Archive of SID

Optimization of recombinant laccase production by *Yarrowia lipolytica* in a medium containing glucose as carbon source with Taguchi method

Farshad Darvishi *
Associate Professor of Microbiology, University of Maragheh, Iran, f.darvishi@ymail.com
Marzie Moradi
M.Sc. of Microbial Biotechnology, University of Maragheh, Iran, marzie.moradi88@gmail.com
Catherine Madzak
Professor of Microbiology, University of Paris, France, catherin.madzak@grignon.inra.fr
Claude Jolivalt
Professor of Biochemical Engineering, University of Sorbonne, France, claud.jolivalt@upmc.fr

Abstract

Introduction: Laccases (EC 1.10.3.2; benzenediol: oxygen oxidoreductase) are copper-containing oxidases that use molecular oxygen to oxidize various aromatic and non-aromatic compounds. Laccase is applied in delignification of lignocellulosic compounds for production of bioethanol, bioremediation of industrial wastewaters especially textile, food industries, and making biosensors.

Materials and methods: The Taguchi experimental design method was used for optimization of laccase production in recombinant strain *Yarrowia lipolytica* YL4. A L-16 Taguchi orthogonal array was used to optimize the carbon and nitrogen sources along with vitamin in four levels.

Results: The results showed that glucose, ammonium chloride, yeast extract and thiamine have significant effects on the production of laccase, respectively. The laccase activity reached to 1.52 U/mL after optimization of medium which is 7.6-fold higher than un-optimized medium.

Discussion and conclusion: According to the analysis of results, the Taguchi experimental design method is a successful approach to increase laccase and recombinant proteins production in *Y. lipolytica*.

Key words: *Yarrowia lipolytica,* laccase, optimization, Taguchi experimental design method

* Corresponding author
Received: September 28, 2016 / **Accepted:** March 8, 2017

www.SID.ir

Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۵۶- ۴۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸

بهینه‌سازی تولید آنزیم لاکاز نوترکیب توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در محیط کشت حاوی گلوکز به عنوان منبع کربن با روش تاگوچی

فرشاد درویشی *: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه مراغه، ایران، f.darvishi@ymail.com
مرضیه مرادی: کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه مراغه، ایران، marzie.moradi88@gmail.com
کاترین مادزاک: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه پاریس، فرانسه، catherin.madzak@grignon.inra.fr
کلاد جولیت: استاد مهندسی بیوشیمی، دانشگاه سوربون، فرانسه، claud.jolivalt@upmc.fr

چکیده

مقدمه: لاکازها ازجمله آنزیم‌های اکسیداز حاوی مس هستند که اکسیژن مولکولی را برای اکسیدکردن ترکیبات مختلف آروماتیک و غیرآروماتیک استفاده می کنند. لاکاز در لیگنین‌زدایی ترکیبات لیگنوسلولزی برای تولید بیواتانول، زیست‌پالایی پساب‌های صنعتی به‌ویژه صنایع منسوجات و غذایی و همچنین ساخت زیست‌حسگرها به کار برده می‌شود.

مواد و روش‌ها: روش طراحی آزمایش تاگوچی برای بهینه‌سازی تولید لاکاز در سویه مخمر نوترکیب *یاروویا لیپولیتیکا* YL4 و آرایه متعامد شانزده‌تایی تاگوچی برای بهینه‌کردن منابع کربن و نیتروژن همراه با ویتامین در چهار سطح استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که به‌ترتیب گلوکز، کلریدآمونیوم، عصاره مخمر و تیامین روی تولید لاکاز اثر بسیاری دارند. فعالیت لاکاز پس از بهینه‌سازی محیط‌کشت به ۱/۵۲ واحد در میلی‌لیتر رسید که بیش از ۷/۶ برابر محیط‌کشت غیربهینه است.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس تجزیه وتحلیل نتایج، روش طراحی آزمایش تاگوچی رویکرد موفقی برای افزایش تولید لاکاز و پروتئین‌های نوترکیب در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* است.

