مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی، شناسایی و بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط مخمر *کاندیدا ویسواناتی*

ماندانا لطفی[۱]، کیوان بهشتی مآل[۱]، هاشم نیری[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران.

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۲/۷/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۱۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۲/۲۰

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1392; 7(4): P 36-42

نویسنده مسئول:

کیوان بهشتی مآل

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران.

تلفن:: ۰۳۱۱۷۴۲۰۱۳۵

پست الکترونیک:

Beheshtimaal@iaufala.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: پروتئازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند که تقریباً ۶۰٪ فروش آنزیم دنیا به آن‌ها اختصاص دارد. از این میان پروتئازهای قلیایی بیشترین کاربرد را در صنعت دارند. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی مخمر بومی مولد آنزیم پروتئاز قلیایی و بررسی اثر شرایط مختلف در تولید این آنزیم بود.

مواد و روش کار: نمونه‌گیری از پساب کارخانه‌های مختلف در شهر اصفهان انجام شد. به منظور غربال‌گری گونه مولد آنزیم پروتئاز قلیایی سنجش آنزیم به روش لوری برای همه جدایه ها انجام شد و در مرحله بعدی اثر غلظت‌های مختلف یک منبع نیتروژن، pH، دما و در نهایت اثر سرعت‌های هوادهی مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی مورد بررسی و سنجش قرار گرفت و سپس به‌منظور شناسایی مولکولی جدایه، PCR انجام شد.

یافته‌ها: از میان باکتری های جداسازی شده، *کاندیدا ویسواناتی* برای مراحل بعدی انتخاب شد. حداکثر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در غلظت ۰/۵٪ نیترات سدیم، pH=۸، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و سرعت هوادهی ۲۰۰ rpm مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نیاز فراوان به آنزیم‌های صنعتی در کشور و فعالیت بالای آنزیم پروتئاز قلیایی تولیدی توسط سویه معرفی‌شده، به نظر می‌رسد استفاده از سویه‌های محلی می‌تواند در دستیابی به تولید بالای آنزیم پروتئاز قلیایی و بی‌نیازی کشور به واردات این محصول مؤثر واقع شود.

کلمات کلیدی : پروتئاز قلیایی، PCR، نیترات سدیم، *کاندیدا ویسواناتی*.

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

پروتئازها یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند و کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف ازجمله صنعت نساجی، داروسازی، چرم‌سازی و دباغی، شوینده‌های صنعتی، تولید الکل و آبجو، نانوایی و شیرینی‌پزی و ... دارند. پروتئازها را بر اساس تفاوت آن‌ها در شرایط بهینه برای فعالیت ویژه، سوبسترا، pH، دما، پایداری، جایگاه فعال و مکانیسم‌های کاتالیتیکی تقسیم‌بندی می‌کنند (۱). بر اساس pH مناسب برای فعالیت، پروتئازها به سه دسته پروتئاز های اسیدی، پروتئاز های خنثی و پروتئاز های قلیایی تقسیم می‌شوند. حداکثر فعالیت پروتئاز های اسیدی در pH ۲ تا ۶، پروتئازهای خنثی در pH ۶/۵ تا ۷/۵، پروتئازهای قلیایی در pH ۸ تا ۱۱ است. میکروارگانیسم‌های صنعتی اخیراً به عنوان منبع غنی برای سنتز و جداسازی آنزیم‌های صنعتی مطرح‌شده‌اند و حدود ۹۰٪ از آنزیم‌های صنعتی امروزه توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. میکروارگانیسم‌های مختلفی قادر به تولید آنزیم پروتئاز قلیایی هستند که در بین آن‌ها مخمرها شامل *آئروبازیدیوم پلولانس* (۲)، *کاندیدا اوله آ* (۳)، *یاروویا لیپولیتیکا* (۴،۵) و علاوه بر مخمرها، باکتری‌ها شامل: باسیلوس ها (۶،۷) و قارچها شامل: آسپرژیلوس ها (۱،۸،۹) اصلی‌ترین تولیدکنندگان این آنزیم هستند. در حال

