مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره دوم (پیاپی ۱۵) تابستان ۱۳۹۲
صفحات ۱۵۶-۱۴۸

Original Article

غربالگری مولکولی *سراشیا مارسیسنس* تولید کننده پروتئاز خارج سلولی از محیط های مختلف غرب مازندران

راحله سلطانمرادی*[۱]، امیرسلیم رزم آرا[۲]، سید رضا حسینی دوست[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و فناوری های نوین تهران، گروه میکروب شناسی، [۲] کاردان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد چالوس، گروه دامپزشکی [۳] استاد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و فناوری های نوین تهران، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: پروتئازها یکی از مهم ترین آنزیم های کاربردی در بیوتکنولوژی و صنایع مختلف مانند صنایع چرم، صنایع غذایی، داروسازی، شوینده ها و غیره می باشند. میکروب ها به دلیل رشد سریع، سهولت کشت، دستکاری ژنتیکی در جهت تولید بهینه آنزیم، از منابع عمده تولید پروتئازها به شمار می روند. این مطالعه با هدف جداسازی سویه های *سراشیا مارسیسنس* از منابع طبیعی غرب مازندران و ارزیابی قابلیت تولید آنزیم پروتئاز انجام شده است.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی بر روی ۱۵۰ نمونه جمع آوری شده از عمق ۰ تا ۱۰ سانتی متری خاک ها و آب های مناطق غرب مازندران انجام شد. به منظور جداسازی و شناسایی اولیه میکروارگانیسم های دارای فعالیت پروتئولیتیک از محیط کشت Skim milk agar و آزمون های یوشیمیایی استفاده شد. پس از استخراج DNA و با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن 16S rDNA گونه *سراشیا مارسیسنس* شناسایی گردید. سپس بهینه سازی دمایی و زمانی بر روی سویه های برتر مولد آنزیم انجام شد. همچنین وزن مولکولی تقریبی آنزیم به وسیله رسوب دهی پروتئین و روش SDS-PAGE تعیین گردید.

یافته ها: در مجموع از ۲ سویه *سراشیا مارسیسنس* جداسازی شده در این مطالعه، نمونه N به عنوان سویه جدید با نام *سراشیا مارسیسنس* سویه ۴۲۴ در بانک جهانی ژن با شماره KC790390 به ثبت رسید. این دو سویه بیشترین مقدار تولید آنزیم را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در مدت ۲۴ ساعت نشان دادند. بیشترین تولید آنزیم مربوط به *سراشیا مارسیسنس* سویه ۴۲۴ با فعالیت معادل ۱۹۹/۸۰ U/ml و وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون بود.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان دهنده پتانسیل بالای *سراشیا مارسیسنس* سویه ۴۲۴ در تولید پروتئاز و سراشیوپپتیداز می باشد. بنابراین ارزیابی پتانسیل کاربردی این آنزیم ها در صنایع مختلف پیشنهاد می شود.

واژگان کلیدی: *سراشیا مارسیسنس*، 16S rDNA، سراشیوپپتیداز، فعالیت آنزیمی، SDS-PAGE

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۱

مقدمه

سراشیا مارسیسنس (*Serratia marcescens*) یک باکتری گرم منفی متعلق به جنس *سراشیا* (*Serratia*) و خانواده *انتروباکتریاسه* (*Enterobacteriacea*) می باشد (۱). این باکتری قادر به تولید و ترشح آنزیم های هیدرولیتیک خارج سلولی است که در اکثر فرآیندهای صنعتی مورد استفاده قرار می گیرند (۲ و ۳). پروتئازها آنزیم هایی می باشند که با تبدیل مولکول های پروتئین به پپتیدها و اسیدهای آمینه موجب کاتالیز واکنش

* آدرس برای مکاتبه: تهران دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و فناوری های نوین تهران، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۳۵۳۶۶۵۶۸۳ پست الکترونیک: msoltanmoradi29@yahoo.com

های هیدرولیتیک می گردند (۴). این آنزیم ها علاوه بر اینکه به عنوان افزودنی در شوینده ها به کار می روند، در صنایع مختلف مانند صنایع غذایی، دارویی، چرم و تشخیص پزشکی نیز مورد استفاده قرار می گیرند (۵ و ۶).

