مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهارم، شماره سوم و چهارم (پیاپی ۱۱)، زمستان ۱۳۹۰
صفحات ۷۶-۶۷

Original Article

غربالگری باکتری‌های بومی مولد ال-گلوتامیناز و تولید آنزیم به وسیله تخمیر غوطه‌ور

مریم رنجبر مبارکه*[۱]، محسن مبینی دهکردی[۲]، علی اصغر رستگاری[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی، [۲] استادیار، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه ژنتیک، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه بیوشیمی

چکیده

سابقه و هدف: ال-گلوتامیناز آنزیمی است که به دلیل کاربرد گسترده در صنایع دارویی و غذایی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این آنزیم یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های درمانی است که برای درمان لوسمی استفاده می‌شود. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی مولد آنزیم ال-گلوتامیناز و بررسی کمی فعالیت آنزیم در شرایط تخمیر غوطه‌ور، به منظور تعیین بهترین جدایه از نظر فعالیت آنزیم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: باکتری‌های تولید کننده ال-گلوتامیناز از نمونه‌های خاک و آب رودخانه زاینده رود و کارون و حوضچه پرورش ماهی جداسازی شدند. جدایه‌ها به منظور تولید آنزیم ال-گلوتامیناز به کمک محیط مینی‌مال گلوتامین آگار (MGA) غربالگری شدند. تولید ال-گلوتامیناز در سیستم تخمیر غوطه‌ور با استفاده از محیط مینرال سالت گلوتامین (MSG) انجام شد و آنزیم تولید شده به صورت کمی اندازه‌گیری گردید. بهترین جدایه مولد آنزیم به وسیله ی ویژگی های ریخت شناسی و تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شد.

یافته‌ها: در این مطالعه ۱۱ سویه باکتری مولد ال-گلوتامیناز جداسازی گردید. از این میان سویه CH3-GLU بیشترین تولید آنزیم را به میزان ۳۷/۹۱±۰/۶۲ U/ml در دمای ۴۵°C پس از ۹۶ ساعت نشان داد. این جدایه به عنوان سویه‌ای از *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) شناسایی گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان داد که باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* سویه CH_3-GLU به عنوان یک سویه بومی پتانسیل بالایی در تولید ال-گلوتامیناز دارد.

واژگان کلیدی: ال-گلوتامیناز، باکتری‌های بومی ایران، *باسیلوس*

دریافت مقاله: خرداد ۱۳۹۰ *پذیرش برای چاپ:* تیر ۱۳۹۰

*) آدرس برای مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی.

تلفن: ۰۳۱۲۳۱۲۰۱۳٤

پست الکترونیکی: mmaryamr129@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ال-گلوتامیناز (EC 3.5.1.2) یک آنزیم آمیدوهیدرولاز است که نقش مهمی در متابولیسم نیتروژن در سلول‌های زنده ایفا می‌کند (۱). از آن‌جایی که این آنزیم با حذف گلوتامین موجب تخریب سلول‌های تومور وابسته به گلوتامین می‌گردد، امروزه به عنوان یک آنزیم درمانی شناخته شده است. همچنین اثر مهار کنندگی ال-گلوتامیناز در لوسمی لمفوبلاستیک حاد و لوسمی L1210 نیز به اثبات رسیده است (۲ و ۳).

آسیویسین (Acivicin) یک داروی شیمیایی ضدسرطان است. مطالعات نشان می‌دهد که استفاده همزمان از آسیویسین و آنزیم ال-گلوتامیناز نتایج بهتری را در مهار سلول‌های توموری به دنبال خواهد داشت (٤). از مهم‌ترین کاربردهای درمانی این آنزیم درمان بیماری ایدز می‌باشد (٥). بر اساس مطالعات هوآنگ (Huang) و همکاران در سال ۲۰۱۱، ال-گلوتامیناز تولید شده توسط باکتری *سودوموناس* 7A (*Psuedomonase* 7A)، می‌تواند سلول‌های عفونی شده با HIV را مهار کند (٦ و ٧).

