فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۰، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۱- ۱۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

جهش‌زایی توسط UV و اسید نیترو برای افزایش تولید رنت در *Rhizomucor miehei*

ناصر تاجیک*: کارشناس ارشد مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران، nt.search7@gmail.com
مهرداد آذین: دانشیار بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، azin@irost.org
مسعود فلاح‌پور: استادیار بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، fallahpour@irost.ir
رضوان پوراحمد: استادیار صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران، rjpourahmad@yahoo.com

چکیده

مقدمه: در این تحقیق، تکنیک جهش و انتخاب، برای افزایش تولید رنت (آنزیم دلمه کننده شیر) در *ریزوموکور میه هی* استفاده شد. جهش و انتخاب، تکنیکی برای اصلاح سویه‌های میکروبی است که طی آن، با استفاده از عوامل جهش‌زا در ارگانیسم مورد نظر جهش ایجاد شده، سپس، جهش یافته‌های مطلوب با یک استراتژی مشخص انتخاب می‌شوند.

مواد و روش‌ها: در ابتدا تعدادی جهش یافته با کاربرد دوزهای بهینه از UV (به عنوان جهش‌زای فیزیکی) و اسید نیترو (به عنوان جهش‌زای شیمیایی) به شکل تصادفی ایجاد شد. سپس، از میان جهش یافته‌های به دست آمده، بهترین سویه‌ها از نظر تولید، انتخاب شده و از نظر فعالیت دلمه کنندگی، فعالیت پروتئولیتیکی، سینتیک تولید آنزیم، نسبت $\frac{C}{P}$ (نسبت فعالیت دلمه کنندگی به فعالیت پروتئولیتیکی)، بازدهی، بهره‌وری و ضریب رشد ویژه، با سویه والد در ۵ تکرار مقایسه شدند.

نتایج: در این تحقیق فعالیت دلمه کنندگی رنت حاصل از سویه والد، ۱۱۸۳ $SU.mL^{-1}$ تعیین شد. همچنین، جهش یافته‌هایی با نام‌های انتخابی *U-1113* و *N-0227* ایجاد شد که به ترتیب قادر به تولید ۱۷۷۱ و ۱۸۶۴ $SU.mL^{-1}$ رنت بودند. نسبت $\frac{C}{P}$ در مورد رنت سویه والد ۴۹۵۰ و در مورد جهش یافته‌های *U-1113* و *N-0227* به ترتیب ۸۱۱۴ و ۸۱۹۳ $SU.PU^{-1}$ به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: فعالیت آنزیم در جهش یافته‌های *U-1113* و *N-0227* نسبت به سویه والد، به ترتیب ۴۹/۷ و ۵۷/۶ درصد افزایش داشت (P value< ۰/۰۵). همچنین، میزان بهره‌وری، بازدهی و نسبت $\frac{C}{P}$، به طور معنی‌داری نسبت به سویه والد بهبود یافت (P value< ۰/۰۵)؛ که نشان می‌دهد جهش‌زاهای مورد استفاده بر کیفیت و کمیت رنت سویه یاد شده موثر بوده است.

واژه‌های کلیدی: اسید نیترو، جهش‌زایی، رنت میکروبی، *ریزوموکور میه هی*، فعالیت دلمه کنندگی، UV

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

کیموزین (رنت) یک مخلوط آنزیمی است که در صنایع پنیرسازی برای انعقاد شیر به کار می‌رود (۱). در گذشته، رنت از معده چهارم گوساله‌های شیرخوار به دست می‌آمد. اما با افزایش تقاضا برای مصرف گوشت و پنیر، ضروری بود تا به سایر منابع آنزیم‌های دلمه کننده توجه شود. به این ترتیب برخی رنت‌های حیوانی جایگزین کشف شدند و امروزه نیز برخی آنزیم‌های دلمه کننده شیر با منشا میکروبی، کاربرد تجاری یافته اند (۲).

رنت مورد استفاده در صنایع پنیرسازی نباید دارای اثر پروتئولیز محسوس روی کازئین شیر باشد. در این صورت ممکن است پپتیدهای آب دوست تشکیل شده و باعث ایجاد طعم تلخ در محصول شود. از این رو لازم است رنت جایگزین، فعالیت دلمه کنندگی بالا و فعالیت پروتئولیتیکی پائینی داشته باشد. به این ترتیب نسبت فعالیت دلمه کنندگی به فعالیت پروتئولیتیکی ($\frac{C}{P}$)[۱]، به عنوان یک شاخص برای انتخاب سویه‌های میکروبی مناسب، توسط محققان به کار رفته است (۳ و ۴).

به طور کلی در میان میکروارگانیسم‌های تولید کننده رنت، گونه‌های قارچی به علت دارا بودن نسبت $\frac{C}{P}$ بالا، اهمیت بیشتری دارند. در این رابطه رنت به دست آمده از کپک *ریزوموکور میه هی*[۲]، یکی از بهترین جایگزین‌های کیموزین گوساله است که به علت شاخص‌های کیفی مشابه، دارای اهمیت تجاری است (۵ و ۶).

به منظور اهداف تجاری، یکی از بهترین روش‌های افزایش تولید و توسعه سویه‌های صنعتی، بهبود ژنتیکی سویه‌های میکروبی است. در این رابطه می‌توان به روش نوترکیبی و تکنیک جهش و انتخاب اشاره نمود. در سال‌های گذشته پژوهش‌های بسیاری در رابطه با افزایش تولید رنت با روش نوترکیبی انجام شده است که در میان آن‌ها می‌توان به پژوهش‌های وارد و همکاران[۳]، کاپرالک و همکاران[۴] و بادی و همکاران[۵] اشاره داشت (۷- ۹). سکر و همکاران[۶] با بهینه‌سازی تولید رنت *ریزوموکور میه هی* در فرمانتور مداوم، تولید این آنزیم را در سطح ۷/۵ گرم بر لیتر گزارش کردند (۱۰). همچنین، می‌توان به تحقیقات داسیلویرا و همکاران[۷] و نیز دلیما و همکاران[۸] در زمینه بهینه‌سازی تولید رنت اشاره کرد (۱۱ و ۱۲).