حاضر اطلاعات کمی مربوط به تولید و فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی توسط مخمرها وجود دارد. با توجه به مزایایی که مخمرها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم پروتئاز قلیایی دارند شامل اندازه بزرگ مخمرها که سبب تسهیل جداسازی مخمرها از مایع تخمیری می‌شود، امکان به دست آوردن مخمرها از مکان‌های مختلف و همچنین تولید خارج سلولی آنزیم پروتئاز قلیایی توسط اکثر مخمرها و با توجه به این‌که در کشور ایران در رابطه با تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط مخمرها هنوز در این زمینه تحقیقی صورت نگرفته است. شایسته است این روند تحقیقات در ارتباط با تولید آنزیم پروتئاز قلیایی ادامه یابد و در جهت تکمیل این تحقیقات عمل شود تا زمینه بومی‌سازی تکنولوژی استخراج این آنزیم در مقیاس صنعتی از مخمر در آینده مهیا گردد. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی مخمر بومی مولد آنزیم پروتئاز قلیایی و بررسی اثر شرایط مختلف در تولید این آنزیم بود.

مواد و روش‌ها:

جداسازی مخمرها از پساب:

به‌منظور جداسازی گونه‌های مختلف مخمر، نمونه‌های پساب از ۱۶ کارخانه مختلف شامل کارخانه‌های شیر و لبنیات، رب گوجه‌فرنگی، مربا، بیسکوئیت سازی، کیک و نوشابه، قند، سوسیس و کالباس، سالاد الویه، ماکارونی، کمپوت سازی، بستنی‌سازی، گز و پولکی و شرکت نفت استان اصفهان (اصفهان) و کارخانه‌های قند، شیر و لبنیات و بیسکوئیت سازی استان چهارمحال و بختیاری (شهرکرد) در ظروف استریل جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و سری رقت تهیه شد سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-4} و 10^{-5} cfu/ml به پلیت YPG آگار (عصاره مخمر ۱۰g/l، گلوکز ۲۰g/l، پپتون ۲۰g/l، تکمیل‌شده با ۰/۰۵٪ کلرامفنیکل) اضافه و به روش کشت چمنی کشت داده شدند و پس‌ازآن به مدت ۳ تا ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند (۲).

بررسی کلنی‌ها و خالص‌سازی:

به‌منظور بررسی کلنی‌ها رنگ‌آمیزی ساده با استفاده از رنگ متیلن بلو انجام شد و خصوصیات کلنی‌های رشد کرده نظیر اندازه، مورفولوژی از بالا، از نیم‌رخ، رنگ و حالت آن‌ها موردبررسی قرار گرفت و هرکدام از کلنی‌های متفاوت با استفاده از روش کشت خطی بر روی محیط‌های YPG آگار دیگری خالص شدند.

روش سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی:

بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی با روش رنگ سنجی لوری صورت گرفت. ابتدا مقدار ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع میکروبی با سرعت ۲۵۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی حاوی آنزیم، برداشته و به این محلول آنزیمی، مقدار ۱ میلی‌لیتر سوبسترا یا همان محلول کازئین ۲٪با pH قلیایی ۱۱ اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس 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 سلسیوس سانتریفیوژ گردید، سپس به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (Na_2CO_3) ۰/۴ مولار و ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیو کالتوس فنل با رقت ۰/۱ اضافه کرده و لوله مذکور برای انجام واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی ۴۰ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی قرار داده شد. سپس دانسیته نوری (OD) محلول در طول‌موج ۶۶۰ نانومتر خوانده شد و از روی منحنی استاندارد، مقدار L-تیروزین آزادشده برحسب میکروگرم (µg) اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم محاسبه شد (۱۰). بنا به تعریف یک واحد فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی مقدار آنزیمی است که بتواند از سوبسترای کازئین یک میکروگرم L-تیروزین در مدت واکنش (۱۰ دقیقه) و تحت شرایط آزمایش (دمای ۴۰ درجه سلسیوس) آزاد نماید و واحد آن در میلی‌لیتر و در زمان ۱۰ دقیقه محاسبه می‌شود (U/ml/10min).