واژه‌های کلیدی: *یاروویا لیپولیتیکا*، لاکاز، بهینه‌سازی، روش طراحی آزمایش تاگوچی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لاکاز (بنزودیول اکسیژن اکسیدوردوکتاز، EC 1.10.3.2) از آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز حاوی مس است که اکسیژن مولکولی را برای اکسیدکردن ترکیبات آروماتیک و غیرآروماتیک استفاده می‌کند (۱). لاکازها، گلیکوپروتئین‌های دایمر یا تترامری هستند که چهار اتم مس به ازای هر مونومر دارند (۲).

لاکاز در رنگ‌زدایی رنگ‌های صنعتی در پساب‌ها، اکسیداسیون و حذف ترکیبات فنلی و زنوبیوتیک‌ها کاربرد (۳ و ۴) و توانایی دپلیمریزه‌کردن لیگنین را دارد (۵). به‌تازگی، کاربرد لاکاز به‌عنوان کاتالیزور زیستی در سنتز ترکیبات آلی درخور توجه بسیار شده است و این آنزیم با داشتن توانایی پلیمریزه‌کردن مواد، در صنایع غذایی کاربرد دارد (۶). نخستین بار یوشیدا در سال ۱۸۸۳، لاکاز را در شیرابه درختان لاکی چینی یا ژاپنی کشف کرد که به وفور در بافت‌های گیاهان یافت می‌شود. شناسایی و خالص‌سازی لاکاز از عصاره گیاهی خام دشوار است و بنابراین، لاکازهای گیاهی کمتر شناخته و استفاده شده‌اند. لاکازهای قارچی بیشتر در بازیدیومایست‌ها و آسکومایست‌ها یافت می‌شوند (۷ و ۸).

یاررویا به خانواده همی‌آسکومایست‌ها تعلق دارد که در پژوهش‌های بنیادی و زیست‌فناوری طی دهه‌های گذشته به آن توجه شده است (۹ و ۱۰). سویه *یاررویا لیپولیتیکا* از محیط‌های مختلفی مانند محیط‌های غنی از لیپید یا محیط‌های دریایی و شور جداسازی و توانایی آن در تجزیه پروتئین‌ها و لیپیدها با تولید لیپازهای خارج‌سلولی و فعالیت‌های پروتئیولیتیکی به‌روشنی مشاهده شده است. بیشتر سویه‌های *یاررویا* در دماهای بیشتر از ۳۲ درجه سانتی‌گراد رشد نمی‌کنند و به‌شدت هوازی هستند (۱۱–۱۳). مخمر *یاررویا لیپولیتیکا* میزبان یوکاریوتی جذاب برای تولید پروتئین های هترولوگ است و گنجایش ترشحی زیادی برای پروتئین‌های هترولوگ و نوترکیب دارد (۱۴ و ۱۵).

طراحی آزمایش به یافتن ارتباط بین عوامل آزمایش‌شده و تولید محصول کمک می‌کند (۱۶). روش تاگوچی شامل طراحی سیستم، طراحی عامل و طراحی تعادل فرایندهاست تا فرایند به بهترین کیفیت محصول منتج شود. مزیت عمده روش تاگوچی استفاده از طراحی عوامل است که روشی مهندسی برای طراحی فرایند یا محصول با تمرکز روی تعیین عوامل است تا بهترین سطوح شاخص کیفیت را با حداقل خطا ایجاد کند. روش تاگوچی روشی کارا و قوی برای طراحی فرایندهایی است که به‌شکل مداوم و بهینه در شرایط گوناگون عمل می‌کنند (۱۷).

هدف پژوهش حاضر، بهینه‌سازی تولید آنزیم نوترکیب لاکاز در محیط کشت حاوی گلوکز (منبع کربن) توسط مخمر *یاررویا لیپولیتیکا* با روش تاگوچی است.

