Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۶۱- ۷۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

بررسی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* با استفاده از محیط کشت‌های مختلف

مانـــدانا لطفـــی: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، lotfi_m1367@yahoo.com
کیوان بهشتی مآل*: استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران ، beheshtimaal@iaufala.ac.ir
هاشـــم نیـــری: استادیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، nayeri@iaufala.ac.ir

چکیده

مقدمه: پروتئازهای قلیایی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی محسوب می‌شوند و با توجه به کاربردهای فراوانی که در حذف آلاینده‌های محیطی و پیشبرد فرآیندهای صنعتی دارند، مورد توجه پژوهشگران بسیاری قرار گرفته‌اند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مخمر بومی مولد آنزیم پروتئاز قلیایی و تعیین فعالیت آنزیم در این جدایه است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری از خاک، آب و پساب کارخانه‌های مختلف انجام شد. به منظور غربال‌گری گونه‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی در ابتدا از محیط کشت پپتون آگار با اسیدیته قلیایی و محیط کشت میلک آگار استفاده شد. در مرحله بعد سنجش آنزیم با روش لوری انجام و اثر محیط کشت‌های مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی بررسی شد. برای شناسایی بهترین گونه مولد، DNA جدایه استخراج و PCR انجام شد.

نتایج: از بین تمام جدایه‌ها، ۲۷ جدایه مولد آنزیم پروتئاز قلیایی بودند و جدایه‌ای که بیش‌ترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی معادل ۵۲۵ (واحد/ میلی‌لیتر) را داشت برای مراحل بعدی انتخاب شد. بیشینه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در محیط کشت YPG براث مشاهده شد. مقایسه توالی *18s rDNA* مخمر جدا شده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی حداکثر شباهت جدایه را با گونه *یاروویا لیپولیتیکا* نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به کاربردهای فراوان این آنزیم در صنعت و تولید نشدن آن در کشور، به نظر می‌رسد استفاده از سویه‌های محلی می‌تواند در دستیابی به تولید بالای آنزیم پروتئاز قلیایی مفید واقع شود. همچنین، با توجه به غیر بیماری‌زا بودن سویه معرفی شده و تولید بالای آنزیم می‌توان این سویه را به عنوان سویه صنعتی مناسب معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: پروتئاز قلیایی، پپتون آگار، میلک آگار، *یاروویا لیپولیتیکا*

* نویسنده مسؤول مکاتبات

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه آنزیم‌های میکروبی کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف دارند. متوسط رشد سالانه بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی ۳/۳ درصد افزایش داشته است (۱). در این میان پروتئازها یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستندکه کمابیش ۶۰ درصد فروش آنزیم دنیا به آن‌ها اختصاص دارد. پروتئازها بر اساس جایگاه کاتالیتیکی به دو دسته پروتئازهای خارج سلولی و پروتئازهای داخل سلولی تقسیم می‌شوند. حداکثر فعالیت پروتئازهای اسیدی در اسیدیته ۲ تا ۶، پروتئازهای خنثی در اسیدیته ۶/۵ تا ۷/۵، پروتئازهای قلیایی در اسیدیته ۸ تا ۱۱ است (۲ و ۳). سرین پروتئازهای قلیایی به طور اختصاصی به فرمول شوینده‌ها اضافه می‌شوند. از لحاظ تجاری سرین پروتئازهای قلیایی بیشترین کاربرد را دارند. مهم‌ترین سرین پروتئازهایی که هم اکنون استفاده می‌شوند سابتیلیزین کارلزبرگ جدا شده از *باسیلوس لیکنی فورمیس*، سابتیلیزین بی پی ان از *باسیلوس آمیلو لیکنی فورمیس*، سابتیلیزین ای و سابتیلیزینان ای تی از *باسیلوس سابتیلیس* هستند (۴ و ۵). آنزیم پروتئاز قلیایی کاربردهای فراوانی در صنعت دارد که شامل صنایع غذایی، صنایع تخمیری، شوینده‌ها و دترجنت‌ها، چرم‌سازی و دباغی، مکمل غذایی دام طیور، صنعت روغن کشی، صنعت الکل‌سازی، صنایع نساجی، داروسازی و ... است. مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی، مخمرها، قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند. مهم‌ترین مخمرهای مولد آنزیم پروتئاز قلیایی گزارش شده، *یاروویا لیپولیتیکا*، *کاندیدا اوله آ* و *آئروبازیدیوم پلولانس* و ... هستند. مهم‌ترین قارچ‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نیدولانس* هستند. مهم‌ترین باکتری‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی، *باسیلوس لیکنی فورمیس*، *باسیلوس آلکالوفیلوس* و *باسیلوس سابتیلیس* هستند (۶- ۱۳). با توجه به نیاز روز افزون به این آنزیم در کشور و کاربردهای وسیعی که آنزیم پروتئاز قلیایی در صنایع مختلف دارد و مزایایی که مخمرها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم پروتئاز قلیایی دارند، به نظر می‌رسد که برای تکمیل این پژوهش‌ها و شناسایی مخمرهای بومی مولد آنزیم ادامه این پژوهش‌ها امری ضروری است. اهداف اصلی در این پژوهش جداسازی، شناسایی و معرفی سویه‌های مخمری بومی برتر مولد آنزیم پروتئاز قلیایی و استخراج این آنزیم است.

