فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی۹، جلد ۳، شماره ۲، بهار ۸۹، صفحه ۲۷ تا صفحه۳۵

غربال‌گری بیولوژیک و شناسایی اشریشیا کولی مولد آنزیم پنی سیلین G آسیلاز و بهینه سازی شرایط تولید آنزیم

هادی عظیمی[۱]، صفر فرج نیا[۲]، رضا مودب[۳]، نازلی سعیدی[۴]، هادی فیضی[۱]

۱- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان.
۲- استادیارمرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. Farajnia@yahoo.com
۳- استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
۴- استادیارمرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۳

چکیده

پنی سیلین G آسیلاز *E. coli* از پر مصرف ترین آنزیم‌ها در صنعت داروسازی می باشد. این آنزیم جهت هیدرولیز پنی سیلینG به ٦-APA که یک حدواسط مهم در تولید پنی سیلین‌های نیمه سنتزی بوده، استفاده می‌شود. به دلیل اهمیت این آنزیم، تلاش‌های فراوانی جهت یافتن سویه‌هایی با بازده بالای آنزیم انجام گرفته شده است. هدف از این بررسی غربال نمونه‌های بالینی برای شناسایی سویه‌های *E. coli* مولد آنزیم پنی سیلین آسیلاز و بهینه سازی تولید می‌باشد. باکتری‌های *E. coli* جداسازی شده از نمونه‌های بالینی برای دارا بودن فعالیت پنی سیلین آسیلازی با روش bioassay غربال شدند. این روش براساس استفاده از سراشیا مارسنس پایه گذاری شده که حساس به ٦-APA و مقاوم به پنی سیلین است. پس از شناسایی سویه مولد آنزیم، اثر زمان، دما، غلظت فنیل استیک اسید وpH محیط کشت بر میزان تولید آنزیم بررسی و جهت سنجش کمی‌فعالیت آنزیمی‌از روش کلریمتریک استفاده شد.از میان ۱۲۱ ایزوله مورد بررسی، تنها سه ایزوله فعالیت پنی سیلین G آسیلازی داشته و فعالیت یکی از آن‌ها قوی تر بود. برای سویه انتخاب شده فعالیت بهینه درحضور ۰/۱٪ فنیل استیک اسید، pH مابین ۷-۸، زمان انکوباسیون ٤٨ ساعت و دمای ۳۲ درجه سانتی گراد بدست آمد. نتایج بررسی حاضر نشان داد که روش بیولوژیکی یک روش سریع و کار آمد برای شناسایی باکتری‌های مولد پنی سیلین G آسیلاز بوده و می‌تواند برای جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم فوق مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه: پنی سیلین G آسیلاز، *E. coli*، غربال بیولوژیک، بهینه سازی.

مقدمه

پنی سیلین‌ها از جمله مهم‌ترین آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام مورد استفاده در درمان عفونت‌های میکروبی بوده وکاربرد وسیع آن‌ها موجب پیدایش مقاومت نسبت به آن‌ها شده است. جهت غلبه بر این نوع مقاومت امروزه تولید آنتی بیوتیک‌های نیمه سنتزی رایج گردیده و بالغ بر ۲۰ نوع پنی سیلین نیمه سنتزی به صورت تجاری تولید می‌شوند که آموکسی سیلین، آمپی سیلین، سفالکسین، سفازولین از جمله آن‌ها می‌باشند (۱۳).مشتقات نیمه سنتزی پنی سیلین علاوه بر داشتن خصوصیاتی هم چون پایداری بیشتر، جذب سریع تر و طیف اثر وسیع تر نسبت به پنی سیلین‌های G و V، مشکل مقاومت باکتریایی را نیز در بسیاری از موارد حل کرده اند(۲۲). در فرایند تولید پنی سیلین‌های نیمه سنتزی، پنی سیلین با یکی از دو روش شیمیایی یا آنزیمی‌پنی سیلین به ۶- آمینوپنیسیلانیک

www.SID.ir

اسید (APA-۶) شکسته می‌شود، که این ماده حد واسط برای ساخت مشتقات دیگر، با روش شیمیایی مجدداً حلقوی می‌گردد(۲). از مزایای تبدیل آنزیمی‌پنی سیلین به APA-۶ می‌توان به انباشته شدن کمتر مواد شیمیایی مضر در محیط، کارایی و سرعت بالاتر، امکان بازیابی و استفاده مجدد از آنزیم و هزینه پائین تر اشاره نمود. در روش آنزیمی‌تبدیل پنی سیلین به APA-۶ از پنی سیلین آسیلازها استفاده می‌شود . پنی سیلین G آسیلاز یک آنزیم مهم از نظر تجاری در صنعت داروسازی است که با هیدرولیز باند آمیدی در زنجیره جانبی پنی سیلین G موجب تولید فنیل استیک اسید و APA-۶ می گردد.