مواد و روش‌ها

ریزموجودات استفاده‌شده و نگهداری آنها: لاکاز قارچ پوسیدگی سفید *ترمتس ورسیکالر*[1] (lacIIIb) با همکاری گروه پژوهشی کاترین مادزاک[2] در مرکز ملی پژوهش‌های کشاورزی فرانسه (INRA) و کلاد جولیولت[3] در دانشگاه سوربون فرانسه با وکتور کامل بیانی/ترشحی بر پایه پروموتور هیبرید قوی در مخمر *یاررویا لیپولیتیکا* بیان شده است. میزان لاکازی که مخمر نوترکیب *یاررویا لیپولیتیکا* سویه YL4 تولید می‌کند، حدود ۰/۲ واحد در میلی‌لیتر گزارش شده است

www.SID.ir

Archive of SID

(۱۴ و ۱۸). سویه مخمر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون محیط کشت YPD (حاوی ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و پپتون در لیتر) به مدت ۶ ماه نگهداری می‌شود (۱۹).

سنجش فعالیت لاکاز: سنجش استاندارد فعالیت لاکاز با اندازه‌گیری اکسیداسیون آنزیمی ABTS[۴] در ۴۲۰ نانومتر (ε=۳/۶ ×۱۰^{۴}cm^{-1}M^{-1}) برای محصول اکسیدشده) انجام می‌شود (۱۸). برای تهیه محلول رویی حاوی آنزیم، ۱ میلی‌لیتر محیط‌کشت به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل به ۵۰ میکرولیتر ABTS ۱ میلی‌مولار در بافر سیتریک‌اسید/ هیدروژن‌فسفات‌دی‌سدیم (۰/۱ مولار با اسیدیته ۳) با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اشباع‌شده با هوا اضافه شد. سینتیک فعالیت آنزیم با دستگاه اسپکتروفتومتری طی ۱ دقیقه و در طول موج ۴۲۰ نانومتر بررسی شد. ۱ واحد در میلی‌لیتر (U/mL) فعالیت آنزیم، مقداری از آنزیم است که ۱ میکرومول از ABTS را طی ۱ دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اکسید می‌کند (۱۸).

سنجش میزان رشد: برای بررسی و اندازه‌گیری میزان رشد مخمرها از روش مستقیم شمارش با لام نئوبار استفاده شد (۲۰).

فرایند تخمیر تولید لاکاز در ارلن: ابتدا سویه مخمر در شرایط استریل روی محیط‌کشت YPD [۵] جامد کشت و برای مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس در شرایط استریل، یک کلنی به ۲۰ میلی‌لیتر محیط YPD مایع در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و دور چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، مایه تلقیح آماده شد. محیط‌کشت تولید لاکاز یعنی محیط‌کشت PPB[۶] (حاوی ۲۰ گرم گلوکز، ۰/۳۲ گرم عصاره مخمر، ۱/۳۲ گرم دی‌هیدروژن‌پتاسیم‌فسفات، ۱/۳۲ گرم کلریدآمونیم، ۰/۱۳۲ گرم سولفات‌منیزیم و ۰/۳۳۴ میلی‌گرم تیامین در لیتر) به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری به میزان ۱ درصد تلقیح شد. نمونه‌برداری برای شمارش سلول‌های مخمر و سنجش فعالیت لاکاز انجام شد و سپس ارلن‌های تلقیح‌شده به شیکر-انکوباتور با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و دور چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه منتقل شدند و در مدت ۷ روز، هر ۲۴ ساعت نمونه‌برداری برای بررسی میزان رشد مخمر و سنجش تولید لاکاز در شرایط استریل انجام شد (۱۸).