در صنایع غذایی، از ال-گلوتامیناز برای طعم‌دهی بهتر غذاهای تخمیری استفاده می‌گردد. در سال ۱۹۷٤ محققان ژاپنی پس از جداسازی قارچ *آسپرژیلوس سوجا* (*Aspergillus sojae*) از خمیر سویا دریافتند که گلوتامیناز تولید شده توسط این قارچ، محتوای پروتئینی غذا را هیدرولیز کرده و با تولید اسید گلوتامیک نقش مهمی در بهبود مزه غذا دارد (۸ و ۹). امروزه برای تعیین سطح گلوتامین در کشت‌های سلولی هیبریدوما (Hybridoma) و نیز سلول‌های پستانداران از آنزیم ال-گلوتامیناز استفاده می‌گردد (۱۰). تولید ال-گلوتامیناز با استفاده از کشت سلول‌های پستانداران و میکروارگانیسم‌ها انجام می‌شود. اما به دلیل سادگی و مقرون به صرفه بودن، تولید میکروبی آن ترجیح داده می‌شود. میکروارگانیسم‌های مختلفی مانند باکتری‌ها، مخمرها، کپک‌ها و قارچ‌های رشته‌ای قادر به تولید ال-گلوتامیناز می‌باشند (۱۱).

با توجه به کاربرد گسترده آنزیم ال-گلوتامیناز در پزشکی و صنایع غذایی و نیز ضرورت تولید این آنزیم در مقیاس بالا، یافتن سویه‌های بومی بالقوه برای تولید ال-گلوتامیناز اهمیت دارد. جداسازی و خالص سازی میکروارگانیسم‌های بومی با هدف تولید آنزیم ال-گلوتامیناز این قابلیت را دارد که بررسی دقیق علمی بر روی جدایه‌های کشور از نظر تولید آنزیم فوق انجام شود. همچنین امکان ردیابی جدایه‌هایی که قابلیت بالایی در تولید آنزیم دارند نیز فراهم می‌گردد. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی مولد آنزیم ال-گلوتامیناز و بررسی کمی فعالیت آنزیم در شرایط تخمیر غوطه‌ور، به منظور تعیین بهترین جدایه از نظر فعالیت آنزیم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه و جداسازی باکتری: در این مطالعه نمونه‌ها از عمق ٥ cm خاک حاشیه رودخانه‌های زاینده رود و کارون، آب رودخانه کارون و نیز رسوبات حوضچه پرورش ماهی در استان اصفهان جمع آوری شدند. در ابتدا ٥ گرم از نمونه مورد نظر با ٤٥ ml آب مقطر استریل مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر با دور ۱۰۰ rpm قرار داده شد. سپس ۱ ml از سوسپانسیون یاد شده را به ۹ ml بافر پتاسیم فسفات استریل (pH ۷، ۰/۰۱ مولار) منتقل و به کمک روش رقیق سازی متوالی تا غلظت 10^{-8} رقیق گردید.

۰/۱ میلی لیتر از رقت های 10^{-7} و 10^{-8} بر روی محیط تریپتون سوی آگار (TSA) به صورت سطحی کشت و در دمای ۳٥°C به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از تهیه کشت خالص از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط یاد شده، تمامی نمونه‌ها برای مطالعات بیشتر در دمای ٤°C نگهداری گردیدند (۱۲).

ب) غربالگری سویه‌های تولید کننده ال-گلوتامیناز: انتخاب

Archive of SID
www.SID.ir

باکتری‌های مولد ال-گلوتامیناز بر اساس روش سنجش سریع پلیت (Rapid Plate Assay) با استفاده از محیط مینی مال گلوتامین آگار (MGA = Minimal Glutamine Agar) اصلاح شده حاوی (W/V) ۱٪ گلوتامین (ساخت شرکت Sigma آمریکا) به عنوان منبع کربن و نیتروژن، ۰/۰۵٪ $MgSO_4$، ۰/۰۵٪ KCl، ۰/۰۲٪ NaCl و ۱/۵٪ آگار صورت گرفت. همچنین ۰/۰۱۲٪ فنل رد (ساخت شرکت Acrose آمریکا) به عنوان شناساگر pH به محیط اضافه شد. کشت باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای انجام شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۵°C گرمخانه گذاری گردید. پلیت‌های کشت شده پس از ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بررسی و با نمونه کنترل مقایسه گردیدند.

فعالیت ال-گلوتامیناز به وسیله تشکیل یک هاله صورتی اطراف کلنی به صورت کیفی تعیین گردید (۱۲ و ۱۳). تولید ال-گلوتامیناز به وسیله باکتری‌های مولد به صورت کیفی با استفاده از محیط MGA در دمای ۳۵°C تا ۵۰°C بررسی شد. سویه‌ای که قادر به تولید آنزیم در دمای بالا بود به عنوان سویه ترموفیل تعیین گردید.