مواد و روش‌ها

جداسازی سویه‌های مختلف مخمر: به منظور جداسازی سویه‌های مختلف مخمر، نمونه‌های خاک از مناطق باغ بهادران، فلاورجان، حاشیه زاینده رود و ...، نمونه‌های آب از رودخانه زاینده رود اصفهان، دریای مازندران و خلیج فارس و نمونه‌های پساب از کارخانه‌های رب گوجه فرنگی و مربا، قند، کیک و نوشابه، شیر و لبنیات و ... در ظروف استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل شد. پس از تهیه سری رقت میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های 10^{-3} و 10^{-4} برداشته و به پلیت‌های حاوی محیط کشت YPG آگار [عصاره مخمر ۱۰ (گرم/ لیتر)، گلوکز ۲۰ (گرم/ لیتر)، پپتون ۲۰ (گرم/ لیتر)، آگار ۱۵ (گرم/ لیتر)، تکمیل شده با ۰/۰۵ درصد کلرامفنیکل] اضافه و با استفاده از میله شیشه‌ای سرکج استریل به روش اسپرید پلیت کشت داده

www.SID.ir

Archive of SID

و پس از آن به مدت ۳ تا ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۸ و ۱۴).

بررسی کلونی‌های رشد کرده و خالص‌سازی هر نمونه به طور جداگانه: پس از طی شدن زمان انکوباسیون برای نمونه‌های رشد کرده رنگ آمیزی ساده با استفاده از رنگ متیلن بلو انجام شد و هرکدام از کلونی‌های متفاوت با استفاده از روش کشت خطی بر روی محیط‌های YPG آگار دیگر خالص شدند.

غربال‌گری اولیه جدایه‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی: در ابتدا از محیط کشت پپتون آگار با اسیدیته‌های ۹، ۱۰ و ۱۱ [پپتون ۲۰ (گرم/ لیتر) و آگار ۲ درصد] استفاده شد. جدایه‌های مخمر جداسازی شده را در ابتدا با کشت در محیط‌های مایع YPG (که قبلاً در لوله‌های آزمایش و به میزان ۱۰ میلی‌لیتر تهیه شده و استریل شده بودند) به مدت ۴۸ ساعت، فعال کرده و از هر لوله YPG که حاوی یکی از جدایه‌های جدا شده بود به طریق کشت خطی بر روی محیط‌های پپتون آگار [پپتون ۲۰ (گرم/ لیتر)، آگار ۱۵ (گرم/ لیتر)] با اسیدیته‌های مختلف کشت داده و برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعدی از محیط کشت میلک آگار [شیر بدون چربی ۵۰ درصد، آگار ۱۵ (گرم/ لیتر)] استفاده شد. پس از تهیه محیط‌های میلک آگار، جدایه‌هایی که بر روی پپتون آگار قلیایی رشد خوبی داشتند روی محیط میلک آگار کشت داده و به مدت ۳ تا ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. جدایه‌های دارای هاله بزرگ‌تر برای مرحله بعد انتخاب شدن (۶).

