. coli* و در نهایت بهینه‌سازی محیط کشت تولید آنزیم بود.

## مواد و روش‌ها

برای جداسازی *E. coli* از آب ابتدا به کمک بطری‌های شیشه‌ای سر سمباده‌ای عمل نمونه‌برداری از ۵۰ چاه مختلف انجام گرفت. نمونه‌های آب‌های مورد نظر به محیط‌های کشت Lactose broth محتوی لوله‌های دورهام اضافه شدند. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌هایی که ایجاد کدورت کردند به عنوان نمونه‌های مثبت انتخاب گردیدند. برای شناسایی نمونه‌های مثبت، این نمونه‌ها به محیط افتراقی SIM، TSI، EMB، Urea agar و Simmons Citrate، MR-VP تلقیح شدند. بعد از ۲۴ ساعت نتایج بررسی گردیدند (۱۴). از پلیت‌های حاوی Nutrient agar برای نگهداری سویه جدا شده در یخچال استفاده شد. در مرحله Screening test برای خارج کردن آنزیم از فضای پری پلاسمیک دو متد شوک اسمزی و حرارتی مورد استفاده قرار گرفتند (۸، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۸ و ۱۹). برای مشخص نمودن بیماری‌زایی و یا غیر بیماری‌زایی سویه جدا شده از آنتی سرم‌های اختصاصی ضد EPEC استفاده گردید. برای رسم منحنی رشد باکتری و اندازه‌گیری میزان آنزیم موجود در آن محیط کشت پایه مناسب تهیه شد. محیط کشت پایه بعد از فاصله زمانی ۱۶ ساعت از زمان تلقیح بررسی گردید (این کار از ۱۶ تا ۸۰ ساعت تکرار شد). میزان کدورت و تولید آنزیم در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. اجزای محیط کشت پایه بر حسب گرم شامل ۰/۰۳، KCl ۰/۱۵، NaCl ۰/۳، Tris HCl ۱/۸۹،  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ۰/۰۲،  $\text{MgCl}_2$  ۰/۰۰۷،  $\text{CaCl}_2$  ۱، Bactopeptone ۰/۰۴،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=۷/۵ و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بودند. برای سنجش فعالیت آنزیم در این تحقیق از بافر ۰/۱ مولار Glycine

NaOH با pH = ۸/۵ و سوبسترای اختصاصی (نمک دی سدیم ۴ نیتروفنیل فسفات ۶ آبه) استفاده گردید. فعالیت آنزیم در طول موج ۴۱۰ nm بوسیله اسپکترو فتومتر با روش Catherine and Kelly اندازه‌گیری شد (۷). در بررسی تأثیر منابع مختلف کربنی و نیتروژنی در میزان بیوسنتز آنزیم، محیط‌های کشت پایه با منابع کربنی مختلف شامل گلوکز، سوکروز، لاکتوز، مالتوز، فروکتوز و هم چنین با منابع نیتروژنی مختلف شامل باکتوپتون، پیتون و عصاره مخمر به طور جداگانه از هر کدام به میزان ۱٪ تهیه گردید. در بررسی بهترین غلظت گلوکز و باکتوپتون در میزان بیوسنتز آنزیم، محیط‌های کشت پایه بدون گلوکز و باکتوپتون تهیه گردید. سپس به هر کدام به طور جداگانه ۰/۱ تا ۱ گرم گلوکز و باکتوپتون اضافه شد. در بررسی Inorganic phosphate در میزان بیوسنتز آنزیم، ۰/۰۱ تا ۰/۰۸ گرم فسفات غیر آلی به طور جداگانه به محیط‌های کشت پایه بدون فسفات اضافه گردید. در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl در میزان بیوسنتز آنزیم به محیط‌های کشت فاقد NaCl به طور جداگانه غلظت‌های ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۰/۹، ۰/۹ گرم NaCl اضافه شد. در بررسی تأثیر میزان تلقیح در بیوسنتز آنزیم، به محیط کشت پایه به طور جداگانه یک تا شش میلی‌لیتر باکتری تلقیح گردید (شمارش باکتری در واحد حجم با استفاده از لام نئوبار انجام گرفت). به هر یک از پارامترهای مورد بررسی در محیط کشت پایه ۱٪ باکتری تلقیح شد. بعد از قرار گرفتن محیط‌های کشت پایه در انکوباتور شیکردار با دور بالا در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس میزان کدورت و تولید آنزیم بعد از ۶۴ ساعت بررسی گردید. در بررسی تأثیر دما در میزان بیوسنتز آنزیم و تعیین دمای بهینه، به محیط کشت

