Archive of SID

تأثیر شرایط محیطی و غذایی بر تولید پروتئاز توسط یک گونهٔ باسیلوس جدا شده ازخاک پارک جنگلی لویزان

عباس اخوان سپهی*[۱]، لیلا جبل عاملی[۲]، اشرف السادات نوحی[۲] و جواد جعفری اقدم[۱]

[۱] تهران، دانشگاه آزاداسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی

[۲] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۲

چکیده

خاک پارکهای جنگلی تهران برای باسیلوسهای پروتئولیتیک مورد غربال سازی قرار گرفتند. پارکهای جنگلی مورد آزمایش شامل چیتگر، خجیر، سرخه حصار، لویزان و طالقانی بودند. در مجموع از ۵ نمونه خاک مورد آزمایش،٤۰ جدایه باسیلوس به دست آمد که پس از غربال سازی بر روی محیط Skim milk agar ، ۱۸جدایه واجد فعالیت پروتئولیتیکی بودند. با مقایسهٔ قطر هاله های شفاف، یکی از جدایه های پارک جنگلی لویزان- واقع درشمال شرق تهران- به منظور انجام مطالعات آزمایشگاهی بیشترانتخاب شد. این باکتری بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، رنگ آمیزی گرم، تستهای بیوشیمیایی و نهایتاً تعیین توالی ۱٦S rDNA به عنوان Bacillus sp. CR-179 تشخیص داده شد. تولید پروتئاز توسط باسیلوس کشت داده شده در محیط مایع حاوی ۱ درصد نشاسته به عنوان منبع کربن و ۰/٤ درصد عصارهٔ خیساندهٔ ذرت به عنوان منبع نیتروژن در مدت ۷۲ ساعت به بیشترین میزان خود یعنی U/mL ۳٤۰/۹۰۸ رسید. نشاسته و مالتوز بهترین سوبسترا برای تولید پروتئاز بودند، در حالی که برخی از قند های خالص از جمله فروکتوز، گلوکز و سوکروز تأثیری بر روی تولید پروتئاز نداشتند. در بین منابع متعدد نیتروژن آلی، عصارهٔ خیساندهٔ ذرت، که از منابع ارزان قیمت است، به عنوان بهترین منبع و به دنبال آن عصارهٔ مخمر، آب پنیر و عصارهٔ گوشت قرار داشتند.. این گونهٔ باسیلوس قادر به استفاده از اوره به عنوان یک منبع نیتروژن غیر آلی به منظور رشد وتولید پروتئاز نبود و pH بهینه برای تولید پروتئاز نیز ۸ تعیین شد. مطالعات انجام شده بر روی خصوصیات آنزیمی نشان داد که این پروتئاز خام بیشترین فعالیت خود را در pH~۹ و دمای ٦۰ درجهٔ سانتی گراد نشان داد که آن را برای به کارگیری در بسیاری از فعالیتهای صنعتی مناسب می سازد.

واژه های کلیدی: پروتئاز، باسیلوسهای پروتئولیتیک، باسیلوس لیکنی فورمیس خصوصیات آنزیمی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۲۹۷۷۸٤۸، پست الکترونیکی : khavansepahy@gmail.com

مقدمه

پروتئازها آنزیمهایی هستند که با افزودن مولکول آب به پیوندهای پپتیدی، پروتئینها را به پپتید های کوچک یا آمینواسیدهای آزاد، هیدرولیز می کنند. آنها جزء هیدرولازها و زیرکلاس پپتیدهیدرولازها یا پپتیدازها به شمار می آیند. پروتئازها یکی از مهم ترین گروه آنزیمهای صنعتی را تشکیل می دهند که حدوداً مسئول ٦۰ درصد از داد وستد وفروش آنزیمی در سراسر جهان هستند. پروتئازها در کاربردهای صنعتی متنوعی مانند صنایع دارویی، صنایع شوینده، صنعت چرم وبافندگی و صنایع غذایی ازجمله در ترد کردن گوشت، بهبود کیفیت خمیرنان وبهبود طعم ومزه بیسکویت و شیرینی مورد استفاده قرار می گیرند. درضمن پروتئازها در زدودن نقره