امروزه میکروب ها به دلیل جمعیت بالا، رشد سریع، سهولت کشت، امکان بررسی تولید پروتئاز و دستکاری ژنتیکی در جهت تولید بهینه آنزیم، از منابع عمده تولید پروتئازها به شمار می روند. از پروتئازهای میکروبی می توان به سرین، سیستئین، آسپارتیک و متالوپروتئازها (تریپسین، کیموتریپسین و سراشیوپپتیداز) اشاره نمود (۷).

سراشیوپپتیداز (Serratiopeptidase) یک متالوپروتئاز ۵۰ کیلو دالتونی می باشد که به صورت خارج سلولی در مراحل تخمیر باکتری *سراشیا مارسیسنس* تولید می گردد. این آنزیم در اروپا و آسیا به عنوان یک داروی ضد التهابی (۸) و مسکن قوی در درمان بیماری های التهابی مزمن مانند تصلب شرائین، آرتریت، برونشیت و سینوزیت مورد استفاده قرار می گیرد (۹). همچنین مطالعات اخیر نشان می دهد که استفاده از سراشیوپپتیداز خوراکی می تواند در درمان و یا جلوگیری از ایجاد بیماری های ویروسی مانند ایدز، هپاتیت C و B نیز نقش مهمی ایفا نماید (۱۰).

امروزه پژوهش های زیادی بر روی تولید، خالص سازی و تعیین ویژگی سراشیوپپتیداز با استفاده از سویه های مختلف *سراشیا* در حال انجام است (۱۱ و ۱۲). تولید سراشیوپپتیداز، به ویژه توسط *سراشیا مارسیسنس*، تا حد زیادی تحت تأثیر شرایط محیط کشت از جمله منبع نیتروژن می باشد. به طوری که بررسی های مختلف نشان دهنده تولید مقادیر زیادی متالوپروتئاز در صورت استفاده از این نوع محیط ها بوده است (۱۵-۱۳). هدف از این پژوهش، جداسازی سویه های *سراشیا مارسیسنس* از منابع طبیعی غرب مازندران و ارزیابی قابلیت تولید آنزیم پروتئاز بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه: در این مطالعه به صورت مقطعی و تصادفی ۱۵۰ نمونه از عمق ۰ تا ۱۰ سانتی متری خاک ها و آب های مناطق غرب مازندران تحت شرایط استریل، با رعایت فواصل زمانی با استفاده از اسپاچول و لوله فالکون جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

ب) جداسازی جنس سراشیا: پس از تهیه رقت سریالی از نمونه های جمع آوری شده، به منظور جدا کردن میکروارگانیسم های دارای فعالیت پروتئولیتیک از محیط کشت Skim milk agar استفاده گردید. نمونه های رقیق شده با روش سفره ای بر روی محیط یاد شده کشت داده شدند و در دمای محیط به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرما گذاری گردیدند. در ادامه کلنی های صورتی و قرمزی رنگی که قادر به ایجاد هاله شفاف در محیط بودند (نشان دهنده تجزیه کازئین توسط پروتئاز) در پلیت شطرنجی به صورت نقطه ای کشت داده شدند.

ج) آزمون های بیوشیمیایی شناسایی باکتری: کلنی های دارای فعالیت پروتئازی به کمک رنگ آمیزی گرم و آزمون های بیوشیمیایی متداول، تا حد جنس *سراشیا* شناسایی گردیدند.

د) شناسایی باکتری از طریق توالی پرایمر اختصاصی: پس از استخراج DNA باکتری توسط کیت شرکت MBTS، میزان خلوص آن با توجه به مقدار A260/A280 اندازه گیری شد. در این پژوهش تکثیر قطعه 16S rDNA مطابق با روش گیری (Giri) و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام گردید (۱۶). در ادامه محصولات PCR به منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شدند. همچنین تعیین توالی با استفاده از برنامه Blast در سایت NCBI ردیف سازی گردید.

