Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):483-489

A Study on the Potential of Uricase Production by Halophilic Bacteria and Enzyme Production Optimization

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Shirazian P.[1] *PhD,*
Ghasemi A.[1] *PhD,*
Asad S.*[1] *PhD,*
Amoozegar M.A.[2] *PhD*

How to cite this article
Shirazian P, Ghasemi A, Asad S, Amoozegar M.A. A Study on the Potential of Uricase Production by Halophilic Bacteria and Enzyme Production Optimization. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3)-:483-489.

[1]Biotechnology Department, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
[2]Microbiology Department, Biology Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

**Correspondence*
Address: Biotechnology Department, No.13, Shafiee Alley, Ghods Street, Enghelab Avenue, Tehran, Iran. Postal Code: 1417614411
Phone: +98 (21) 66491622
Fax: +98 (21) 66491622
asad@ut.ac.ir

Article History
Received: August 3, 2017
Accepted: December 7, 2017
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Uricase (EC 1.7.3.3) was first utilized in the 1970s, to prevent the uric acid increase in the blood stream and the formation of urate crystals. Later, this enzyme was produced using recombinant DNA technology. However, immunogenic responses towards the alien protein in some patients has led to searching for new uricases with more desirable properties. Considering the interesting characteristics of enzymes of halophilic and halotolerant bacteria, the potential of 85 native Iranian halophilic bacteria isolated from Urmia salt lake for uricase production was evaluated, and the best producer was identified by means of 16S rRNA gene sequencing with more than 99% similarity to Halomonas sulfidaeris. In the following, significant physicochemical and environmental factors for optimal production of uricase by the selected strain were determined. The best combination of effective factors for the enzyme production was identified by Response Surface Methodology (RSM). The optimum enzyme production was found to be at pH=8, 34.5°C, 3% NaCl, and 7.5g/L of uric acid which resulted in the significant production of 32.5U/ml. This strain can be used in subsequent studies regarding the therapeutic application of this halotolerant enzyme.

Keywords Therapeutic Enzymes; Halophilic Bacteria; Uricase; Optimization

CITATION LINKS

[1] Complexed and ligand-free high-resolution ... [2] Urate oxidase from Aspergillus flavus: new crystal-packing ... [3] Polymorphism of microcrystalline urate oxidase from ... [4] Diagnosis and management of gout: a ... [5] Recent developments in our understanding ... [6] Prevalence of hyperuricemia and relation of serum ... [7] Rasburicase in the management of tumor lysis: an evidence-based ... [8] Pitfalls, prevention, and treatment of hyperuricemia during ... [9] Reduced-dose rasburicase (recombinant xanthine oxidase) in ... [10] Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia ... [11] Peg-modified ... [12] Rasburicase (Elitek): a novel agent for tumor lysis ... [13] Therapeutic perspectives on uricases for ... [14] Uricases as therapeutic agents to treat refractory gout: Current states and ... [15] Hemolytic anemia following rasburicase administration: a review ... [16] Risk of anaphylaxis with repeated courses of rasburicase: a research on adverse ... [17] Mucor hiemalis: a new source for uricase ... [18] Isolation, screening and production studies of uricase producing ... [19] Isolation, partial purification and characterization of thermophilic uricase from ... [20] Cloning and characterization of Halomonas elongata L-asparaginase, a promising ... [21] Screening for uricase enzyme from halotolerant bacteria. 15th International Congress of Microbiology ... [22] The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and ... [23] A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of urate oxidase activity and its kinetic ... [24] DNA, RNA, and protein extraction: the past and ... [25] Enhancement of a novel extracellular uricase production ... [26] Screening, production and optimization of uricase ... [27] Optimization of novel and greener approach for the ... [28] Improved production of Pseudomonas ... [29] Isolation and identification of uric acid degrading bacteria ... [30] studies on production, optimization and purification of uricase from Gliocladium ... [31] Isolation and optimization of Pseudomonas aeruginosa for ... [32] Isolation of a thermostable uricase-producing bacterium and study on its enzyme production ... [33] Antigen dose and strain variation as factors in the genetic control of the immune response to sperm whale ... [34] Dose-response effects in immunizations with keyhole limpet haemocyanin and rabies vaccine: shift in some immunodeficiency ... [35] Specificity of cellular immune ... [36] Industrial applications of microbial salt-tolerant enzymes: an annotated ... [37] Industrial and environmental applications of halophilic ... [38] Perspectives and application of halophilic ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی توانمندی تولید آنزیم یوریکاز توسط سویه‌های نمک‌دوست بومی ایران و بهینه‌سازی تولید آنزیم

