بررسی پراکندگی و فعالیت باکتری‌های پروتئولیتیک دریایی در لایه‌های سطحی و زیرسطحی حوزهٔ جنوبی دریای خزر

مریم طباطبایی‌نسب*

چکیده

آنزیم‌های پروتئاز که مواد پروتئینی را به مواد ساده‌تر و آمینواسیدها تبدیل می‌کنند، در صنایع مختلف، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. باکتری‌های مختلف، از جمله گونه‌هایی از باسیلوس و آئروموناس، توانایی تولید این آنزیم‌ها را دارند.

در این تحقیق، به منظور جداسازی باکتری‌های پروتئولیتیک، ابتدا از آبهای سطوح مختلف آب از حوزهٔ جنوبی دریای خزر در مناطق خزرآباد و ساری نمونه‌برداری شد و از نمونه‌های آب و رسوب تهیه‌شده، بر روی محیط کشت Milk Agar کشت داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای مساعد ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از آن، کلنی‌ها از نظر تعداد، مورفولوژی و فیزیولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحلهٔ بعد به منظور جداسازی پروتئاز از نمونه‌های باکتری‌های پروتئاز مثبت جدا شده در محیط skim milk ۱٪ کشت تهیه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد درون انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ قرار داده شد. بعد از سانتریفوژ نمونه در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و افزودن آزوگازئین ۲٪ به عنوان سوبسترا و بافر فسفات سدیم، تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ سود و یک مولار، جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین به روش بردفورد محاسبه گردید. سپس

* کارشناس تجهیزات آزمایشگاهی، سازمان مرکزی دانشگاه پیام نور

Archive of SID

www.SID.ir

نمونهٔ تخلیص‌شده به روش SDS – PAGE الکتروفورز گردید. در مرحلهٔ بعد، به منظور تعیین شرایط بهینه تولید آنزیم، اثر pH ، غلظت‌های مختلف نمک و دما بر روی تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

تمامی این باکتری‌ها باسیل‌های گرم منفی فاقد اندوسپور شناسایی شدند. در بین باکتری‌های مزبور، تحت شرایط ذکرشده، یک سویه، توانایی بالاتری را در تولید آنزیم در خود نشان داد که مراحل تکمیلی شناسایی آن از طریق آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفت و گونهٔ آن به نام Flavimonas oryzihabitans توسط مؤسسه تحقیقاتی و تولیدی زکریا آزما شناسایی و تأیید شد.

بهترین نتایج حاصل از این تحقیق در pH ۷/۲، دمای ۳۰ درجهٔ سانتیگراد و غلظت‌های نمک ۲/۵-۰/۲ مولار به دست آمده است.

کلیدواژه

باکتریهای پروتئولیتیک، پروتئاز، دریای خزر.

مقدمه

آنزیمهای پروتئاز که مواد پروتئینی را به مواد ساده‌تر و آمینواسیدها تبدیل می‌کنند، شامل کموتریپسین و تریپسین، پروتئازهای پانکراتیک، بروملانین (Bromelanine)، آنزیم آناناس، پاپائین (Papain)، آنزیم انبهٔ هندی و پپتیدهای آنتروباکتری سراشیا (Serratia) می‌باشند(Murray, 2001).

آنزیم‌های پروتئاز از اهمیت صنعتی بالایی برخوردارند. بیش از ۶۰ درصد آنزیم‌های تجارتی را پروتئازها تشکیل می‌دهند(عالم‌زاده، ۱۳۷۷).

شناخت واقعی پروتئازهای قلیایی مورد استفاده در شوینده‌ها از سال۱۹۶۰ توسعه یافت. در حال حاضر، تولید پروتئازهای قلیایی مورد استفاده در شوینده‌ها، ۲۵ درصد تولید آنزیم‌های تجارتی را تشکیل می‌دهد. پروتئاز در صنایع لبنی موجب ایجاد طعم و رایحهٔ مناسب در پنیر می‌شود. افزودن آنزیم پروتئاز موجب تقلیل مدت رسیدن پنیر به چند هفته می‌شود. پروتئاز آسپرژیلوس اوریزا در صنایع نان نیز از جملهٔ پروتئازهای قابل بررسی است (عالم‌زاده،۱۳۷۷).

پروتئازها در تنظیم‌های متابولیکی مانند انعقاد خون و کنترل فشار خون مؤثرند (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶).