ه) بهینه سازی حرارتی: در ابتدا یک لوپ از باکتری مورد نظر در مرکز پلیت حاوی محیط کشت Skim milk agar به صورت نقطه ای کشت داده شد و در دماهای مختلف ۲۵، ۲۸، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرما گذاری و سپس قطر هاله ها اندازه گیری شد.

و) سنجش فعالیت آنزیمی: سنجش فعالیت پروتئازی با اصلاح روش هضم کازئین توسط ماناچینی (Manachini) انجام گرفت (۱۷). ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه به ۳ میلی لیتر

محیط Luria Bertani مایع تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. سوسپانسیون میکروبی به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ و مایع روماند حاوی آنزیم جداسازی گردید. به منظور تهیه سوبسترا ابتدا محلول Skim milk (۱٪) با سیترات فسفات بافر ۰/۰۰۵ مولار با pH ۷/۵ مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب داغ قرار داده شد. در ادامه ۱ میلی لیتر از سوبسترای یاد شده با ۱ میلی لیتر مایع روماند حاوی آنزیم مخلوط و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. واکنش با اضافه نمودن ۳ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ (TCA) با دمای ۲ درجه سانتی گراد، متوقف شد. به منظور رسوب پروتئین های هضم نشده، لوله ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۲ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با دور rpm ۱۴۰۰ سانتریفوژ گردیدند. در نهایت جذبمایع روماند شفاف در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه Biochrom UV/ visible spectrophotometer خوانده شد. فعالیت آنزیمی پروتئاز برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند یک میکروگرم فرآورده تیروزین را در هر میلی لیتر، از سوبسترای کازئین در مدت یک دقیقه تولید نماید. این فعالیت به صورت واحد آنزیمی در میلی لیتر (U/ml) گزارش گردید.

ز) تولید و رسوب دهی پروتئین: ۳۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی ذخیره شده، در ۳ میلی لیتر محیط Skim milk broth تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه و دور ۲۰۰rpm به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در ۳ میلی لیتر محیط Luria Bertani مایع تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه و دور ۲۰۰rpm به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. پس از گذشت مدت زمان یاد شده و ترشح آنزیم (هیدرولیز کامل محیط)، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند. ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به وسیله استون سرد ۱۰۰٪ تا ۸۰٪ حجم سوسپانسیون به صورت قطره قطره و همراه با تکان ملایم رسوب دهی شد. محلول اشباع حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت در یخچال قرار داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار با درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. به رسوب حاصله ۵۰ میکرولیتر Tris-Hcl ۰/۰۱ مولار با pH ۸ اضافه و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

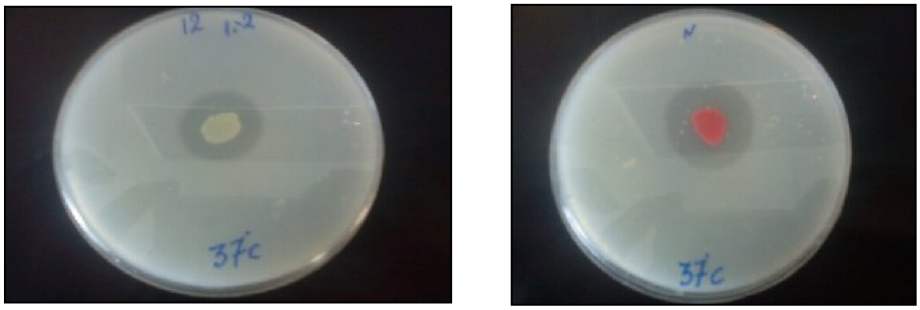
ح) تعیین وزن مولکولی با استفاده از SDS-PAGE: آنزیم سراشیوپپتیداز خالص مطابق با روش ماکلسون (Machielsen) به وسیله سدیم دودوسیل سولفات- ژل پلی آکریل آمید (۱۵٪) الکتروفورز گردید (۱۸). در این مطالعه ژل جدا کننده دارای pH ۸/۸ و ژل متراکم کننده دارای pH ۶/۸ بودند. در ادامه نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم و در حالت مخلوط با بافر نمونه و Reducing Agent درون ژل بارگیری شدند. در نهایت ژل به کمک محلول رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو(Coomasie brilliant blue R-250) به مدت ۱۶ ساعت با دور rpm ۴۰ رنگ آمیزی گردید.