www.SID.ir

Archive of SID

از فیلمهای X-Ray نیز کاربرد دارند(۵ و ۷). پروتئازها توسط طیف گسترده ای از موجودات مانند حیوانات، گیاهان، قارچها و باکتریها تولید می شوند. دربین پروتئازهای متعدد، انواع باکتریایی درمقایسه با دیگر پروتئازها از اهمّیت بیشتری برخوردار هستند . در واقع میکرو ارگانیسم ها تولید کنندگان ترجیحی پروتئاز بوده وعلاوه براین که نیازمند فضای کوچکی برای کشت هستند، به راحتی می توانند مورد دستکاری ژنتیکی نیز قرار گیرند(١٦). به این ترتیب می توان آنزیمهای جدیدی را با ویژگیهای تغییر یافته تولید کرد که این ویژگیها برای بسیاری از کاربردها مناسب می باشند. در ضمن پروتئازهای میکروبی به طور طبیعی، خارج سلولی بوده وبه طور مستقیم توسط تولید کننده به محیط مایع ترشح می شوند. همچنین پروتئازهای میکروبی به علـّت رشد سریع تولید کنندگان آنها، درمدّت زمان نسبتاً کوتاهی توسط روشهای تخمیری تولید می شوند. و به همین دلیل است که نسبت به انواع حیوانی وگیاهی ارجحیت داشته واکثر پروتئازهای موجود منشأء میکروبی دارند. در بین باکتریهای تولید کنندۀ پروتئاز، باسیلوسها به عنوان تولید کنندگان اختصاصی پروتئازها می باشند (٦).

در این مطالعه با توجه به اهمیت پروتئازها درصنایع مختلف و اختصاصی بودن باسیلوسها به عنوان تولید کنندگان پروتئاز، خاک پارکهای جنگلی تهران (لویزان، چیتگر، سرخه حصار، طالقانی و خجیر) به منظور غربال سازی باسیلوسهای تولید کنندۀ پروتئاز مورد آزمایش قرارگرفت تا علاوه بر جداسازی باسیلوسهای پروتئولیتیک از هر نمونه خاک، قوی ترین جدایۀ مولد به منظور بهینه سازی شرایط تولید آنزیم شناسایی و تأثیر فاکتورهای غذایی و محیطی مختلف بر رشد و تولید پروتئاز توسط آن بررسی شود.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه از خاک: نمونه گیری از قسمتهای غنی خاک، یعنی اطراف ریشۀ گیاهان که به علت وجود ترشحات ریشه ای، میکروارگانیسم های بیشتری را در اطراف خود جمع کرده است، صورت گرفت. ابتدا لایه سطحی خاک کنار زده شد ونمونه های خاک از عمق ۱۰ تا ٤٠ سانتیمتری جمع آوری و پس از ریختن در فانلهای سترون در شرایط سرما به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی و غربال سازی باسیلوسها از نمونه های خاک: جداسازی با استفاده از روش متداول کخ و با بهره گیری از مقاومت اسپورها نسبت به حرارت صورت گرفت. باکتریهای جداشده بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، رنگ آمیزی گرم، تستهای بیوشیمیایی شامل هیدرولیز کازئین، لسیتین، ژلاتین، نشاسته، تستهای اوره آز، احیای نیترات، کاتالاز، تجزیۀ سیترات، بررسی حرکت باکتری و قابلیت استفاده از قند ها مانند مانیتول، مالتوز، گزیلوز و آرابینوز شناسایی شدند.

غربال سازی باسیلوسهای پروتئولیتیک: باکتریهای به دست آمده از مرحلۀ قبل بر روی محیط Skim milk agar کشت داده شده و به مدت٢٤ تا ٧٢ ساعت در دمای ٣٧ درجۀ سانتی گراد گرما گذاری شدند.در این مرحله باسیلوسهای قادر به تولید پروتئاز هاله های شفافی را در محیط ایجاد می کردند که نشان دهندۀ تجزیۀ کازئین توسط پروتئاز بود . در نهایت یکی از جدایه های پروتئولیتیک با توجه به بیشترین قطر هالۀ شفاف، انتخاب شد و مورد آزمایشات بیشتر قرار گرفت.

شناسایی بهترین باکتری مولد آنزیم: برای تعیین گونۀ باکتری مورد نظر، توالی ١٦ S rDNA آن نیز تعیین شد. به این منظور ابتدا استخراج DNA باکتری با استفاده از کیت شرکت Roche صورت گرفت، سپس به منظور مشاهدۀ باندهای DNA ، الکتروفوزر انجام شد ودر مرحلۀ بعد DNA را از درون ژل بریده و با پرایمرهای عمومی forward 3 و reverse 5 که دارای توالی زیر می باشند،