تاریخچهٔ استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک در درمان سرطان بسیار طولانی است. در سال ۱۹۰۶ جان برد، جنین‌شناس اسکاتلندی، در کتاب خود تحت عنوان *درمان سرطان با آنزیم*، روش موفق استفاده از عصارهٔ پانکراتیک را توضیح داد (Murray, 2001).

با توجه به اهمیت استفاده از این آنزیم در صنایع مختلف، دستیابی به منابع دیگر تولیدکنندهٔ آنزیم ضروری به نظر می‌رسد. به همین جهت میکروارگانسیم‌های دریایی که در این زمینه ناشناخته‌تر می‌باشند مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهش با اهداف زیر انجام شد:

۱. جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروتئولیتیک از حوزهٔ جنوبی دریای خزر؛

۲. جداسازی پروتئاز باکتریایی از نمونه‌های باکتری‌های پروتئاز مثبت جداشده؛

۳. تعیین شرایط بهینهٔ تولید آنزیم، بررسی اثر pH و غلظت‌های مختلف نمک و دما بر روی تولید آنزیم؛

۴. الکتروفورز پروتئاز تولیدشده با روش SDS-PAGE .

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از آب و رسوب از ۲ ایستگاه (ساری ـ خزرآباد) یک نمونه در یک‌متری و دیگری در پنج‌متری سواحل جنوبی دریای خزر (فاصلهٔ منطقهٔ نمونه‌برداری از ساحل) توسط نمونه‌برداری «ون وین گرب» صورت گرفت.

جهت جداسازی باکتری‌های پروتئولیتیک دریایی، نمونه‌های آب و رسوب نمونه‌برداری شده از ۲ ایستگاه یادشده، روی محیط کشت skim milk Agar به روش خطی کشت داده و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°c گرماگذاری شد. کلنی‌های رشدکرده را در این محیط ـ که اطراف آنها هالهٔ شفاف ایجاد شده است ـ شناسایی و سپس کلنی‌های جدا شده را خالص نموده، از نظر مورفولوژی، ماکروسکوپی و پراکندگی باکتری‌های پروتئولیتیک، در دو ایستگاه نمونه‌برداری شده بررسی کردیم.

جداسازی پروتئاز باکتری‌های جداشده

۱. برای جداسازی، از محیط‌های کشت حاوی skim milk 1% و محیط نوترنیت استفاده گردید.
ـ سوسپانسیون باکتریایی که با شاهد مک فارلند مقایسه شده‌بود، به نسبت ۳ تا ۵ درصد به محیط نوترنیت و٪۱ skim milk تلقیح گردید.

۲. نمونهٔ فوق در ۱۰۰۰۰ دور به مدت۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی آن به‌منظور بررسی وجود آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

۳. ۰/۱۵ ml مایع رویی به ۰/۲۵ ml بافر فسفات ۵ mM با pH معادل ۷ (خنثی) که حاوی ۲۰٪ Azocascin به‌عنوان سوبسترا بود اضافه شد.

۴. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در حمام ۲۵ درجه قرار داده شد.

۵. سپس به آن ۱/۲ ml از TCA (تری کلرو استیک اسید) ۱۰ درصد اضافه کرده، نمونه را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دادیم تا فعالیت آنزیم متوقف شود.

۶. نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ کرده، رسوب را حذف نمودیم و مایع رویی آن به‌منظور بررسی وجود آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

۷. ۱/۲ میلی‌مول نمونه به ۱/۴ میلی مول NaOH یک مولار اضافه گردید.

۸. میزان جذب در نمونهٔ مورد نظر، در طول موج ۵۹۵ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد(In Jae Park at.aL. 2003).

۹. میزان غلظت پروتئین را با روش برَد فورد تعیین گردید (Ford, 1975).

روش انجام آزمون به ترتیب زیر می‌باشد:

- از محلول آلبومین سرم گاوی با غلظت نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر، با مقادیر ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکرولیتر، در دو سری لوله ریخته و حجم هر لوله، به‌وسیلهٔ نمک طعام با غلظت ۰/۱۵ مول، به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد.
- به هر لوله ml ۱ از محلول رنگی کوماسی برلیانت بلو اضافه نموده و دو دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شد.
- جذب هریک از نمونه‌های فوق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد، سپس منحنی استاندارد رسم گردید (نمودار ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی نوع پروتئاز تولیدشده با روش الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دو دودسیل سولفاَت *(SDS-PAGE)*

بررسی شرایط بهینهٔ تولید آنزیم

ابتدا نمونه‌ها را روی محیط کشت حاوی شیر (میلک آگار) که دارای pH=5، pH=7 و pH=9 است به صورت نقطه‌ای کشت دادیم. سپس نمونه‌ها را در دمای ۳۰˚c به مدت ۹۶ ساعت گرماگذاری کرده، در فواصل زمانی مختلف قطر هالهٔ شفاف باکتری را اندازه‌گیری نمودیم.