APA-۶ پیش ساز اصلی در تولید پنی سیلین‌های نیمه سنتزی مانند آمپی سیلین و آموکسی سیلین می‌باشد(۱،۹،۱۰،۱۲). فعالیت پنی سیلین G آسیلازی در ارگانیسم‌های متعددی ازجمله باکتری‌های گرم منفی و مثبت، قارچ‌های رشته ای و مخمرها گزارش شده است. بیشترین بررسی‌ها بر روی آنزیم حاصل از اشریشیا کولی و باسیلوس مگاتریوم انجام گرفته و تولید این آنزیم توسط گونه‌های وحشی و نوترکیب باکتری اشریشیا کولی توسط بسیاری ازپژوهش گران بررسی شده است(۳،۱۸،۱۹،۲۰). آنزیم پنی سیلین G آسیلاز بالغ و فعال در *E. coli* یک هترودایمر ۸۶ کیلودالتونی متشکل از دو زنجیره آلفا (α) و بتا (β) است که در کنار هم پیچیده شده و توسط نیروهای غیر کوالان به هم متصل می شوند. بیان آنزیم قابل القا بوده و تولید در نژادهای وحشی، با افزودن فنیل استیک اسید آغاز و آنزیم به فضای پری پلاسمی‌ترشح می‌شود(۵،۶،۷،۱۱،۱۴).

امروزه پیشرفت‌های روزافزون بیوتکنولوژی و روش‌های مبتنی بر آن هم چون توسعه روش‌های جدید غربال گری برای میکروارگانیسم‌های تولید کننده، روش‌های تثبیت آنزیم و بهینه سازی پارامترهای اصلی فرمانتاسیون و دستکاری ویژگی‌های ژنتیکی و ژن‌های کدکننده پنی سیلین G آسیلاز می تواند کمک شایانی در تولید بهتر و بیشتر آنزیم به صنعت داروسازی بکنند .هدف از این بررسی غربال گری و شناسایی باکتری تولید کننده آنزیم از نمونه‌های کلینیکی و بهینه سازی شرایط کشت در جهت تولید بالاتر آنزیم است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد آزمایش

در تحقیق حاضر ایزوله‌های اشریشیا کولی از نمونه‌های کلینیکی اخذ شده از بیماران مشکوک به عفونت‌های ادراری، جدا سازی و نمونه‌های مشکوک با جلای فلزی در محیط EMB آگار انتخاب و توسط روش‌های میکروبیولوژیکی معمول نظیر تست‌های IMVIC مورد شناسایی وپس ازآن جهت شناسایی سویه‌های تولید کننده آنزیم پنی سیلین G آسیلاز مورد بررسی قرار گرفتند. هم چنین جهت انجام Bioassay از باکتری سراشیا مارسنس حساس به APA-۶ و مقاوم به پنی‌سیلین استفاده شد .

غربال استرین‌های تولید کننده آنزیم با روش Bioassay

جهت غربال گری ایزوله‌های *E. coli* برای شناسایی سویه‌های تولید کننده آنزیم پنی سیلین آسیلاز از روش bioassay توصیف شده Meevootisom و همکارانش، استفاده شد(۱۷). بدین ترتیب که ابتدا یک کلنی منفرد از هر پلیت در محیط کشت نوترینت آگار حاوی فنیل استیک اسید به چند قسمت مساوی تقسیم و به صورت نقطه‌ای با کمک آنس استریل تلقیح گردید . سپس پلیت‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند . در مرحله بعد مقدار ۰/۵ میلی لیتر از نوترینت آگار نیمه جامد که حاوی پنی سیلین G، پتاسیم با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود روی پلیت‌ها به طور یکنواخت اضافه و پس از گذشت چند دقیقه و سفت شدن آگار مقدار ۰/۵ میلی لیتر از کشت ۱۸ ساعته ازباکتری سراشیا مارسنس حساس به APA-۶ در LB مایع روی سطح سفت شده آگار پخش گردید. سپس پلیت‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه و بررسی شدند. جهت روشن شدن این موضوع که‌هاله عدم رشد سراشیا مربوط به ممانعت مواد دیگری غیر از

Archive of SID

www.SID.ir

APA-۶ نیست دو آزمایش تکمیلی زیر انجام گرفت:

تست تاییدی طبق Meevootisom و همکاران که در این تست بر روی پلیت حاوی باکتری مولد آنزیم محیط نوترینت آگار فاقد پنی سیلین اضافه شد تا اگر سراشیا در حضور پنی سیلین رشد نماید صحت انجام تست مشخص گردد(۱۷).