به طور کلی تکنیک جهش– انتخاب در ۲ مرحله انجام می‌شود. در مرحله اول با استفاده از عوامل جهش‌زا در میکروارگانیسم مورد نظر جهش[۹] ایجاد می‌شود؛ سپس، در مرحله دوم، جهش یافته‌های مطلوب با یک استراتژی مشخص انتخاب[۱۰] می‌شوند (۲). فونگارو و همکاران[۱۱] با سه سیکل متوالی جهش- انتخاب، موفق به جداسازی سویه ای از *کاندیدا تسوکوبائنسیس*[۱۲] شدند که میزان تولید رنت آن حدود ۲ برابر نسبت به سویه والد افزایش داشت. ضمن آن که فعالیت پروتئولیتیکی سویه اصلاح شده تقریبا ۲۰ درصد کاهش یافت (۱۳).

با این حال با وجود مطالعات فراوانی که تاکنون در زمینه افزایش تولید رنت انجام شده، کمتر به موضوع جهش- انتخاب پرداخته شده است. بنابراین، هدف از انجام این تحقیق، استفاده از عوامل جهش‌زا مشتمل بر UV (به عنوان عامل جهش‌زای فیزیکی) و اسید نیترو[۱۳] (به عنوان عامل جهش‌زای شیمیایی)، برای تهیه سویه‌های جهش یافته از *ریزوموکور میه هی* بود که راندمان تولید رنت بیشتری داشتند. مهم‌ترین اثر جهش‌زایی پرتوهای UV، ایجاد دایمرهای تیمین در

ساختار DNA سلول است که در طول موج ۲۵۴ نانومتر به حداکثر می‌رسد (۱۴ و ۱۵). اسید نیترو نیز از جهش‌زاهای قوی است که سازوکار تاثیر آن بر DNA، عموما به دآمیناسیون بازهای آدنین، گوانین و سیتوزین مربوط می‌شود که در نتیجه آن پیوندهای هیدروژنی بازهای یاد شده تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۱۶).

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم مورد استفاده

سویه میکروبی مورد استفاده در این پژوهش، *ریزوموکور میه هی* (*PTCC 5145*) بود که از مرکز منطقه ای کلکسیون میکروارگانیسم‌های ایران، وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران تهیه شد. محیط کشت مورد استفاده برای نگهداری سویه میکروبی، حاوی عصاره مالت تهیه شده از شرکت بهنوش ایران (۶۰ گرم بر لیتر)، پودر شیر بدون چربی ساخت شرکت مرک آلمان (۱۵ گرم بر لیتر) و آگار (۱۵ گرم بر لیتر) بود که در اسیدیته ۵ به شکل مایل تهیه و پس از کشت و رشد میکروارگانیسم در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، در یخچال ذخیره و هر ۱۵ روز تجدید کشت شد.

جهش‌زایی با UV

۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کنیدیوسپور حاوی ۲×۱۰^{۸} بر میلی‌لیتر، از اسپورهای با عمر ۳ روز، در پلیت‌های حاوی محیط کشت DRBC Agar (ساخت شرکت کیولب[۱۴]) کشت داده شد. سپس، در شرایط تاریکی، پلیت‌ها زیر لامپ UV ۳۰ وات (شرکت فیلیپس[۱۵]) با طول موج ۲۸۰ نانومتر و در زمان‌های مختلف ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰و۱۸۰ ثانیه تحت تابش مستقیم UV قرار گرفتند. به طوری که فاصله لامپ UV تا سطح پلیت‌ها ۲۰ سانتی‌متر بود. ضمن آن که در هنگام تیمار با UV درب پلیت‌ها برداشته شد. پلیت‌ها تا زمان ظاهر شدن کلونی‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و سپس کلونی‌های تشکیل شده، شمارش شدند (۲ و ۱۷). دوزی به عنوان دوز بهینه UV تعیین شد که در شرایط متعارف فوق، ۹۹/۹۹ درصد اسپورهای اولیه را از بین ببرد (۱۸).

جهش‌زایی با اسید نیترو

۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کنیدیوسپور حاوی ۲×۱۰^{۸} بر میلی‌لیتر، به ۵ میلی‌لیتر محلول نیتریت سدیم (شرکت مرک آلمان) ۰/۲ مولار در بافر استات (با غلظت ۰/۲ مولار و اسیدیته ۴/۵) اضافه و به شیکر انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سلسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه انتقال یافت. به منظور توقف جهش‌زایی، در فواصل زمانی ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تیمار شده، با بافر فسفات (با غلظت ۰/۲ مولار و اسیدیته۷/۱) مخلوط شده و از هر یک، رقت مناسبی برای کشت تهیه شد. کشت از سوسپانسیون‌های یاد شده در پلیت‌های حاوی محیط DRBC Agar انجام شد. به دنبال آن گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تا زمان ظاهر شدن کلونی‌ها انجام و کلونی‌های تشکیل یافته، شمارش شدند. به این ترتیب، دوز بهینه اسید نیترو، میزان غلظتی تعیین شد که قادر بود ۴ سیکل لگاریتمی از اسپورهای اولیه را از بین ببرد (۱۸).

تولید آنزیم

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون کنیدیوسپور حاوی ۴×۱۰^{۷} بر میلی‌لیتر به ۴۰ میلی‌لیتر محیط تولید آنزیم در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری تلقیح شد. محیط تولید حاوی:

عصاره مالت (۴۰ گرم بر لیتر) و پودر شیر بدون چربی (۱۵ گرم بر لیتر) بود که پس از تنظیم اسیدیته روی ۶، در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۵ دقیقه استریل شد. سپس، ارلن‌ها به شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۸۰ دور در دقیقه انتقال یافت. پس از ۵ روز، زیست توده تولید شده با استفاده از کاغذ صافی و با کمک پمپ خلا جدا شد و از سوپرناتانت شفاف حاصل که حاوی آنزیم رنت است، برای اندازه‌گیری کمی استفاده شد (۲).