www.SID.ir

Archive of SID

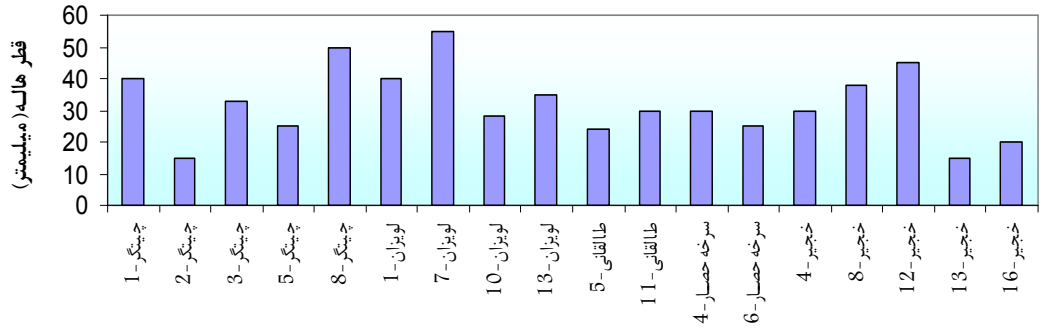
PCR صورت گرفت. نمونه برای تعیین ترادف توسط شرکت SQ lab به آلمان فرستاده شد.

forward 3: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

reverse 5: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

نتایج به دست آمده با برنامهٔ BLAST مقایسه و بهترین گونهٔ مولد آنزیم شناسایی شد.

تولید پروتئاز: محیط کشت مورد استفاده به منظور تولید پروتئاز حاوی نشاسته: ۰/۵ گرم، عصارهٔ خیساندهٔ ذرت : ۰/۲ گرم، K_2HPO_4 : ۰/٤۳۵ گرم، KCl : ۰/۰۱۵ گرم، $MgSO_4$: ۰/۰۲۵ گرم، $CaCl_2$: ۰/۰۱٤۵ گرم در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر بود (۳). pH محیط نیز توسط سدیم بی کربنات ۱ درصد به ۸ رسانده شد. به۵۰ میلی لیتر از این محیط یک میلی لیتر از کشت ۲٤ ساعتهٔ باکتری تلقیح شد و در شیکر انکوباتور تنظیم شده با دور ۱۵۰rpm به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد گرماگذاری شد. در انتهای هر دوره از تولید پروتئاز، رشد باکتری به وسیله جذب نوری (OD600nm) بررسی شد و کشت در دمای ٤ درجهٔ سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه با g ۱۵۵۰۰ سانتریفیوژ شد و محلول شفاف رویی به عنوان آنزیم خام در مرحلهٔ سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت(۲).



باسیلوس های پروتئولیتیک از پنج نمونه خاک مورد آزمایش

نمودار1. مقایسه قطر هاله های ایجاد شده بر روی محیط Skim milk agar

سنجش فعالیت آنزیم: برای بررسی فعالیت پروتئاز ٤۵۰ میکرولیتر کازئین ۰/۵ درصد در گلایسین – NaOH (۹ ~ pH) با ۵۰ میکرو لیتر محلول آنزیمی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦۰ درجهٔ سانتی گراد گرما گذاری شد و نهایتا" ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به منظور خاتمهٔ واکنش اضافه شد. مخلوط واکنش در g ۱٤۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ وجذب محلول شفاف رویی در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت پروتئاز برابر با مقدار آنزیمی که می تواند یک میکروگرم تیروزین را در مدت یک دقیقه در شرایط آزمایش آزاد سازد تعیین شد و به صورت واحد آنزیمی در میلی لیتر(U/mL) گزارش شده است (۸).

تأثیر دما بر فعالیت پروتئاز: تأثیر دما بر فعالیت آنزیم با انجام واکنش آنزیمی در ۹ ~ pH و در محدودهٔ دمایی ٤۰ تا ۷۵ درجهٔ سانتی گراد بررسی شد.

تأثیر pH بر فعالیت پروتئاز: تعیین pH بهینه برای فعالیت آنزیم، از طریق حل کردن کازئین ۰/۵ درصد در بافر های مختلف و انجام واکنش آنزیمی در دمای ٦۰ درجهٔ سانتی گراد صورت گرفت. بافر های مورد استفاده برای این منظور شامل بافر سدیم فسفات (۷ ~ pH)، بافر -Tris

www.SID.ir

Archive of SID

HCl(۸ ~ pH) وگلایسین – NaOH برای محدودهٔ pH، ۹ تا ۱۱ بودند(۱۷).