تست حساسیت سویه *E. coli* و سراشیا نسبت به پنی سیلین G که برای این کار تست آنتی بیوگرام معمولی با روش انتشار در دیسک انجام و با استفاده از محیط مولرهینتون آگار و دیسک‌های تجاری پنی سیلین G و استاندارد نیم مک فارلند عدم حساسیت سویه سراشیا نسبت به پنی سیلین تائیدگردید .

شرایط محیط کشت مایع جهت تولید آنزیم توسط *E. coli*

جهت تحریک تولید آنزیم درسویه‌های غربالی ابتدا باکتری‌ها را به محیط پیش کشت که شامل محیط LB مایع بود منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. سپس مقداری از باکتری‌ها به محیط کشت مایع تولید آنزیم شامل پپتون باکتریولوژیک(۵٪)، عصاره گوشت(۳٪) و فنیل استیک اسید(۰/۱۵٪) تلقیح شدند. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور shaker دار در دور ۱۵۰ rpm انکوبه و پس از آن میزان فعالیت آنزیمی‌سویه‌ها سنجیده شد.

سنجش کمی‌میزان تولید آنزیم

اساس این روش بر واکنش‌معرف PDAB با APA-۶ استوار می‌باشد. محصول واکنش PDAB باAPA-۶ محلول زرد رنگی است که در طول موج ۴۱۵ نانومتر دارای بالاترین جذب نوری بوده و میزان جذب نوری با مقدارAPA-۶ موجود در محلول رابطه مستقیم دارد. با قرائت OD های بدست آمده از اسپکتروفوتومتری می توان میزانAPA-۶ موجود در محلول را تخمین زد. برای این کار ابتدا مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع که حاوی باکتری *E. coli* مورد نظر بوده به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ و سپس رسوب حاصل در ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات حل و با ۰/۵ میلی لیتر از محلول پنی سیلین G پتاسیم ۰/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر به مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردیده و سپس به ترتیب ۱ میلی لیتر سود ۰/۰۵٪ و ۲ میلی لیتر استیک اسید ۲۰٪ به محلول اضافه و محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در مرحله آخر مایع رویی به لوله جدید منتقل و به آن مقداری از محلول PDAB ۰/۵٪ اضافه و به فاصله زمانی کوتاهی جذب نوری (OD) محلول در طول موج۴۱۵ نانومتر قرائت شد (۱۶) .

بهینه سازی شرایط تولید آنزیم

در مرحله بهینه سازی یکی از سویه‌ها که داری فعالیت آنزیمی‌بیشتری بود انتخاب و اثر شرایط مختلف بر مقدار تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی تاثیر زمان کشت باکتری

در این مرحله ابتدا باکتری مورد نظر را در چهار لوله مختلف کشت داده و محیط‌ها به ترتیب ۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور shaker دار در دور ۱۵۰ rpm انکوبه و پس از طی مدت زمان‌های تعیین شده میزان تولید آنزیم با روش کلریمتریک بررسی شد.

بررسی تاثیر دماهای مختلف انکوباسیون

در این آزمایش ابتدا باکتری مورد نظر در چهار لوله جداگانه تلقیح و محیط‌ها به ترتیب در دماهای ۲۸، ۳۰، ۳۲ و ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور shaker دار با دور ۱۵۰ rpm انکوبه شده و در مرحله آخر توسط روش کلریمتریک میزان تولید آنزیم بررسی شد.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف فنیل استیک اسید

جهت انجام این آزمایش باکتری مورد نظر درشش لوله آزمایش جداگانه که حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵ گرم از فنیل استیک اسید در محیط تولید بودند تلقیح گردیده و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در ۲۸ درجه میزان تولید آنزیم با روش کلریمتریک بررسی شد.