بررسی اثر دما بر روی تولید آنزیم

ابتدا نمونه‌ها را روی محیط کشت حاوی شیر (میلک آگار) کشت داده و در دماهای مختلف ۲۵˚c، ۳۰˚c، ۳۷˚c و به مدت ۱۲۰ ساعت گرماگذاری نمودیم و در فواصل زمانی مختلف قطر هالهٔ شفاف باکتری را اندازه‌گیری کردیم.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک بر روی تولید آنزیم

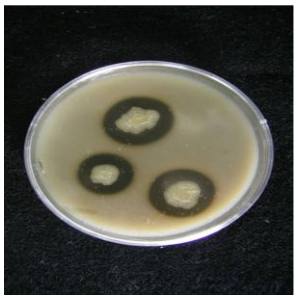
باکتری‌ها را بر روی غلظت‌های مختلف Nacl ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و۲/۵ مولار کشت دادیم و به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری کردیم.

آزمون‌های شناسایی سویه‌های باکتری

شناسایی سویه‌های جداشده، توسط روش‌های معمول میکروبیولوژیک (روش‌های میکروسکوپی، ماکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی) صورت گرفت.

نتیجه‌گیری

نتایج کشت نمونه‌های آب و رسوب نمونه‌برداری شده در عکس۱ مشاهده می‌شود.



عکس۱: نمایی از باکتری خالص‌شدهٔ پروتئولیتیک بر روی پلیت حاوی محیط skim milk. هالهٔ شفاف در اطراف کلنی‌ها نشانهٔ پروتئاز مثبت بودن باکتری‌هاست.

از بین باکتری‌های پروتئولیتیک جداشده، سه باکتری خاصیت پروتئاز بهتری نشان دادند و از بین آنها نیز باکتری A1 به‌عنوان بهترین باکتری مولد پروتئاز که از رسوب ایستگاه خزرآباد نمونه‌گیری شده بود، شناسایی گردید. با توجه به نتایج حاصل، درصد تعداد کل کلنی‌های باکتری‌های پروتئولیتیک در نمونهٔ رسوب، در ایستگاه ساری ۹٪ و در ایستگاه خزرآباد ۱۲/۶٪ اعلام شد و تعداد کل کلنی‌های باکتری‌های پروتئولیتیک در نمونهٔ آب در ایستگاه ساری ۶/۶٪ و در ایستگاه خزرآباد ۷/۵ ٪ اعلام گردید.

بنابراین، با توجه به نتایج حاصل از شمارش تعداد کلنی‌های باکتری‌های پروتئولیتیک از نمونه‌های آب و رسوب دو ایستگاه ساری و خزرآباد در حوزهٔ جنوبی دریای خزر، تعداد باکتری‌های پروتئولیتیک در نمونهٔ رسوب، بیش از نمونهٔ آب می‌باشد(جدول ۱).

جهت جداسازی پروتئاز باکتری‌های جداشده، میزان جذب نمونه را توسط دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۹۵ نانومتر بررسی و با مقایسه با منحنی استاندارد برَد فورد، میزان پروتئین ۰/۳۴۰ میلی‌گرم، میلی لیتر گزارش گردید (نمودار ۱).

1. Coomasie Brilliant Blue Solution

Archive of SID

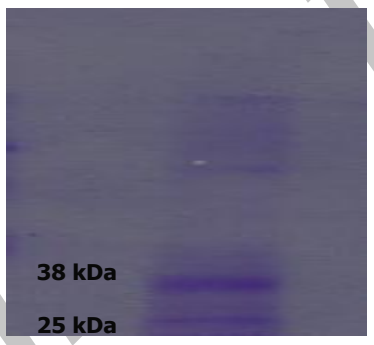
www.SID.ir

تعیین پروتئاز تولیدشده با الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-AGE) بررسی شد و دو باند پروتئینی با وزن مولکولی ۳۸ و ۲۵ کیلودالتون مشاهده شد.