یافته ها

در این پژوهش از میان ۱۵۰ نمونه آب و خاک مورد بررسی، ۷۵ باکتری جداسازی گردید. پس از غربال سازی بر روی محیط Skim milk agar، ۶۰ باکتری دارای فعالیت پروتئولیتیکی شناسایی شد (شکل ۱).

الف) ویژگی مورفولوژیک و بیوشیمیایی: ارزیابی ویژگی ظاهری و میکروسکوپی نشان داد که باکتری مولد پروتئاز دارای کلنی های سفید- صورتی یا قرمز رنگ و موکوئیدی می باشد. رنگ آمیزی گرم نیز نشان دهنده وجود باسیل های کوتاه گرم منفی بوده است. همچنین این سویه ها از نظر آزمون های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، سیترات و هیدرولیز کازئین مثبت بودند. اما از نظر تست های اکسیداز، اندول و اوره آز منفی بودند.

ب) Specific - PCR: از آنجایی که در این مطالعه به منظور شناسایی *سراشیا مارسیسنس* از پرایمرهای اختصاصی گونه استفاده شده گردید، مشاهده باند در محدوده ۴۱۷ جفت باز،



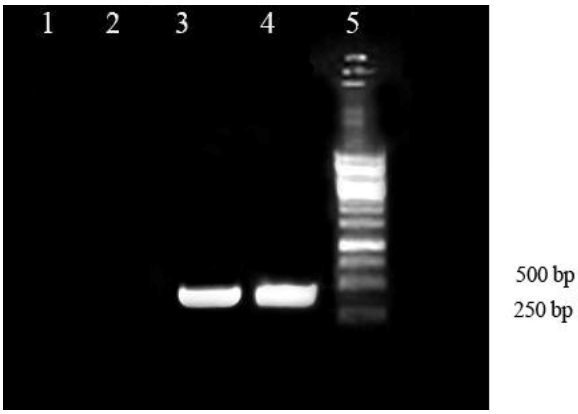
شکل ۱: هاله پروتئازی نمونه های *(Serratia marcescens 424)* N و ۱۲ در محیط Skim milk Agar.

تنها در ۲ نمونه، تأیید کننده حضور *سراشیا مارسیسنس* در آنها می باشد (شکل ۲). پس از مقایسه توالی به دست آمده از نظر همولوژی با سایر ژن های مشابه، مشخص گردید که سویه جداسازی شده جدید و دارای همولوژی ۹۸٪ می باشد (جدول ۱). این سویه با نام *Serratia marcescens* 424 در بانک جهانی ژن با شماره دسترسی KC790390 به ثبت رسید.

ج) بهینه سازی حرارتی: همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، قطر هاله ها با گذشت زمان افزایش داشت. به طوری که بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گزارش گردید.

د) فعالیت آنزیمی پروتئاز: در این مطالعه فعالیت آنزیمی برای نمونه N معادل ۱۹۹/۸۰ U/ml و برای نمونه شماره ۱۲ معادل ۱۵۵/۲۹ U/ml محاسبه شد.

ه) نتایج ارزیابی آنزیم با SDS – PAGE: نتایج نشان داد که آنزیم به دست آمده از نمونه N در محیط Luria Bertani broth (حاوی تریپتون و عصاره مخمر) دارای وزنی معادل ۵۲ کیلو دالتون و نمونه ۱۲ دارای وزنی حدود ۶۰ تا ۷۰ کیلو دالتون می باشند (شکل ۳). این در حالی است که نمونه N در محیط Skim milk broth فاقد هرگونه باندی بود و تنها نمونه ۱۲ در این محیط ایجاد باند نمود. نتایج نشان داد که حداکثر میزان تولید آنزیم سراشیوپپتیداز زمانی روی می دهد که هم تریپتون و هم عصاره مخمر در محیط کشت وجود داشته باشد. اما برای تولید آنزیم پروتئاز ترکیب خاصی مد نظر نیست و این آنزیم در هر دو محیط تولید می گردد.