پژمان شیرازیان PhD
گروه بیوتکنولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
علی قاسمی PhD
گروه بیوتکنولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
صدیقه اسد* PhD
گروه بیوتکنولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
محمدعلی آموزگار PhD
گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده
آنزیم یوریکاز (EC 1.7.3.3) در دهه ۱۹۷۰ برای اولین‌بار برای پیشگیری از افزایش غلظت اوریک‌اسید در خون و تشکیل بلورهای اورات استفاده شد. این آنزیم بعدها به‌صورت نوترکیب استفاده شد اما به‌علت واکنش ایمنی بیماران به این پروتئین بیگانه برای بدن، تلاش‌ها برای یافتن منابع جدیدی از این آنزیم با ویژگی‌های مطلوب‌تر ادامه دارد. با توجه به اهمیت باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک در تولید آنزیم‌هایی با ویژگی‌های منحصربه‌فرد، در این پروژه ۸۵ سویه از این باکتری‌ها که در مطالعات پیشین از دریاچه ارومیه جداسازی شده بودند، برای تولید آنزیم یوریکاز بررسی شدند و بهترین سویه تولیدکننده براساس توالی‌یابی ژن *16S rRNA* بیش از ۹۹% به *هالوموناس سولفیداریس* (*Halomonas sulfidaeris*) شباهت نشان داد. در ادامه با تغییر فاکتورهای محیطی و فیزیکوشیمیایی محیط کشت، مهم‌ترین عوامل موثر بر تولید یوریکاز توسط این باکتری شناسایی و با استفاده از روش بهینه‌سازی سطح پاسخ تولید آنزیم بهینه شد. در شرایط بهینه میزان تولید آنزیم در pH=۸، دمای ۳۴/۵°C، غلظت کلریدسدیم ۳% و غلظت اوریک‌اسید ۷/۵گرم بر لیتر به ۳۲/۵واحد بر میلی‌لیتر افزایش یافت که در مقایسه با گزارشات موجود، مقدار قابل توجهی است. این سویه می‌تواند در تحقیقات بعدی در مورد کاربردهای درمانی آنزیم مقاوم به نمک آن مورد استفاده قرار بگیرد.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های دارویی، باکتری نمک‌دوست، یوریکاز، بهینه‌سازی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۶
*نویسنده مسئول: asad@ut.ac.ir

مقدمه

آنزیم یوریکاز (EC 1.7.3.3) که با نام‌های اورات‌اکسیداز، اسیداوریک‌اکسیداز و اورات اکسیژن اکسیدوردوکتاز نیز شناخته می‌شود به‌طور طبیعی در بدن وجود دارد و در مسیر متابولیکی پورین‌ها فعال است[1]. این آنزیم با وزن مولکولی ۱۳۵کیلودالتون متشکل از چهار زیر واحد یکسان با وزن مولکولی ۳۴کیلودالتون است[2]. این آنزیم در حضور اکسیژن، اوریک‌اسید را اکسیده کرده و به آلانتوئین و آب‌اکسیژنه تبدیل می‌کند[3]. آلانتوئین دارای حلالیت بیشتری نسبت به اوریک‌اسید بوده و در نتیجه به‌راحتی از بدن دفع می‌شود[4]. حال آن که اوریک‌اسید که یک اسید ضعیف است (pKa برابر با ۵/۸)، در بدن به‌صورت یون اورات وجود دارد که در صورت افزایش غلظت ممکن است به‌صورت بلور در بافت‌ها رسوب کند[5, 6].

در میان درمان‌های موجود، درمان‌های آنزیمی مناسب‌ترین گزینه به نظر می‌رسند. یوریکاز به‌دلیل تبدیل اوریک‌اسید به آلانتوئین که در مایعات زیستی به غلظت اشباع نمی‌رسد و در نتیجه به فرم کریستالی در نمی‌آید، کاربرد درمانی دارد. این دارو فواید بسیاری از قبیل کاهش شدید غلظت اوریک‌اسید خون طی زمان ۲۴ساعت و محافظت بهتر از کلیه‌ها در مقابل سنگ‌سازی نسبت به سایر داروها را دارد[7-9].

در ابتدا یوریکاز دارویی را از عصاره کشت *آسپرژیلوس فلاووس* استخراج می‌کردند. این دارو تحت نام یوریکوزایم به فرم تزریقی تولید می‌شد. این دارو علاوه بر تولید کم در میزبان وحشی، مشکلاتی نیز به همراه داشت[10]. فیزیولوژی و ژنوم این قارچ ساده نیست و بنابراین امکان تولید سویه‌ای از این قارچ که به‌طور مداوم مقدار قابل توجهی از این آنزیم را تولید کند، امکان‌پذیر نیست. همچنین این قارچ تولیدکننده آفلاتوکسین‌ها است که جداسازی آنها مشکل بوده و محصول نهایی باید از نظر وجود این سموم بررسی شود[11]. امروزه این دارو به‌صورت نوترکیب در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* به فرم مونومر با وزن مولکولی ۳۴کیلودالتون توسط شرکت فرانسوی سانوفی اونتیس تولید می‌شود[12]. همچنین فرم پگیله‌شده یک آنزیم یوریکاز (پگلوتیکاز) دیگر که آن نیز از منشا یوکاریوتی (حیوانی) است در سال ۲۰۱۰ توسط شرکت ساوینت تاییده سازمان غذا و داروی ایالات متحده را دریافت کرده است[13, 14].

اما آنزیم‌های تجاری موجود مشکلاتی از جمله شوک آنافیلاکسیس و کم‌خونی همولیتیک دارند که هر دوی این موارد از ایمونوژن‌بودن پروتئین بیگانه تزریقی برای بدن ناشی می‌شود[15, 16]. هر چند پگیله‌کردن توانسته از میزان واکنش ایمنی‌زایی آنزیم بکاهد اما این پروسه سبب کاهش فعالیت پروتئین شده است[14]، در نتیجه تحقیقات برای یافتن یوریکازهایی از منابع جدید ادامه دارد[17-19]. آنزیم‌های نمک‌دوست برای کاربرد درمانی می‌توانند گزینه مناسبی باشند چون فعالیت در محیط خون انسانی نیازمند تحمل شرایط اسمزی خون (معادل ۰/۹% نمک) است. این میزان نمک می‌تواند جلوی فعالیت آنزیم‌هایی از منابع غیرنمک‌دوست را بگیرد که در نتیجه به‌کارگیری گونه‌های نمک‌دوست مولد آنزیم‌های دارویی به‌نوبه خود می‌تواند به کاهش دوز مورد نیاز کمک کند. کاهش دوز مورد نیاز علاوه بر کاهش هزینه، در کاهش احتمال ایمنی‌زایی نیز موثر است. این در حالی است که گزارش‌هایی دال بر این که آنزیم‌های نمک‌دوست می‌توانند پایداری بهتری در خون از خود نشان بدهند و در نتیجه با کاهش دوز مورد نیاز امکان واکنش ایمنی را کمتر کنند، وجود دارد[20]. تا به امروز تنها یک گزارش در مورد تولید یوریکاز توسط باکتری نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک ارایه شده است[21]، بنابراین هدف از این پروژه بررسی توانمندی این گروه از باکتری‌ها برای تولید این آنزیم ارزشمند قرار گرفت. بدین‌منظور ۸۵ سویه نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک که پیش‌تر از