روش اندازه‌گیری و سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی: بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی بر اساس روش رنگ‌سنجی پروتئین‌ها به روش لوری انجام شد. ابتدا مقدار ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع میکروبی با استفاده از پی پت استریل برداشته و به لوله آزمایش تمیز منتقل شد. سپس، به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۲۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و با استفاده از یک پی پت تمیز مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی حاوی آنزیم برداشته و به لوله تمیز دیگری منتقل شد. به این محلول آنزیمی مقدار ۱ میلی‌لیتر سوبسترا یا همان محلول کازئین ۲ درصد با اسیدیته قلیایی ۱۱ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از تمام شدن مدت ۱۰ دقیقه بلافاصله به مخلوط آنزیم و سوبسترا مقدار ۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۴ مولار تری کلرواستیک اسید اضافه شد و محتویات لوله برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس، به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۰/۴ مولار و ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیو کالتوس فنل با رقت ۰/۱ اضافه و لوله یاد شده برای انجام واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار داده شد. پس از اتمام زمان ۲۰ دقیقه لوله آزمایش از بن ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد خارج و جذب یا دانسیته نوری (OD) محلول در طول موج ۶۶۰ نانومتر خوانده شد. سپس،از روی منحنی استاندارد، مقدار ال- تیروزین آزاد شده بر حسب میکروگرم اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم محاسبه شد. بر اساس تعریف، یک واحد فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی مقدار آنزیمی است که بتواند از سوبسترای کازئین یک میکروگرم ال- تیروزین در مدت واکنش (۱۰ دقیقه) و با شرایط آزمایش (دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) آزاد کند و واحد آن در میلی‌لیتر و در زمان ۱۰ دقیقه محاسبه می‌شود (۱۳).

www.SID.ir

Archive of SID

منحنی استاندارد فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی: محلول‌هایی حاوی ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-تیروزین تهیه شد. سپس، به ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های یاد شده مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۰/۴ مولار و ۱ میلی‌لیتر محلول فولین سیو کالتوس فنل با رقت ۰/۱ اضافه و برای انجام واکنش و تغییر رنگ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار داده شد. پس از اتمام این مدت جذب نوری محلول‌ها در طول موج ۶۶۰ نانومتر خوانده شد. بنابراین، جذب محلول‌های حاوی ال- تیروزین با میزان مشخص بر حسب میکروگرم مشخص شد. برای رسم منحنی استاندارد OD بر حسب مقدار ال- تیروزین (میکروگرم) از نرم افزار آماری SPSS استفاده شد. با توجه به مقادیر ثابت و متغیر داده شده از رایانه معادله خط هم بستگی محاسبه شد. تبدیل مقادیر OD به مقدار ال- تیروزین بر حسب میکروگرم در تمامی آزمایش‌های آینده با استفاده از معادله خط همبستگی آن [Y=0.0071X+0.0448] انجام شده است (۱۵).

تعیین جدایه برتر مخمری مولد آنزیم پروتئاز قلیایی: در این مرحله از آزمایش جدایه‌هایی که بهترین رشد را در محیط کشت پپتون آگار قلیایی داشتند و قطر هاله شفاف دور کلونی‌های آن‌ها از سایر ایزوله‌ها بیشتر بود به منظور اندازه‌گیری و سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی انتخاب شد. به همین علت از محیط کشت YPG براث استفاده شد. از هر کدام از جدایه‌ها کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه و تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ عدد مخمر به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPG براث منتقل شد. ارلن‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. سپس، فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در آن با استفاده از روش رنگ‌سنجی لوری اندازه‌گیری و جدایه مخمری که بیشترین فعالیت آنزیمی را داشت برای شناسایی مولکولی انتخاب شد.

بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی: اثر القایی مواد اولیه در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی بررسی شد. محیط کشت‌هایی که مورد آزمایش قرار گرفتند شامل: YPG براث، محلول پپتون [پودر پپتون ۲۰ (گرم/ لیتر)، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر]، محلول نشاسته [نشاسته محلول ۲۵ (گرم/ لیتر)، نیترات سدیم ۲۰ (گرم/ لیتر)، آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر] و ملاس چغندر [ملاس چغندر ۳۰ میلی‌لیتر، آب مقطر ۷۰ میلی‌لیتر] بود. پس از تلقیح، همه ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند.

استخراج DNA از مخمر: برای استخراج DNA بافر استخراج [Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار، NaCl ۱/۴ مولار، EDTA ۵۰۰ میلی‌مولار، مرکاپتواتانول ۲ میکرولیتر] ساخته شد. ۱ میلی‌لیتر از بافر با ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع حاوی مخمر ترکیب شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی به لوله جدیدی منتقل شد. ۶۰۰ میکرولیتر مخلوط ایزوآمیل الکل و کلروفرم با نسبت ۱:۲۴ به مخلوط افزوده و به مدت ۱ دقیقه لوله به آرامی تکان داده شد. سپس، مخلوط به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ دو لایه در مخلوط ایجاد شد. لایه رویی به لوله دیگری منتقل و به اندازه هم حجم آن ایزوپروپانول

www.SID.ir

Archive of SID

سرد افزوده شد. مخلوط به آرامی تکان داده شد و به مدت ۶۰ دقیقه در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مولکول‌های DNA دو مرتبه با الکل اتانول ۷۰ درصد شستشو داده و هر دو بار به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوبات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد تا خشک شوند. DNA حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل و در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶).