بررسی اثر pH محیط کشت بر میزان تولید آنزیم

جهت انجام این آزمایش پنج محیط جداگانه مایع

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه و pH محیط‌ها قبل از استریلیزاسیون به ترتیب روی ۵،۶، ۷، ۸، ۹ pH تنظیم شدند. بعد از تلقیح باکتری‌ها و انکوباسیون به مدت زمان تعیین شده میزان تولید آنزیم با روش کلریمتریک بررسی گردید.

نتایج

غربال و شناسایی سویه‌های تولید کننده آنزیم پنی سیلین G آسیلاز با روش Bioassay

روش Bioassay یک روش میکروبیولوژیکی و کیفی است که اساس آن حساسیت سویه سراشیا مارسنس مورد نظر به 6-APA و مقاومت آن به پنی سیلین می‌باشد. در صورت تولید آنزیم پنی سیلین آسیلاز توسط سویه‌های اشرشیا کولی مورد آزمایش و انتشار آن در محیط، آنزیم موجب شکستن پنی سیلین G موجود به 6-APA و فنیل استیک اسید شده و 6-APA باعث مهار رشد سراشیا مارسنس می‌گردد. از میان ۱۲۱ نمونه اشرشیا کولی مورد آزمایش تنها درمورد ۳ ایزوله هاله عدم رشد سراشیا مشاهده شد .این عدم رشد به صورت هاله کاملاً مشخصی بر روی کلنی‌های اشریشیا کولی و در میان پیگمان صورتی سراشیا که در نواحی رشد به طور یکنواختی منتشر شده بود نمایان گردید (شکل ۱).

سنجش کمی‌میزان تولید آنزیم

مقادیر به دست آمده از سه سویه غربال شده برابر ۱/۳۰، ۰/۲۲ و ۰/۱۴ بود که نمونه ی دارای جذب بالاتر جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش‌های بهینه سازی انتخاب شد .

بررسی تاثیر زمان کشت باکتری: بررسی اثر زمان بر مقدار تولید آنزیم نشان داد که فعالیت آنزیمی‌سویه مورد نظر در ۴۸ ساعت انکوباسیون بیشترین مقدار بوده واین فعالیت از ۱۸ ساعت پس از انکوباسیون به تدریج افزایش و در ۴۸ ساعت به بیشترین مقدار خود می‌رسد، اما پس از آن به شدت رو به کاهش می‌گذارد(نمودار۱).

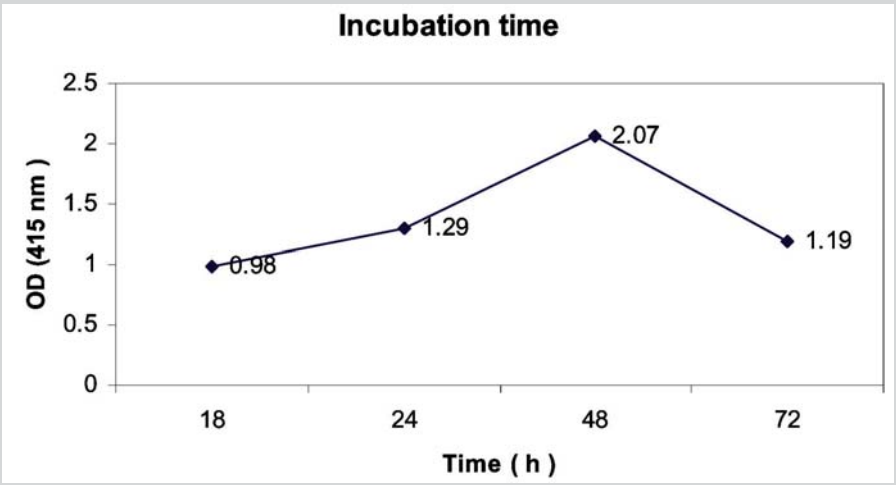
بررسی تاثیر دماهای مختلف انکوباسیون: از نظر دمای بهینه کشت باکتری برای تولید آنزیم، نتایج بررسی حاضر نشان داد که هرچند دمای ۳۷ درجه سانتی گراد دمای بهینه جهت رشد باکتری است اما بیشترین تولید آنزیم در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد مشاهده شده و با تعیین دما از ۲۸ به ۳۲ این مقدار افزایش داشت. در دماهای بالاتر از ۳۲ درجه میزان تولید آنزیم به تدریج رو به کاهش گذاشته و در ۳۷ درجه سانتی گراد تولید آنزیم در سویه حدود یک چهارم میزان تولید در ۳۲ درجه سانتی گراد است .این نتایج پیشنهاد کننده این موضوع است که پروسه ی پروتئولیتیک یا بلوغ آنزیم یک پروسه ی حساس به دماهای بالاست.