ج) تولید ال-گلوتامیناز به وسیله‌ی تخمیر غوطه‌ور: به منظور تولید آنزیم ال-گلوتامیناز در شرایط تخمیر غوطه‌ور از محیط مینرال سالت گلوتامین (Mineral Salt Glutamine یا MSG) حاوی (w/v) ۱٪ گلوتامین، ۰/۵٪ گلوکز، ۰/۱٪ PO_2KH_4، ۰/۰۵٪ $MgSO_4$، ۰/۰۲٪ NaCl، ۰/۰۱٪ $CaCl_2$، ۰/۰۱٪ $NaNO_3$ و ۰/۰۱٪ تری سدیم سیترات با pH ۷ استفاده گردید. ارلن‌های حاوی ۲۵ ml محیط کشت MSG استریل و با ٤٪ مایه تلقیح، تلقیح شدند. مایه تلقیح یک سوسپانسیون میکروبی تازه در محیط MSG، با مقدار جذب نوری ۰/٦ در طول موج ٦۰۰ nm بود. تمامی ارلن‌ها در در دمای ۳۵°C در انکوباتور شیکردار (SKIR-601Shin-Saeng) با دور ۱۲۰ rpm به مدت ۱۲۰ ساعت گرمخانه گذاری شدند (۱۱و ۱٤).

تولید آنزیم توسط سویه ترموفیل در دمای ۳۵°C تا ۵۰°C بررسی گردید.

د) استخراج آنزیم خام: نمونه‌گیری هر ۲٤ ساعت یک بار انجام شد. نمونه‌های جمع آوری شده در یک سانتریفوژ یخچال دار با دور ۱۰۰۰۰ rpm و دمای ٤°C سانتریفوژ شدند. پس از حذف بیومس باکتری، مایع رویی در لوله‌های درپوش دار جمع آوری و به عنوان آنزیم خام در مطالعه استفاده گردید (۱۵).

ه) سنجش فعالیت ال-گلوتامیناز: سنجش ال-گلوتامیناز بر اساس روش ایمادا انجام شد. مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۰/۵ ml ال-گلوتامین (۰/۰٤ M)، ۰/۵ ml بافر تریس (۰/۱M) با pH ۸/۲، ۰/۵ ml آب دیونیزه و ۰/۵ ml محلول آنزیم خام بود که به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C نگهداری گردید. فعالیت آنزیم با اضافه کردن ۰/۵ ml تری کلرو استیک اسید (۱/۵ M) متوقف می‌گردد. در ادامه ml ۰/۱ از محلول یاد شده با ml ۳/۷ آب دیونیزه مخلوط شد و ml ۰/۲ از معرف نسلر (Merck آلمان) نیز به آن اضافه گردید. رنگ ایجاد شده در محیط پس از ۱۵ دقیقه در طول موج ٤۸۰ nm به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر (S2100 SUV- America) خوانده شد (۱٦). از نمونه فاقد آنزیم به عنوان شاهد استفاده گردید.

در این مطالعه یک واحد آنزیم ال-گلوتامیناز، مقدار آنزیمی تعریف گردید که بتواند ۱ میکرومول آمونیاک را در شرایط بهینه آزمایش (دمای ۳۷°C و pH ۸/۲) نشاندار نماید. همچنین به منظور مقایسه تولید آنزیم توسط جدایه‌های مختلف و نیز رسم نمودار، از نسخه ۱۸ نرم افزار SPSS استفاده شد.

و) تعیین هویت: سویه بالقوه بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی مرسوم طبقه‌بندی گردید (۱۷).