تعیین کیفیت و غلظت DNA: هر نمونه DNA با ۵ میکرولیتر مخلوط بافر به نسبت ۳:۱ ترکیب و به شکل جداگانه‌ای در یک چاهک روی ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شد. برای تخمین غلظت DNA از نشانگر اندازه با اندازه ۱۵۰۰ جفت باز استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام و سپس، ژل توسط نور ماورا بنفش مشاهده شد. غلظت نمونه‌های DNA از طریق مقایسه موقعیت و شدت باند حاصل از DNA با الگوی نوار بندی حاصل از نشانگر مورد استفاده تعیین شد و سپس، به منظور رقیق‌سازی DNA از آب مقطر استریل استفاده شد و نمونه‌های آماده شده برای انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر نگهداری شد.

انجام PCR: در این پژوهش از آغازگرهای عمومی ITS_4 و ITS_5 به ترتیب به عنوان آغازگرهای سنس و آنتی‌سنس استفاده شد. توالی آغازگر عمومی برای ITS_4 5'- ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' و برای ITS_5 به شکل 5'- GATCCTTCCGCAGGTTCAC-3' است.

مراحل زمانی PCR شامل دمای واسرشت ابتدایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه، دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۷۰ ثانیه و دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۸ دقیقه بود. به منظور تعیین توالی، به ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR ۱۵ میکرولیتر آب مقطر اضافه و برای شرکت تکاپوزیست ارسال شد. توالی با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی ژن بانک و با استفاده از نرم افزار بلاست با یکدیگر مقایسه شد و نوع مخمر در سطح جنس و گونه مشخص شد.

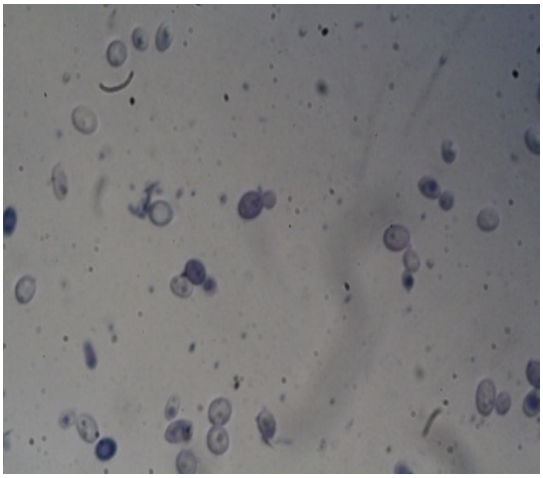
نتایج

غربالگری اولیه جدایه‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی: از بین جدایه‌های جداسازی شده، تعداد ۲۷ جدایه رشد خوبی را در محیط کشت پپتون آگار با اسیدیته قلیایی نشان دادند که از این میان ۱۰ جدایه در محیط میلک آگار هاله شفاف وسیعی در اطراف کلونی‌های تکشان مشاهده شد و به عنوان جدایه‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی انتخاب شدند.

تعیین برترین مخمر مولد آنزیم پروتئاز قلیایی: تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط ۱۰ جدایه مشخص شده در مرحله قبل که در محیط شیر بهترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی را از خود نشان داده بودند بررسی شد. جدایه ۳۸ با فعالیت آنزیمی معادل ۴۶۰ (واحد/ میلی‌لیتر) بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان داد و برای مرحله بعدی آزمایش انتخاب شد (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



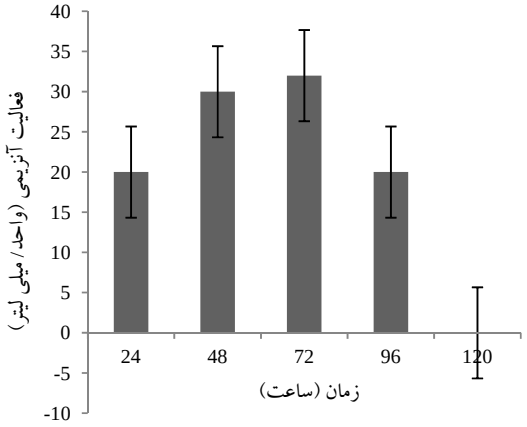
شکل ۱- تصویر میکروسکوپی جدایه ۳۸ با رنگ آمیزی آبی متیلن

بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی: در این آزمایش محیط کشت‌های YPG براث، محلول پپتون، محلول نشاسته و ملاس چغندر در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی استفاده شد. نتایج در شکل‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ آورده شده است.