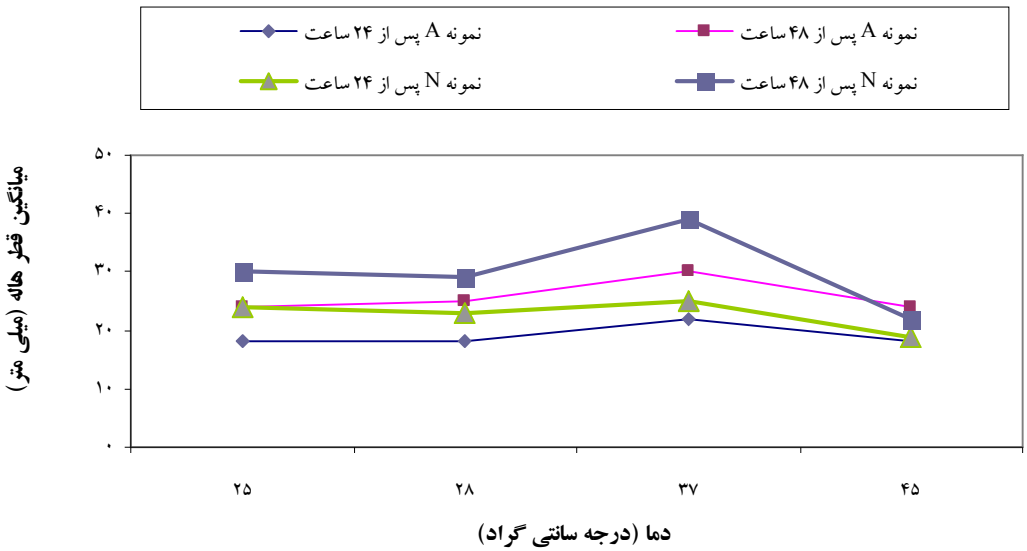
شکل ۲: الکتروفورز حاصل از تکثیر بخشی از ژن 16S rDNA با پرایمر اختصاصی *سراشیا مارسیسنس*. ستون ۱) کنترل منفی، ستون ۳) نمونه شماره ۱۲، ستون ۴) نمونه N، ستون ۵) سایز مارکر (1 kb).

بحث

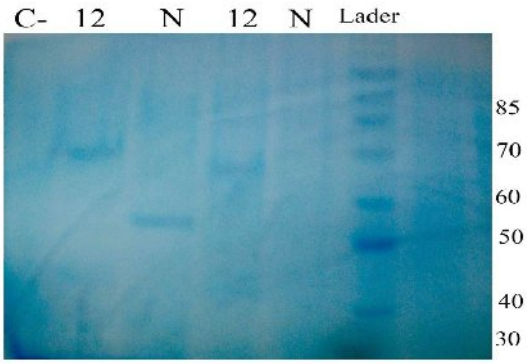
در مواردی که نمونه مورد آزمایش میکروارگانیسم های موجود در آب و خاک باشد، نمونه گیری از مناطق مختلف و بسته به نوع پروتئاز مورد بررسی می تواند متغیر باشد. در مطالعه ای

جدول ۱: همولوژی بخش تکثیر شده 16S rDNA سویه *Serratia marcescens 424* با سایر سویه های ثبت شده در NCBI.

سویه شناسایی شده	سایر ژن های مشابه	درصد همولوژی
Serratia marcescens 424	*Serratia marcescens SER1*	٪۹۸
	Serratia marcescens BW30	٪۹۸
	Serratia marcescens GRD 1	٪۹۸
	Serratia marcescens LEP9	٪۹۸
	Serratia marcescens RSPB11	٪۹۸



نمودار ۱: نتایج مربوط به بهینه سازی دمایی آنزیم سراشیوپپتیداز.