تأثیر فاکتور های غذایی و محیطی مختلف بر رشد باکتری وتولید آنزیم توسط آن: منابع کربن مورد آزمایش شامل نشاسته، مالتوز، لاکتوز، گلوکز، فروکتوز، سوکروز وگالاکتوز بودند که میزان آنها در کلیهٔ محیطها به طور ثابت ۱ درصد در نظر گرفته شد. تأثیر منابع مختلف نیتروژن از جمله عصارهٔ خیساندهٔ ذرت (Corn steep liquor)، عصاره مخمر، عصارهٔ گوشت، آب پنیر(whey protein)، پپتون، تریپتون و اوره نیز در غلظت ۰/٤ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

تأثیر pH بر رشد باکتری و تولید آنزیم با تهیهٔ محیطهای تولید در محدودهٔ pH ٦ تا ۱۰ بررسی شد. تعدیل سازی pH محیط نیز توسط سدیم بی کربنات ۱ درصد صورت گرفت.

فاکتور دور شیکر هم به منظور بررسی تأثیر هوادهی و هم زدن محیط تولید مورد آزمایش قرار گرفت. به این منظور، دورهای ۱۱۰rpm، ۱۳۰rpm، ۱۵۰rpm و ۱۸۰rpm انتخاب شدند.

نتایج

ازنمونه های خاک مورد آزمایش،٤۰ جدایه باسیلوس به دست آمد که پس از غربال سازی بر روی محیط Skim milk agar ، ۱۸ جدایه واجد فعالیت پروتئولیتیکی بودند. با مقایسهٔ قطر هاله های شفاف، یکی از آنها به عنوان قوی ترین جدایهٔ مولد آنزیم انتخاب شد . نمودار۱ نشان می دهد که باسیلوس جدا شده از خاک پارک جنگلی لویزان توانست پس از ۷۲ ساعت هاله ای به قطر ۵۵ میلی متر ایجاد کند.

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی باکتری: بررسی مورفولوژیکی و میکروسکوپی نشان داد که باکتری مولد پروتئاز واجد کلنیهای کرم رنگ، مات، بزرگ و با حاشیهٔ مضرس بود و رنگ آمیزی گرم نیز نشان دهندهٔ وجود باسیلهای گرم مثبت با زنجیره های کوتاه و واجد اسپور مرکزی بود.نتایج تستهای بیوشیمیایی نیز در جدول ۱ نشان داده شده اند. توالی ۱٦S rRNA به دست آمده نیز دربرنامه BLAST، نشان دهندهٔ تشابه ۹۷ درصد باکتری جداشده با Bacillus sp. CR-179 بود.

جدول ۱- نتایج تستهای بیوشیمیایی مربوط به باسیلوس مورد نظر

تستهای بیوشیمیایی	نتایج
هیدرولیز کازئین	+
هیدرولیز لسیتین	+
هیدرولیز ژلاتین	+
هیدرولیز نشاسته	+
اوره آز	-
کاتالاز	+
احیای نیترات	+
تجزیهٔ سیترات	-
حرکت	+
مانیتول	-
مالتوز	+
گزیلوز	+
آرابینوز	-

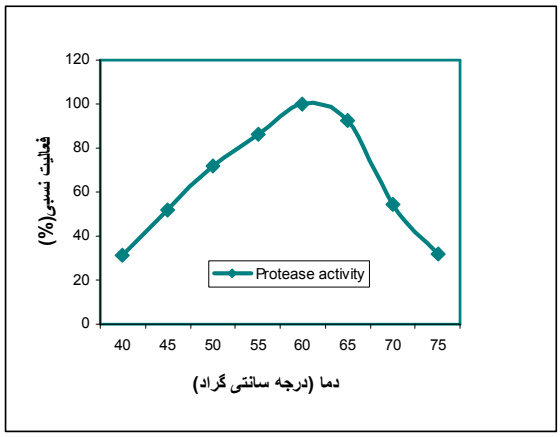
تأثیر دما بر فعالیت پروتئاز: سنجش فعالیت پروتئاز در محدودهٔ دمایی بین ٤۰ تا ۷۵ درجهٔ سانتی گراد و به طور ثابت در PH ~ ۹ صورت گرفت. نمودار۲ نشان می دهد که فعالیت آنزیمی از دمای ٤۰ تا ٦۰ درجهٔ سانتی گراد افزایش می یافت و دمای بهینه ٦۰ درجه سانتی گراد بود. در دماهای بیش از ٦۰ درجهٔ سانتی گراد کاهش فعالیت آنزیمی صورت گرفت.