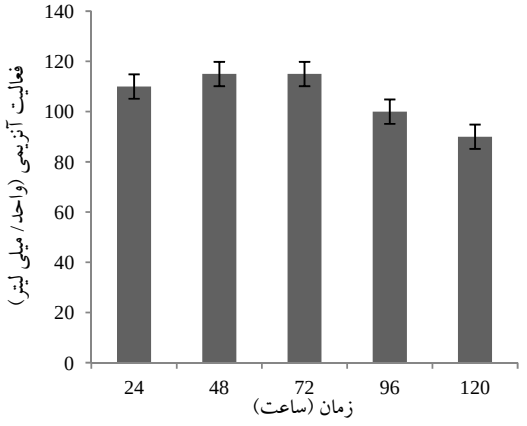
فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در محیط ملاس چغندر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت به ترتیب معادل ۲۰، ۳۰، ۳۲، ۲۰ و صفر (واحد/ میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد که حداکثر فعالیت آنزیم تولید شده پس از ۷۲ ساعت به دست آمد (شکل ۲).

فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در محیط محلول پپتون در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت به ترتیب معادل ۱۱۰، ۱۱۵، ۱۱۵، ۱۰۰ و ۹۰ (واحد/ میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد که حداکثر فعالیت آنزیم تولید شده پس از ۷۲ ساعت به دست آمد (شکل ۳).

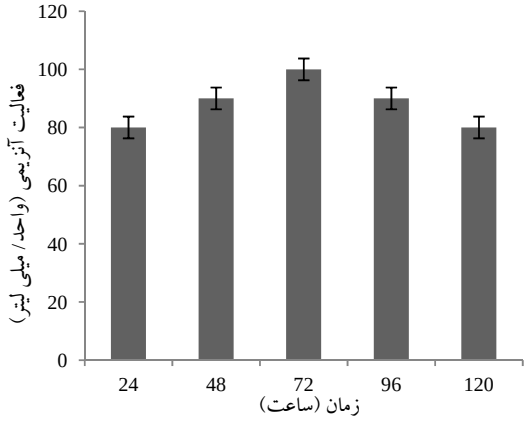
فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در محیط محلول نشاسته در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت به ترتیب معادل ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۹۰ و ۸۰ (واحد/ میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد که حداکثر فعالیت آنزیم تولید شده پس از ۷۲ ساعت به دست آمد (شکل ۴).



شکل ۲-مقایسه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در محیط کشت ملاس چغندر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه



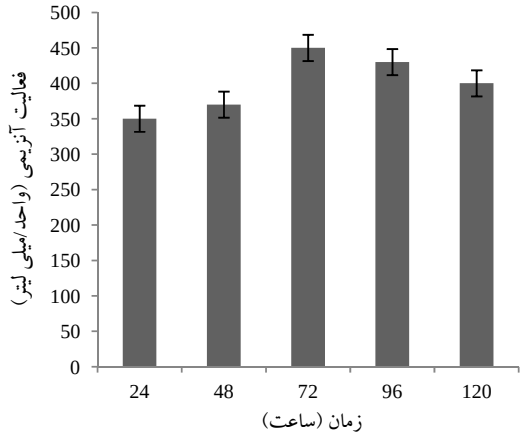
شکل ۳-مقایسه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در محیط کشت محلول پپتون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه



شکل ۴-مقایسه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در محیط کشت محلول نشاسته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- مقایسه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در محیط کشت YPG براث در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه

فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در محیط YPG براث در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت به ترتیب معادل ۳۵۰، ۳۷۰، ۴۵۰، ۴۳۰ و ۴۰۰ (واحد/ میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد که حداکثر فعالیت آنزیم تولید شده پس از ۷۲ ساعت به دست آمد (شکل ۵).