### نتایج

*E. coli* موجود در آب بوسیله محیط‌های افتراقی طبق جدول ۱ جداسازی گردید. با استفاده از این محیط‌های افتراقی در نهایت ۲۰ نمونه مثبت تشخیص داده شد بعد از بررسی با شوک حرارتی و اسمزی یک سویه که توانایی تولید آنزیم را داشت به عنوان سویه مناسب انتخاب گردید. با آنتی سرم بکار رفته روی سویه مورد نظر مشخص شد که این سویه بیماری‌زا نبود. در بررسی تأثیر فاز رشد، فاز رشد در میزان بیوسنتز آنزیم مشاهده گردید، که *E. coli* بعد از ۶۴ ساعت رشد در محیط پایه و بعد از ۴۰ ساعت رشد در محیط بهینه وارد فاز رکود شد. هم چنین مشاهده شد که اپتیمم میزان تولید آنزیم در این باکتری در فاز رکود رخ می‌دهد. از بین منابع مختلف کربن، گلوکز به عنوان بهترین منبع کربن انتخاب گردید. از بین غلظت‌های مختلف گلوکز (۰/۱ تا ۱ درصد) تست شده، غلظت ۰/۵ بالاترین مقدار تولید آنزیم را به همراه داشت. در حالی که کمترین بازدهی تولید آنزیم مربوط به غلظت ۰/۱ بود.

تولید آنزیم (گلوکز ۰/۵٪، باکتوپتون ۰/۵٪، ۰/۶٪ NaCl، ۰/۰۱٪  $KH_2PO_4$ ) اضافه گردید. این محیط کشت بهینه در انکوباتور شیکردار با دماهای ۱۷، ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سلیسیوس قرار گرفت. در بررسی تأثیر pH در میزان بیوسنتز آنزیم و تعیین pH بهینه، محیط کشت بهینه با pH های ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵ و ۹ تهیه گردید. در بررسی تأثیر شرایط محیطی در میزان بیوسنتز آنزیم و تعیین شرایط بهینه، محیط کشت بهینه در دو حالت بررسی گردید. در حالت اول محیط کشت بهینه در انکوباتور شیکردار با دور بالا (۲۰۰ rpm) قرار گرفت در حالت دوم محیط کشت بهینه در جار شمع دار قرار گرفت. در بررسی فاز رشد و زمان رشد در میزان بیوسنتز آنزیم و تعیین حالت بهینه، میزان کدورت و تولید آنزیم محیط کشت بهینه در فاصله زمانی ۸ ساعته از زمان تلقیح اندازه‌گیری شد (این کار از ۸ تا ۶۴ ساعت تکرار گردید). به هر یک از پارامترهای مورد بررسی در محیط کشت بهینه ۶٪ باکتری تلقیح شد بعد از ۴۰ ساعت میزان کدورت و تولید آنزیم در محیط بهینه بررسی گردید.