تأثیر pH بر فعالیت پروتئاز: با توجه به نمودار ۳، پروتئاز به دست آمده از این باسیلوس در محدودهٔ وسیعی از pH فعالیت داشت، اما pH بهینه برای فعّالیت آن ۹ بود . فعالیت آنزیمی در ٦/۵ ~pH و ۱۱~pH به ترتیب ٤۵/۸

www.SID.ir

Archive of SID

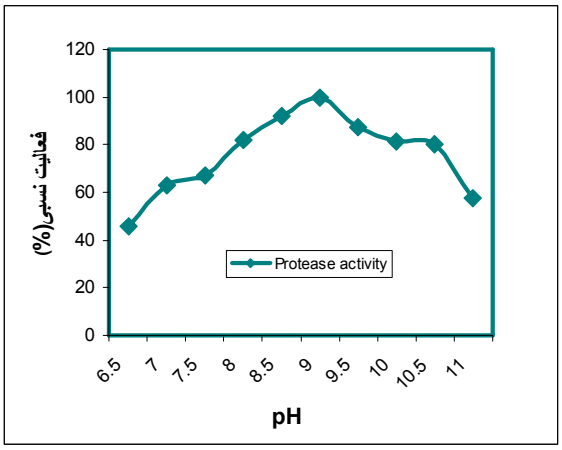
درصد و۵۷/۷ درصد فعالیت آنزیمی در۹ pH~ بود. این نتایج نشان می دهد که پروتئاز به دست آمده از این باکتری یک پروتئاز قلیایی و ترموفیل می باشد.



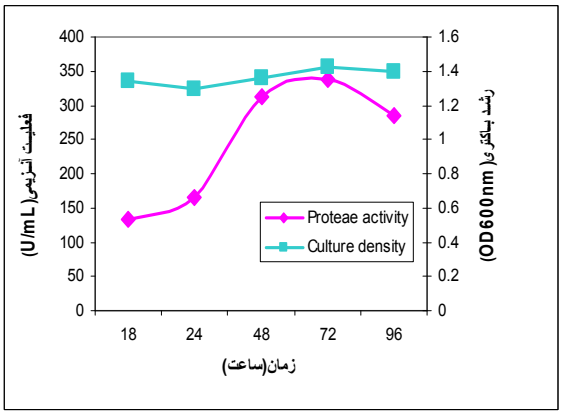
نمودار۲- بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیمی

تأثیر فاکتورهای غذایی و محیطی مختلف بر رشد باکتری وتولید آنزیم توسط آن: نمودار٤، بیانگر زمان تولید پروتئاز توسط باکتری و ارتباط آن با رشد باکتری می باشد. تولید پروتئاز در ٢٤ ساعت آغاز و بیشترین مقدار در ۷۲ ساعت مشاهده شد. پس می توان نتیجه گرفت که تولید آنزیم همزمان با قرار گرفتن باکتری در مرحلهٔ رکود (Stationary phase) می باشد. همان طور که در نمودار مشخص است،پس از ۷۲ ساعت تولید آنزیم کاهش می یابد که این مسئله می تواند به علت ورود باکتری به فاز مرگ باشد. علاوه بر این گرما گذاری طولانی مدت محیط کشت باکتری می تواند منجر به تجزیهٔ پروتئازها در اثر حملهٔ دیگر پروتئازها شود که خود مسبب کاهش فعالیت آنزیمی پس از ۷۲ ساعت می باشد (۱و۳).

جدول ۲ نشان می دهد که نشاسته پس از ۷۲ ساعت منجربه بیشترین تولید پروتئاز شده.به دنبال نشاسته، مالتوز، گالاکتوز و لاکتوز بیشترین تأثیر را بر تولید آنزیم داشتند. با این وجود باکتری با مصرف کردن مالتوز و گالاکتوز رشد بیشتری نسبت به نشاسته داشت، که این مسئله بیانگر یکسان نبودن منبع کربن بهینه برای رشد باکتری و تولید آنزیم می باشد . فروکتوز،گلوکز و سوکروز برای رشد مورد استفاده قرار گرفت، اما تولید پروتئاز به خوبی انجام نشد. با توجه به جدول ۳، در بین منابع نیتروژن، عصارهٔ خیساندهٔ ذرت که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیز می باشد، پس از ۷۲ ساعت منجر به بیشترین تولید پروتئاز شد، همچنین باکتری با مصرف عصارهٔ مخمر، آب پنیرو عصارهٔ گوشت تولید نسبتا"مناسبی از پروتئاز را نشان داد، اوره به عنوان یک منبع غیر آلی نیتروژن برای رشد وتولید آنزیم مناسب نبود.