شناسایی مولکولی مخمر مولد آنزیم پروتئاز قلیایی: مقایسه توالی *18s rDNA* مخمر جدا شده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی با استفاده از نرم افزار بلاست انجام شد و مخمر مورد نظر براساس تحلیل توالی ژنومی *18s rDNA* شناسایی شد. جدایه ۳۸ جداسازی شده از پساب کارخانه رب گوجه فرنگی و مربا حداکثر تشابه را به میزان ۹۹ درصد با *یاروویا لیپولیتیکا* نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری

بیشتر آزمایش‌ها و پژوهش‌هایی که در زمینه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی انجام گرفته با استفاده از سویه‌های استاندارد و آماده بوده است. برای مثال نلسون و یانگ[۱] در سال ۱۹۸۷ تولید آنزیم خارج سلولی پروتئاز قلیایی توسط مخمر *کاندیدا اوله آ* را بررسی کردند (۱۱). کلودیا و همکاران[۲] در سال ۲۰۰۱ کنترل ژنتیکی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی را در سویه‌های موتانت *یاروویا لیپولیتیکا*[۳] ارزیابی کردند (۱۷). چی و همکاران[۴] در سال ۲۰۰۷ توانستند مخمر دریایی *آئروبازیدیوم پلولانس* مولد آنزیم پروتئاز قلیایی را از رسوبات کارخانه نمک در اطراف خط ساحلی دریا کینگ دائو[۵] چین جداسازی کنند (۸). آکپینار و همکاران[۶] در سال ۲۰۱۱ موفق به جداسازی *یاروویا لیپولیتیکا* مولد آنزیم پروتئاز قلیایی از پنیر شدند (۶). *یاروویا لیپولیتیکا* از پساب کارخانه‌های شهر اصفهان جداسازی شد. از آن جا که در پژوهش‌های مختلف از سویه‌های آماده استفاده شده است، روش‌های غربال‌گری در این زمینه کمتر به چشم می‌خورد. برای مثال چی و همکاران در سال ۲۰۰۷ به محیط کشت پایه YPG آگار ۰/۲ درصد کازئین اضافه کردند که این امر قطعاً تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در جدایه‌ها را مشخص نمی‌کند. بهشتی مآل و همکاران[۷] در سال ۲۰۰۹ از محیط کشت کازئین آگار با اسیدیته‌های قلیایی ۹، ۱۰ و ۱۱ استفاده کردند و نتایج خوبی را به دست آوردند (۱۴). در این پژوهش در ابتدا از محیط پپتون آگار قلیایی با اسیدیته‌های ۹، ۱۰ و ۱۱ استفاده شد، با توجه به کم هزینه و ساده بودن این روش، روش مناسبی برای جداسازی اولیه سویه‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی بوده و نتایج رضایت بخشی نیز داشته است. شایان ذکر است در مقالات و پژوهش‌های گوناگون به این روش اشاره‌ای نشده است.