شکل ۳: باند پروتئینی در ژل SDS-PAG. ستون ۱) کنترل منفی، ستون ۲) نمونه شماره ۱۲ در محیط Luria Bertani broth، ستون ۳) نمونه N در محیط Luria Bertani broth، ستون ۴) نمونه شماره ۱۲ در محیط Skim milk broth، ستون ۵) نمونه N در محیط Skim milk broth، ستون ۶) سایز مارکر (SMO431).

که توسط تمیلمانی (Tamilmani) و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد، پروتئاز خارج سلولی از خاک مناطق مرغ داری جداسازی گردید. این آنزیم قادر به هضم و هیدرولیز پر مرغ و خروس (به عنوان یک محصول جانبی زائد در مرغداری ها) بود (۱۸). به طور تقریباً مشابه در پژوهش حاضر به منظور جمع آوری میکروارگانیسم های بیشتر، نمونه گیری از خاک و آب کشتارگاه های دام و طیور غرب مازندران انجام گرفت.

بررسی ها نشان می دهد که باکتری *سراشیا مارسیسنس* قادر به تولید بسیاری از آنزیم های خارج سلولی مانند کیتوزاناز، نوکلئاز، لیپاز، همولیزین، سرین، پروتئاز تیول و متالوپروتئیناز (ترپسین، کیموترپسین و سراشیوپپتیداز) می باشد (۱۹و۲۰).

موهان کومار (Mohankumar) و هری کریشنا راج (Hari Krishna Raj) در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ در هند انجام دادند، از *سراشیامارسیسنس* آنزیم سراشیوپپتیدازی را جداسازی نمودند که در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و pH ۶ دارای فعالیت آنزیمی معادل ۲۱۰/۵۶ U/ml بود (۲۱).

بدهه (Badhe) و همکاران در سال ۲۰۰۹ شرایط بهینه تخمیر را با هدف تولید آنزیم سراشیوپپتیداز از *سراشیا مارسیسنس* ATCC 13880 در محیط های کشت پایه و اصلاح شده با یکدیگر مقایسه نمودند. نتایج آنها نشان داد که تولید متوسط تخمیر اصلاح شده در شرایط pH ۷، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۲۴ ساعت برابر با ۲۷/۳۶ U/ml بود. اما میزان تولید آنزیم سراشیوپپتیداز در محیط کشت پایه U/ml ۱۷/۹۷ گزارش گردید (۲۲). با این وجود در مطالعه حاضر باکتری *سراشیا مارسیسنس* سویه ۴۲۴ در pH ۷/۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد فعالیتی معادل U/ml ۱۹۹/۸۰ داشته است. همچنین یافته های تحقیق حاضر نشان می دهد که تولید آنزیم

سراشیوپپتیداز پس از ۱۲ ساعت شروع و با گذشت ۴۸ ساعت تخمیر به اتمام می رسد. موکش کومار (Mukesh Kumar) و همکاران در سال ۲۰۱۲، پس از ارزیابی تولید آنزیم های لیپاز و پروتئاز توسط *سراشیامارسیسنس* دریافتند که حداکثر تولید آنزیم لیپاز ۱۹۵ U/ml و آنزیم پروتئاز ۱۷۳ U/ml پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون می باشد (۲۳).

در پژوهش حاضر از محیط کشت Skim milk agar به منظور جداساری باکتری ها استفاده گردید. در این محیط جدایه ها با مصرف کازئین موجود، قادر به فعالیت پروتئازی بودند. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که بیشترین فعالیت پروتئازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، پس از گذشت ۴۸ ساعت و با قطر هاله ۳۳ میلی متر، مربوط به باکتری *سراشیا مارسیسنس* ۴۲۴ بوده است. با استفاده از روش SDS-PAGE مشخص گردید که وزن مولکولی و استاندارد آنزیم سراشیوپپتیداز در سویه N، ۵۲ کیلو دالتون می باشد. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه موهان کومار و هری کریشنا راج در سال ۲۰۱۱ هم خوانی دارد (۲۱).