بررسی اثرpH محیط کشت بر مقدار تولید آنزیم در سویه مورد بررسی نشان داد که pH مابین ۸-۷ بهترین pH برای تولید آنزیم بوده و در pHهای پائین تر و بالاتر هم میزان رشد باکتری و هم میزان تولید در سویه به صورت

شکل ۱- کشت نقطه‌ای از باکتری‌های غربال شده وهاله عدم رشد سراشیا مارسنس حساس به ٦- APA تولید شده

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار۱- منحنی تاثیر زمان‌های مختلف انکوباسیون بر مقدار تولید آنزیم

قابل توجهی کاهش می‌یابد(نمودار۲).

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فنیل استیک اسید

بررسی اثر غلظت‌های مختلف فنیل استیک اسید نشان داد که برای سویه مورد بررسی در این بررسی بیشترین میزان تولید در حضور ۱ گرم بر۱۰۰ میلی لیتر از فنیل استیک اسید رخ می‌دهد در حالی که درغلظت‌های بالاتر این ماده، از فعالیت آنزیمی‌ممانعت به عمل آمد(نمودار۳)

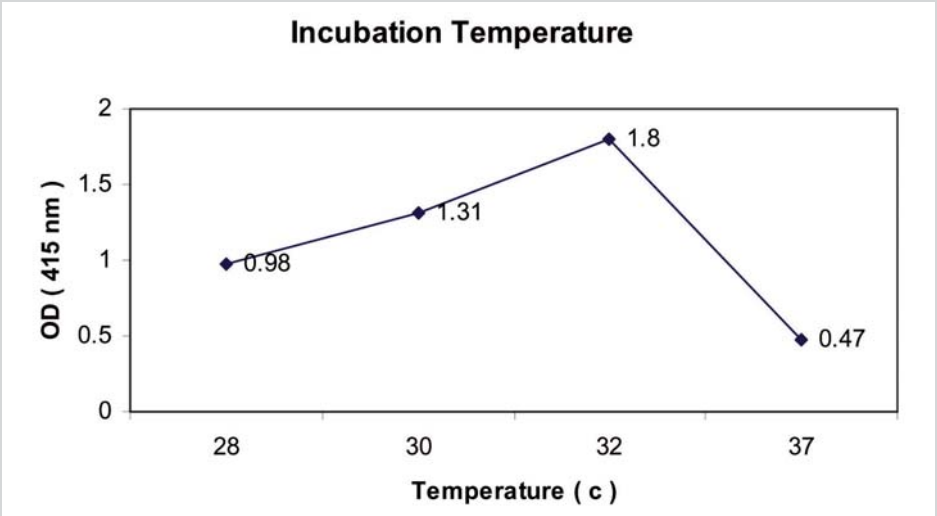
.

بررسی تاثیر pH محیط کشت

بررسی اثرpH محیط کشت بر مقدار تولید آنزیم در سویه مورد بررسی نشان داد که pH مابین ۷-۸ بهترین pH برای تولید آنزیم بوده و در pHهای پائین تر و بالاتر هم میزان رشد باکتری و هم میزان تولید در سویه به صورت قابل توجهی کاهش می‌یابد(نمودار۴).