Archive of SID

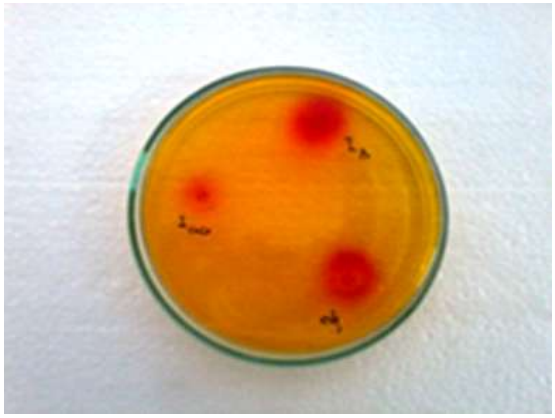
www.SID.ir

نتایج

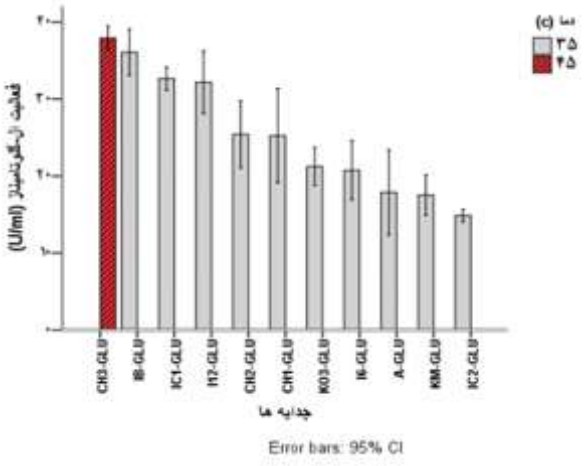
در این مطالعه ۳٤ سویه باکتری از نمونه‌های مختلف جداسازی گردید. جدایه‌ها به منظور تولید ال-گلوتامیناز بر روی محیط MGA غربالگری شدند. ایجاد هاله صورتی اطراف کلنی بر روی محیط MGA نشانه تولید ال-گلوتامیناز توسط باکتری می‌باشد (شکل۱). از میان سویه‌های جداسازی شده، ۱۱ باکتری تولید کننده آنزیم ال-گلوتامیناز بودند. از این تعداد تنها یک سویه به دلیل تولید آنزیم تا دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد به عنوان سویه ترموفیل معرفی گردید.

تمامی ۱۱ سویه در تخمیر غوطه‌ور، آنزیم ال-گلوتامیناز را با بازده بین ۳۷/۹۱ U/ml تا ۱٤/۸۵ تولید کردند (جدول ۱). بر اساس نمودار ۱، سویه CH3-GLU که از حاشیه رودخانه کارون جدا شده بود، بیشترین میزان تولید آنزیم را (۳۷/۹۱ U/ml) پس از گذشت ۹٦ ساعت در دمای ٤٥°C داشت و به عنوان سویه بالقوه انتخاب گردید.

کلنی‌های سویه CH3-GLU بر روی محیط تریپتون سوی آگار (TSA) به صورت گرد، موجی و دارای سطحی زبر مشاهده شد.



شکل ۱: غربالگری باکتری‌های تولید کننده ال-گلوتامیناز روی محیط MGA.



نمودار ۱: مقایسه فعالیت ال-گلوتامیناز در جدایه‌های مختلف در دمای مختلف.

این سلول‌ها گرم مثبت، دارای آرایش تکی یا زنجیره‌ای با اندوسپور انتهایی بودند. تمامی مشخصات مرفولوژیک و بیوشیمیایی سویه CH3-GLU در جداول ۲ و ۳ آورده شده است. بر این اساس جدایه CH3-GLU، سویه‌ای از *باسیلوس سوبتیلیس* شناسایی گردید.

بحث

به طور کلی امروزه آنزیم‌ها مهم‌ترین تولیدات به دست آمده از منابع میکروبی برای بشر می‌باشند و به دلیل مقرون به صرفه بودن، نسبت به آنزیم‌هایی که از گیاهان و حیوانات به دست می‌آیند ترجیح داده می‌شوند (۱۸).

تاکنون مطالعات زیادی به منظور جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد ال-گلوتامیناز به دلیل کشف خصوصیات ضدتوموری آن انجام شده است. اکثر میکروارگانیسم‌هایی که فعالیت ال-گلوتامیناز دارند از خاک جدا می‌شوند. با این وجود، گزارش‌های زیادی نیز از جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد ال-گلوتامیناز از زیستگاه‌های آبی وجود دارد (۱۳ و ۱۹).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: مقایسه فعالیت ال-گلوتامیناز در تمامی جدایه‌ها.