جدول۱. وضعیت تعداد باکتری‌های پروتئولیتیک از نمونه‌های آب و رسوب دو ایستگاه ساری و خزرآباد در حوزهٔ جنوبی دریای خزر

تعداد کل کلنی	ایستگاه ساری		ایستگاه خزرآباد	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
تعداد کل کلنی‌های باکتریایی در نمونهٔ رسوب	۵۵	–	۷۹	–
تعدا کل کلنی‌های باکتری‌های پروتئولیتیک در نمونهٔ رسوب	۵	۹	۱۰	۱۲/۶

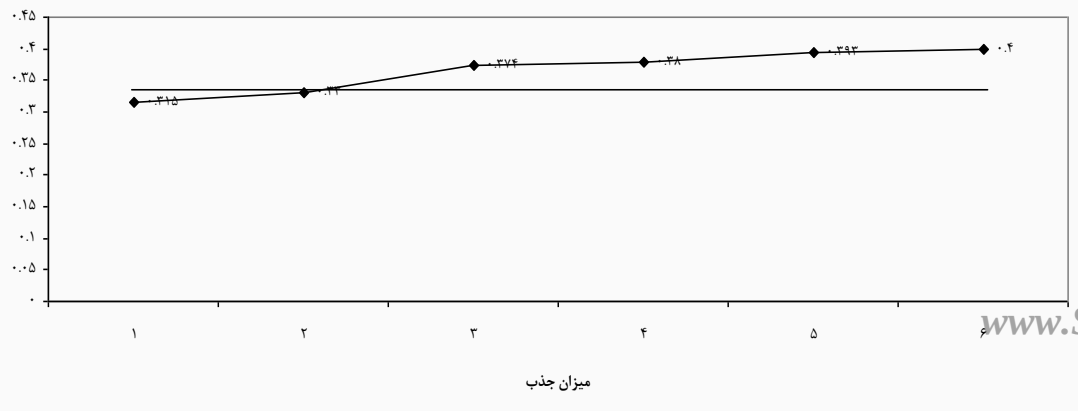
تعداد کل کلنی	ایستگاه ساری		ایستگاه خزر آباد	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
تعداد کل کلنی باکتریایی در نمونهٔ آب	۳۰	–	۴۰	–
تعداد کل کلنی‌های باکتری‌های پروتئولیتیک در نمونهٔ آب	۲	۶/۶	۳	۷/۵



عکس۲. نمایی از باندهای پروتئینی مشاهده شده با روش (SDS-PAGE).

در بررسی نتایج حاصل از بهینه‌سازی آنزیم مشاهده‌شده، بهترین pH برای رشد باکتری پروتئولیتیک، pH برابر ۷ و بهترین دما برای رشد باکتری ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد است؛ همچنین، بهترین رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نمک ۰/۲ الی ۲/۵ مولار انجام گرفته است(جدول‌های ۲، ۳ و ۴).

نمودار۱. جذب نمونهٔ پروتئاز باکتری جدا شده A۱



www.SID.ir

جدول ۲. جدول زمان‌بندی رشد باکتری پرتئولیتیک در محیط کشت Skim milk در pH های ۵،۷،۹

pH	کلنی	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹٦ ساعت
pH5	A۱	۰	۰	۰	۰
	A۲	۰	۰	۰	۰
	A۳	۰	۰	۰	۰
pH9	A۱	۱۲mm	۱۹ mm	۲۵ mm	۳٤ mm
	A۲	۱٤ mm	۲۰ mm	۳۱ mm	۳۵ mm
	A۳	۹ mm	۱٦ mm	۲۲ mm	۳۰ mm
pH7	A۱	۲۰ mm	۲۷ mm	۳۳ mm	٤۰ mm
	A۲	۱۵ mm	۲٤ mm	۳۲ mm	٤٤ mm
	A۳	۱٤ mm	۲۰ mm	۲٦ mm	۳۱ mm

جدول ۳. جدول زمان‌بندی رشد باکتری پروتئولیتیک در محیط کشت Skim milk در دماهای مختلف ۲۵°c، ۳۰°c، ۳۷°c