جدول ۱: محیط‌های افتراقی به کار رفته در شناسایی *E. coli*

EMB	TSI	SIM	MR	VP	Urea agar	Simmons Citrate	محیط‌های افتراقی باکتری
کلنی‌هایی با جلای فلزی	محیط کاملاً زرد با تولید حباب	اندول +	+	-	-	-	<i>E. coli</i>

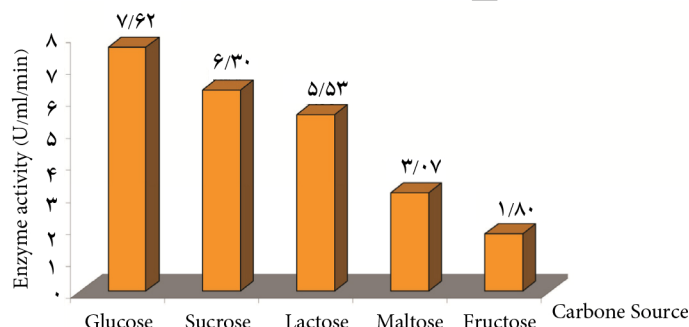
جدول ۲: مقایسه فعالیت آنزیم (برحسب واحد) در سویه بومی *E. coli*

با *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

فعالیت آنزیمی	سویه
7.62 (U/ml/min)	Native <i>E. coli</i> Strian Base culture medium
32.97 (U/ml/min)	Native <i>E. coli</i> Strian Optimum culture medium
35.5 (U/ml/min)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 Optimum culture medium

تست شده مشاهده گردید، که غلظت ۰/۵٪ بالاترین مقدار تولید آنزیم را به همراه داشت. در حالی که در غلظت ۰/۱٪ بازدهی تولید آنزیم به کمترین مقدار خود رسید.

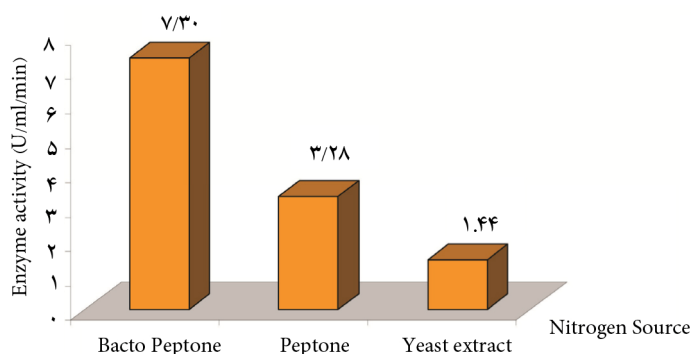
نمودار ۱ تأثیر منابع مختلف کربن را در میزان بیوسنتز آنزیم نشان داده است. از بین منابع نیتروژنی، باکتوپیتون به عنوان بهترین منبع نیتروژنی انتخاب شد و از بین غلظت‌های مختلف باکتوپیتون (۰/۱ تا ۱ درصد)



نمودار ۱: تأثیر منابع کربنی مختلف در میزان بیوسنتز آنزیم - بیشترین بازدهی تولید آنزیم با حضور گلوکز در محیط پایه (گلوکز به عنوان القاء کننده تولید آنزیم) - کمترین بازدهی تولید آنزیم با حضور فروکتوز در محیط پایه

۶٪ و کمترین میزان تولید آنزیم در تلقیح ۱٪ بود. از بین غلظت‌های مختلف  $\text{NaCl}$  تست شده بیشترین میزان تولید آنزیم مربوط به غلظت ۰/۶٪ بود در حالی که کمترین میزان تولید آنزیم در حضور غلظت ۰/۱۵٪ مشاهده گردید. از بین pH های مختلف آزمایش شده  $\text{pH} = 7/5$  به عنوان pH مناسب برای بالا بردن میزان تولید آنزیم توسط باکتری انتخاب گردید.