نام جدایه	منبع جداسازی	فعالیت آنزیم	دما (°C)	زمان (ساعت)
CH_3-GLU	حاشیه رود خانه کارون	۳۷/۹۱±۰/۶۲	۴۵	۹۶
I_B-GLU	حاشیه رودخانه زاینده رود	۳۶/۰۹±۱/۲۱	۳۵	۷۲
I_{c1}-GLU	حاشیه رودخانه زاینده رود	۳۲/۶۴±۰/۶۰	۳۵	۷۲
I_{12}-GLU	حاشیه رودخانه زاینده رود	۳۲/۱۷±۱/۶۴	۳۵	۷۲
Ch_2-GLU	حاشیه رود خانه کارون	۲۵/۴۲ ±۱/۷۵	۳۵	۷۲
Ch_1-GLU	حاشیه رود خانه کارون	۲۵/۲۳±۲/۴۶	۳۵	۷۲
Ko_3-GLU	رسوبات حوضچه پرورش ماهی	۲۱/۲۵±۱/۰۰	۳۵	۷۲
I_6-GLU	حاشیه رودخانه زاینده رود	۲۰/۷۶±۱/۵۴	۳۵	۷۲
A-GLU	آب رودخانه کارون	۱۷/۸۸±۲/۲۱	۳۵	۷۲
Km-GLU	حاشیه رودخانه زاینده رود	۱۷/۵۰±۱/۰۵	۳۵	۷۲
I_{c2}-GLU	حاشیه رودخانه زاینده رود	۱۴/۸۵±۰/۳۳	۳۵	۷۲

جدول ۲: مشخصات مرفولوژیک جدایه CH_3-GLU.

آزمون	نتایج
کاتالاز	+
اکسیداز	+
تولید گاز از گلوکز	–
VP	–
H_2S	–
لستیناز	+
لیپاز	+
حساسیت به پنی‌سیلین	+
تخمیر کربوهیدرات‌ها	
گلوکز	+
گالاکتوز	+
مانیتول	+
ساکاروز	+
لاکتوز	–
مانوز	+

از سویه‌های مولد ال-گلوتامیناز که از خاک جدا شده‌اند می‌توان به سویه‌های *کلاستریدیوم*، *اروینیا*، *سودوموناس* و *باسیلوس* اشاره نمود (۱۱ و ۱۶).

با توجه به مطالعات انجام شده و بررسی وجود باکتری‌های مولد آنزیم ال-گلوتامیناز در منابع خاکی و آبی، در پژوهش حاضر نمونه‌های مورد بررسی از حاشیه رودخانه‌های زاینده رود و کارون، آب رودخانه کارون و رسوبات حوضچه پرورش ماهی در استان اصفهان جمع آوری گردیدند. به منظور تولید آنزیم ال-گلوتامیناز غربالگری میکروارگانیسم‌ها بر اساس روش پراکاش (Prakash) و همکاران در سال ۲۰۰۹ و بالاگورونا‌تان (Balagurunathan) و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از محیط MGA تکمیل شده با فنل رد انجام گرفت (۱۲و ۱۳). با این تفاوت که این دو محقق، جداسازی و غربالگری را همزمان بر روی محیط MGA انجام دادند. محیط یاد شده حاوی فنل رد است و می‌تواند موجب جهش در میکروارگانیسم‌ها گردد. از آن‌جایی که

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعه حاضر با هدف جداسازی باکتری‌های مولد ال-گلوتامیناز و نیز ارزیابی میزان فعالیت آنزیم انجام شد، دست یابی به سویه وحشی حائز اهمیت بود. بنابراین از محیط MGA تنها به منظور غربالگری استفاده گردید.

در اکثر بررسی‌های انجام شده از جمله مطالعه پراکاش (Prakash) و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای تولید ال-گلوتامیناز به وسیله باکتری‌ها از محیط کشت مینرال سالت گلوتامین (Mineral Salt Glutamine) استفاده شده است. آن‌ها محیط‌های مختلفی مانند محیط اصلاح شده مخلوط آب دریا (Modified Sea-Water Complex Broth)، نوترینت براث اصلاح شده (Modified Nutrient Broth)، زوبل براث اصلاح شده (Modified Zobell Broth)، مینی مال گلوتامین براث (Minimal Glutamine Broth) و مینرال سالت گلوتامین را به منظور تولید آنزیم ال-گلوتامیناز مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیشترین میزان تولید آنزیم در محیط مینرال سالت گلوتامین انجام شده است (۱٤). به همین دلیل در پژوهش جاری برای تولید آنزیم ال-گلوتامیناز توسط باکتری‌های مولد از محیط کشت یاد شده استفاده گردید.