طراحی آزمایش به روش تاگوچی: برای طراحی آزمایش از نرم‌افزار Qualitek-4 (Nutek Inc., MI) استفاده شد. در این روش، ابتدا عامل و سطوح پیش‌بینی و وارد نرم‌افزار می‌شوند. پس از واردشدن نتایج آزمایش حاصل از سه تکرار، نرم‌افزار داده‌ها را با روش میانگین تجزیه و تحلیل و مقدار بهینه را برای عامل پیشنهاد می‌کند و بر اساس آن باید آزمایش تأییدی انجام شود. عامل اصلی پژوهش حاضر، مقدار گلوکز (منبع کربن)، عصاره مخمر و کلرید آمونیم (منابع نیتروژن) و ویتامین تیامین در چهار سطح بود که مقادیر در نرم‌افزار وارد شدند (جدول ۱) و بر اساس آنها، نرم‌افزار شانزده آزمایش را پیشنهاد کرد (جدول ۲). ۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت طبق جدول ۲، در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و اتوکلاو شد. در شرایط استریل، ۱ درصد مایع تلقیح از سویه مخمر به همه محیط‌ها اضافه شد. سپس ارلن‌ها به درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه منتقل شدند و هر ۲۴ ساعت طی ۷ روز در شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

استریل از ارلن‌ها نمونه‌برداری شد تا تعداد مخمرها و میزان تولید آنزیم بررسی شود. پس از انجام آزمایش‌ها، مطابق با آنچه نرم‌افزار با در نظرگرفتن سهم هر یک از عوامل در آزمایش در نظر می‌گیرد، مقدار سطوح بهینه هر عامل پیشنهاد می‌شود.

آزمایش‌ها برای سطوح مختلف منبع کربن (گلوکز)، منابع نیتروژن (کلریدآمونیم و عصاره مخمر) و ویتامین تیامین مشخص‌شده در جدول ۱ طراحی شده‌اند.

جدول ۱- عوامل و سطوح منتخب برای بهینه‌سازی به روش تاگوچی

عامل	سطح یک	سطح دو	سطح سه	سطح چهار
گلوکز	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰
کلریدآمونیم	۱	۲	۳	۴
عصاره مخمر	۱	۲	۳	۴
تیامین	۰	۰/۳	۰/۶	۰/۹

سطوح برای گلوکز، کلریدآمونیم، عصاره مخمر گرم بر لیتر و برای تیامین میلی‌گرم در لیتر است.

جدول ۲- آزمایش‌های طراحی‌شده (آرایه‌های متعامد M-16) به روش تاگوچی

شماره آزمایش	منبع کربن	کلریدآمونیم	عصاره مخمر	تیامین
آزمایش شماره ۱	۱	۱	۱	۱
آزمایش شماره ۲	۱	۲	۲	۲
آزمایش شماره ۳	۱	۳	۳	۳
آزمایش شماره ۴	۱	۴	۴	۴
آزمایش شماره ۵	۲	۱	۲	۳
آزمایش شماره ۶	۲	۲	۱	۴
آزمایش شماره ۷	۲	۳	۴	۱
آزمایش شماره ۸	۲	۴	۳	۲
آزمایش شماره ۹	۳	۱	۳	۴
آزمایش شماره ۱۰	۳	۲	۴	۳
آزمایش شماره ۱۱	۳	۳	۱	۲
آزمایش شماره ۱۲	۳	۴	۲	۱
آزمایش شماره ۱۳	۴	۱	۴	۲
آزمایش شماره ۱۴	۴	۲	۳	۱
آزمایش شماره ۱۵	۴	۳	۲	۴
آزمایش شماره ۱۶	۴	۴	۱	۳