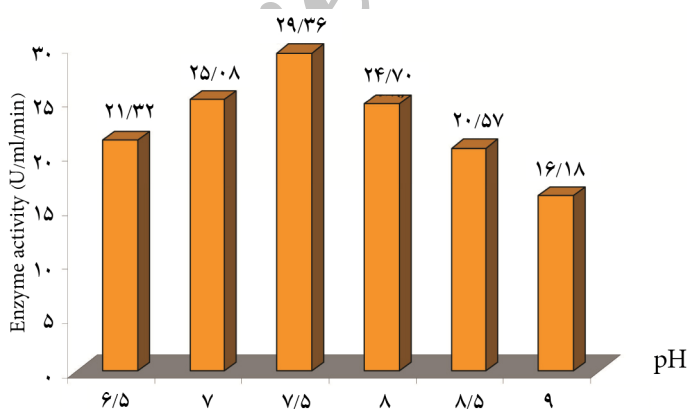
نمودار ۲ تأثیر منابع مختلف نیتروژنی را در میزان بیوسنتز آنزیم نشان داده است. از بین غلظت‌های مختلف فسفات غیرآلی (۰/۰۱ تا ۰/۰۸ درصد) مشاهده گردید که بازدهی تولید آنزیم در حضور غلظت کم فسفات (۰/۰۱٪) به حداکثر مقدار خود رسید و با بالا بردن غلظت فسفات (۰/۰۸٪) کاهش شدیدی در میزان بیوسنتز آنزیم ایجاد گردید. از بین تلقیح‌های انجام شده مشاهده گردید که بالاترین میزان تولید آنزیم در تلقیح



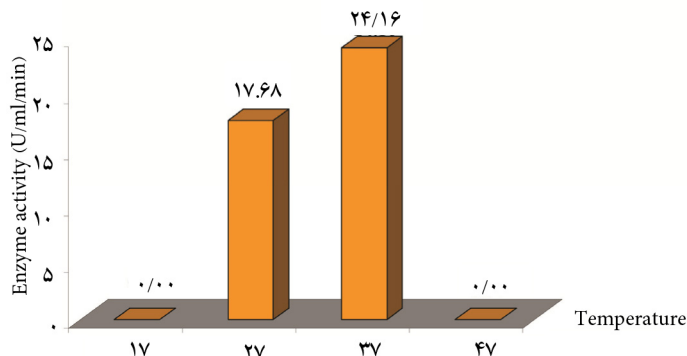
نمودار ۲: تاثیر منابع مختلف نیتروژنی در میزان بیوسنتز آنزیم با بیشترین بازدهی تولید آنزیم با حضور باکتوپپتون در محیط پایه - کمترین بازدهی تولید آنزیم با حضور عصاره مخمر در محیط پایه

بر میزان بیوسنتز آنزیم نشان داده است. بهترین شرایط برای تولید آنزیم در این سویه بومی شرایط هوازی بود. به طوری که در شرایط بی‌هوازی باکتری قادر به تولید آنزیم نبود. از میان pH های مختلف آزمایش شده ماکزیمم فعالیت آنزیم در  $pH = 8/5$  بود.

نمودار ۳ تاثیر pH های مختلف را در میزان بیوسنتز آنزیم نشان داده است. از میان دماهای مختلف آزمایش شده بهترین دمای محیط کشت جهت تولید و بالا بردن میزان تولید آنزیم توسط باکتری، دمای ۳۷ درجه سلیسیوس بود. نمودار ۴ تاثیر دماهای مختلف را



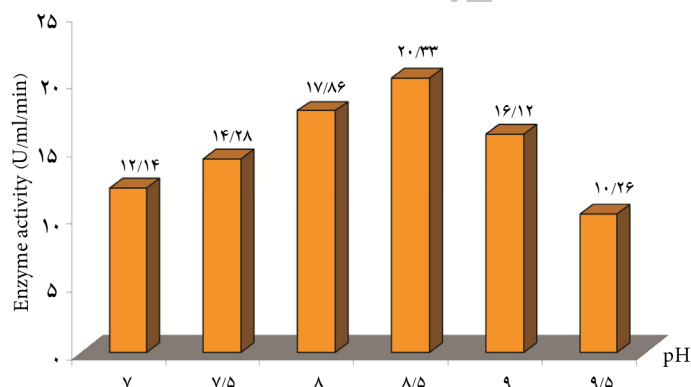
نمودار ۳: تاثیر pH در میزان بیوسنتز آنزیم -  $pH = 7/5$  بهترین pH محیط کشت جهت تولید و بالاترین میزان تولید آنزیم توسط باکتری - کمترین بازدهی تولید آنزیم توسط باکتری در محیط کشت با  $pH = 9$



نمودار ۴: تاثیر دما در میزان بیوسنتز آنزیم - دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس بهترین دمای محیط کشت جهت تولید و بالاترین میزان تولید آنزیم توسط باکتری - کمترین بازدهی تولید آنزیم توسط باکتری در دمای ۲۷ درجه سیلیسیوس - دماهای ۱۷ و ۴۷ درجه سیلیسیوس، دماهای نامساعد محیط کشت جهت تولید آنزیم

اپتیمم فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس مشاهده گردید.