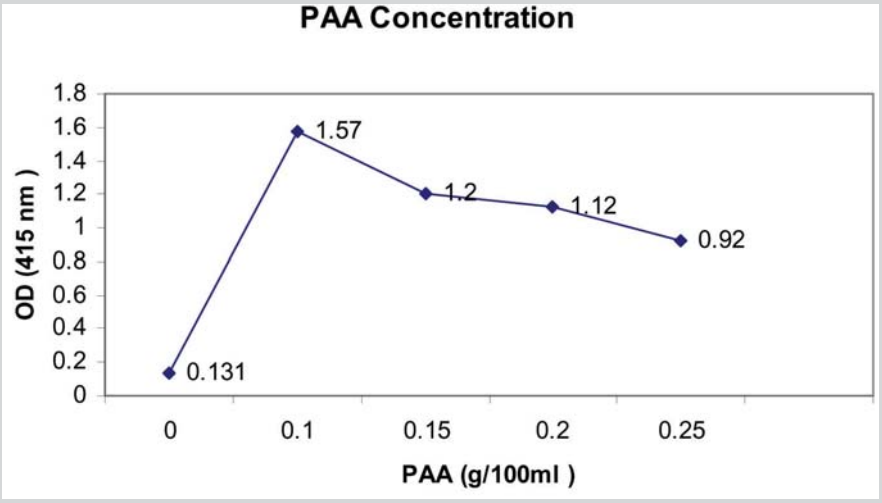
بحث و نتیجه گیری

از زمان اولین گزارش در مورد پنی سیلین G آسیلاز

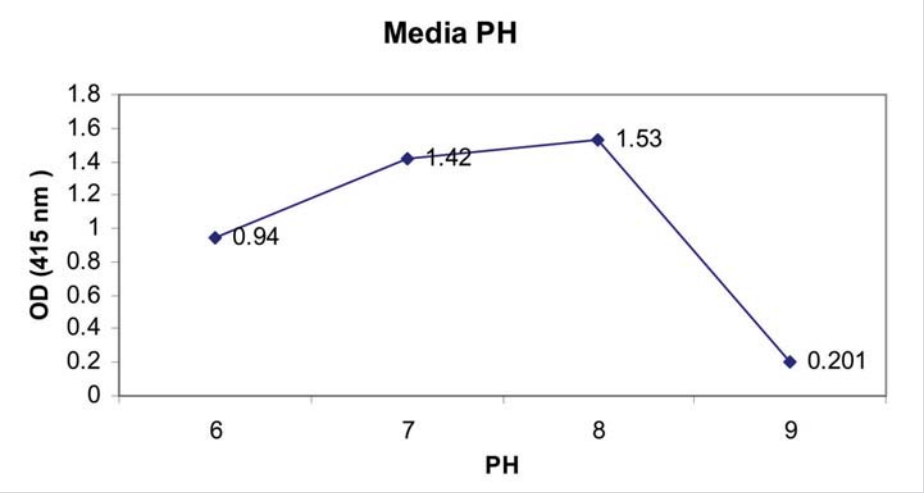


نمودار۲- منحنی تاثیر دماهای مختلف انکوباسیون در مقدار تولید آنزیم

www.SID.ir



نمودار۳- منحنی تاثیر غلظت‌های مختلف فنیل استیک اسید در مقدار تولید آنزیم



نمودار٤- منحنی تاثیر PHهای مختلف محیط در مقدار تولید آنزیم

توسط Szentirmai در سال ۱۹۶۳ در پنی سیلیوم کریزوژنوم (۲۱) این آنزیم یکی از مهم‌ترین کاتالیست‌ها در صنعت تولید آنتی بیوتیک‌ها بوده ومحققین متعددی به طور مستقل هیدرولیز پنی سیلین‌های مختلف را توسط پنی سیلین G آسیلاز حاصل از میکروارگانیزم‌های مختلف شرح داده اند . در سال‌های اخیر پژوهش‌های فراوانی در مورد غربال گری و بهینه سازی سویه‌های تولید کننده این آنزیم صورت گرفته که هدف آن‌ها یافتن سویه‌هایی با بازده بالاتر و بهبود شرایط تولید در مقیاس صنعتی بوده است.

بررسی حاضر نیز با هدف شناسایی و جداسازی سویه‌های مولد آنزیم پنی سیلین G آسیلاز انجام و به روش Bioassay با استفاده از باکتری سراشیا مارسنس جهت غربال‌گری اولیه استفاده شد. از مجموع ۱۲۱ سویه *E. coli* مورد بررسی ۳ سویه مولد آنزیم شناسایی گردید. روش‌های مختلفی برای غربال و شناسائی سویه‌های مولد پنی‌سیلین G آسیلاز به کار گرفته شده است. در سال ۱۹۸۳ Meevootisom و همکارانش با بررسی روش‌های مختلف غربال گری چندین روش ساده وسریع به ویژه روش Bioassay را پیشنهاد کردند. آن‌ها از میان