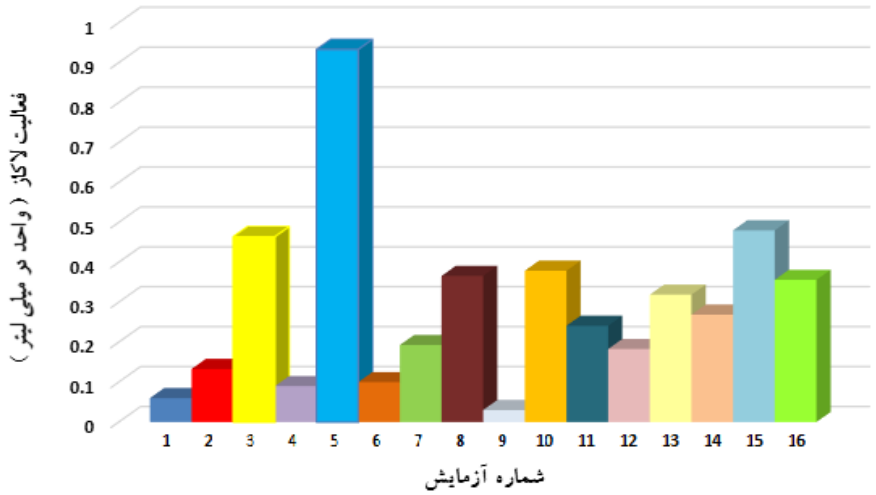
نتایج

برای بهینه‌سازی تولید لاکاز در محیط‌کشت PPB حاوی گلوکز، طراحی آزمایش به روش تاگوچی برای تعیین سطوح مناسب عوامل اصلی استفاده شد. در روش تاگوچی، چهار عامل گلوکز، عصاره مخمر، کلریدآمونیم و تیامین در چهار سطح، عوامل اصلی در نظر گرفته شدند (۱۸). اثر گلوکز به‌عنوان منبع کربن و عامل اول در محدوده ۵۰ تا ۲۰۰ گرم در لیتر (در چهار سطح ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در لیتر)، کلریدآمونیم و عصاره مخمر به‌عنوان منابع نیتروژن و به‌ترتیب عامل دوم و سوم در محدوده غلظت‌های ۱ تا ۴ گرم در لیتر (در چهار سطح ۱، ۲، ۳ و ۴ گرم در لیتر) و تیامین به‌عنوان ویتامین و عامل چهارم در محدوده ۰ تا ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر (در چهار سطح ۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر) روی تولید لاکاز بررسی شد. این عوامل و سطوح آنها به نرم‌افزار Qualiteck-4 وارد شدند و نرم‌افزار، شانزده آزمایش را پیشنهاد کرد. پس از ساخت محیط‌کشت‌ها و تلقیح و گذشت ۶ روز که زمان اوج تولید است، سنجش لاکاز انجام و نتایج به نرم‌افزار وارد شد. میزان تولید لاکاز برای شانزده آزمایش پیشنهادی نرم‌افزار پس از شش روز در شکل ۱ دیده می‌شود.

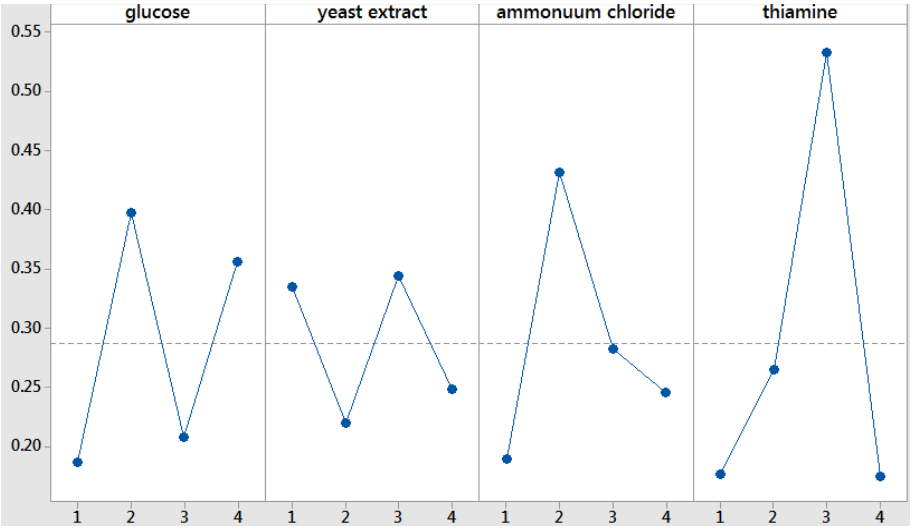
نتایج آزمایش‌ها با نرم‌افزار تجزیه و تحلیل و مطابق شکل ۲ مشخص شد که سطح دو گلوکز (۱۰۰ گرم در لیتر)، سطح دو عصاره مخمر (۲ گرم در لیتر)، سطح سه کلریدآمونیم (یعنی ۳ گرم در لیتر) و سطح سه تیامین (۰/۶ میلی‌گرم در لیتر)، سطوح مناسب چهار عامل مؤثر در محیط‌کشت برای تولید لاکاز هستند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- نتایج تولید لاکاز برای شانزده آزمایش طراحی‌شده به روش تاگوچی در محیط PPB حاوی گلوکز پس از ۶ روز