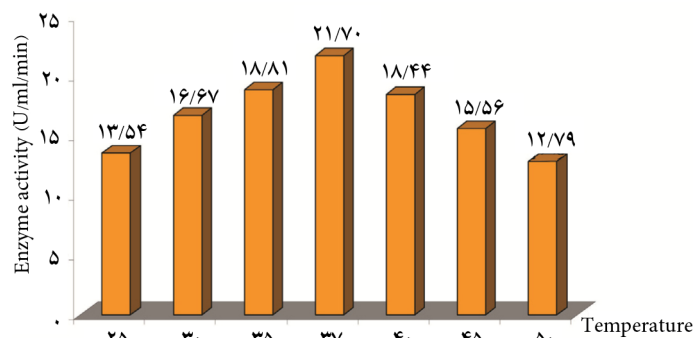
نمودار ۵: تاثیر pH های مختلف را بر فعالیت آنزیم نشان داده است. از بین دماهای مختلف آزمایش شده



نمودار ۵: تاثیر pH روی فعالیت آنزیم - ماکزیمم فعالیت آنزیم در  $pH = 8.5$  (بهینه) - کمترین میزان فعالیت آنزیم در  $pH = 9.5$

شد که زمان ماندگاری آنزیم به دست آمده توسط شوک حرارتی هفت روز در دمای ۲-۸ درجه یخچال بود.

نمودار ۶: تاثیر دماهای مختلف را بر فعالیت آنزیم نشان داده است. با اندازه گیری فعالیت آنزیم در روزهای مختلف در دمای ۲-۸ درجه یخچال مشخص



نمودار ۶: تأثیر دما روی فعالیت آنزیم - اپتیمم فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس - کمترین فعالیت آنزیم در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس

اتفاق می افتد (۹). در واقع نتیجه این بررسی نشان داد که بیش از ۵۰ درصد پروتئین هایی که در طول رشد در انتهای فاز لگاریتمی و اوایل فاز رکود سنتز می شوند مربوط به تولید آنزیم باشد. همچنین مطالعات مشابهی که Costerton و همکاران (۸) انجام دادند بیان نمودند که ماکزیمم تولید این آنزیم در سویه *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 در انتهای فاز لگاریتمی و اوایل فاز رکود اتفاق می افتد (۷). دو نتایج فوق با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت داشت. از تاثیر منابع کربنی مختلف آزمایش شده در این تحقیق نتیجه گرفته شد که با وجود گلوکز در محیط پایه تولید آنزیم افزایش می یابد و گلوکز به عنوان منبع کربن نقش القاء کننده گی تولید آنزیم را داشت و غلظت ۰/۵٪ مناسب ترین غلظت در این سویه بومی بود کمترین بازدهی تولید آنزیم با حضور فروکتوز در محیط پایه مشاهده گردید. از میان منابع نیتروژنی آزمایش شده در این تحقیق باکتوپپتون موثر شناخته شد و از بین غلظت های مختلف باکتوپپتون تست شده غلظت ۰/۵٪ در میزان بیوسنتز آنزیم بیشترین تاثیر را داشت به طوری که کمترین بازدهی تولید آنزیم مربوط به عصاره مخمر در محیط پایه بود. با مطالعاتی که Harold و James (۱۲) در خانواده

نتایج حاصل از سنجش میزان بیوسنتز آنزیم در محیط کشت بهینه در مقایسه با محیط کشت پایه نشان داد که ماکزیمم میزان بیوسنتز آنزیم در محیط کشت بهینه و محیط کشت پایه به ترتیب ۳۲/۹۷ و ۷/۶۲ یونیت به ازای میلی لیتر در دقیقه بود.