www.SID.ir

Archive of SID

دریاچه ارومیه جداسازی و خالص شده بودند برای تولید این آنزیم مورد مطالعه قرار گرفتند. بهترین سویه از لحاظ میزان تولید یوریکاز، انتخاب و با توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی شد. همچنین تولید آنزیم توسط سویه منتخب بهینه‌سازی شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک

در این تحقیق ۸۵ سویه باکتری نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک که قبلاً جداسازی و خالص شده بودند و می‌توانستند غلظت ۳% نمک را به‌طور نسبی تحمل کنند[22]، از نظر توانایی تولید آنزیم یوریکاز مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی سویه‌ها برای تولید آنزیم یوریکاز

سنجش تولید آنزیم یوریکاز ابتدا در محیط کشت جامد و سپس برای سویه‌های منتخب (سویه‌هایی که پس از رشد روی پلیت جامد، هاله شفاف در اطرافشان ایجاد شده بود) در محیط کشت مایع مجدد صورت پذیرفت تا فعالیت آنزیمی به‌صورت دقیق محاسبه شود. محیط کشت جامد M-9 تغییریافته برای سنجش تولید آنزیم یوریکاز با ترکیب زیر استفاده شد (مقادیر به‌ازای یک‌لیتر):
گلوکز: ۱۰گرم، سدیم‌هیدروژن‌فسفات ۲آبه: ۶گرم، پتاسیم‌دی‌هیدروژن فسفات: ۳گرم، سدیم‌کلرید: ۳۰گرم، منیزیم‌سولفات ۷آبه: ۰/۵گرم، کلسیم‌کلرید ۲آبه: ۰/۱۵گرم، اوریک‌اسید: ۵گرم و آگار: ۱۴گرم.
باکتری‌های تولیدکننده آنزیم یوریکاز با مصرف اوریک‌اسید سبب شفاف‌شدن محیط کشت اطراف کلنی باکتریایی می‌شوند. پس از رشد باکتری‌ها به‌مدت ۴۸ تا ۷۲ساعت در دمای ۳۷°C در محیط کشت، قطر هاله شفاف اطراف کلنی باکتری برای سویه‌های مثبت اندازه‌گیری شد. محیط مایع برای سنجش دقیق فعالیت آنزیمی مشابه محیط کشت فوق و تنها بدون افزودن آگار تهیه شد.

سنجش فعالیت آنزیم یوریکاز

برای سنجش فعالیت آنزیمی باکتری‌ها، از محلول رویی پس از سانتریفوژ محیط کشت (۷۲ساعت کشت در دمای ۳۷°C) استفاده شد. به مقدار ۰/۲میلی‌لیتر از مایع رویی پس از سانتریفوژ، ۰/۱۵میلی‌لیتر بافر ۰/۱مولار سدیم‌بورات (میزان pH برابر با ۸/۵)، ۰/۱۵میلی‌لیتر محلول فنول ۱/۵%، ۰/۱۵میلی‌لیتر محلول ۴-آمینوآنتی‌پیرین (4-AAP) با غلظت ۶۰میلی‌مولار، ۰/۱۵میلی‌لیتر آنزیم پراکسیداز (HRP) با فعالیت ۲۰واحد بر میلی‌لیتر و ۲/۲میلی‌لیتر اسیداوریک با غلظت ۰/۱۲میلی‌مولار حل‌شده در بافر ۰/۱مولار سدیم‌بورات (میزان pH برابر با ۸/۵) با حجم نهایی ۳میلی‌لیتر مخلوط و در دمای ۳۷°C به‌مدت ۲۰دقیقه انکوبه شد. سپس تغییرات جذب در طول موج ۵۰۵۰نانومتر اندازه‌گیری شد. واحد فعالیت یوریکازی (U) به‌صورت تولید یک‌میکرومول آب‌اکسیژنه (H_2O_2) در دقیقه در دمای ۳۷°C تعریف می‌شود[23].

بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم‌ها

برای بهینه‌سازی تولید آنزیم، ابتدا عوامل تاثیرگذار بر بیان آنزیم توسط باکتری تعیین شدند. برای این منظور اثر فاکتورهای دما، pH، سرعت برهم‌زدن (هوادهی)، غلظت نمک (سدیم‌کلرید) و غلظت اوریک‌اسید بر میزان تولید آنزیم در محیط مایع مورد بررسی قرار گرفت. شرایط اولیه به‌صورت pH برابر ۷، غلظت نمک برابر ۳%، دمای رشد برابر ۳۷°C، غلظت اوریک‌اسید برابر ۵گرم بر لیتر بود. فاکتورهای دما، pH، غلظت نمک و غلظت اوریک‌اسید به‌عنوان فاکتورهای موثر برای بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ انتخاب شدند. برای بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ از نرم‌افزار Design Expert 9.0 استفاده شد. در این روش حد بالا و پایین برای هر یک از متغیرها تعیین می‌شود و سپس نرم‌افزار یک مجموعه از آزمایش‌ها را برای شرایط بهینه ارایه می‌کند. حد بالا و پایین متغیرها در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱) حد بالا و پایین برای هر یک از متغیرها در بهینه‌سازی تولید آنزیم یوریکاز به روش RSM