رسم منحنی استاندارد فعالیت آنزیم:

محلول‌های حاوی ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (µg/ml) L-تیروزین تهیه شد و سنجش آنزیم به روش لوری انجام و منحنی استاندارد رسم شد. برای رسم منحنی استاندارد OD برحسب مقدار L- تیروزین (µg) از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد و با توجه به مقادیر ثابت و متغیر داده‌شده از کامپیوتر معادله خط هم‌بستگی محاسبه شد. تبدیل مقادیر OD به مقدار L- تیروزین برحسب میکروگرم در

تمامی آزمایش‌های آینده با استفاده از این منحنی استاندارد و معادله خط همبستگی آن صورت گرفته است (۱۱).

تعیین گونه برتر مخمری مولد آنزیم پروتئاز قلیایی

به‌منظور تعیین جدایه مولد آنزیم پروتئاز قلیایی از محیط کشت YPG براث استفاده شد. از هرکدام از جدایه ها کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه و تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ عدد مخمر به ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPG براث منتقل شد. ارلن ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند و سپس فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در آن با استفاده از روش لوری اندازه‌گیری و جدایه مخمری که بیشترین فعالیت آنزیمی را داشت برای مراحل بعدی انتخاب شد.

بررسی اثر pH های اولیه مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی:

برای انجام این آزمایش محیط‌های مایع YPG براث با pH های ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ ساخته شد. پس از عمل تلقیح محیط کشت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با سرعت هوادهی۱۰۰ rpm قرار گرفتند. سپس از هر محیط نمونه‌گیری شد و فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در آن با استفاده از روش لوری مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۲).

بررسی اثر دماهای مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی:

دماهایی که در این آزمایش موردبررسی قرار گرفت شامل دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سلسیوس بود. بعد از ۷۲ ساعت از هر محیط نمونه‌گیری شد و فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در آن با استفاده از روش لوری مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۳).

بررسی اثر سرعت‌های هوادهی مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی:

برای انجام این آزمایش سرعت‌های هوادهی ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ دور بر دقیقه موردبررسی قرار گرفت. پس از طی شدن زمان انکوباسیون فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی تحت عمل سنجش آنزیمی به روش لوری قرار می‌گرفتند (۱۴).

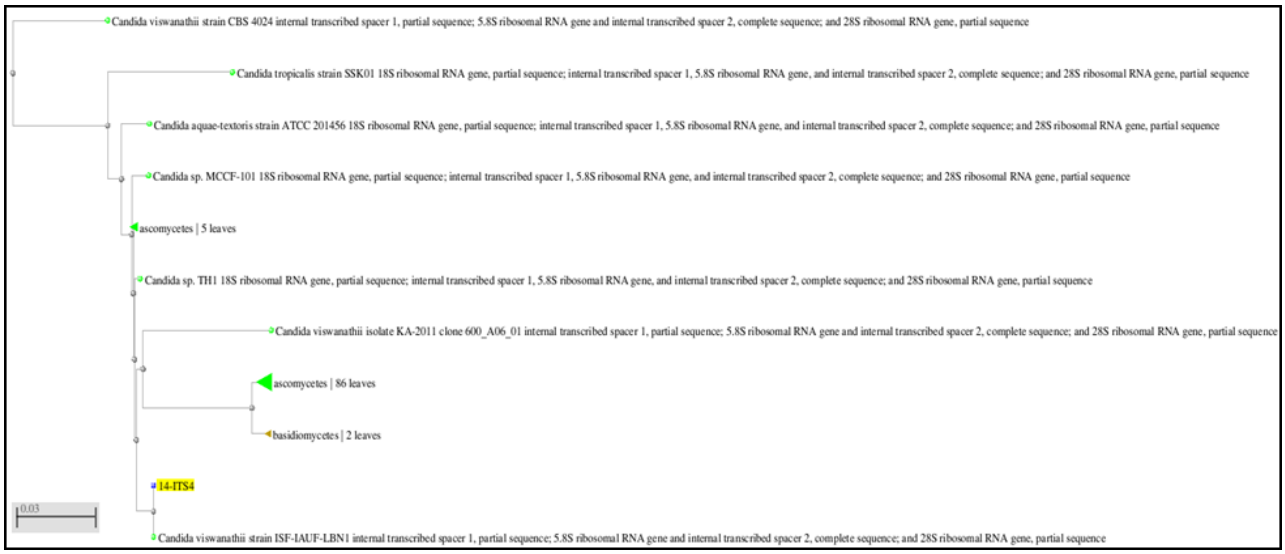
بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیترات سدیم در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی:

به محیط کشت پایه YPG براث غلظت‌های مختلف نیترات سدیم شامل ۰/۰۲۵٪، ۰/۵٪، ۱٪ و ۲٪ اضافه شد. پس از عمل تلقیح محیط کشت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس از هر محیط نمونه‌گیری شد و فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در آن با استفاده از روش لوری مورد ارزیابی قرار گرفت (۲).