سنجش کمیت‌های آزمایشی

سنجش فعالیت دلمه کنندگی آنزیم

برای اندازه‌گیری فعالیت دلمه کنندگی، ابتدا محلول ۱۰ درصد پودرشیر بدون چربی، حاوی غلظت ۰/۰۱ مولار کلرید کلسیم تهیه شد. سپس، ۰/۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت آنزیمی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به ۵ میلی‌لیتر سوبسترا (محلول فوق) اضافه و زمان انعقاد محلول تا ایجاد نخستین فلوکوله‌ها اندازه‌گیری شد. فعالیت دلمه کنندگی با استفاده از رابطه ۱ به دست آمد (۱۹). رابطه ۱: $CA = \frac{M}{E} \times \frac{35}{T} \times \frac{2400}{t}$

در رابطه ۱:CA فعالیت دلمه کنندگی آنزیم برحسب واحد سوکسله بر میلی‌لیتر ($SU.mL^{-1}$)، M و E به ترتیب حجم سوبسترا و حجم سوپرناتانت آنزیمی بر حسب میلی‌لیتر، T دمای محیط واکنش آنزیم - سوبسترا برحسب درجه سلسیوس و t زمان انعقاد شیر بر حسب ثانیه است.

سنجش فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم

برای انجام آزمایش، ابتدا لازم بود تا سوبسترای پروتئینی تهیه شود. به همین منظور محلول ۵ گرم پودر کازئین در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (۷/۲۵ اسیدیته و غلظت ۰/۲۵ مولار) به آن افزوده و با آب مقطر به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به منظور سنجش فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم، ۵ میلی‌لیتر از سوبسترای کازئینی تهیه شده در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به ۱ میلی‌لیتر سوپرناتانت آنزیمی افزوده شد. پس از ۱۵ دقیقه، واکنش با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۵ درصد متوقف شد. پس از ۳۰ دقیقه و پایدار شدن محلول‌ها، جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر، با استفاده از اسپکتروفتومتر (بیو کروم بیو ویو ۲[۱۶] - انگلستان) خوانده شد. یک واحد فعالیت پروتئولیتیکی، معادل مقدار آنزیمی تعریف شد که جذب نمونه را در طول موج ۲۸۰ نانومتر از مسیری به طول ۱ سانتی متر، به میزان یک واحد افزایش دهد. به این ترتیب نتایج سنجش فعالیت پروتئولیتیک بر حسب $PU.mL^{-1}$ گزارش شد (۲۰).

ترسیم منحنی سینتیک تولید آنزیم

برای رسم منحنی سینتیک تولید آنزیم، ابتدا هر کدام از سویه‌های اصلی و جهش یافته، با سه تکرار کشت داده شدند. محیط‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۸۰ دور بر دقیقه در شیکرانکوباتور (ان بیوتک[۱۷] - کره جنوبی) گرمخانه گذاری شدند. در هر ۲۴ ساعت، ۳ ارلن از محیط‌های تلقیح شده مربوط به هر سویه را از شیکر خارج کرده و فعالیت دلمه کنندگی آن‌ها اندازه‌گیری شد. با قرار دادن میانگین فعالیت دلمه کنندگی آنزیم هر سویه نسبت به زمان، منحنی سینتیک تولید آنزیم رسم شد (۱۱)

ارزیابی بهره‌وری آنزیم

از رابطه ۲، به منظور تعیین میزان بهره‌وری آنزیم استفاده شد (۲۱). رابطه ۲: $P = \frac{CA}{v \times t}$

در رابطه ۲: P بهره‌وری آنزیم بر حسب سوکسله بر میلی‌لیتر ساعت ($SU.mL^{-1}h^{-1}$)، CA فعالیت دلمه‌کنندگی آنزیم بر حسب واحد سوکسله بر میلی‌لیتر ($SU.mL^{-1}$)، v حجم محیط تولید بر حسب میلی‌لیتر و t زمان بر حسب ساعت است.

ارزیابی بازدهی آنزیم

میزان بازدهی نسبت به منابع کربن و نیتروژن محیط تولید، با استفاده از رابطه‌های ۳ و ۴ تعیین شد (۲۲):

رابطه ۳: $Y_{CA/C} = \frac{CA}{M_C}$

رابطه ۴: $Y_{CA/N} = \frac{CA}{M_N}$

در رابطه‌های ۳ و ۴: $Y_{CA/C}$، بازدهی تولید آنزیم نسبت به منبع کربن بر حسب واحد سوکسله بر گرم کربوهیدرات ($SU.g^{-1}_C$)، $Y_{CA/N}$، بازدهی تولید آنزیم نسبت به منبع نیتروژن بر حسب واحد سوکسله بر گرم نیتروژن ($SU.g^{-1}_N$) و M_C و M_N به ترتیب جرم کربوهیدرات و نیتروژن محیط بر حسب گرم (g) است.

سنجش ضریب رشد ویژه

در ابتدا، سوسپانسیون کنیدیوسپور حاوی ۴×۱۰^{۷} بر میلی‌لیتر به محیط تولید تلقیح و به شیکر انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سلسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت، ۱۰ درصد (حجمی/حجمی) از محیط فوق به محیط جدید تلقیح و وزن خشک اولیه آن‌ها اندازه‌گیری شد. پس از ۴ روز گرمخانه‌گذاری در شیکر انکوباتور با شرایط یاد شده، زیست توده تولید شده با استفاده از صافی کاغذی و پمپ خلا جدا شده و وزن خشک ثانویه آن‌ها نیز تعیین شد. برای تعیین وزن خشک، صافی‌های کاغذی محتوی زیست توده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس در فور قرار گرفتند (۲۳). با محاسبه وزن خشک اولیه و ثانویه و استفاده از رابطه مونود (رابطه ۵)، ضریب رشد ویژه به دست آمد (۲۴). (رابطه ۵):

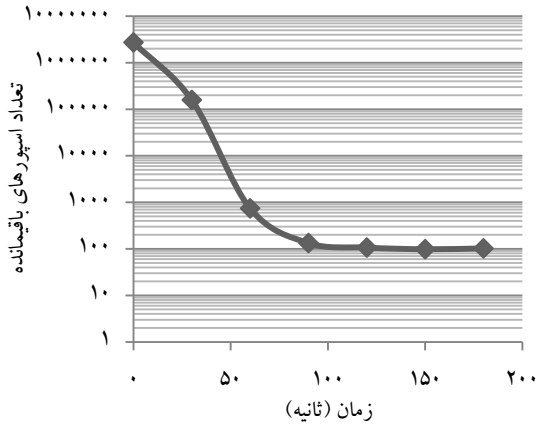
$$\text{ضریب رشد ویژه} = \frac{\ln(\text{وزن خشک ثانویه}) - \ln(\text{وزن خشک اولیه})}{\text{زمان انجام آزمایش}}$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