شکل ۲- اثر اصلی تغییر سطح هر یک از عوامل بر روند بهینه‌سازی تولید لاکاز توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* سویه YL4

جدول ۳، تأثیر هر سطح از هر عامل را بر تولید بهینه لاکاز در سویه یادشده نشان می‌دهد؛ مطابق این جدول، برهم‌کنش گلوکز و کلریدآمونیم با ۵۰ درصد اثر، بیشترین تأثیر را بر تولید لاکاز داشته است و پس از آن، اثر برهم‌کنش کلریدآمونیم و عصاره مخمر با مقدار ۴۶ درصد در جایگاه دوم قرار دارد. برهم‌کنش گلوکز و عصاره مخمر اثری برابر ۴۲ درصد، برهم‌کنش عصاره مخمر و تیامین ۱۲ درصد تأثیر و در نهایت، برهم‌کنش گلوکز و تیامین با ۵/۵ درصد کمترین تأثیر را بر تولید لاکاز دارند.

جدول ۳- برهم‌کنش چهار عامل گلوکز، کلریدآمونیم، عصاره مخمر و تیامین بر تولید لاکاز

شماره	عوامل برهمکنش‌دهنده	ستون‌ها	درصد اهمیت
۱	گلوکز×کلرید آمونیم	۱×۲	۵۰/۱۶
۲	کلریدآمونیم×عصاره مخمر	۲×۳	۴۶/۵۱
۳	گلوکز×عصاره مخمر	۱×۳	۴۲/۰۸
۴	کلریدآمونیم×تیامین	۲×۴	۲۱/۸۷
۵	عصاره مخمر×تیامین	۳×۴	۱۲/۷۹
۶	گلوکز×تیامین	۱×۴	۵/۵۳

www.SID.ir

Archive of SID

روش تاگوچی، بهینه‌سازی پیچیده فرایندهای زیستی را تسهیل و به‌آسانی اثر هر عامل را بر پایه رابطه بین متغیرها و شرایط بهینه شناسایی می‌کند. پس از مشخص‌شدن عوامل اصلی و سطوح مناسب آنها، نرم‌افزار آزمایشی را برای بیشترین تولید لاکاز پیشنهاد کرد؛ در طرح پیشنهادی مقدار گلوکز ۱۰۰گرم در لیتر، کلریدآمونیم ۳ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۲ گرم در لیتر و تیامین ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد. بهینه‌سازی محیط تخمیر برای رشد بهینه میکروبی و افزایش تولید آنزیم انجام می‌شود (۲۱). نرم‌افزار، بیشترین مقدار تولید آنزیم لاکاز مورد انتظار را ۰/۸۴۳ واحد در میلی‌لیتر پیش‌بینی کرده بود؛ با انجام آزمایش بر اساس عوامل و سطوحی که نرم‌افزار پیشنهاد کرد، تولید لاکاز به ۱/۵۲ واحد در میلی‌لیتر رسید که میزان تولید نسبت به محیط‌کشت PPB غیربهینه، ۷/۶ برابر شد.