متغیر	حد پایین	حد بالا
دما (°C)	۲۸	۴۲
pH	۴	۸
غلظت نمک (گرم بر لیتر)	۳۰	۱۲۰
غلظت اوریک‌اسید (گرم بر لیتر)	۰	۱۰

تعیین ترادف ژن *16S rRNA* و آنالیز فیلوژنی

ژنوم باکتری منتخب با استفاده از روش فنل- کلروفوم استخراج شد[24]. ژنوم استخراج‌شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. پرایمرهای عمومی 27F با توالی 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و 1492R با توالی 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' برای تکثیر ژن *16S rRNA* به کار رفتند. واکنش PCR با دمای ذوب اولیه ۹۵°C به‌مدت ۱۰دقیقه و سپس ۳۵ سیکل با دمای ذوب ۹۵°C به‌مدت یک‌دقیقه، دمای اتصال ۵۳°C به‌مدت یک‌دقیقه و سپس دمای سنتز رشته‌ها ۷۲°C به‌مدت ۱/۵دقیقه و در نهایت دمای اضافی نهایی ۷۲°C به‌مدت ۱۰دقیقه صورت گرفت. سپس محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی فرستاده شدند.

نتایج و بحث

بررسی تولید و فعالیت آنزیم یوریکاز

با کشت سویه‌ها روی محیط کشت جامد حاوی اوریک‌اسید، ۴ سویه (۴/۷% سویه‌ها) هاله شفاف اطرافشان تشکیل شد که نشان‌دهنده تولید آنزیم یوریکاز است (جدول ۲). سنجش فعالیت آنزیمی در محیط مایع برای این ۴ سویه در شرایط یکسان (pH برابر ۷، غلظت نمک برابر ۳%، دمای رشد برابر ۳۷°C، غلظت اوریک‌اسید برابر ۵گرم بر لیتر) صورت پذیرفت که نتایج به‌همراه بهینه رشد نمکی، صفت رنگ‌پذیری گرم و شکل ظاهری باکتری در جدول ۲ قابل مشاهده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲) سویه‌های نمک‌دوست و تحمل‌پذیر نمک تولیدکننده آنزیم یوریکاز

نام سویه	قطر هاله (میلی‌متر)	فعالیت (واحد بر میلی‌لیتر)	صفت رنگ‌پذیری گرم	ظاهر میکروسکوپی	بهینه نمک برای رشد (درصد وزنی/حجمی)
MB10	۲۱	۲۷	منفی	باسیل	۳
BG24	۱۲	۱۷	منفی	باسیل	۳
N7	۲	۳	مثبت	باسیل، اسپوردار مرکزی	۱۲
G7	۱	۱	مثبت	کوکوباسیل	۳

براساس نتایج، سویه MB10 با بیشترین میزان تولید یوریکاز برای مطالعات بیشتر انتخاب شد.

شناسایی بهترین سویه تولیدکننده آنزیم یوریکاز

براساس تعیین توالی ژن *16S rRNA* مشخص شد سویه MB10، ۹۹/۴۷% با سویه *هالوموناس سولفیداریس* ATCC BAA-803 (*Halomonas sulfidaeris* ATCC BAA-803) شباهت دارد و در بانک ژنی با کد AF212204 ثبت شده است.

بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم یوریکاز

همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، میزان اولیه تولید آنزیم توسط سویه منتخب در شرایط pH اولیه برابر ۷، غلظت نمک برابر ۳%، دمای رشد برابر ۳۷°C غلظت اوریک‌اسید برابر ۵گرم بر لیتر و سرعت هوادهی ۱۵۰rpm، برابر ۲۷واحد بر میلی‌لیتر بود.

با بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر میزان تولید آنزیم، فاکتور سرعت هوادهی با توجه به تاثیر بسیار اندک بر میزان تولید آنزیم حذف و چهار فاکتور دیگر برای بهینه‌سازی انتخاب شدند. در روش بهینه‌سازی RSM، از نرم‌افزار Design Expert 9.0 و روش کامپوزیت مرکزی با آلفا برابر یک (صورت‌محور) استفاده شد. پس از قراردادن شرایط بالا و پایین برای هر یک از متغیرها، نرم‌افزار ۳۰ آزمایش با شرایط مختلف برای بهینه‌سازی ارایه کرد. شرایط هر آزمایش و میانگین نتایج فعالیت آنزیمی حاصل از سه تکرار مستقل در جدول ۳ ذکر شده است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، بهترین شرایط فعالیت آنزیمی بین حالت‌های پیشنهادشده در آزمایش شماره ۲۵ به دست آمد که برابر ۳۰واحد بر میلی‌لیتر بود. به علاوه نرم‌افزار شرایط pH=۸، دمای برابر ۳۴/۵°C، غلظت نمک ۳% و غلظت اوریک‌اسید ۷/۵گرم بر لیتر را برای داشتن فعالیت ۳۳واحد بر میلی‌لیتر پیشنهاد داد که با تکرار آزمایش در شرایط بهینه پیشنهادی فعالیت آنزیمی ۳۲/۵واحد بر میلی‌لیتر حاصل شد.