فعالیت ال-گلوتامیناز در باکتری‌های مختلفی از جمله سویه‌های *باسیلوس*، *پرووییدنشیا* (*Providencia*)، *میکروکوکوس* (*Micrococcus*)، *سودوموناس* و *اکتینومیست‌ها* (*Actinomycetes*) گزارش شده است. اما تنها سویه‌های *باسیلوس* به عنوان سویه‌های تجاری در تولید ال-گلوتامیناز مطرح می‌باشند (۱۱).

در سال ۲۰۱۰ در هند بالاگوروناتان (Balagurunathan) و همکارانش *اکتینومیست‌های* مولد گلوتامیناز را از رسوبات دریا جدا کردند. آن‌ها توانستند ۲۰ سویه مولد آنزیم جدا کنند (۱۲). در مطالعه حاضر ۳٤ سویه باکتری از نمونه‌های مختلف جداسازی گردید. از میان سویه‌های جداسازی شده، ۱۱ باکتری تولید کننده آنزیم ال-گلوتامیناز بودند.

در سال ۱۹۷۲ تولید ال-گلوتامیناز توسط *آکروموباکتریاسه* CEAE (*Achromobacteraceae*) که از

جدول ۳: مشخصات بیوشیمیایی جدایه CH_3-GLU.

آزمایش	ویژگی
شکل	دایره‌ای
حاشیه	موجی
برامدگی	مسطح
سطح	زبر- خشن
ظاهر	مات
پیگمان	-
واکنش گرم	گرم مثبت
شکل سلول	میله‌ای
آرایش	تکی یا زنجیره کوتاه
اندوسپور	+
شکل	بیضی
کپسول	-
تحرک	+

زیستگاه خاکی جدا شده بود در شرایط بهینه و دمای ۲۵°C به میزان ۰/۱۳ U/ml گزارش گردید (۲۰).

سودوموناس BTMS-51 یک سویه مولد ال-گلوتامیناز است که توسط کومار (Kumar) و همکاران از زیستگاه خاکی جداسازی شد. بیشترین تولید ال-گلوتامیناز توسط این باکتری در دمای ۳۰°C به میزان ۳٦/۰۵ U/ml بوده است (۱۱).

در سال ۲۰۰٦ سیواکومار (Sivakumar) و همکاران تولید ال-گلوتامیناز را در باکتری *استرپتومایسس ریموسوس* (*Streptomyces rimosus*) که از پوست ماهی جدا شده بود مورد بررسی قرار دادند. این باکتری در دمای ۲۷°C و شرایط بهینه توانست ۱۷/۵۱ U/ml آنزیم تولید نماید (۲۱).

Archive of SID
www.SID.ir

لیر (Lyer) و سینگال (Singhal) در سال ۲۰۰۹ یک سویه *پرویدنشیا* را از آب دریا جدا کردند. بیشترین بازده آنزیم توسط این باکتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۰/۱۲ U/ml به دست آمد (۲۲).

تولید ال-گلوتامیناز در باکتری *ویبریو* (*Vibrio*) سویه SFL-2 و *کلبسیلا اوکسی‌توکا* (*Klebsiella oxytoca*) که از زیستگاه‌های آبی و خاکی جدا شده بودند توسط لیر (Lyer) و سینگال (Singhal) در سال ۲۰۱۰ و پراکاش (Prakash) و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعه شد. بر اساس نتایج آن‌ها حداکثر تولید آنزیم در *ویبریو* سویه SFL-2 و *کلبسیلا اوکسی توکا* به ترتیب ۰/٤٦U/ml و ۰/٤٤U/ml بوده است. از طرفی این میزان تولید به ترتیب در دماهای ۳۵°C و ۳۳°C مشاهده گردید (۱۳ و ۲۳).

از آن‌جایی که در تمامی مطالعات انجام شده، محیط مورد استفاده برای تولید آنزیم و نیز روش اندازه‌گیری آنزیم مشابه است، بنابراین تفاوت در بازده آنزیم را می‌توان به سویه مورد بررسی نسبت داد.

در مطالعه حاضر سویه CH_3-GLU که از حاشیه رودخانه کارون جدا شده بود، بیشترین فعالیت ال-گلوتامیناز را نشان داد. بیشترین سطح تولید آنزیم توسط این سویه در دمای ٤٥°C به میزان ۳۷/۹۱ U/ml گزارش گردید. پس از آن جدایه I_B-GLU که از حاشیه رودخانه زاینده رود جدا شده بود، بازده ۳٦/۰۹ U/ml را در دمای ۳۵°C نشان داد.