## بحث

در اکثر سویه های تولید کننده آنزیم آلکالین فسفاتاز مشاهده گردید که بیشترین میزان تولید آنزیم در اوایل فاز رکورد اتفاق می افتد زمانی که متابولیسم رشد سلولی در طی این فاز کاهش می یابد. این عمل موجب سنتز آنزیم خواهد شد. نتایج به دست آمده در این تحقیق با این مطلب مطابقت داشت. زیرا این سویه بومی در محیط کشت پایه بعد از ۶۴ ساعت رشد و در محیط کشت بهینه بعد از ۴۰ ساعت رشد وارد فاز رکورد شد. تولید آنزیم در این سویه بومی در محیط کشت پایه و بهینه اوایل فاز رکود به بیشترین مقدار خود رسید. Donald و همکاران با مطالعاتی که روی سویه *Bacillus licheniformis* MC14 در سال ۱۹۸۱ انجام دادند به این نتیجه رسیدند که بیشترین تولید آنزیم در انتهای فاز لگاریتمی و اوایل فاز رکود



در میدان حرارتی معین رشد می‌کند که از این ویژگی‌های گونه‌ای محسوب می‌شود و تغییرات دمای محیط کشت می‌تواند تأثیر زیادی در تولید آنزیم توسط باکتری داشته باشد.

با مطالعاتی که Qader و همکاران (۲۱) در *Bacillus Subtilis* انجام دادند دمای ۳۷ درجه سلیسیوس و  $\text{pH} = 7$  را مناسب‌ترین دما و  $\text{pH}$  جهت رشد باکتری برای تولید آنزیم بیان کردند. از بین فاکتورهای مورد بررسی فسفات غیر آلی به عنوان عامل مهار کننده در این سویه بومی معرفی گردید ماکزیمم فعالیت آنزیم این سویه بومی در  $\text{pH} = 8/5$  و دمای ۳۷ درجه سلیسیوس بود با افزایش میزان  $\text{pH}$  تقریباً ۳۰ درصد فعالیت آنزیم کاسته می‌شود زیرا تغییرات  $\text{pH}$  بر روی ساختمان پروتئینی آنزیم مؤثر می‌باشد و  $\text{pH}$  های خیلی اسیدی و یا خیلی قلیایی سبب غیر فعال شدن مولکول پروتئینی آنزیم و نیز دگرگونی پیوند آپو آنزیم و کو آنزیم می‌گردد. هم چنین تغییرات  $\text{pH}$  در اغلب موارد بر میزان یونیزه شدن سوستر و درجه یونیزاسیون اسیدهای آمینه که در تشکیل جایگاه فعال (Active site) آنزیم به کار رفته‌اند مؤثر می‌باشد. بدین ترتیب بر میل ترکیبی آنزیم و سوستر و نیز عمل کاتالیزی آنزیم تأثیر گذار است. همچنین با افزایش دما تقریباً ۲۰ درصد فعالیت آنزیم از بین می‌رود به طور کلی سرعت واکنش‌های شیمیایی در اثر حرارت افزایش می‌یابد. در مورد واکنش‌های آنزیمی نیز افزایش حرارت تا حدود ۵۰ درجه سبب زیاد شدن سرعت واکنش می‌شود ولی حرارت‌های بالاتر موجب دگرگونی ساختمان پروتئین آنزیم می‌گردد و در نتیجه اثر غیر فعال کننده حرارت بر روی مولکول آنزیم شدیدتر از اثر فعال کننده آن خواهد بود به طوری که در حرارت‌های ۷۰ و ۸۰ درجه،