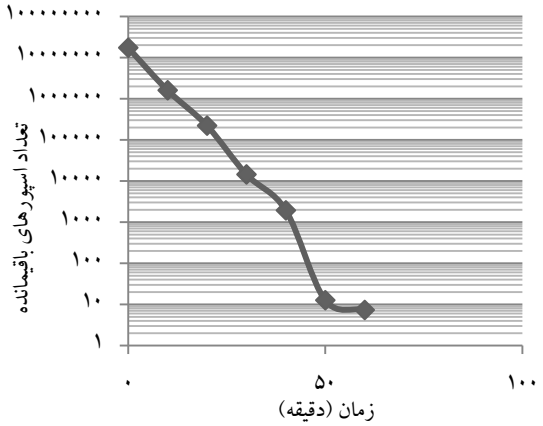
تمام داده‌های به دست آمده از آزمایش‌های مختلف، در قالب طرح کاملا تصادفی بررسی‌های آماری شد. در آزمایش‌های نهایی مربوط به هریک از میکروارگانیسم‌ها، تعداد ۳ تیمار با ۵ تکرار در نظر گرفته شد. در این پژوهش، به منظور بررسی ویژگی کمی داده‌ها، از تحلیل واریانس و نرم افزار اس پی اس اس نگارش ۱۶[۱۸] و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد. همچنین، رسم نمودارها به کمک نرم افزار مایکروسافت آفیس اکسل ۲۰۰۷[۱۹] انجام شد.

نتایج

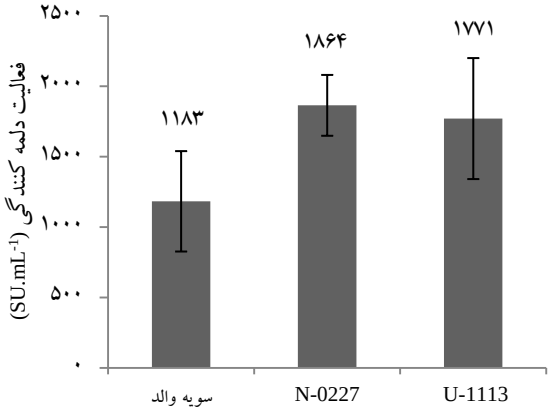
منحنی لگاریتمی مرگ اسپورهای *ریزوموکور میه هی* در اثر UV و اسید نیترو، به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است. همان گونه که مشاهده می‌شود. دوز بهینه UV برای کاهش ۴ سیکل لگاریتمی (۹۹/۹۹ درصد اسپورهای تلقیح شده)، در زمان تقریبی ۵۲ ثانیه به دست آمد؛ در مورد اسید نیترو، این زمان حدود ۴۰ دقیقه بود.



شکل ۱- منحنی لگاریتمی مرگ اسپورهای ریزوموکور میه هی در اثر UV



شکل ۲- منحنی لگاریتمی مرگ اسپورهای ریزوموکور میه هی در اثر اسید نیترو

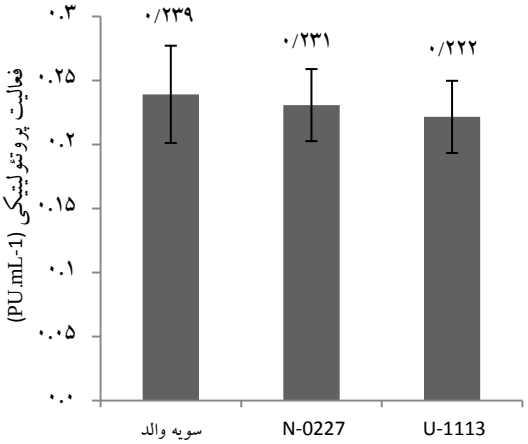


شکل ۳- مقایسه فعالیت دلمه کنندگی سویه‌های والد و جهش یافته *ریزوموکور میه هی*

(error barها نشان دهنده انحراف معیار ۵ تکرار است)

مقدار فعالیت دلمه کنندگی رنت حاصل از سویه والد $SU.mL^{-1}$ ۱۱۸۳ اندازه‌گیری شد. این مقادیر در مورد جهش یافته‌های *N-0227* و *U-1113* به ترتیب $SU.mL^{-1}$ ۱۸۶۴ و $SU.mL^{-1}$ ۱۷۷۱ به دست آمد (شکل ۳).

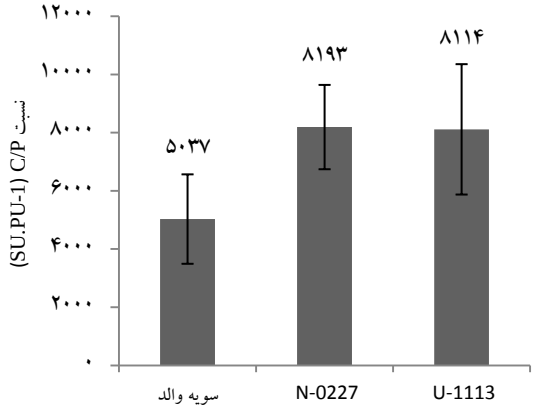
همچنین، فعالیت پروتئولیتیکی رنت حاصل از سویه والد $PU.mL^{-1}$ ۰/۲۳۹ اندازه‌گیری شد که این مقادیر برای جهش یافته‌های *N-0227* و *U-1113* به ترتیب $PU.mL^{-1}$ ۰/۲۳۱ و $PU.mL^{-1}$ ۰/۲۲۲ به دست آمد (شکل ۴).