شناسایی مولکولی

بافر استخراج حاوی ۲۰g/l پودر CTAB، Tris-HCl۱۰g/l با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، NaCl۱۰g/l با غلظت ۱/۴ مولار، EDTA ۵ g/l با غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار و ۲ میکرولیتر مرکاپتواتانول بود. ۱ میلی‌لیتر از بافر با ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع حاوی مخمر ترکیب و به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت سپس نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند و به محلول رویی ۶۰۰ میکرولیتر مخلوط ایزوآمیل الکل و کلروفرم با نسبت ۱:۲۴ افزوده شد 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 دولایه در مخلوط ایجاد شد. لایه رویی به لوله دیگری منتقل شد و به اندازه هم‌حجم آن ایزوپروپانول سرد افزوده شد. مخلوط به آرامی تکان داده شد و به مدت ۱ ساعت در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مولکول‌های DNA دو بار با الکل اتانول ۷۰٪ شستشو داده شدند و هر دو بار به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوبات در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند تا خشک شوند. DNA حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد (۱۵). در این تحقیق از آغازگرهای یونیورسال ITS4 و ITS1به ترتیب به عنوان آغازگرهای سنس و آنتی سنس استفاده شد. توالی آغازگر یونیورسال برای ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 و برای ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' می‌باشد (۱۶). مراحل زمانی PCR شامل دمای واسرشت ابتدایی ۹۴ درجه سلسیوس ۲ دقیقه، دمای واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس ۴۵

ثانیه، دمای اتصال ۵۶ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس ۷۰ ثانیه و دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سلسیوس ۸ دقیقه بود. وزن محصول PCR، ۶۰۰bp به دست آمد. به منظور تعیین توالی، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به میکروتیوب های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید و به هر میکروتیوب ۱۵ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. همچنین ۱۰ میکرولیتر از آغازگرهای سنس و آنتی سنس هم به‌طور جداگانه به میکروتیوب های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و به منظور تعیین توالی برای شرکت تکاپوزیست، تهران ارسال گردیدند. توالی‌ها بعد از دریافت، توسط نرم‌افزار Finch TV و Mega 4 با توالی‌های موجود در پایگاه جهانی ژن (Gen Bank) و با استفاده از نرم‌افزار BLAST مقایسه شدند و نوع مخمرها در سطح گونه مشخص شد.



شکل ۱: درخت فیلوژنی جدایه ۱۴

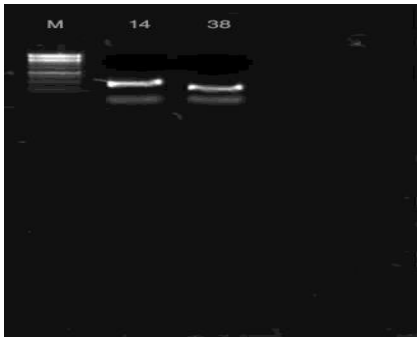
یافته‌ها

تعیین برترین مخمر مولد آنزیم پروتئاز قلیایی:

از مجموع ۳۵ جدایه مخمری جداسازی شده از پساب کارخانه‌های مختلف، جدایه جداسازی شده از پساب کارخانه تهیه رب گوجه و مربا (جدایه ۱۴) با فعالیت آنزیمی معادل (u/ml ۳۸۰) بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان داد و برای مراحل بعدی انتخاب شد.

شناسایی مولکولی:

مقایسه توالی 18srDNA مخمر جداشده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی با استفاده از نرم‌افزار BLAST انجام شد و مخمر موردنظر بر اساس آنالیز توالی ژنومی 18SrDNA شناسایی شد. جدایه حداکثر تشابه را به میزان ۹۹٪ با *کاندیدا ویسواناتی* نشان داد (اشکال ۱ و ۲).