سپس نتایج حاصل به‌صورت یک معادله چندجمله‌ای درجه دو برازش شد. در این معادله تولید آنزیم (فعالیت آنزیمی) براساس ۴ فاکتور دما (A)، pH (B)، درصد نمک (C) و غلظت اوریک‌اسید (D) بیان شده است:

$$\text{تولید آنزیم} = +25.57 - 0.33A + 0.78B - 2.28C + 9.89D + 0.062AB + 0.063AC - 0.31AD + 0.063BC + 0.69BD - 2.06CD - 4.64A^2 + 0.36B^2 + 0.86C^2 - 12.64D^2$$

در بررسی‌های صحت و دقت مدل ارایه‌شده برای تولید آنزیم، میزان F value برابر ۱۴۹ بود که نشان می‌دهد مدل از دقت بالایی برخوردار بوده و تنها ۰/۰۱% احتمال دارد این مدل تحت تاثیر خطا قرار گیرد. همچنین R^2 برابر ۰/۹۹ نشان‌دهنده انطباق بالای مدل بر واقعیت‌ها است (هر چه R^2 به یک نزدیک‌تر باشد، انطباق بیشتر خواهد بود؛ جدول ۴).

جدول ۳) فعالیت آنزیمی یوریکازی در روش بهینه‌سازی RSM

آزمایش	pH	دما (°C)	غلظت نمک (%)	غلظت اوریک‌اسید (گرم بر لیتر)	فعالیت (واحد بر میلی‌لیتر)
۱	۸	۴۲	۱۲	۱۰	۱۶
۲	٤	۲۸	۳	۰	۰
۳	٤	۴۲	۳	۱۰	۲۱
٤	٦	۳۵	۷/۵	۵	۲٦
۵	٤	۲۸	۱۲	۱۰	۱٤
٦	٦	۳۵	۷/۵	۰	۰
۷	۸	۴۲	۳	۰	۰
۸	٦	۳۵	۷/۵	۵	۲٦
۹	۸	۲۸	۳	۰	۰
۱۰	٦	۳۵	۷/۵	۵	۲٦
۱۱	٤	۳۵	۷/۵	۵	۲٤
۱۲	۸	۲۸	۱۲	۰	۰
۱۳	۸	۲۸	۳	۱۰	۲۵
۱٤	٦	۳۵	۷/۵	۱۰	۲۵
۱۵	٦	۳۵	۷/۵	۵	۲٦
۱٦	۸	۴۲	۳	۱۰	۲٤
۱۷	۸	۴۲	۱۲	۰	۰
۱۸	۸	۲۸	۱۲	۱۰	۱۷
۱۹	٦	۳۵	۷/۵	۵	۲٦
۲۰	٤	۲۸	۳	۱۰	۲۳
۲۱	٦	۳۵	۷/۵	۵	۲٦
۲۲	٤	۲۸	۱۲	۰	۰
۲۳	٤	۴۲	۱۲	۰	۰
۲٤	۸	۳۵	۷/۵	۵	۲۷
۲۵	٦	۳۵	۳	۵	۳۰
۲٦	٤	۴۲	۱۲	۱۰	۱۳
۲۷	٦	۲۸	۷/۵	۵	۲۱
۲۸	٤	۴۲	۳	۰	۰
۲۹	٦	۴۲	۷/۵	۵	۲۰
۳۰	٦	۳۵	۱۲	۵	۲۲

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴) جدول تحلیل واریانس مربوط به مدل quadratic برای تولید یوریکاز

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value Prob>F
Model	۳۶۵۰	۱۴	۲۶۱	۱۴۹	<۰/۰۰۰۱
A-Temp	۲	۱	۲	۱	۰
B-pH	۱۱	۱	۱۱	۶	۰
C-NaCl	۹۳	۱	۹۳	۵۳	<۰/۰۰۰۱
D-Uric Acid	۱۷۶۰	۱	۱۷۶۰	۱۰۰۸	<۰/۰۰۰۱
AB	۰	۱	۰	۰	۱
AC	۰	۱	۰	۰	۱
AD	۲	۱	۲	۱	۰
BC	۰	۱	۰	۰	۱
BD	۸	۱	۸	۴	۰
CD	۶۸	۱	۶۸	۳۹	<۰/۰۰۰۱
A^2	۵۶	۱	۵۶	۳۲	<۰/۰۰۰۱
B^2	۰	۱	۰	۰	۱
C^2	۲	۱	۲	۱	۰
D^2	۴۱۴	۱	۴۱۴	۲۳۷	<۰/۰۰۰۱
Residual	۲۶	۱۵	۲		
Lack of Fit	۲۶	۱۰	۳		
Pure Error	۰	۵	۰		
Cor Total	۳۶۷۶	۲۹			