شکل ۴ - مقایسه فعالیت پروتئولیتیکی سویه‌های والد و جهش یافته *ریزوموکور میه هی*

(error barها نشان دهنده انحراف معیار ۵ تکرار است)

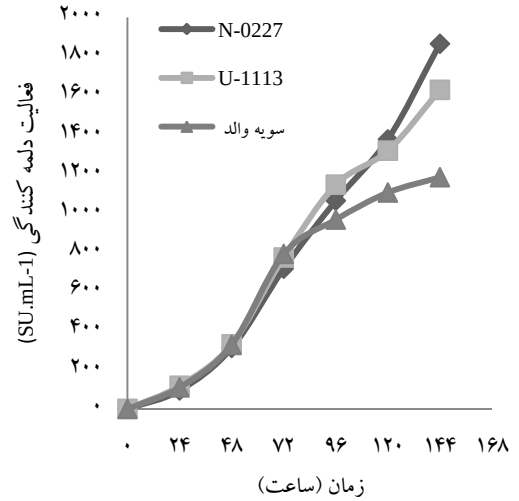
نتایج مربوط به نسبت $\frac{C}{P}$ آنزیم سویه‌های والد و جهش یافته *ریزوموکور میه هی* در شکل ۵ آمده است. همان گونه که ملاحظه می‌شود، این کمیت برای سویه والد، *U-1113* و *N-0227* به ترتیب ۵۰۳۷، ۸۱۹۳ و $SU.PU^{-1}$ ۸۱۱۴ به دست آمده است.



شکل ۵- مقایسه نسبت $\frac{C}{P}$ آنزیم سویه‌های والد و جهش یافته *ریزوموکور میه هی*

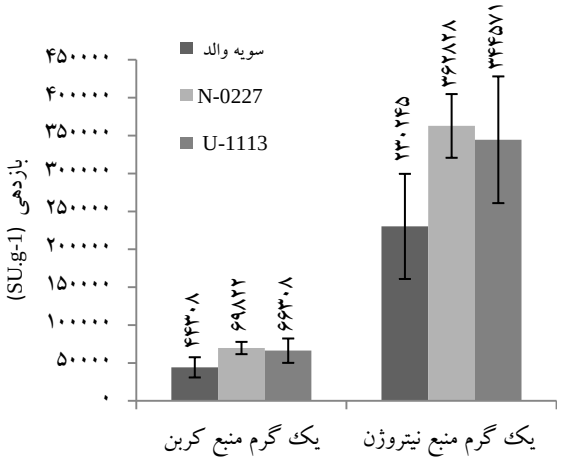
(error barها نشان دهنده انحراف معیار ۵ تکرار است)

شکل ۶ سینتیک تولید آنزیم را تا ۱۴۴ ساعت نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود، تولید رنت از سویه‌های جهش یافته و والد تا زمان ۹۶ ساعت، با آهنگ کمابیش یکسانی افزایش یافته است. اما پس از ۹۶ ساعت، تولید رنت از سویه‌های جهش یافته در مقایسه با سویه والد، شتاب بیشتری گرفته، به طوری که در زمان ۱۴۴ ساعت پس از کشت، این اختلاف کاملا مشخص شده است.



شکل ۶- مقایسه سینتیک تولید رنت حاصل از سویه والد و جهش یافته‌ها

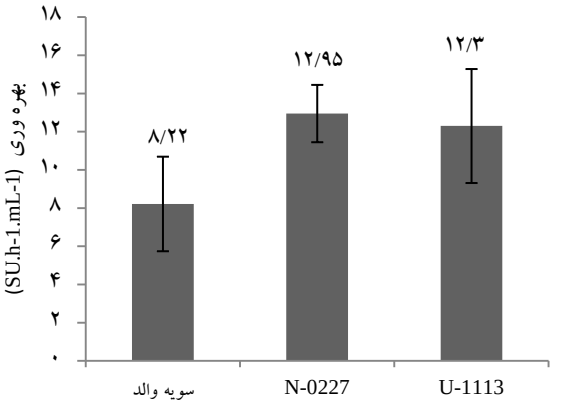
در مورد سویه والد، بازدهی تولید آنزیم نسبت به منابع کربن و نیتروژن به ترتیب ۴۴۳۰۸ و ۲۳۰۲۴۵ $SU.g^{-1}$ محاسبه شد؛ این کمیت‌ها برای *N-0227* به ترتیب ۶۹۸۲۲ و ۳۶۲۸۲۸ و برای *U-1113* به ترتیب ۶۶۳۰۸ و ۳۴۴۵۷۱ $SU.g^{-1}$ به دست آمد (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه بازدهی تولید رنت از سویه والد و جهش یافته‌ها نسبت به منابع کربن و نیتروژن محیط تولید

(error barها نشان دهنده انحراف معیار ۵ تکرار است)

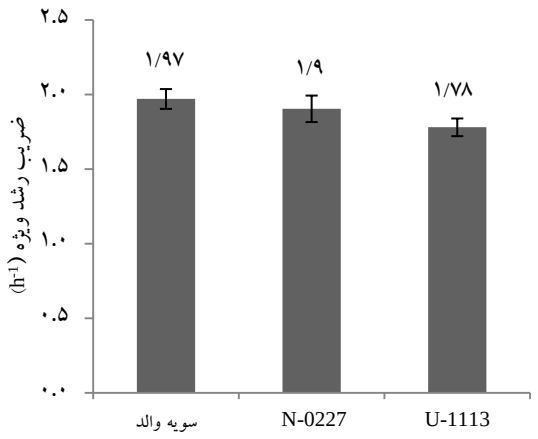
همچنین، بهره‌وری آنزیم نیز در سویه والد، ۸/۲۲ و در جهش یافته‌های *N-0227* و *U-1113*، به ترتیب ۱۲/۹۵ و ۱۲/۳ $SU.h^{-1}.mL^{-1}$ محاسبه شد (شکل ۸).



شکل ۸- مقایسه بهره‌وری تولید رنت از سویه والد و جهش یافته‌ها

(error barها نشان دهنده انحراف معیار ۵ تکرار است)

نتایج ارزیابی ضریب رشد ویژه در شکل ۹ نمایش داده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود این کمیت برای سویه والد ۱/۹۷ و برای جهش یافته‌های *N-0227* و *U-1113*، به ترتیب ۱/۹ و ۱/۷۸ h^{-1} اندازه‌گیری شد.



شکل ۹- مقایسه ضریب رشد ویژه سویه والد و جهش یافته‌ها (error barها نشان دهنده انحراف معیار ۵ تکرار است)

بحث و نتیجه‌گیری

پیش از القای جهش، دوزهای بهینه عوامل جهش‌زای مورد استفاده (اسید نیترو و UV) برای از بین بردن ۹۹/۹۹ درصد از اسپورهای تلقیح شده، تعیین شد. در نتیجه احتمال یافتن جهش یافته در بین کلونی‌های تشکیل شده، بیشتر شد. به همین دلیل ابتدا منحنی‌های مرگ اسپورهای *ریزوموکور میه هی* در اثر تیمار با اسید نیترو و UV رسم شد (۲۵ و ۲۶).