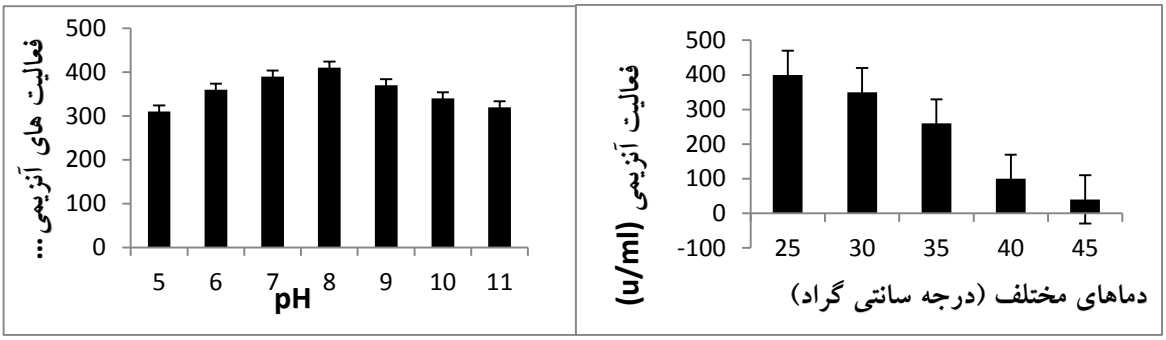


شکل ۲: DNA تکثیرشده جدایه ۱۴ با استفاده از پرایمر *18srDNA*

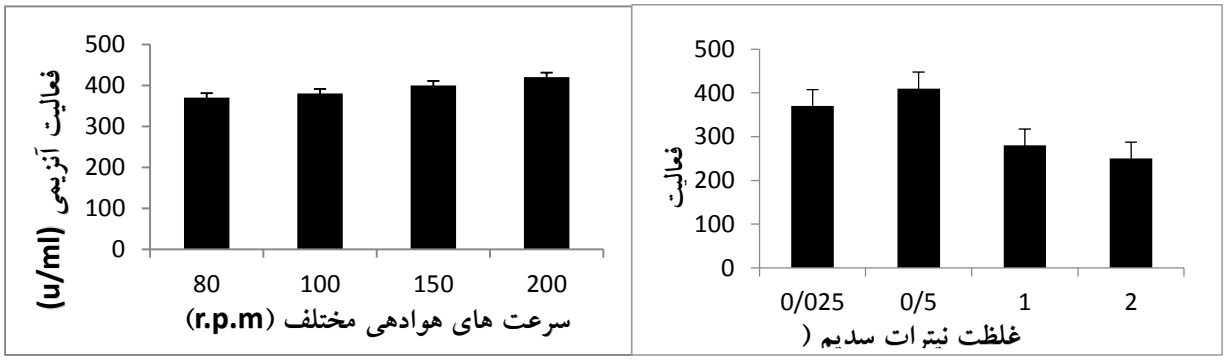
اثر شرایط مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی:

فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی توسط مخمر *کاندیدا ویسواناتی* در محیط‌های با pH ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ به ترتیب معادل (u/ml) ۳۱۰، (u/ml) ۳۶۰، (u/ml) ۳۹۰، (u/ml) ۴۱۰، (u/ml) ۳۷۰، (u/ml) ۳۴۰ و (u/ml) ۳۲۰، در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سلسیوس به ترتیب معادل (u/ml) ۴۰۰، (u/ml) ۳۵۰، (u/ml) ۲۶۰، (u/ml) ۱۰۰، (u/ml) ۴۰، در سرعت‌های هوادهی ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ دور بر دقیقه معادل

(u/ml) ۳۷۰، (u/ml)۳۸۰، (u/ml)۴۰۰ و (u/ml) ۴۲۰ و در غلظت‌های ۰/۰۲۵٪، ۰/۵٪ ، ۱٪ و ۲٪ نیترات سدیم به ترتیب معادل (u/ml) ۳۷۰، (u/ml)۴۱۰، (u/ml)۲۸۰ و (u/ml) ۲۵۰ اندازه‌گیری شد (اشکال ۳-۶).