www.SID.ir

۴۱۱ ایزوله اشریشیا کلی و ۹۷۶ ایزوله باسیلوس به ترتیب ۲۰ و ۵ ایزوله با فعالیت پنی سیلین آسیلازی را شناسایی کردند(۱۷) . در سال ۱۹۹۱، Amahmood و همکارانش در بررسی بر روی تولید پنی سیلین آمیدوهیدرولاز توسط ایزوله‌های باکتریایی بومی جداسازی شده، از میان ۲۵۰ ایزوله چهار سویه را به عنوان تولید کننده این آنزیم را شناسایی کردند(۱۵). در سال ۲۰۰۲ جوادپور و همکارانش به جدا سازی باکتری اشریشیا کولی تولید کننده آنزیم پنی سیلین G آسیلاز و بررسی ویژگی‌های کینتیکی فعالیت آنزیمی سلول پرداختند. آن‌ها در تحقیق خود حدود ۶۵ استرین از این باکتری که از نمونه‌های کلینیکی تهیه شده بود را بررسی کردند و در این ۶۵ نمونه تنها به یک نمونه مثبت برخورد نمودند. نتایج بررسی حاضر با بررسی‌های فوق سازگاری داشته ونشان می‌دهد که روش Bioassay یک روش غربالی کارآمد برای شناسایی سویه‌های پنی سیلین آسیلاز می‌باشد. پس از شناسایی سویه مولد پنی سیلین آسیلاز جهت افزایش میزان تولید آنزیم از بهینه سازی شرایط کشت استفاده گردیده و اثر زمان، دما و غلظت القاگر فنیل استیک اسید به عنوان پارامترهای اصلی موثر در مقدارتولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌های قبلی در مورد آنزیم پنی سیلین G آسیلاز نشان داده اند که تولید این آنزیم به ویژه در *E. coli* القا پذیر بوده و فنیل استیک اسید به عنوان القاگر تولید آنزیم شناخته شده است(۱۶). در سال ۱۹۸۳ Meevootisom و Somsuk به جداسازی استرین‌های اشریشیا کولی محلی (بومی) با فعالیت پنی سیلین G آسیلازی بالا دست زدند، نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که تولید آنزیم نیازمند حضور حداکثر غلظت ۰/۰۶۴٪ از فنیل استیک اسید در محیط کشت مایع است و در غلظت‌های بالاتر از ۰/۱۵٪ تولید آنزیم و رشد سلولی متوقف می شود هم چنین تولید آنزیم متأثر از دما می باشد. تولید تنها در طول رشد و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انجام می گیرد و در ۳۷ تولیدی صورت نمی گیرد(۱۶).

در سال ۲۰۰۰، Arshad و همکاران در بررسی کینتیک رشد و تولید پنی سیلین G آسیلاز حاصل از باکتری اشریشیا کولی، نشان دادند که تولید بهینه آنزیم پس از ۱۸ ساعت انجام گرفت. هم چنین مشخص شد بیشترین تولید در غلظت‌هایی مابین ۱ تا ۲ گرم در لیتر فنیل استیک اسید انجام می‌شود(۴). نتایج محمود و همکارانش در تحقیقی مشابه بر روی بهینه سازی محیط جهت تولید آنزیم در باسیلوس نشان داد که فعالیت بهینه در سویه غربال شده در ۱۶ ساعت، در pH برابر ۷، در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و در حضور فنیل استیک اسید ۲ گرم بر لیتر از حاصل شد(۱۵). در سال ۲۰۰۲ نتایج جوادپور و همکارانش بر روی جدا سازی باکتری اشریشیا کولی تولید کننده آنزیم پنی سیلین G آسیلاز و بررسی ویژگی‌های کینتیکی فعالیت آنزیمی سلول نشان داد که pH و دمای بهینه برای فعالیت پنی سیلین آسیلاز در نمونه مورد آزمایش به ترتیب ۸ و ۵۷ درجه سانتی گراد است(۱۲). Enshasy و همکارانش بر روی پروسه بهینه‌سازی و افزایش تولید پنی سیلینG آسیلاز توسط استرین استاندارد اشریشیا کلی ATCC ۱۱۱۰۵ کار کردند. در میان محیط‌های مختلف استفاده شده محیط متشکل از ترپیتون، عصاره مخمر، سدیم کلراید و گلوکز بیشترین حجم آنزیم را پس از ۲۴ ساعت حاصل کرد (۸).

مقایسه نتایج به دست آمده در بررسی‌های بهینه سازی تحقیق حاضر با نتایج بررسی‌های دیگران نشان می‌دهد که این نتایج با برخی بررسی‌ها سازگاری و با برخی بررسی‌های دیگر تفاوت دارد. به نظر می‌رسد دلیل چنین تفاوتی به تفاوت‌های سویه مورد بررسی مربوط بوده و ویژگی‌های رشد و تولید آنزیم، صفاتی ویژه و اختصاصی سویه و از سویه‌ای به سویه دیگر متفاوت می‌باشد و لازم است برای هر سویه شرایط بهینه شناسایی گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Anuj, K., Chandel, L., Venkateswar, R., Lakshmi Narasu, M., Singh, Om. V. (2008). The realm of penicillin G acylase in B-lactam antibiotics. Enzyme and Microbial Technology, 42,199–207.