نمودار۳ – بررسی تأثیر pH بر فعالیت آنزیمی



نمودار ٤- تولید پروتئاز در فواصل زمانی مختلف و ارتباط آن با رشد باکتری

باکتری با قرار گرفتن در محیطهای دارای pH های مختلف و تولید آنزیم در این محیطها، نشان داد که در طیف وسیعی از pH قادر به فعالیت می باشد، به طوری که حتی قادر

www.SID.ir

Archive of SID

بود در ٦ ~ pH و ۱۰ ~ pH نیز به رشد و تولید پروتئاز بپردازد اما با توجه به جدول٤، در ۸ ~ pH بیشترین رشد و تولید آنزیم را داشت.

جدول۲- تأثیر منابع کربن مختلف بر رشد باکتری و تولید آنزیم

منبع کربن	رشد باکتری (OD600nm) در ساعت ۷۲	فعالیت آنزیمی (U/mL) در ساعت ۷۲
نشاسته	۱/٤۲۸	۳۳۷/۵۳۲
مالتوز	۱/٦۲۰	۳۰۳/۷٦٦
گالاکتوز	۱/۵۱۲	۲۹۷/۲۷۲
لاکتوز	۱/۳۲۲	۲۲۹/۷٤۰
فروکتوز	۱/۱۲۵	۷٦/٤۹۳
گلوکز	۱/۱۲۱	۵۲/۵۹۷
سوکروز	۱/۱۱۷	٤۹/۷٤۰

OD: Optical density

جدول۳- تأثیر منابع نیتروژن مختلف بر رشد باکتری و تولید آنزیم

منبع نیتروژن	رشد باکتری (OD600nm) در ساعت ۷۲	فعالیت آنزیمی (U/mL) در ساعت ۷۲
عصارهٔ خیسانده ذرت	۱/٤۱۰	۳۳٦/۲۳۳
عصارهٔ مخمر	۱/۳۹۱	۳۰۸/۹٦۱
آب پنیر	۱/۱۱٤	۲۳۹/۸۷۰
عصارهٔ گوشت	۱/۳۸۳	۲۰۳/۲٤٦
تریپتون	۰/۹۵٤	۱۹۰
پپتون	۱/۰۳۰	۵۹/٦۷
اوره	۰/٦٦٦	۲۳/٤٤۱

جدول٤- تأثیر pH های مختلف بر رشد باکتری و تولید آنزیم

pH	رشد باکتری (OD600nm) در ساعت ۷۲	فعالیت آنزیمی (U/mL) در ساعت ۷۲
٦	۰/۹۸۰	۱٦۸/۱۸
۷	۱/۳۳۵	۲٦۰/۱۲۹
۸	۱/٤۰۲	۳۳۵/٤۵٤
۹	۱/۰۱۲	۲۵۳/۳۷
۱۰	۰/۵۳٤	۱٦۳/۵۰٦

در مورد باسیلوس جدا شده از خاک پارک جنگلی لویزان دور شیکر ۱۵۰ rpm انتخاب شد، چرا که باکتری دراین دور پس از ۷۲ ساعت بیشترین رشد وتولید آنزیم را داشت . جدول ۵ نشان می دهد که دورهای بالاتر (۱۸۰rpm) و پایین تر(۱۱۰ rpm و ۱۳۰rpm) هر کدام توانستند به عللی باعث اثر منفی در رشد وتولید آنزیم شوند.

جدول ۵- تأثیر دورهای شیکر مختلف بر رشد باکتری و تولید آنزیم

دورشیکر(rpm)	رشد باکتری (OD600nm) در ساعت ۷۲	فعالیت آنزیمی (U/mL) در ساعت ۷۲
۱۱۰	۱/۳۲۷	۳۰۱/٦۸۸
۱۳۰	۱/۳۸۸	۳۲۰/۳۸۹
۱۵۰	۱/٤۱۸	۳٤۵/۸٤٤
۱۸۰	۱/۳۳۰	۳۰۷/۱٤۲

بحث

در این مطالعه، ۱۸ باسیلوس پروتئولیتیک از خاک پارکهای جنگلی تهران جدا شد که جدایهٔ به دست آمده از خاک پارک جنگلی لویزان به عنوان بهترین باسیلوس مولد آنزیم به منظور انجام مطالعات بیشتر انتخاب شد. این جدایه با استفاده از تستهای بیوشیمیایی، تعیین توالی ۱٦S rDNA شناسایی و به عنوان *Bacillus* sp. CR-179 تشخیص داده شد.