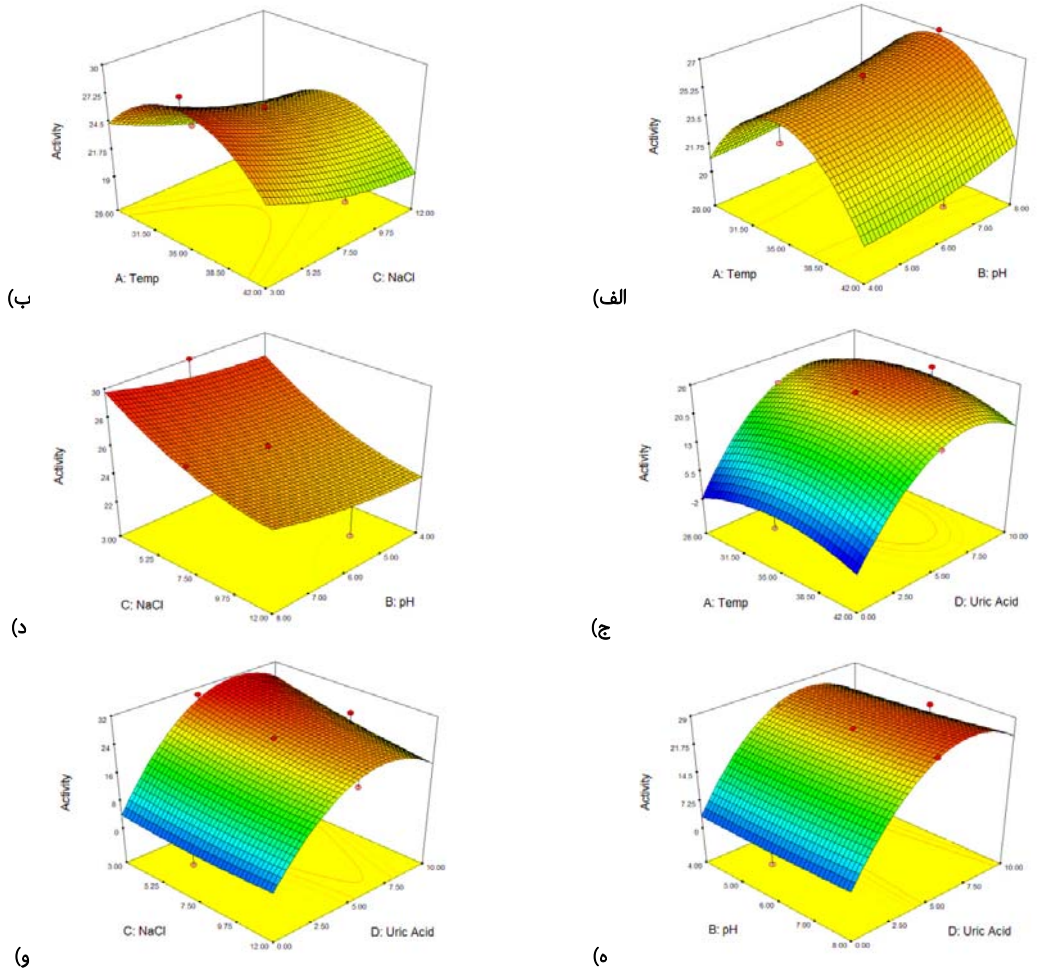
براساس مدل ارایه‌شده تولید آنزیم در اثر تغییر همزمان دو عامل نیز بررسی شد، که نتایج به‌صورت زیر به دست آمد (شکل ۱):

با درنظرگرفتن نتایج جدول آزمون تحلیل واریانس، به این نتیجه می‌رسیم که تنها فاکتورهای B، C، D، CD، A^2 و D^2 فاکتورهای مهم و تاثیرگذار در میزان تولید آنزیم هستند. حال با درنظرگرفتن فاکتورهای با اهمیت در معادله نهایی به نتیجه زیر خواهیم رسید:

فعالیت آنزیمی=+25.69+0.78B-2.28C+9.89D-2.06CD-4.13 A^2-12.13D^2

با اعمال این تغییرات میزان F value و R2 به‌ترتیب برابر ۳۴۴ و ۰/۹۹ خواهد شد که بسیار معنی‌دار است. تنها برهم‌کنش همزمان تاثیرگذار و با اهمیت برهم‌کنش همزمان غلظت نمک- غلظت اوریک‌اسید است. با استفاده از این روش میزان تولید آنزیم از ۲۷واحد بر میلی‌لیتر به حدود ۳۲/۵واحد بر میلی‌لیتر افزایش یافت. گزارشات دیگری نیز در راستای افزایش تولید آنزیم یوریکاز توسط سویه‌های وحشی ارایه شده‌اند.

تولید یوریکاز در مقالات مختلف با بهینه‌سازی منبع کربن و نیتروژن[25]، کربن و نیتروژن و دما و pH [26, 27]، pH و نمک‌های سولفات[28]، pH و دما و نمک و منابع مختلف و کربن و نیتروژن[29] و اجزای محیط کشت[30] بهینه‌سازی شده است.



شکل ۱) بررسی اثر همزمان دو فاکتور بر تولید آنزیم یوریکاز: الف) دما و pH، ب) دما و غلظت نمک، ج) دما و غلظت اوریک‌اسید، د) pH و غلظت نمک، ه) pH و غلظت اوریک‌اسید، و) نمک و اوریک‌اسید