همچنین در مطالعه حاضر وزن مولکولی سویه شماره ۱۲ حدود ۶۰ تا ۷۰ کیلودالتون گزارش گردید که با یافته های موکش کومار و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطابقت دارد. این محققان وزن مولکولی آنزیم پروتئاز را در باکتری *سراشیا مارسیسنس* معادل ۵۰ تا ۷۵ کیلو دالتون و وزن مولکولی آنزیم لیپاز را ۵۰ تا ۶۵ کیلو دالتون گزارش نمودند (۲۳).

از آنجایی که مایع روماند گونه *سراشیا مارسیسنس* عاری از ناخالصی های پروتئینی بود و همچنین به دلیل ترشحی بودن آنزیم، خالص سازی آنزیم پروتئاز بدون نیاز به انجام روش پر هزینه کروماتوگرافی انجام گرفت. به طوری که رسوب دهی از طریق دناتوراسیون نسبی آنزیم با استون و سپس بازسازی ساختار پروتئینی، روشی کارآمدتر و کم هزینه تر نسبت به روش یاد شده می باشد.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان دهنده پتانسیل بالای *سراشیا مارسیسنس* سویه ۴۲۴ در تولید پروتئاز و سراشیوپپتیداز می باشد. بنابراین از این آنزیم ها می توان در صنایع مختلف به ویژه داروسازی استفاده بهینه نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Grimont F, Grimont PAD. The Genus *Serratia*. Prokaryotes. 2006; 6: 219-244.
2. Salamone PR, Wodzinski RJ. Production, purification and characterization of a 50-kDa extracellular metalloprotease from *Serratia marcescens*. Appl Microbiol Biotechnol. 1997; 48 (3): 317-324.
3. Ahamed A, Vermette P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. Biochem Eng J. 2010; 49(3): 379-387.
4. Sharma A, Tiwari R. Extracellular enzyme production by environmental strains of *Serratia* spp. isolated from river Narmada. Indian J Biochem Biophys. 2005; 42(3): 178-181.
5. Someya N, Nakajima M, Hirayae K, Hibi T, Akutsu K. Synergistic antifungal activity of chitiolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens*

strain B_2 against gray mold pathogen *Botrytis cinerea*. J Gen Plant Pathol. 2001; 67(4): 312-317.

6. Gupta R, Beg Q.K, Lorenz P. Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 59(1):15-32.

7. Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline proteases: a review. Bioresour Technol. 1998; 64 (3): 175-183.

8. Mazzone A, Catalani M, Costanzo M, Drusian A, Mandoli A, Russo S, Guarini E, Vesperini G. Evaluation of *Serratia* peptidase in acute or chronic inflammation of otorhinolaryngology pathology: a multicentre, double-blind, randomized trial versus placebo. J Int Med Res. 1990; 18(5): 379-388.

9. Klein G, Kullich W. Short-term treatment of painful osteoarthritis of the knee with oral enzymes, a randomized, double-blind study versus diclofenac. Clin Drug Invest. 2000; 19(1): 15-23.

10. Fujisaki S, Ohnuma S, Horiuchi T, Takahashi I, Tsukui S, Nishimura Y, Nishino T, Kitabatake M, Inokuchi H. Cloning of a gene from *Escherichia coli* that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. Gen. 1996; 175(1-2): 83-87.

11. Decedue CJ, Broussard EA, Larson AD, Braymer HD. Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Serratia marcescens*. Biochem Biophys Acta. 1979; 569(2): 293-301.

12. Miyata K, Tomoda K, Isono M. *Serratia* protease Part III. Characteristics of the enzyme as a metalloenzyme. Agric Biol Chem. 1971; 35: 460-467.

13. Braun V, Schmitz G. Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. Arch Microbiol. 1980; 124(1): 55-61.

14. Casta eda-Agullo M. Studies on the biosynthesis of extracellular proteases by bacteria: I. *Serratia marcescens*, synthetic and gelatin media. J Gen Physiol. 1956; 39(3): 369-375.

15. Miyazaki H, Yanagida N, Horinouchi S, Beppu T. Specific excretion into the medium of a serine protease from *Serratia marcescens*. Agric Biol Chem. 1990; 54(10): 2763-2765.