2. Anupama, P., Kumar, H., Marwaha, S.S., Kennedy, J.F. (2000). Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA) . Biotechnology Advances, 18, 289–301.

3. Arroyo, M., de IM, I., Acebal, C., Pilar, C.M. (2003). Biotechnological application of penicillin acylase. State-of-the-art.Appl Biotechnol, 60,507-514.

4. Arshad, R., Ahmad, M.S. (2000). Kinetic study of growth and penicillin G acylase production by *Escherichia coli*. Pakistan Journal Of Biological Sciences, 3(5),862-865.

5. Brannigan, J.A. (2000). Structural studies of penicillin acylase 313 . Applied Biochemistry and Biotechnology, 88,2273-2289.

6. Choi, K.S., Kim, J.A., Kang, H.S. (1992). Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 . Journal of Bacteriology,174(19), 6270-6276 .

7. Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S., Sudhakaran, V.K., Shewale, j.G. (1994). Molecular biology of b-lactam acylases.World J.Microbial. Biotechnol, 10,129-138.

8. Enshasy, H.A. (2009). Optimization and scaling up of penicillin acylase production process by *Escherichia coli*.World Applied Sciences Journal, 6(10),1348-1358.

9. Hamilton-Miller, J.M.T. (1966). Penicillinacylase.Bacteriological Reviews American Society for Microbiology, 30(4).

10. Hamilton-Miller, J. M.T. (2008). Development of the semi-synthetic Penicillins and Cephalosporins.International Journal of Antimicrobial Agents, 31, 189–192.

11. Hesham, A., Enshasy, M.S., Mohy, D., Sayed, M., Bakry, M. (2009). Optimization and scaling up of penicillin acylase production process by *Escherichia coli*. World Applied Sciences Journal, 6 (10), 1348-1358.

12. Javadpur, S., Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Nrdamadi, S., Farahmand, B. (2002). Isolation of penicillin acylase producing *E.coli* and kinetics characterization of the Whole cell enzyme activity .Iranian Biomedical Journal, 6, 93-96.

13. Jeyaprakash, R., Paramasamy, G. (2004). Recent biotechnological interventions for developing improved Penicillin G acylase.Journal of Bioscience and Bioengeeniering, 97(1),1-13.

14. Kheirolomoom, A., Kazemi-Vaysari, A., Ardjmand, M., Doosty, H. (2001). Optimization of penicillin G acylase production . Scientia IraniCa, 8 (3), 159-165.

15. Mahmood, Z.A., Shaikh, D., Zoha, S.M.S. (1991). Penicillin amidohydrolase productivity of locally isolated bacterial species . Folia Microbial,36(5),444-446.

16. Meevootisom, V., Somsuk, P. (1983). Penicillin acylase of *Escherichia coli*. J.SCI.SOC. Thailand, 9,143-152.

17. Meevootisom, V., Somsuk, I.P., Prachaktam, R., Flegel, T.W. (1983). Simple screening method for isolation of penicillin acylase-producingbacteria.Applied and Environmental Microbiology, 46(5), 1227-1229 .

18. Perry, C.C., Kuo, B.Y., Lin, W.J. (1991). Optimization of the Host/Vector system and cukture condition for production of penicillin acylase in *Escherichia coli* .Journal of Bioscience and Bioengineering, 88(2),160-167.

19. Simon, A.W.J., Peter, A.J., Janssen, D.B.

Archive of SID

www.SID.ir

(2007). Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of b-lactam antibiotics . Enzyme and Microbial Technology, 40,1335-1344.

20. Sudhakaran, V.K., Borkar, P.S. (1985). Microbial transformation of beta-lactam antibiotics: enzyme from bacteria, sources and study-asum up. Hindustan Antibiot Bull, 27,63-119.

21. Szentirmai, A. (1963). Production of penicillin acylase .APPLIED MICROBIOLOGY, 12(3),185-187:

22. Valle, f., Balbas, P., Merino, E., Bolivar, F. (1991). The role of Penicillin amidase in nature and in industry. Trends Biochem. Sci, 16, 36-40.

Archive of SID

www.SID.ir