*Enterobacteriaceae* انجام دادند از گلوکز و باکتوپیتون به عنوان فاکتورهای موثر گزارش کردند. از بین غلظت‌های مختلف  $\text{NaCl}$  آزمایش شده در این تحقیق هر یک از غلظت‌ها اثرات متفاوتی بر روی میزان بیوسنتز آنزیم در این سویه بومی داشتند بطوری که ماکزیمم تولید آنزیم در غلظت ۰/۶٪ مشاهده گردید. با مطالعاتی که Pandey و Banik (۲۰) روی *Bacillus licheniformis* انجام دادند بیان نمودند که چهار نمک  $\text{CaCl}_2$ ،  $\text{MgSO}_4$ ،  $\text{MnSO}_4$  و  $\text{NaCl}$  مقدار بهینه آن‌ها می‌تواند تأثیر مهمی در میزان بیوسنتز این آنزیم داشته باشد. از میان  $\text{pH}$  های مختلف آزمایش شده  $\text{pH}$  بهینه جهت فعالیت سلول برای تولید آنزیم در این تحقیق  $\text{pH} = 7/5$  بود رشد باکتری‌ها و فعالیت آن‌ها به شدت تحت تأثیر  $\text{pH}$  محیط قرار می‌گیرد. ماهیت فعالیت متابولیکی باکتری‌ها طوری است که  $\text{pH}$  محیط کشت بعد از شروع رشد آن‌ها معمولاً ثابت باقی نمی‌ماند با تجزیه پروتئین‌ها فرآورده‌های قلیایی و با تخمیر هیدرات کربن اسیدهای آلی تولید می‌گردد. بنابراین ماهیت باکتری‌ها و مواد مورد تجزیه، ضمن رشد باکتری تغییرات  $\text{pH}$  محیط را تعیین می‌کنند و تغییرات  $\text{pH}$  محیط می‌تواند تأثیر زیادی در تولید آنزیم توسط باکتری داشته باشد. و از بین دماهای آزمایش شده در این سویه بومی بهترین دما جهت فعالیت سلول برای تولید آنزیم در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس مشاهده گردید. با تغییر دما هر کدام اثرات متفاوتی در میزان بیوسنتز آنزیم توسط این سویه بومی داشتند بطوری که در دمای ۱۷ و ۴۷ درجه سلیسیوس این سویه بومی قادر به تولید آنزیم نبود. درجه حرارت محیط کشت می‌تواند میزان رشد، تأثیر بقا و مرگ باکتری را تعیین کند. هر نوع باکتری فقط

5. Bugg, T., 2004. Introduction of enzyme and coenzyme chemistry. J. Biol. Chem. 46: 4511-4525.
6. Buist, G.; Ridder, A.N.J.A.; Kok, J. and Kuipers, O.P., 2006. Different subcellular locations of secretome components of Gram-positive bacteria. J. Microbiology. 152:2867-2874.
7. Catherine, T.; Kelly, M.; Nash, and William, M., Fogarty, 1984. Effect of manganese on alkaline phosphates production in *Bacillus* sp.RK11. J.Biotech.19:61-66.
8. Costerton, J.W. and Ingram, J.M., 1970. Release of Alkaline Phosphatase for cells of *Pseudomonase aeruginosa* by Manipulation of Cation Concentration and of pH. J. Bacteriol.104: 748-753.
9. Donald, B.; Spencer, C. and Marion, H., 1981. Effect of Cobalf on Synthesis and Activation of *Bacillus licheniformis* Alkaline Phosphatase. J. Bacteriol. 145:926-933.
10. Fotadar, U.; Zaveloff, P. and Terracio, L., 2005. Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatueres. J. Microbiology. 45:403-409.
11. Garcia, M.; Karplus, M. and Truhlar, D.G., 2004. How enzyme work. Science. 303: 95-186.
12. Harold, C. and James, C., 1967. Relase of Surface Enzymes in *Enterobacteriaceae* by Osmotic Shok. J. Bacteriol. 94:1934-1945.
13. Heppel, L.A., 1967. Selective release of enzyme from bacteria. Science 156:141-1455.
14. Madigan, M.T. and Martink, J.M., 2006. Brock Biology of microorganisms (11 thed). Pearson. ISBN: 13-9.
15. Malamy, M. and Horecker, B.L., 1964. Release of alkaline phosphates from cells of *Escherichia coli* upon lysozyme spheroplast formation. J. Biol. Chem. 241:5419-5427.
16. Maria, C. and Pilar, N., Ortega, 2003. Alkaline phosphates enzyme kinetics *Escherichia coli* humate enzyme-ca complexes thermal stability. Science. 83: 232-239.