درمواردی که میکروارگانیسم های خاک به عنوان نمونهٔ مورد آزمایش می باشند، نمونه گیری از مناطق مختلف بسته به نوع پروتئاز مورد جستجو می تواند متغیر باشد . درمطالعه ای که توسط Tamilmani وهمکارانش درسال ۲۰۰۸ انجام شد، پروتئاز خارج سلولی از خاک مناطق مرغ داری جدا شد که قابلیت هضم وهیدرولیز کردن پرمرغ وخروس راداشت . پرمرغ و خروس به عنوان یک محصول جانبی زائد در مرغداریها می باشد که می توان از طریق آنزیمی، با استفاده از پروتئازها به هیدرولیز آن

www.SID.ir

Archive of SID

پرداخت(۱۵). اما از آنجاییکه به طور کلی هدف از انجام این مطالعه غربال سازی باسیلوسهای پروتئولیتیک خاک پارکهای جنگلی تهران بود، خاکهای مورد آزمایش از قسمتهایی جمع آوری شدند که خاک به علت رویش گیاهان غنی باشد، تا میکروارگانیسم های بیشتری در نمونهٔ مورد نظر وجود داشته باشند. آنزیم به دست آمده از باکتری مورد بررسی، بهترین فعالیت خود را در دمای ٦۰ درجهٔ سانتی گراد و pH~ ۹ نشان داد . نتایج مربوط به تعیین خصوصیات آنزیمی تا حدودی مشابه با یافته های Muhammad Nadeem و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بود، به طوری که آنها توانستند از باسیلوس لیکنی فورمیس ۲-N، پروتئازی را به دست آورند که دردمای٦۰ درجه سانتی گراد و ۱۱ ~pH بهترین فعالیت آنزیمی را داشت . ازچنین پروتئازهایی می توان درصنایع چرم سازی وشوینده استفاده کرد(۱۱). اگرچه در اکثر موارد سعی بر یافتن پروتئازهای ترموفیل است، اما Eui-sun son وهمکارش درسال ۲۰۰۳ نشان دادند که پروتئاز *B. amyloliquefaciens S94* در محدودهٔ دمایی ۱۵ تا ٤۵ درجهٔ سانتی گراد- به ویژه در دماهای پایین تر- فعالیت هیدرولیتیکی بیشتری داشت (٤).

همان طور که گفته شد، در این مطالعه پروتئاز در طول مرحلهٔ رکود از رشد باکتری تولید می شود که این نتیجه با برخی گزارشات قبلی مبنی بر اینکه باسیلوسها معمولا" در انتهای فاز لگاریتمی پروتئاز بیشتری تولید می کنند، مغایرت دارد(۱۷). با بررسی اثرمنابع مختلف کربن ونیتروژن بر تولید آنزیم مشخص شد که مناسب ترین منابع به ترتیب نشاسته و عصارهٔ خیساندهٔ ذرت بودند. از آنجاییکه این دو منبع نسبتا" ارزان قیمت هستند، استفاده از آنها برای تولید پروتئاز و به کارگیری در فعالیتهای صنعتی مقرون به صرفه می باشد. در همین راستا Singh و همکارانش در سال۱۹۹٤، با استفاده از منبع نیتروژن ارزان قیمت، یعنی عصارهٔخیساندهٔ ذرت، موفق به تولید پروتئاز اسیدی مقاوم به حرارت توسط آسپرژیلوس نایجر *F2078* شدند(۱٤). البته در همهٔ موارد منابع به کار گرفته شده ارزان قیمت نیستند، به طوری که در مطالعه ایی که فرانک قائمی اسکویی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی *Bacillus clausii* انجام دادند، مشخص شد که این باکتری با در اختیار داشتن سوکروز و عصارهٔ مخمر، قادر به تولید بیشترین میزان پروتئاز بود(٦). از دیگر فاکتور های تأثیر گذار بر تولید آنزیم، pH محیط می باشد که بهترین pH برای باکتری مورد مطالعه حدود ۸ بود. در مطالعهٔ مشابهی که در سال ۲۰۰۱ توسط Zvidzai و همکارانش صورت گرفت، مشخص شد که باسیلوس سوبتیلیس جدا شده از قسمتهایی از زیمباوه، در محیط تولید با ۸ ~ pH توانست به تولید پروتئاز بپردازد وفعالیت پروتئولیتیکی آن توسط یونهای منیزیوم، منگنز وآهن حدود ۲۰ درصد افزایش می یافت (۱۸). دور شیکر نیز از نظر هوادهی و پخش شدن مواد غذایی در محیط، حائز اهمیت است. در مورد این باکتری دورهای پایین (۱۱۰rpm و۱۳۰ rpm) و نیز دور بالا (۱۸۰rpm) مناسب نبودند اما در صورت هم زدن با rpm ۱۵۰، رشد باکتری و تولید آنزیم بیشتر صورت گرفت. این دور شیکر از آن جهت برای باکتری مناسب است که می تواند باعث رسیدن اکسیژن محلول درمحیط به باکتریها ونیز افزایش جذب مواد غذایی موجود در محیط توسط باکتریها شود. درمورد دور بالا(۱۸۰rpm)، کاهش فعالیت آنزیمی احتمالا" به علت دناتوره شدن آنزیمهای تولید شده در محیط و همچنین آسیب دیدن سلولهای باکتریایی به علت برخورد شدید با دیوارهٔ ارلن بوده است (۱، ۹ و ۱۰). در مطالعه ایی که توسط Norazizah shafee وهمکارانش در سال ۲۰۰۵ بر روی باسیلوس سرئوس سویهٔ ۱٤٦ صورت گرفت نیز همین نتیجه حاصل شد، به طوری که دور بالا (۲۰۰rpm)، منجر به کاهش فعالیت پروتئاز می شد، اما باکتری با قرار گرفتن در rpm ۱۰۰ به علت ناکافی بودن هوادهی و عدم کسب مواد غذایی به میزان مورد نیاز نمی توانست تولید پروتئاز بالایی داشته باشد(۱۲).