پس از آن، به منظور القای جهش و ایجاد سویه‌های جهش یافته از دوزهای بهینه اسید نیترو و UV استفاده شد. به منظور یافتن جهش یافته برتر از نظر تولید رنت، جهش یافته‌های ایجاد شده از نظر فعالیت دلمه کنندگی آنزیم شده و از میان آن‌ها، سویه‌های با فعالیت پروتئولیتیکی کمتر انتخاب شدند.

از بین جهش یافته‌های مورد ارزیابی که با اسید نیترو تیمار شده بودند، در نهایت جهش یافته ای با نام انتخابی *N-0227*، جداسازی شد. به همین ترتیب جهش یافته دیگری با نام انتخابی *U-1113* که حاصل تیمار با UV بود، جدا شد. به منظور اطمینان از پایداری جهش‌های ایجاد شده در جهش یافته‌های یاد شده، ۱۰ بار تجدید کشت متوالی انجام شد و فعالیت آنزیم آن‌ها اندازه‌گیری شد. در نهایت پس از حصول اطمینان از پایداری، رنت تولیدی از آن‌ها از نظر کیفی و کمی با رنت سویه والد مقایسه شد.

در این پژوهش، فعالیت دلمه کنندگی اندازه‌گیری شده برای سویه والد (۱۱۸۳ $SU.mL^{-1}$)، با نتایج داسیلویرا و همکاران (۱۱۰۵ $SU.mL^{-1}$) کاملا منطبق بود (۱۱). ضمن آن که نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوطه نشان داد که فعالیت دلمه کنندگی رنت حاصل از *N-0227* و *U-1113*، به ترتیب ۵۷/۶ و ۴۹/۷ درصد در مقایسه با سویه والد افزایش یافته است (P value< ۰/۰۵)؛ در حالی که فعالیت پروتئولیتیکی سویه جهش یافته یاد شده تغییر معنی داری در مقایسه با سویه والد نشان نداد (P value> ۰/۰۵). به این ترتیب با افزایش فعالیت دلمه کنندگی و ثبات نسبی فعالیت پروتئولیتیکی، نسبت $\frac{C}{P}$ آنزیم، ۶۲/۶ درصد در *N-0227* و ۶۱/۱ درصد در *U-1113* افزایش یافت(P value < ۰/۰۵). هر چه مقدار نسبت $\frac{C}{P}$ آنزیم بیشتر باشد، آنزیم اختصاصی تر عمل کرده و راندمان دلمه در فرآیند تهیه پنیر بیشتر خواهد بود. به عبارت دیگر هر چه این نسبت بیشتر باشد، کیفیت رنت بیشتر و کارایی آن بالاتر است (۲۷).

همچنین، نتایج به دست آمده از سینتیک تولید آنزیم، با گزارش‌های سکر و همکاران، روی *ریزوموکور میه هی* منطبق است. طبق گزارش یاد شده، منحنی سینتیک تولید آنزیم تا حدود ۴۲۰ ساعت پس از تلقیح، حالتی صعودی داشته و پس از آن نزول پیدا می‌کند (۱۰). در این پژوهش، سینتیک تولید آنزیم تا ۱۴۴ ساعت ارزیابی شد.

همچنین، نتایج به دست آمده برای بازدهی آنزیم سویه والد، نسبت به منبع کربن و نیتروژن محیط که به ترتیب ۴۴۳۰۸ و ۲۳۰۲۴۵ $SU.g^{-1}$ اندازه‌گیری شد، نسبت به نتایج دلیما و همکاران به ترتیب ۶۲/۵ و ۵۳/۵ درصد بیشتر بود (۱۲). این تفاوت می‌تواند با در نظر گرفتن ترکیب محیط کشت و شرایط حاکم بر آزمایش توجیه شود؛ به طوری که فرمولاسیون محیط کشت و شرایط آزمایشی در این پژوهش نسبت به تحقیق دلیما و همکاران، در افزایش بازدهی آنزیم تاثیرگذارتر بوده است. ضمن آن که نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به بازدهی آنزیم سویه والد و جهش یافته‌ها، وجود تفاوت معنی‌دار را نشان داد (P value< ۰/۰۵). بنابراین، بازدهی آنزیم در سویه‌های *N-0227* و *U-1113* به ترتیب ۵۷/۶ و ۴۹/۷ درصد نسبت به سویه والد افزایش یافت. این نتایج به خوبی نشان می‌دهد که در ازای مقدار یکسان مواد موجود در محیط تولید، سویه‌های جهش یافته نسبت به سویه والد، توانایی بیشتری در سنتز آنزیم داشته اند.

نتایج به دست آمده برای بهره‌وری آنزیم در سویه والد (۸/۲۲ $SU.h^{-1}.mL^{-1}$) با نتایج داسیلویرا و همکاران (۸/۸۸ $SU.h^{-1}.mL^{-1}$) قابل مقایسه است (۱۱). این رقم در مورد جهش یافته‌های *N-0227* و *U-1113*، به ترتیب ۵۷/۶ و ۴۹/۷ درصد نسبت به سویه والد افزایش یافت (p< ۰/۰۵). نتایج حاصل از محاسبه بهره‌وری نشان داد که به ازای حجم تولید و زمان یکسان، تولید آنزیم توسط جهش یافته‌ها نسبت به سویه والد بیشتر است.

بر اساس مطالعات سکر و همکاران، روند تولید زیست توده در کپک *ریزوموکور میه هی* تا حدود ۱۹۰ ساعت پس از تلقیح، به شکل خطی و با آهنگی کمابیش یکنواخت ادامه یافته و پس از آن تقریبا ثابت می‌شود (۱۰). بنابراین، نتایج به دست آمده با نتایج دلیما و همکاران منطبق است. به طوری که ضریب رشد ویژه در مطالعات آن‌ها رقمی در حدود ۲/۱۳ h^{-1} محاسبه شد که با ضریب رشد ویژه اندازه‌گیری شده برای سویه والد در این پژوهش (۱/۹۷ h^{-1}) قابل مقایسه است (۱۲).