دما	کلنی	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹٦ ساعت	۱۲۰ ساعت
۲۵ °C	A۱	۱۰ mm	۱۵ mm	۲۵ mm	۳۰ mm	۳٤ mm
	A۲	۱۲ mm	۱٦ mm	۲۷ mm	۳۰ mm	–
۳۰ °C	A۱	۱۷ mm	۲۱ mm	۳٤ mm	۳٦ mm	۳٦ mm
	A۲	۱٤ mm	۲۰ mm	۲۷ mm	۳۳ mm	۳۷ mm
۳۷ °C	A۱	۱۵ mm	۲۰ mm	۲۵ mm	۳٦ mm	–
	A۲	۱٤ mm	۱۸ mm	۲۲ mm	۲٦ mm	۳۰ mm

جدول ٤. جدول رشد باکتری پروتئولیتیکA1 در غلظت های مختلف NaCl

لوله	غلظت مختلف نمک	رشدباکتری
۱	لوله شاهد	– (شفاف بودن لوله)
۲	۰/۲ مولار	+ (کدر شدن لوله)
۳	۰/۵ مولار	+
٤	۱ مولار	+
۵	۱/۵ مولار	+
٦	۲ مولار	+
۷	۲/۵ مولار	+

www.SID.ir

شناسایی سویه‌های جداشده توسط روش‌های معمول میکروبیولوژیک (روش‌های میکروسکوپی، ماکروسکوپی) و تست‌های بیوشیمیایی انجام‌شده، منتهی به این نتیجه شد که سویهٔ باکتری جداشده از رسوبات جنوبی دریای خزر مورد تأیید مؤسسه تحقیقاتی زکریا آزما، Flavimonas oryzihabitans قرار گرفت.

جدول۵. نتایج حاصل از انجام تستهای بیوشیمیایی سویه Al

Test KIA reaction OF	Result AIK/NC oxidative	Strain
Oxidase reaction	+	Flavimonas oryzihabitans
Catalase	+	
Growth on Mac Conkey	+	
Hyrolysis of Gelatin		
Starch	-	
Casein	-	
Urea	-	
Esculin	-	
Indole	-	
SH2	-	
Motility	+	
Optimal growth aat 30 °c	+	
Mannitol	+	
Xylose	+	
Sucorse	+	
Maltose	+	
Glucose	+	
Ornithine decarboxylase	-	
Lysine decarboxylase	-	
ONPG	-	
Phenylalanine deminase Lecithinase	-	
	-	

مشخصات میکروسکوپی کلنی پرتئولیتیک به روش رنگ‌آمیزی گرم مشاهده شد. نوع باکتری باسیل گرم منفی بدون اسپور و بدون کپسول بود.

جدول ۶. نتایج حاصل از تشخیص سویهٔ باکتری پروتئولیتیک A-1

نام سویه	محل جدا سازی	روش رنگ آمیزی گرم	مشخصات میکروسکوپی	مشخصات ماکروسکوپی	تعیین هویت نهایی
A-1	رسوب سواحل جنوبی دریای خزر (ساری)	باسیل گرم منفی	فاقد اسپور و کپسول، هوازی	کلنی مسطح با حاشیه صاف	**Flavimonas oryzihabitans**

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

عالم‌زاده، ایران (۱۳۷۷)، *فرایندهای آنزیمی*، انتشارات علمی دانشگاه صنعتی شریف؛

صبوری، علی اکبر و علی‌اکبر موسوی موحدی (۱۳۷۵)، *سینتیک آنزیمی*، انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، تهران؛

مرتضوی، سید علی؛ مهدی کریمی و دیگران (۱۳۷۶)، *بیوتکنولوژی میکروبیولوژی صنعتی*، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد؛

موری، درو؛ کوبایاشی، تامپسون (۱۳۷۱)، *باکتری‌شناسی پزشکی*، ترجمه نوید اسفندیاری و همکاران، انتشارات جهاد دانشگاهی؛

وزیری، بزرگمهر (۱۳۶۳)، *اصول آزمایش‌های بیوشیمیایی در میکروب‌شناسی تشخیصی*، انتشارات امیرکبیر، تهران.

Ford, Brad (1975), "the Bard ford Assay", *General Laboratory;*

In Jae Park at. aL. (2003), "Characterization of the proteolytic Activity of Bacteria Biological contactor", *the Journal of microbiology*, 73-77;

Mclean, Michelle (1990), *Survival of viruses in marine sediment*;

Murray, Michael. T. (2001), what are proteolytic Enzymes? *Proteolytic Enzymes in cancer therapy*;

Sharmin, S. at.aL. (2004),"proteolytic Activity of lactobacillus species Isolated from Rumen".■

Archive of SID

www.SID.ir