میزان فعالیت و دمای تولید آنزیم توسط سویه CH_3-GLU نسبت به سایر جدایه‌های شناسایی شده در این مطالعه و مطالعات دیگر قابل مقایسه است. به طوری که توانایی تولید آنزیم ال-گلوتامیناز در دمای بالا (٤٥°C) این سویه را از دیگر جدایه‌ها متمایز می‌کند. این سویه بر اساس جداول کتاب برگی سویه‌ای از *باسیلوس سوبتیلیس* تعیین گردید که امروزه جزء میکروارگانیسم‌های امن و بی‌خطر برای استفاده در صنعت طبقه بندی شده است (٢٤). این خصوصیات باکتری را برای استفاده در فرآیندهای بیوتکنولوژی ارزشمند می‌نماید.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* سویه CH_3-GLU به عنوان یک سویه بومی به منظور تولید آنزیم ال-گلوتامیناز معرفی گردید. به دلیل پتانسیل بالا در تولید ال-گلوتامیناز، این سویه می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات آینده باشد. در مطالعه حاضر تولید آنزیم ال-گلوتامیناز در شرایط تخمیر غوطه ور مورد بررسی قرار گرفت. اما مطالعات بعدی می‌تواند در راستای بهینه سازی تولید آنزیم در شرایط تخمیر غوطه‌ور، تولید آنزیم در شرایط تخمیر در بستر جامد و نیز یافتن سوبسترای مناسب برای تولید این آنزیم باشد. به طوری که با مطالعات بیشتر بر روی بهینه‌سازی شرایط تخمیر می‌توان تولید را در این سویه افزایش داد. همچنین با یافتن روش‌های مناسب برای تثبیت آنزیم و یا میکروارگانیسم مولد می‌توان بازده تولید ال-گلوتامیناز را تا چند برابر افزایش داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد

اسلامی واحد فلاورجان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Erickson JW, Cerione RA. Glutaminase: a hot spot for regulation of cancer cell metabolism. Oncotarget. 2010; 1(8): 734-740.
2. Spiers AS, Wade HE. Bacterial glutaminase in treatment of acute leukemia. Br Med J. 1976; 1(6021): 1317-1319.
3. El-Asmar FA, Greenberg DM. Amand GSt. Studies on the mechanism of inhibition of tumor growth by the enzyme glutaminase. Cancer Res. 1966; 26(1): 116-122.
4. Roy S, Ghosh S, Mallick P, Maity p. Acivicin wuth glutaminase regulates proliferation and invasion of human MCF-7 and OAW-42 cells-AN in vitro study. Indian J Exp Biol. 2008; 46(1): 22-26.
5. Kumar SR, Chandrasekaran M. Continus production of L-glutaminase by an immobilized marine *Pseudomonase* sp BTMS-51 in a packed bed reactor. Process Biochem. 2003; 38 (10): 1431-1436.
6. Huang Y, Zhao L, Jia B, Wu L, Li Y, Curthoys N, Zheng JC. Glutaminase dysregulation in hiv-1 infected human microglia mediates neurotoxicity: relevant to hiv-1 associated neurocognitive disorders. J Neurosci. 2011; 31(42): 15195-15204.
7. Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi CT, Curi R. Glutamine and glutamate their central role in cell metabolism and function. Cell Biochem Funct. 2003; 21(1): 1-9.
8. Yamamoto S. Hitoshi H. Production of glutaminase by *Aspergillus sojae*. J Ferment Technol. 1974; 52(8): 564-569.
9. Thongsanit J, Yano S, Tachiki T, Wakayama M. Identification of a glutaminase producing bacteria strain isolated from thai fermentated pork sausage and characterization of glutaminase production. Ann Microbiol. 2008; 58(4): 671-675.
10. Nathiya K, Nath SS, Angayarkanni J, Palaniswamy M. Screening of a high glutaminolytic enzyme producing strain and its extracellular production by solid state fermentation**.** Int J Pharm Biosci. 2011; 3(2): 298-302.
11. Prasanth Kumar K, Prabhakar T, Sathish T, Grija Sankar G, Moges F, Swarajya Lakshmi G, Ramana H. Studies on extracellular L-glutaminase production by halophilic *Aspergillus* sp. J Pharm Chem. 2009; 3 (1): 4-7.
12. Balagurunathan R, Radhakrishnan M, Somasundaram ST. L-glutaminase producing *Actinomycetes* from marine sediments selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. Aust J Basic Appl Sci. 2010; 4(5): 698-705.
13. Jeya Prakash P, Poorani E, Anantharaman P, Balasubramaniam T. L-glutaminase production and the growth of marine bacteria. Res J Microbiol. 2009; 4: 168-172.
14. Jeya Prakash P, Poorani E, Anantharaman P. Effect of media composition L-glutaminase production from lagoon *Vibrio* sp SFL2. Int J Biotechnol Biochem. 2010; 6 (5): 769-782.
15. Pallem C, Manipati S, Somalanka SR. Process optimization of L-glutaminase production by *Trichoderma koningii* under solid state fermentation (SSF). Int J Appl Biol Pharm Technol. 2010; 1(3): 1168-1174.
16. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. Microbiology. 1973; 76(1): 85-99.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Whitman WB, Vos PD, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Raineg FA, Schleifer KH. The firmicutes. Whitman WB. Bergeys' manual of systematic bacteriology. 2thed. Georgia Athens, USA. Springer. 2009; 19-21.
18. Sabu A. Source, Propertis And Applications Of microbial therapeutic enzymes. Indian J Biotechnol. 2003; 2: 334-341.
19. Renu S, Chandrasekaran M. Extracellular L-glutaminase production by marine bacteria. Biotechnol Lett. 1992; 14(6): 471-474.
20. Roberts J, Holcenberg JS, Dolowy WC. Isolation, crystallization, and properties of *Achromobacteraceae* glutaminase asparaginase with antitumor activity. J Biol Chem. 1972; 247 (1): 84-90.
21. Sivakumar K, Sahu MK, Manivel PR, Kannan L. Optimum condition for L-glutaminase production by *actinomycete* strain isolated from estuarine fish, chanoschanos. Indian J Exp Boil. 2006; 44(3): 256-258.
22. Lyer PV, Singhal RS. Screening and selection of marine isolated for L-glutaminase production and media optimization using response surface methodology. Appl Biochem Biotechnol. 2009; 159 (1): 233-250
23. Lyer P, Singhal R. Isolation, screening, and selection of an L-glutaminase producer from soil and media optimization using a statistical approach. Biotechnol Bioprocess Eng. 2010; 15 (6): 975-983.
24. Astuto-Gribble LM, Gaudioso JM, Caskey SA, Zemlo TR. A survey of bioscience research and biosafety and biosecurity practices in Asia, Eastern Europe, Latin America, and the middle east. Appl Biosaf. 2009; 14(4): 181-196.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal Of Microbial World
Vol 4, No 3 & 4, January 2012

Original Article

Screening native L-glutaminase producing bacteria and enzyme production by submerged fermentation

Maryam Ranjbar-Mobarake[1], Mohsen Mobini-Dehkordi[2], Ali Asghar Rastegary[3]

[1] M.Sc., Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: L-glutaminase is widely used in pharmaceutical and food industries, such as treatment of leukemia. This study aimed to isolate and identify native L-glutaminase producing bacteria in Iran and to study its quantitative activity in submerged fermentation.

Material and Methods: The L-glutaminase producer bacteria were isolated from soil and water samples of Zayandehrod and Karoon Rivers and also from the sediments of fishing pools. The isolates were screened using minimal glutamine agar (MGA) medium for producing L-glutaminase enzyme. The samples were grown in a submerged fermentation system using mineral salt glutamine (MSG) medium, and the produced enzyme was assayed quantitatively. The best glutaminase producer bacterium was identified by the gram-staining and biochemical tests.

Results: In this study, 11 glutaminase producer strains were isolated. *Bacillus subtilis* CH_3-GLU strain showed maximum enzyme productivity 37.91±0.62 U/ml at temperature 45° C after 96 hours.

Conclusion: Based on this study, *Bacillus subtilis* CH_3-GLU showed the highest rate of glutaminase production.

Keywords: L-glutaminase, Iranian native bacteria, *Bacillus*

Archive of SID

Correspondence to: Maryam Ranjbar-Mobarake
E-mail: mmaryamr129@yahoo.com
Tel: +983123120134
Journal of Microbial World, 2012, 4(3&4): 67-76

www.SID.ir