در مرحله دوم غربال‌گری از محیط کشت میلک آگار استفاده شد. این روش برای غربال‌گری میکروارگانیسم‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی بسیار مرسوم است. برای مثال شافعی و همکاران[۸] در سال ۲۰۱۰، آکپینار در سال ۲۰۱۱، ابراهیم و همکاران[۹] در سال ۲۰۰۷، ونتوسا و همکاران[۱۰] در سال ۱۹۸۲، داویدو و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران[11] در سال ۱۹۸۷ از این روش برای غربال‌گری ایزوله‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی استفاده کردند (۱۳، ۶، ۱۸ و ۱۹). رشد بر روی چنین محیطی حکایت از ترشح آنزیم پروتئاز خارج سلولی دارد. با توجه به این که استفاده از محیط پپتون آگار مقیاسی از مقدار ترشح آنزیم پروتئاز در اختیار ما نمی‌گذاشت از محیط‌های میلک آگار استفاده شد که در اثر هیدرولیز کازئین محیط کدر و سفید رنگ به شفاف تبدیل می‌شود. بنابراین، استفاده از این دو روش برای غربال‌گری میکروارگانیسم‌های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی مناسب است که برای جداسازی اکثر جنس‌های مولد این آنزیم قابل انجام است. در این پژوهش نیز بیشتر بودن فعالیت آنزیمی جدایه‌هایی که هاله شفاف وسیع‌تری ایجاد کرده بودند با سنجش به روش لوری تایید شد. محیط کشت‌های YPG براث، محلول نشاسته، محلول پپتون و ملاس چغندر برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی آزمایش شد. از میان این محیط کشت‌ها، محیط کشت YPG براث بهترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی را داشت. این محیط کشت یک محیط کشت غنی کننده است که استفاده از آن باعث افزایش بیومس سلولی به مقدار مناسب می‌شود در حقیقت تعداد سلول‌ها به میزانی رسیده است که بتوانند در فاز تولیدی در محیط اصلی مقدار بالایی آنزیم پروتئاز قلیایی تولید کنند. دوی و همکاران[12] در سال ۲۰۰۹، چی و همکاران در سال ۲۰۰۷ از محیط کشت محلول نشاسته به عنوان محیط القا کننده تولید آنزیم پروتئاز قلیایی به ترتیب توسط *آسپرژیلوس نایجر* و *آئروبازیدیوم پلولانس* استفاده کردند. در این پژوهش هم استفاده از محیط محلول نشاسته باعث القا تولید آنزیم قلیایی توسط *یاروویا لیپولیتیکا* شد. محیط کشتی که برای نخستین بار برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط مخمرها در این پژوهش استفاده شد، محیط ملاس چغندر بود ولی متأسفانه نسبت به محیط YPG براث که بالاترین تولید این آنزیم را داشت این محیط کشت، محیط تولیدی مناسبی نبود که به نظر می‌رسد کاهش تولید آنزیم به علت کاهش بیوماس سلولی که ناشی از غلیظ بودن محیط کشت و وجود مقادیر زیاد ترکیبات قندی است و همچنین، به علت نبود ترکیبات پروتئینی به عنوان القا کننده و وجود بیش از حد ترکیبات قندی که احتمالا نقش مهار کنندگی دارند، باشد. پس از محیط کشت YPG براث بیشترین تولید در محیط پپتون مشاهده شد. البته قبلاً این محیط توسط رانی و همکاران[13] در سال ۲۰۱۲، شافعی و همکاران در سال ۲۰۱۰ و چی و همکاران در سال ۲۰۰۷ به عنوان یک محیط کشت القا کننده تولید آنزیم پروتئاز قلیایی به ترتیب توسط *باسیلوس آلکالوفیلوس*[14]، *استرپتومایسس آلبیدوفلاووس*[15] و *آئروبازیدیوم پلولانس* گزارش شده بود و با توجه به بالا بودن میزان پروتئین و نبود ترکیبات قندی در محیط، القای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در این محیط امری بدیهی است. با توجه به این که جدایه مربوطه یعنی *یاروویا لیپولیتیکا* از پساب کارخانه‌های شهر اصفهان جدا شد، به نظر می‌رسد استفاده از سویه محلی می‌تواند در دستیابی به تولید بالای آنزیم پروتئاز قلیایی مفید واقع شود. همچنین، با توجه به غیر بیماری‌زا بودن سویه معرفی شده و تولید بالای آنزیم در این سویه می‌توان این سویه را به عنوان سویه صنعتی مناسب معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهش و فناوری و مدیریت تحصیلات تکمیلی واحد فلاورجان، دانشگاه آزاداسلامی برای حمایت‌های فنی و اجرایی تشکر و قدردانی می‌کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

(1) Aguilar CN., Gutierrez C., Rado B., Rodriguez PA., Martinez H. Perspective of solid state fermentation for production of food enzymes. *Biochemistry and Biotechnology* 2008; 4 (2): 354- 66.

(2) Akpinar O., Ucar F., Yalcin T. Screening and regulation of alkaline extracellular protease and ribonuclease production of *Yarrowia lipolytica* strains isolated and identified from different cheese in Turkey. *Annals of Microbiology* 2008; 61 (4):904- 15.

(3) Beheshti Maal K., Emtiazi G., Nahvi I. Production of alkaline protease by *Bacillus cereus* and *Bacillus polymixa* in new industrial culture mediums and its immobilization. *African Journal of Microbiology Research* 2009; 3 (9): 491- 97.

(4) Charles P., Devanathan V., Anbu P., Ponnus T., Wamy NM., Kalaichelvan TP., Hur KB. Purification characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Jornal of Basic Microbiology* 2008; 48 (4):347- 52.

(5) Chi Z., Ma C., Wang P., Li HF. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans. Journal of Bioresource Technology* 2007; 98 (5): 534- 38.

(6) Claudia I., Gonzalez L., Roman S., Sylvie B., Claude G. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica. Genetic Society of America* 2001; 23 (6): 417- 27.

(7) Davidow SL., Donnell MM., Kaczmarek SF., Pereiva AD., Dezeeum RJ., Franke EA. Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology* 1987; 169 (1):4621- 29.

(8) Devi MK., Banu AR., Gnanaprabhal GR., Pradeep BV., Palaniswamy M. Purification characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and compatibility with commercial detergent. *Indian Journal of Science and Technology* 2008; 1 (7): 250- 9.

(9) Gawel N.J., Jarret R.L. A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoae. *Plant Molecular Biology Reporter* 1991; 9 (3): 262- 6.

(10) Gupta R., Beg QK., Lorenz P. Bacterial alkaline protease molecular approaches and industrial applications. *Applied Biotechnology* 2002; 59 (2): 15- 32.