16. Giri AV, Anandkumar N, Muthukumaran G, Pennathur G. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. BMC Microbiol. 2004; 4(11): 1-10.

17. Blakebrough N, Moresi M. Scale-up of whey fermentation in a pilot-scale fermenter. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 1981; 12(3): 173-178.

18. Tamilmani P, Umamaheswari A, Vinayagam A, Prakash B. Production of an extra cellular feather degrading enzyme by farm soil in Namakkal district (Tamilnadu). Int J Poultry Sci. 2008; 7(2): 184-188.

19. Ustariz FJ, Laca A, Garcia LA, Diaz M. Fermentation conditions increasing protease production by *Serratia marcescens* in fresh whey. Rev Tec Ing Univ Zulia. 2008; 31(1): 79-89.

20. Michaelis S, Chapon C, D'Enfert C, Pugsley AP, Schwartz M. Characterization and expression of the structural gene for pullulanase, a maltose-inducible secreted protein of

Klebseiella odeling. J Bacteriol. 1985; 164(2): 633-638.

21. Mohankumar A, Hari Krishna Raj R. Indirect genetic characterization of *Serratia marcescens*. J Biol Life Sci. 2012; 3(1): 174-188.

22. Badhe RV, Nanda RK, Kulkarni MB, Bhujbal MN, Patil PS, Badhe SR. Media optimization studies for Serratiopeptidase production from *Serratia marcescens* ATCC 13880, Hindustan Antibiot Bull. 2009; 51(1-4): 17-23.

23. Mukesh Kumar DJ, Lawrence L, Rajan R, Priyadarshini S, Sandhiya K. Characterization of lipase and protease from *Serratia Marcescens* DEPTK21 and its destaining capability. Asian J Exp Biol Sci. 2012; 3(3): 621-628.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 2, June 2013

Original Article

Molecular screening and of extracellular protease producing *Serratia marcescens* from the different environments of west Mazandaran

Raheleh Soltanmoradi[1], Amir Salim Razmara[2], Seyed Reza Hoseini doost[3]

[1] M.Sc., Department of Microbiology, Advance Sciences and Technology Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2]Advanced Diploma, Department of Veterinary, Chalus Branch, Islamic Azad University, Chalus, Iran.
[3]Professor, Department of Microbiology, Advance Sciences and Technology Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives: Proteases are a useful family of enzymes in microbiology with applications in leather industry, food industry, pharmacy, cleaners, and many other industries. Due to rapid replication, fast growing and facility in their genetic manipulations, microorganisms are used as the main resources of production of proteases. This paper aimed to isolate the *Serratia marcescens* strains from the natural environments at western Mazandaran, with the ability to produce proteolytic enzymes.

Materials and Methods: In the present study, 150 natural samples were taken from different depth (0-10 cm) of soils and waters located at western part of Mazandaran. In order to isolate and to identify the microorganisms the samples were grown on Skim milk agar, and the isolates were underwent different biochemical tests. Next, *Serratia marcescens* strains were screened by molecular tests and 16SrRNA. After isolation of the strains, several time and temperature optimization steps were performed on the most potent enzyme producing strains. As well, approximate molecular weight of the enzymes were measured abased on protein deposition and SDS-PAGE.

Results: Only two isolates were identified as *Serratia marcescens*. One of the two isolates belongs to a novel strain nominated as *Serratia marcescens* 424, which recorded in Genbank as KC790390. These two isolates could produce high levels of proteolytic enzyme in 24 hours under 37°C. The highest amount of enzyme belonged to a 52 Dalton molecular weight isolated from *Serratia marcescens* 424.

Conclusion: Our studies show a high potential of the isolated *Serratia marcescens* strains in production of protease and Serratiopeptidase. As a result these strains can be useful in various industries.

Keywords: *Serratia marcescens*, 16S rDNA, Serratiopeptidase, Enzyme activity, SDS-PAGE.

Correspondance to: Raheleh Soltanmoradi

Tel: +989353665683

E-mail: msoltanmoradi29@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(2): 148-156.