شکل ۳ (سمت چپ): مقایسه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *کاندیدا ویسواناتی* در pH های مختلف در زمان حداکثر تولید (۷۲ ساعت)،
شکل ۴ (سمت راست): مقایسه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از حاصل از *کاندیدا ویسواناتی* در دماهای مختلف پس از ۷۲ ساعت (زمان حداکثر تولید)



شکل۵ (سمت چپ) مقایسه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *کاندیدا ویسواناتی* در سرعت‌های هوادهی مختلف پس از ۷۲ ساعت (زمان حداکثر تولید) و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس
شکل ۶ (سمت راست) مقایسه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *کاندیدا ویسواناتی* در غلظت‌های مختلف نیترات سدیم پس از ۷۲ ساعت (زمان حداکثر تولید) و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس

بحث

اکثر آزمایش‌ها و تحقیقاتی که در زمینه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی انجام‌گرفته با استفاده از سویه‌های استاندارد و آماده بوده است. به‌عنوان مثال Nelson و همکاران در سال ۱۹۸۷ تولید آنزیم خارج سلولی پروتئاز قلیایی توسط مخمر *کاندیدا اوله* آ را بررسی کردند (۳). Claudia و همکاران در سال ۲۰۰۱ کنترل ژنتیکی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی را در سویه‌های موتانت *یاروویا لیپولیتیکا* مورد ارزیابی قراردادند (۱۶). *کاندیدا ویسواناتی* از پساب کارخانه‌های شهر اصفهان جداسازی شد. این تحقیق اولین گزارش از تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *کاندیدا ویسواناتی* در جهان است. Akpinar و همکاران در سال ۲۰۱۱، Claudia و همکاران در سال ۲۰۱۱ حداکثر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *یاروویا لیپولیتیکا* را در pH ابتدایی ۹ گزارش کردند و علت این امر را مهار شدن ژن کد کننده آنزیم پروتئاز اسیدی و القای ژن تولیدکننده آنزیم پروتئاز قلیایی در محیطی با شرایط قلیایی دانستند (۱۲، ۱۶). شایان ذکر است که مخمرها و قارچهایی هم که آنزیم پروتئاز اسیدی تولید نمی‌کنند در شرایط کمی قلیایی میزان تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در آن‌ها افزایش می‌یابد، برای مثال Runny و همکاران در سال ۲۰۱۱ حداکثر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *آسپرژیلوس فلاووس* را در pH =۸/۵ ثبت کردند، Chi و همکاران در سال ۲۰۰۷ حداکثر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *آئروبازیدیوم پلولانس* را در pH ۹ گزارش کردند (۸،۲). البته با توجه به این‌که قارچها و مخمرها محیط‌های خنثی تا اندکی اسیدی را برای رشد و متابولیسم ترجیح می‌دهند و همچنین ازآنجایی که pH های شدیداً قلیایی