www.SID.ir

Archive of SID

شایان ذکر است مقدار بیان به‌دست‌آمده در این پروژه از بالاترین مقادیر گزارش‌شده برای تولید یوریکاز توسط یک سویه وحشی است. به‌طور مثال مقادیر گزارش‌شده پس از بهینه‌سازی برای سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* (*Psudomonas aeruginosa*)، گونه مایکوباکتریوم، *زانتوموناس فوسکانس* (*Xanthomonas fuscans*) و حدود ۰/۳واحد بر میلی‌لیتر تا ۰/۷واحد بر میلی‌لیتر است[25, 31, 32]. هر چند این عدد در یک گزارش در مورد *باسیلوس سرئوس* سویه DL3 (*Bacillus cereus strain DL3*) با بهینه‌سازی‌های صورت‌گرفته تا ۱۵/۴۳واحد بر میلی‌لیتر[18] هم افزایش داشته است اما با این وجود مقدار تولید گزارش‌شده در این مقاله از بالاترین اعداد گزارش شده است.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به محدودیت در تعداد سویه‌های نمک‌دوست در دسترس که برای تولید آنزیم یوریکاز مورد مطالعه قرار گرفتند و همچنین عدم خلوص آنزیم اشاره کرد. بنابراین پیشنهاد می‌شود با توجه به پتانسیل بالای محیط‌های شور، تعداد سویه‌های نمک‌دوست بیشتری به این منظور مورد بررسی قرار گیرند. از طرفی دیگر با توجه به این که تعداد باکتری‌های قابل کشت یک محیط در مقابل باکتری‌های غیرقابل کشت آن بسیار اندک است، به‌کارگیری روش‌های مبتنی بر مطالعه متاژنوم به‌منظور بررسی پتانسیل جمعیت غیرقابل کشت محیط‌ها پیشنهاد می‌شود. در آخر تولید نوترکیب آنزیم‌ها به‌منظور افزایش مقیاس تولید و تخلیص آنها به‌منظور مطالعات دقیق‌تر پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش یک سویه نمک‌دوست جدید و بومی ایران که پیش‌تر از دریاچه ارومیه جداسازی و خالص شده بود، قابلیت بالایی در تولید آنزیم یوریکاز از خود نشان داد. همان‌طور که ذکر شد میزان تولید یوریکاز توسط این سویه از سایر گزارشاتی که در مورد تولید در سویه‌های وحشی وجود دارد، بالاتر است. نمک‌دوست‌بودن این آنزیم می‌تواند به خصوصیت دارویی آن کمک کند چون آنزیم نمک‌دوست بهتر می‌تواند شرایط نمکی خون را تحمل کند. این مساله سبب می‌شود دوز کمتری از آنزیم برای رسیدن به یک فعالیت مشخص مورد نیاز باشد. این دوز کمتر علاوه بر کاهش هزینه، شانس واکنش ایمنی را نیز کمتر می‌کند[33-35]. تاکنون مطالعات بسیاری در مورد کاربرد آنزیم‌های نمک‌دوست در صنعت و محیط زیست انجام شده است و در مقالات متعددی مرور شده‌اند[36-38]. اما کاربردهای دارویی این آنزیم‌ها به‌ندرت مورد مطالعه قرار گرفته‌اند[20, 24].

در انتها باید به این نکته اشاره کرد اگرچه تولید آنزیم در این سویه‌ها قابل توجه بود ولی رسیدن به مرحله تولید صنعتی آنزیم نیازمند تحقیقات فراوان و راهی طولانی است. این تحقیقات شامل تولید این پروتئین به‌صورت نوترکیب و تخلیص آن، بررسی پایداری آنزیم در خون در شرایط "*درون شیشه*"، فعالیت آنزیم در حضور سرم انسانی[20]، و همچنین بررسی فعالیت و ایمنی‌زایی آن در موجود زنده است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از همکاری و مساعدت پژوهشگران آزمایشگاه زیست‌فناوری مولکولی و آزمایشگاه اکستریموفیل‌های پردیس علوم دانشگاه تهران و همه عزیزانی که در این پژوهش یاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌نمایند.

تاییدیه‌اخلاقی: هیچ‌گونه تست انسانی یا حیوانی در این مطالعه انجام نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: پژمان شیرازیان (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۵۰%)؛ علی قاسمی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۲۵%)؛ صدیقه اسد (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۳۰%)؛ محمدعلی آموزگار (نویسنده چهارم)، روش‌شناس (۲۰%)

منابع مالی: پژوهش حاضر با حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده است.

منابع

1- Retailleau P, Colloc'h N, Vivarès D, Bonneté F, Castro B, El-Hajji M, et al. Complexed and ligand-free high-resolution structures of urate oxidase (Uox) from Aspergillus flavus: a reassignment of the active-site binding mode. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004;60(Pt 3): 453-62.

2- Retailleau P, Colloc'h N, Vivarès D, Bonneté F, Castro B, El Hajji M, et al. Urate oxidase from Aspergillus flavus: new crystal-packing contacts in relation to the content of the active site. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2005;61(3):218-29.

3- Collings I, Watier Y, Giffard M, Dagogo S, Kahn R, Bonneté F, et al. Polymorphism of microcrystalline urate oxidase from Aspergillus flavus. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010;66(Pt 5):539-48.

4- Suresh E. Diagnosis and management of gout: a rational approach. Postgrad Med J. 2005;81(959):572-9.

5- Terkeltaub R, Bushinsky DA, Becker MA. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics. Arthritis Res Ther. 2006;8 Suppl 1:S4.

6- Conen D, Wietlisbach V, Bovet P, Shamlaye C, Riesen W, Paccaud F, et al. Prevalence of hyperuricemia and relation of serum uric acid with cardiovascular risk factors in a developing country. BMC Public Health. 2004;4:9.

7- Dinnel J, Moore BL, Skiver BM, Bose P. Rasburicase in the management of tumor lysis: an evidence-based review of its place in therapy. Core Evid. 2015;10:23-38.

8- Pession A, Melchionda F, Castellini C. Pitfalls, prevention, and treatment of hyperuricemia during tumor lysis syndrome in the era of rasburicase (recombinant urate oxidase). Biologics. 2008;2(1):129-41.

9- Trifilio S, Gordon L, Singhal S, Tallman M, Evens A, Rashid K, et al. Reduced-dose rasburicase (recombinant xanthine oxidase) in adult cancer patients with hyperuricemia. Bone Marrow Transplant. 2006;37(11):997-1001.