به جز حالت استثنایی، آنزیم‌ها غیر فعال می‌گردند (۵)، (۱۱ و ۲۱). با مطالعاتی که Marina و همکاران (۱۷) روی سویه وحشی *E.coli* k-10 انجام دادند فسفات غیر آلی را به عنوان عامل مهار کننده تولید آنزیم و  $pH = 8/5$  را به عنوان  $pH$  اپتیمم برای فعالیت هر چهار نوع آنزیم آلكالین فسفاتاز در این سویه وحشی گزارش کردند. نتایج حاصل از افزایش میزان تولید آنزیم در محیط کشت بهینه در مقایسه با محیط کشت پایه نشان‌دهنده این مطلب بود که پارامترهایی که در این تحقیق بررسی شدند به عنوان فاکتورهای تأثیر گذار بودند. جدول ۲ مقایسه فعالیت آنزیم (بر حسب واحد) در سویه بومی *E.coli* با *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 نشان داده است.

### سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه همکارانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمائیم.

### منابع

1. Anderson, R.A.; Bosron, W.F.; Bosron, W.F.; Kenndy, F.S. and Vallee, B.L., 1975. The role of magnesium in *Escherichia* alkaline phosphate. J. Biol. Chem. 72:2989-2993.
2. Anderson, R.; Kennedy, F. and Vallee, B., 1976. The effect of Mg (II) on the spectral properties of Co (II) alkaline phosphatase. J. Biol.Chem.15: 3710-3715.
3. Bloch, W. and Schlesinger, M.J., 1974. The phosphate content of *Escherichia coli* alkaline phosphatase and its effect on stopped-flow kinetics. J.Biol.Chem.248, 5794-5805.
4. Bosron, W.; Kennedy, F. and Vallee, B.L., 1975. Zinc and magnesium content of alkaline phosphates from *Escherichia coli*.J.Biol.Chem.660:809-813.

17. Marina, A.; Motlokh, M. and Igor, S., 1981. Multiple Forms of Alkaline phosphatase from *Escherichia coli* cells with Repressed and Derepressed Biosynthesis of the of the Enzyme. J. Bacteriol. 146:453-459.
18. Nev, H.C. and Heppel, L.A., 1965. The release of enzyme from *Escherichia coli* cells are converted to spheroplasts. J. Biol. Chem. 239:3893-3900.
19. Nossal, N.G. and Heppel, L.A., 1966. The release of enzymes by osmotic shock from *E.coli* in exponential phase. J. Biol. Chem. 241:3055-3062.
20. Pandey, S.K. and Banik, R.M., 2008. Selection of metal salts for alkaline phosphate production using response surface methodology Science.42:470-475.
21. Qader, A.; Iqbal, S. and Niazi, Z., 2009. Partial Purification and Characterization of Intracellular Alkaline Phosphatase from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. J. Microbiology 7: 1937-8289.
22. Robert, R.B. and Evan, R.K., 2003. Characterization of a monomeric *E.coli* alkaline phosphatase formed upon a single amino acid substitution. J. Biol. Chem. 278: 23497-23501.
23. Rute, S.M.; Juan, F.M.; Alicia, M. and Paloma, L., 2001. Substrate analysis and molecular cloning of the extra cellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. J. Microbiology. 147:1525-1533.
24. Sebastien, Z.; Jean, L.R.; Didier, H.; Yannick, G.; Joseph, B. and Jacques, D., 2001. Characterization of highly thermostable alkaline phosphatase from *pyrococcusabyssi*. J. Microbiol. 67: 4504-4511.

Archive of SID