باعث رسوب کردن نمک‌ها و املاح ضروری برای رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود در pH های ۱۰، ۱۱ و ۱۲ کاهش چشم‌گیری در رشد و تولید آنزیم پروتئاز قلیایی مشاهده می‌شود. در این تحقیق هم حداکثر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در pH های ابتدایی اندکی قلیایی مشاهده شد که به نظر می‌رسد علت این امر القای ژن کد کننده آنزیم پروتئاز قلیایی و مهار ژن کد کننده آنزیم پروتئاز اسیدی در محیطی اندکی قلیایی باشد. Afifi و همکاران در سال ۲۰۱۳ مناسب‌ترین دمای انکوباسیون برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط پنی *سیلیوم کریزوژنوم* را ۳۰ درجه سلسیوس گزارش کردند (**۱۷**). Charles و همکاران در سال ۲۰۰۸ مناسب‌ترین دمای انکوباسیون برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *آسپرژیلوس نیدولانس* HA-۱۰ را، ۳۵ درجه سلسیوس گزارش کردند (**۱**). در این آزمایش مناسب‌ترین دمای انکوباسیون برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *کاندیدا ویسواناتی*، ۲۵ درجه سلسیوس به دست آمد. با توجه به این‌که گونه مخمری *کاندیدا ویسواناتی* از پساب کارخانه تقریباً با همین دما جداسازی شد نتایج به‌دست‌آمده دور از انتظار نبود. Abdonaser در سال ۲۰۰۹ بهترین سرعت هوادهی برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی را ۲۰۰ دور در دقیقه گزارش کردند (**۲۰**). در تحقیق حاضر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در سرعت هوادهی ۲۰۰ دور در دقیقه به حداکثر خود رسید. به دلیل این‌که مخمرها شدیداً هوازی هستند افزایش سرعت هوادهی باعث افزایش بیوماس سلولی می‌شود و بنابراین هر چه مقدار میکروارگانیسم در واحد حجم بیشتر باشد مقدار تولید آنزیم پروتئاز قلیایی بیشتر خواهد بود. که از این نظر نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق تائید کننده نتایج قبلی است. Chi و همکاران در سال ۲۰۰۷ از نیترات سدیم با غلظت ۲٪ به عنوان منبع نیتروژن استفاده کردند (**۲**). Nadim و همکاران در سال ۲۰۰۸ اذعان داشتند که اضافه کردن نیترات سدیم به میزان ۱٪ باعث افزایش تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* می شود (**۶**). در این تحقیق حداکثر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در حضور ۰/۵٪ نیترات سدیم مشاهده شد.

با توجه به این که گونه مربوطه یعنی *کاندیدا ویسواناتی* 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 تولید بالای آنزیم در این سویه می‌توان این سویه را به‌عنوان سویه صنعتی مناسب معرفی کرد.

References

1. 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. J. Basic Microbiology 2008; 48:347-352.
2. 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; 98:534-538.
3. Nelson G, Young WT. Extracellular acid and alkaline protease from *Candida olea*. Journal of General Microbiology. 1987; 133:1461-1469.
4. Matoba S, Fukayama J, Wing AR, Ogrydziak D. Intracellular precursors and secretion of alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*. Molecular and Cellular Biology.1997; 8(1):4904-4916.
5. Xiumei N, Lixi Y, Chi Z, Jing L, Wang I, Madzak C. Alkaline protease gene cloning from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* HN-3 and the protease surface display on *Yarrowia lipolytica* for bioactive peptid production. Marine Biotech . 2009; 11(1):81-89.
6. Nadeem M, Qazi JI, Baij S, Syed QA. Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2. Food Technology and Biotech. 2008; 46(4):388-394.
7. 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 Biotech. 2009; 3(9):491-497.
8. Rani R, Prasad NN, 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):565-576.
9. 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):250-259.
10. Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Rundall R. Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Bio and Chem. 1951; 193:265-275.

11. Nakamura T, Syukunobe Y, Sakurai T, Idota T. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. Milchwissens Chaft. 1993; 48:11-14.
12. Akpınar O, Uçar F, Yalçın HT. Screening and regulation of alkaline extracellular protease and ribonuclease production of Yarrowia lipolytica strains isolated and identified from different cheeses in Turkey. Ann Microbiol. 2011;61(4):907-15.
13. Cheng K, Lu FP, Li M, Liu LL, Liang XM. Purification and biochemical characterization of a serine alkaline protease TC4 from a new isolated *Bacillus alkalophilus* TCCC11004 in detergent formulations. African Journal of Biotech. 2010; 9(3):4942-4953.
14. Choudhury V. Production isolation and characterization of alkaline protease from Aspergillus versicolor PFF107. Journal of Academic Industry. 2012; 1(5):272-277.
15. Gawel NJ, Jarret RL. A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoae. Plant Molecular Biology Reporter. 1991; 9(3):262-266.
16. 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; 23:417-427.
17. Afifi FA, Abo-Elmagd IH, Housseiny MM. Improvement of alkaline protease production by *Penicillium chrysogenum* NRRL 792 through physical and chemical mutation optimization characterization and genetic variation between mutant and wild type strains. . Ann Microbiol. 2013; 8:269-279.
18. Abdo-naser SS, Salamah AA. Optimization media and cultivation condition for alkaline protease production by alkaliphilic *Bacillus halodurans*. Research Journal of Microbiology. 2009; 4(7):251-259.