در این طرح، ضریب رشد ویژه در *N-0227* در مقایسه با سویه والد، رقمی کم و بیش معادل بوده و اختلاف معنی‌داری ندارد (P value> ۰/۰۵). اما ضریب رشد ویژه جهش یافته *U-1113*، حدود ۹/۶ درصد کاهش یافته است (P value< ۰/۰۵). به طوری که این مقدار از ۱/۹۷ h^{-1} در سویه والد به ۱/۷۸ h^{-1} در سویه جهش یافته *U-1113* کاهش داشته است. با توجه به این که از یک سو القای جهش توسط تابش UV به طور تصادفی روی ساختار DNA تاثیرگذار است و از سوی دیگر برنامه انتخاب جهش یافته برتر، بر اساس فعالیت دلمه کنندگی بالا و فعالیت پروتئولیتیکی پائین آنزیم رنت تولیدی انجام گرفت، کاهش ضریب رشد ویژه توجیه می‌شود. هر چند مقدار این کاهش کمابیش ناچیز بوده است، اما با توجه به تحقق هدف اصلی طرح (افزایش نسبت $\frac{C}{P}$)، این مقدار کاهش در ضریب رشد ویژه در سویه *U-1113* قابل چشم پوشی است.

به این ترتیب دستاوردهای این تحقیق به طور خلاصه به شرح زیر است:

- در این پژوهش، با استفاده از تکنیک جهش و انتخاب و با کاربرد دوز بهینه از عامل جهش‌زای اسید نیترو، سویه ای از اصلاح و جهش یافته ای به نام *N-0227* ایجاد شد که فعالیت دلمه کنندگی رنت حاصل از آن، ۵۷/۶ درصد بیشتر بود.
- همچنین، با استفاده از تکنیک جهش و انتخاب و با کاربرد دوز بهینه از عامل جهش‌زای UV، سویه ای از اصلاح و جهش یافته ای به نام *U-1113* ایجاد شد که فعالیت دلمه کنندگی رنت حاصل از آن، ۴۹/۷ درصد بیشتر بود.
- با توجه به این که فعالیت دلمه کنندگی افزایش و فعالیت پروتئولیتیکی تقریبا بدون تغییر بوده است، طبق محاسبات انجام گرفته نسبت $\frac{C}{P}$ رنت تولیدی در *N-0227* و *U-1113*، به ترتیب ۶۲/۶ و ۶۱/۱ درصد افزایش یافت. به این ترتیب کیفیت رنت تولید شده توسط سویه جهش یافته بیشتر بوده و رنت حاصل از آن برای فرآیند پنیرسازی مناسب تر است.
- جهش یافته‌های یاد شده برای تولید رنت، دارای بازدهی و بهره‌وری بیشتری نسبت به سویه والد بودند. بدیهی است که استفاده از سویه ای با بازدهی و بهره‌وری بیشتر، برای تولید صنعتی رنت مناسب‌تر است.

جدول ۱- مقایسه شاخص‌های سنجش شده برای سویه‌های جهش یافته نسبت به سویه والد

کمیت مورد بررسی	سویه مورد بررسی (درصد تغییر)		
	سویه والد	*N-0227*	*U-1113*
فعالیت دلمه کنندگی ($SU.mL^{-1}$)	۱۱۸۳	۱۸۶۴ (۵۷/۶)	۱۷۷۱ (۴۹/۷)
فعالیت پروتئولیتیکی ($PU.mL^{-1}$)	۰/۲۳۹	۰/۲۳۱ (ns*)	۰/۲۲۲ (ns)
نسبت $\frac{C}{P}$	۵۰۳۷	۸۱۹۳ (۶۲/۷)	۸۱۱۴ (۶۱/۱)
بهره‌وری ($SU.h^{-1}.mL^{-1}$)	۸/۲۲	۱۲/۹۵ (۵۷/۶)	۱۲/۳ (۴۹/۷)
بازدهی نسبت به منبع کربن ($SU.g^{-1}$)	۴۴۳۰۸	۶۹۸۲۲ (۵۷/۶)	۶۶۴۰۸ (۴۹/۷)
بازدهی نسبت به منبع نیتروژن ($SU.g^{-1}$)	۲۳۰۲۴۵	۳۶۲۸۲۸ (۵۷/۶)	۳۴۴۵۷۱ (۴۹/۷)
ضریب رشد ویژه (h^{-1})	۱/۹۷	۱/۹ (ns)	۱/۷۸ (-۹/۶)

* ns: تغییر اندازه‌گیری شده معنی‌دار نیست.

تشکر و قدردانی

از همکاری و کمک‌های خانم‌ها شکری، غازی، سجادی و نوری و نیز آقایان آهی و شرفی و همین‌طور تمام کارکنان پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، به ویژه آقایان مرادی و عربی که در انجام دادن این تحقیق ما را یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Crabbe MJC. Rennets: general and molecular aspects. In: Westwood F, editor. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 3rd edition. London: *Oxford University Press;* 2004. p 24-53.

(2) Fungaro MHP, de Souza Junior CL, de Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner AA. Recurrent mutation- selection to improve rennet production in *Candida tsukubaensis*. *Rev. Brasil Genet* 1994; 14 (2): 377-82.

(3) McSweeney PLH. Biochemistry of cheese ripening. *Dairy Tech* 2004; 57 (4): 127-44.

(4) Rotaru G, Mocanu D, Uliescu M, Andronoiu D. Research studies on cheese brine ripening. *Food Biotechnol* 2008; 2 (2): 30-39.

(5) Sardinas JL. Rennin Enzyme of Endothia parasitica. *App microbiol* 1968; 16 (3): 248-55.

(6) Tubesha ZA, Al-Delaimy KS. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor. Dairy Tech;* 2003; 16 (1): 237-241

(7) Ward M, Wilson LJ, Komada KH, Rey MW, Berka RM. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Biotech* 1990; 8: 435-40.

(8) Kaprálek F , Jecmen P, Sedlaècek J, Fábry M, Zadrazil S. Fermentation conditions for high-level expression of the tac-promoter-controlled calf prochymosin cDNA in *Escherichia coli HB101*. *Biotech Bioeng* 1991; 37: 71-79.

(9) Bodie EA, Armstrong GL, Dunn-Coleman NS. Strain improvement of chymosin-producing strains of *Aspergillus niger var. awamori* using parasexual recombination. *Enz. and Microl. Tech* 1994; 16 (5): 376-82.