(11) Ibrahim ASS., Shayeb NMA., Mabrouk SS. Isolation and identification of alkaline protease production alkaliphilic bacteria from an Egyption soda lake. *Journal of Applied Science* 2007; 3 (8):1363- 8.

(12) Jacobs I., Eliasson M., Uhlen M., Flick J.I. Cloning sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic acid Research* 1985; 13 (7): 8913- 26.

(13) Lowry O.H., Rosebrough N., Farr A., Rundall R. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 1951; 193 (4): 265- 75.

(14) Nadeem M., Qazi J.I., Baij S., Syed Q.A. Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2. *Food Technology and Biotechnology* 2008; 46 (4): 388- 94.

(15) Nakamura T., Syukunobe Y., Sakurai T., Idota T. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. *Milchwissens Chaft* 1993; 48 (9): 11- 4.

www.SID.ir

Archive of SID

(16) Nelson G., Young W.T. Extracellular acid and alkaline protease from *Candida olea*. *Journal of General Microbiology* 1987; 133 (6):1461- 9.

(17) Rani R., Prasad N.N., Sambasivarao RK. Optimization of conditions for the production of alkaline protease from a mutant *Aspergillus flavus* AS.2. *Journal of Society of Applied Sciences* 2012; 3 (3): 565- 76.

(18) Rao MB., Tanksale AM., Ghatge MS., Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbial and Molecular Biology* 1988; 62 (9): 597- 635.

(19) Taylor M.M., Bailey D.G., Feairheller SH. A review of the use of enzyme in tannery. *Journal of American Leather Chemistry* 1987; 82 (5): 153- 65.

(20) Ventosa A., Quesada E., Rodriguz F., Ruiz B.F., Ramos C.A. Numirical taxonomy of moderately halophylic gram negative rods. *Journal of Microbiology* 1982; 12 (8): 281- 6.

[1]- Nelson and Young
[2]- Claudia et al.
[3]- *Yarrowia lipolytica*
[4]- Chi et al.
[5]- Qingdao
[6]- Akpinar et al.
[7]- Beheshti Maal et al.
[8]- Shafei et al.
[9]- Ibrahim et al.
[10]- Ventosa et al.
[11]- Davidow et al.
[12]- Devi et al.
[13]- Rani et al.
[14]- *Bacillus alcalophilus*
[15]- *Streptomyces albidoflavus*

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of alkaline protease production and optimization of culture medium by *Yarrowia lipolytica*

Mandana Lotfi
M.Sc. of Microbiology, Department of Microbiology Falavarjan Islamic Azad University, Isfahan, Iran, lotfi_m1367@yahoo.com
Keivan Beheshti Maal *
Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology Falavarjan Islamic Azad University, Isfahan, Iran, beheshtimaal@iaufala.ac.ir
Hashem Nayeri
Assistant Professor of Biochemistry, Department of Microbiology Falavarjan Islamic Azad University, Isfahan, Iran, nayeri@iaufala.ac.ir

Abstract

Introduction: Proteases are the most important industrial enzymes. These enzymes have gained much attention due to their industrial applications in eliminating the environmental pollutions and improving the industrial processes. The aims of this research were the isolation and identification of native yeasts that were able to produce the alkaline protease.

Materials and methods: Several samples of soil, water and wastewater were collected from various places. The culture media used for screening of yeast spp. with potential of alkaline protease production were alkaline peptone agar and alkaline milk agar. The alkaline protease activity in potential spp. was measured using Lowry method. The effects of different culture media on the production of alkaline protease by selected yeast isolates were determined. For molecular identification of the best isolate, the DNA extraction was performed and the PCR followed using universal *18s rDNA* primers.

Results: Among 27 isolates with the capability of alkaline protease production, one isolate with the most enzyme activity, 525 u/ ml, was selected for further processing. The best culture medium for alkaline protease production was YPG broth. The comparison of *18s rDNA* sequence from isolated yeast with the highest enzyme activity, with the genomic database available in Gen Bank, using BLAST software showed that our yeast isolate had the highest similarity with *Yarrowia lipolytica*.

Discussion and conclusion: According to numerous applications of alkaline proteases industrially and the lack of their production in our country, the native strains could be beneficial for their production. Regarding to non-pathogenicity and high productivity of alkaline protease by our isolated yeast, *Yarrowia lipolytica*, this isolate could be introduced as an amenable strain for industrial production of alkaline protease.

Key words: Alkaline Protease, Milk Agar, Peptone agar, *Yarrowia lipolytica*, Yeast

* Corresponding author
Received: February 20, 2014 / **Accepted:** June 25, 2014

www.SID.ir