بحث و نتیجه‌گیری

سینگهال و همکاران از روش تاگوچی برای بهینه‌سازی تولید لاکاز در قارچ *کریپتوکوکوس آلبیدوس* استفاده کردند. مقادیر تعیین‌شده نرم‌افزار برای اسیدیته به میزان ۶، گلوکز (منبع کربن) به مقدار ۰/۱ درصد، پپتون گوشت (منبع نیتروژن) به مقدار ۰/۵ درصد، سولفات‌مس به مقدار ۲ میلی‌مول بر لیتر و مایع تلقیح به مقدار ۱ درصد بود. پس از بهینه‌سازی، میزان تولید لاکاز به ۲ واحد در میلی‌لیتر افزایش یافت. مایع تلقیح با حدود ۵۲ درصد، بیشترین تأثیر و اسیدیته با مقدار ۷ درصد، کمترین تأثیر را بر تولید لاکاز داشتند (۲۲).

در مطالعه دیگری شرایط کشت غوطه‌ور برای اینکه سویه *تریکودرما آسپرلوم*، لاکاز تولید کند با آرایه‌های متعامد تاگوچی بهینه‌سازی شد. عوامل اسیدیته، گلوکز، سبوس گندم، سیترات‌آمونیم، میزان مایع تلقیح، عصاره مخمر، سولفات‌مس و محلول نمک‌های معدنی در سطوح آرایه‌های متعامد در طراحی آزمایش‌ها انتخاب شدند. نرم‌افزار Qualitek-4، هجده مجموعه آزمایش را طراحی کرد که شرایط بهینه پیش‌بینی‌شده نرم‌افزار اسیدیته ۴/۵، گلوکز ۱ درصد وزن بر حجم، سبوس گندم ۲ درصد وزن بر حجم، سیترات‌آمونیم ۰/۰۲ درصد، مایع تلقیح ۵ درصد، عصاره مخمر ۱ درصد، سولفات‌مس ۰/۵ میلی‌مولار و محلول نمک‌های معدنی ۱۵ درصد بود؛ با این شرایط بهینه پیش‌بینی‌شده، میزان تولید لاکاز به اندازه ۵۶/۷۶ درصد افزایش یافت (۲۳).

پاتل و همکاران، اهمیت منابع کربن و نیتروژن و تأثیر آنها بر تولید لاکاز توسط سویه *پلوروتوس آستریتوس* را بررسی کردند. تأثیر منابع کربن و نیتروژن بر میزان لاکازی که قارچ‌های تولیدکننده لاکاز تولید می‌کنند، اهمیت بسیاری دارد. پژوهش‌های بسیاری درباره اهمیت نوع و غلظت منابع نیتروژن با هم توافق دارند و این پارامتر تنظیم‌کننده قوی در تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنین توسط بازیدیومایست‌های پوسیدگی چوب است. غلظت‌های متفاوت کربن، میزان فعالیت لاکاز مختلفی را نشان می‌دهند؛ زمانی بیشترین فعالیت لاکاز به میزان ۳ واحد در میلی‌گرم حاصل شد که گلوکز به میزان ۱ درصد در محیط وجود داشت. غلظت‌های استفاده‌شدنی نیتروژن در محیط، آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنین را تنظیم می‌کنند؛ سطح کم نیتروژن، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنین را تحریک و سطح زیاد نیتروژن، تولید را محدود می‌کند. پژوهش‌های مشابه درباره غلظت نیتروژن، نتایج گفته‌شده را تأیید می‌کنند (۲۴). در پژوهش حاضر، گلوکز (منبع کربن) و عصاره مخمر و کلریدآمونیوم (منابع نیتروژن) و تیامین (ویتامین و تحریک‌کننده رشد) برای افزایش تولید لاکاز نوترکیب توسط مخمر *یاررویا لیپولیتیکا* بهینه شدند و نتایج برای بهینه‌سازی و افزایش پروتئین‌های نوترکیب با سیستم بیانی مخمر *یاررویا لیپولیتیکا* استفاده می‌شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

(1) Hou H., Zhou J., Wang J., Du C., Yan B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 2004; 39(11): 1415-1419.