(10) Seker S, Beyenal H, Ayhan F, Tanyolac, A. Production of microbial rennin from *Mucor miehei* in a continuously fed fermenter. *Enzyme and Microbial Tech* 1998; 23 (2): 469-74.

(11) Da Silveira GG, de Oliveira GM, Ribeiro EJ, Monti R, Contiero J. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. *Brazilian archives of biology and tech* 2005; 48 (2): 931-37.

(12) de Lima C, Cortezi M, Lovaglio RB, Ribeiro EJ, Contiero J, de Araujo E. Production of rennet in submerged fermentation with the filamentous fungus *Mucor miehei NRRL 3420*. *World app sci* 2008; 4 (1): 578-85.

(13) Fungaro MHP, de Souza Junior CL, de Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner AA. Recurrent mutation-selection to improve rennet production in Candida tsukubaensis. *Rev. Brasil Genet* 1994; 14: 377-82.

(14) Smith KC. Experiments: UV radiation effects on molecules and cells. *Plenum Press* 2010; 113-42.

(15) Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiat Res 2011*; 52 (2):115-25.

(16) Faisal RM. The application of the mutagen nitrous acid to improve the free living nitrogen fixation ability of *Azotobacter spp. Raf.J.Sci 2013*; 24 (1) : 44-53.

(17) Bayram O, Biesemann C, Krappmann S, Galland P, Braus GH. More Than a Repair Enzyme: *Aspergillus nidulans* Photolyase-like CryA Is a Regulator of Sexual Development. *Molecular Biol Cell* 2008; 19 (2): 3254-62.

(18) Carlton BC, Brown AJ. Gene mutation. In: Gerhardt P, editor. Manual of Methods for General Bacteriology. Washington DC: *American Society for Microbiol*; 1981. P 222- 42.

(19) El-Bendary MA, Moharam ME, Ali TH. Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Bacillus sphaericus. Journal of App Sci Research* 2007; 3 (8): 695-99.

(20) Beynon R, Bond JS. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. 2nd Edition. USA: *Oxford University Press*; 2001. P 47-48.

(21) Savergave LS, Gadre RV, Vaidya BK, Narayanan K. Strain improvement and statistical media optimization for enhanced erythritol production with minimal by-products from Candida magnoliae mutant R23. *Biochem Engineering Journal* 2010; 55 (1): 92–100.

(22) Goshadrou A, Karimi K, Taherzadeh MJ. Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. *Indus Crops and Products* 2011; 34 (4): 1219-25.

(23) Belewu MA, Yahaya AA. Effects of *Aspergillus niger* treated Shea butter cake based diets on nutrient intake and weight gain of Red Sokoto goat. *African Journal of Biotechnol* 2008; 7 (9): 1357-61.

(24) Lin S, Mao S, Guan Y, Lue L, Pan Y. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and Bacillus coagulans on the growth, innate immunity and resistance of koi (Cyprinus carpio koi). *Aquaculture* 2012; 342 (6): 36-41.

(25) Parry JM, Cox BS. Photoreactivation of Ultraviolet Induced Reciprocal Recombination, Gene Conversion and Mutation to Prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *H. gen. Microbiol* 1965; 402 (4): 235-41.

(26) Besoain XA, Perez LM, Araya A, Lefever L, Sanguinetti M, Montealegre JR. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici*. *Electronic journal of biotechnol.* 2007; 10 (4): 605-617.

(27) Chitpinityol S, Crabbe MJC. Review: Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem.* 1998; 61 (4): 395-418.

---

[1]- Milk-Clotting activity to Proteolytic activity ratio
[2]- *Rhizomucor miehei*
[3]- Ward *et al.*
[4]- Kapralek *et al*.
[5]- Bodie *et al*.
[6]- Seker *et al.*
[7]- da Silveira *et al.*
[8]- de Lima *et al.*
[9]- Mutagenesis
[10]- Screening
[11]- Fungaro *et al.*
[12]- *Candida Tsukubaensis*
[13]- Nitrous Acid) HNO_2 (
[14]- Quelab
[15]- Philips
[16]- Biochrom Biowave II
[17]- N-Biotek NB-205VL
[18]- SPSS ver.16 (SPSS Inc., Chicago, USA)
[19]- Microsoft Office Excel 2007

Mutagenesis by UV and Nitrous Acid for increase of rennet production in *Rhizomucor miehei*

Naser Tajik *
M.Sc. of Food Science and Technology, Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran, nt.search7@gmail.com
Mehrdad Azin
Associated Professor of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran, azin@irost.org
Masoud Fallahpour
Assistant Professor of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran, fallahpour@irost.ir
Rezvan Pourahmad
Assistant Professor of Food Science and Technology, Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran, rjpourahmad@yahoo.com

Abstract

Introduction: In this study, Mutation and Selection technique was used to increase production of Rennet (milk clotting enzyme) in *Rhizomucor miehei*. Mutation and Selection is a technique for microbial strain improvement in which, mutation is induced on an organism by mutagen factors, then superior mutants are selected by screening procedures.

Materials and methods Mutations were induced by an optimized dose of UV (as physical mutagen) and Nitrous acid (as chemical mutagen). Superior mutants were selected and compared to the parent strain regarding the clotting activity, proteolytic activity, enzyme production kinetic, yield, productivity and special growth rate in 5 replications.

Results: The milk clotting activity of parent strain was 1183 $SU.mL^{-1}$. Mutants designated *U-1113* and *N-0227* were isolated which, produced 1771 and 1864 respectively. $\frac{C}{P}$ ratio was measured 4950, 8114 and 8193 $SU.PU^{-1}$ in parent, *U-1113* and *N-0227*, respectively.

Discussion and conclusion: Production of enzymes in mutants *U-1113* and *N-0227* were increased 49.7 and 57.6% respectively, relative to parent strain. Yield of production, productivity and C/P ratio were also increased significantly in mutants, regarding the same figures obtained for parent ($p<0.05$) that shows mutagens were used, have effected on quantity and quality of strain rennet.

Key words: Clotting activity, Mutagensis, Microbial Rennet, Nitrous acid, *Rhizomucor miehei*, Strain improvement and UV

* Corresponding author
Received: September 8, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013