10- Cammalleri L, Malaguarnera M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. Int J Med Sci. 2007;4(2):83-93.

www.SID.ir

Archive of SID

phase system. Prep Biochem Biotechnol. 2015;45(8):810-24.
26- C Selvaraj PTV. Screening, production and optimization of uricase from P. aeruginosa. Europ J Biotechnol Biosci. 2017;5(1):57-61.
27- Pawar SV, Rathod VK. Optimization of novel and greener approach for the coproduction of uricase and alkaline protease in Bacillus licheniformis by Box-Behnken model. Prep Biochem Biotechnol. 2018;48(1):24-33.
28- Abdel-Fattah YR, Saeed HM, Gohar YM, El-Baz MA. Improved production of Pseudomonas aeruginosa uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. Process Biochem. 2005;40(5):1707-14.
29- Atty FK, Joseph J. Isolation and identification of uric acid degrading bacteria, optimization of uricase production and purification of uricase enzyme. Int J Adv Res. 2016;4(12):2732-42.
30- pooja nanda, pejb, jenifer fernandes, pranita hazarika, rohini raju dhabre. studies on production, optimization and purification of uricase from Gliocladium viride. Res Biotechnol. 2012;3(4):35-46.
31- Anderson A, Vijayakumar S. Isolation and optimization of Pseudomonas aeruginosa for uricase production. Int J Pharm Biosci. 2012;3(1):B143-50.
32- Zhou Xl, Ma XH, Sun GQ, Li X, Guo KP. Isolation of a thermostable uricase-producing bacterium and study on its enzyme production conditions. Process Biochem. 2005;40(12):3749-53.
33- Young CR, Ebringer A, Archer JR. Antigen dose and strain variation as factors in the genetic control of the immune response to sperm whale myoglobin. Immunology, 1978. 34(3): p. 571-9.
34- Korver K, Boeschoten EW, Krediet RT, van Steenis G, Schellekens PT. Dose-response effects in immunizations with keyhole limpet haemocyanin and rabies vaccine: shift in some immunodeficiency states. Clin Exp Immunol. 1987;70(2):328-35.
35- Paul WE, Siskind GW, Benacerraf B. Specificity of cellular immune responses. Antigen concentration dependence of stimulation of DNA synthesis in vitro by specifically sensitized cells, as an expression of the binding characteristics of cellular antibody. J Exp Med. 1968;127(1):25-42.
36- Wackett LP. Industrial applications of microbial salt-tolerant enzymes: an annotated selection of World Wide Web sites relevant to the topics in microbial biotechnology. Microb Biotechnol. 2012;5(5):668-9.
37- Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environ Technol, 2010;31(8-9):825-34.
38- Patel S, Saraf M. Perspectives and application of halophilic enzymes. In: Maheshwari DK, Saraf M, editors. Halophiles: biodiversity and sustainable exploitation. New York: Springer; 2015. pp. 403-19.
11- Ensor CM, Clark MA, Holtsberg FW. Peg-modified uricase [Internet]. Menlo Park, California: Google Patents; 2005 [cited 2018 Jul 9]. Available from: https://patents.google.com/patent/US6913915.
12- Ueng S. Rasburicase (Elitek): a novel agent for tumor lysis syndrome. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2005;18(3):275-9.
13- Garay RP, El-Gewely MR, Labaune JP, Richette P. Therapeutic perspectives on uricases for gout. Joint Bone Spine. 2012;79(3):237-42.
14- Yang X, Yuan Y, Zhan CG, Liao F. Uricases as therapeutic agents to treat refractory gout: Current states and future directions. Drug Dev Res. 2012;73(2):66-72.
15- Nguyen AP, Ness GL. Hemolytic anemia following rasburicase administration: a review of published reports. J Pediatr Pharmacol Ther. 2014;19(4):310-6.
16- Allen KC, Champlain AH, Cotliar JA, Belknap SM, West DP, Mehta J, et al. Risk of anaphylaxis with repeated courses of rasburicase: a research on adverse drug events and reports (RADAR) project. Drug Saf. 2015;38(2):183-7.
17- Tabatabaei Yazdi M, Zarrini GR, Mohit E, Faramarzi MA, Setayesh N, Sedighi N, et al. Mucor hiemalis: a new source for uricase production. World J Microbiol Biotechnol. 2006;22(4):325-30.
18- Nanda P, Babu PE. Isolation, screening and production studies of uricase producing bacteria from poultry sources. Prep Biochem Biotechnol. 2014;44(8): 811-21.
19- Lee NSIS, Mansouri Khosravi HR, Ibrahim N, Shahir S. Isolation, partial purification and characterization of thermophilic uricase from Pseudomonas otitidis strain SN4. Malaysian J Microbiol. 2015;11(4): 352-7.
20- Ghasemi A, Asad S, Kabiri M, Dabirmanesh B. Cloning and characterization of Halomonas elongata L-asparaginase, a promising chemotherapeutic agent. Appl Microbiol Biotechnol. 2017;101(19):7227-38.
21- Honarbakhsh F, Amoozegar MA, Amolmaali S, Mehrshad M. Screening for uricase enzyme from halotolerant bacteria. 15th International Congress of Microbiology Tehran, Iran. Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 2014.
22- Shirazian P, Asad S, Amoozegar MA. The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and L-glutaminase. EXCLI J. 2016;15:268-79.
23- Fraisse L, Bonnet MC, de Farcy JP, Agut C, Dersigny D, Bayol A. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters. Anal Biochem. 2002;309(2):173-9.
24- Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. J Biomed Biotechnol. 2009;2009:574398.
25- Ram SK, Raval K, JagadeeshBabu PE. Enhancement of a novel extracellular uricase production by media optimization and partial purification by aqueous three-

www.SID.ir