(2) Dwivedi UN., Singh P., Pandey VP., Kumar A. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2011; 68(2): 117-128.

(3) Kunamneni A., Plou FJ., Ballesteros A., Alcalde M. Laccases and their applications: A patent review. *Recent Patents on Biotechnology* 2008; 2(1): 10-24.

(4) Mougin C., Jolivalt C., Briozzo P., Madzak C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters* 2003; 1(2): 145-148.

(5) Pannu JS., Kapoor RK. Microbial laccases: A mini-review on their production, purification and applications. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive* 2014; 3(12): 528-236.

(6) Shraddh A., Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A. Laccase: Microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. *Enzyme Research* 2011; 2011: 1-11.

(7) Strong PJ., Claus H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2011; 41(4): 373-434.

(8) Madzak C., Otterbein L., Chamkha M., Moukha S., Asther M., Gaillardin C., et al. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 2005; 5(6-7): 635-646.

(9) Darvishi F., Hosseini B. Effect of olive oil with different purity grades on *Yarrowia lipolytica* lipase production. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 13: 35-42.

(10) Madzak C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015; 99(11): 4559-4577.

(11) Flagfeldt DB., Siewers V., Huang L., Nielsen J. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2009; 26(10): 545-551.

(12) Darvishi Harzevili F. Biotechnological applications of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Springer* Berlin Heidelberg 2014; 1-77.

(13) Darvishi F., Hosseini B. Investigation the effect of olive oil feeding strategies on *Yarrowia lipolytica* lipase production. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 15: 1-8.

(14) Theerachat M., Emond S., Cambon E., Bordes F., Marty A., Nicaud JM., et al. Engineering and production of laccase from trametes versicolor in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 2012; 125: 267-74.

(15) Madzak C., Gaillardin C., Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: A review. *Journal of Biotechnology* 2004; 109(2): 63-81.

(16) Myers WR., Montgomery DC. Response surface methodology. *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics* 2003, 1: 858-869.

(17) Semioshkina N., Voigt G. An overview on Taguchi method. *Journal of Radiation Research* 2006; 47(2): 11-18.

(18) Madzak C., Mimmi MC., Caminade E., Brault A., Baumberger S., Briozzo P., et al. Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein Engineering, Design and Selection* 2005; 19(2): 77-84.

www.SID.ir

Archive of SID

(19) Bergman LW. Growth and maintenance of yeast. *Methods in Molecular Biology* 2001; 177: 9-14.

(20) Darvishi F., Destain J., Nahvi I., Thonart P., Zarkesh-Esfahani H. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. *New Biotechnology* 2011, 28(6): 756-760.

(21) Periasamy R., Palvannan T. Optimization of laccase production by *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology. *Journal of Basic Microbiology* 2010; 50(6): 548-556.

(22) Singhal A., Choudhary G., Thakur IS. Optimization of growth media for enhanced production of laccase by Cryptococcus albidus and its application for bioremediation of chemicals. *Journal of Civil Engineering* 2009; 36(7): 1253-1264.

(23) Sabarathinam S., Jayaraman V., Balasubramanian M., Swaminathan K. Optimization of culture parameters for hyper laccase production by *Trichoderma asperellum* by Taguchi design experiment using L-18 orthogonal array. *Malaya Journal of Biosciences* 2014; 1(4): 214-225.

(24) Patel H., Gupte A., Gupte S. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources* 2009; 4(1): 268-284.

[1]- *Trametes versicolor*
[2]- Catherine Madzak
[3]- Claude Jolivalt
[4]- [2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] or ABTS
[5]- Yeast extract peptone dextrose (YPD)
[6]- Protein production broth (PPB)

www.SID.ir