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به قابلیت باکتریهای بومی در تولید پروتئاز و با استفاده از تکنیکهای مدرن جهت ارتقای کیفیت آنزیم ونیز افزایش تولید آن به کمک روشهای موجود، می توان از باکتریهای بومی کشور درصنایع مختلف حداکثر استفاده را کرد.

تشکر و قدردانی: از دست اندرکاران مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران که با در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی، یاری گر این تحقیق بوده اند، قدردانی و تشکر می گردد.

منابع

1- Burkert, J.F., R.R. Maldonado, F.M. Filho and M.I. Rodrigues.(2005) Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 80: 61-67.

2- Camila Rocha da Silva; Andréia Boechat Delatorre; Meire Lelis Leal Martins(2007)Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease bt thermopHilic Bacillus Sp and some properties of the enzymatic activity . Brazilian Journal of Microbiology 38:253-258.

3- Chu, I.M., Lee, C. and T.S. Li, (1992). Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. Enzyme and Microbial Technology. 14: 755–761.

4- Eui-Sun Son and Jong-Il Kim(2003) Multicatalytic Alkaline Serine Protease from the Psychrotrophic *Bacillus amyloliquefaciens* S94. Journal of Microbiology.25:58-62

5- Folasade M.Olajuyigbe and Joshua O.Ajele.(2005) Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species**.** African journal of Biotechnology.4 :776-779.

6- Ghaemi Oskouie Seyedeh Faranak, Tabandeh Fatemeh, Yakhchali Bagher and Eftekhar Fereshteh (2007)**.**Enhancement of alkaline protease production by *Bacillus clausii* using Taguchi experimental design.African Journal of Biotechnology .6 (22), pp. 2559-2564.

7- Huang Guangrung , Ying Teijing, Huo Po and Jiang Jiaxing.(2005) Purification and characterization of a protease from thermophilic Bacillus strain HS08.African journal of Biotechnology.24:2433-2438.

8- Joo HS, Kumar CG, Park GC, Kim KT, Paik SR, Chang CS (2002). Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. Process Biochemistry. 38: 155–159.

9- Kumar, C.G. and H. Takagi, (1999). Research review paper: microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. Biotechnology Advances. 17: 561-94.

10- Lee, P.G., C.N.A. Razak, R.N.Z.A. Rahman, M. Basri, and A.B. Salleh, (2002). Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. Biochemical Engineering Journal. 13: 73-77.

11- Muhammad Nadeem,Javed Iqbal Qazi,Shahjahan Baig,Qurat-ul-ain Syed(2007) Studies On Commercially Important Alkaline Protease From *Bacillus lichniformis* N-2 Isolated From Decaying Organic Soil. Turkish Journal of Biochemistry. 32 (4) ; 171–177.

12- Norazizah Shafee, Sayangku Norariati Aris, Raja Noor Zaliha Abd Rahman, Mahiran Basri and Abu Bakar Salleh(2005) Optimization of Environmental and Nutritional Conditions for the Production of Alkaline Protease by a Newly Isolated Bacterium *Bacillus cereus* Strain 146. Journal of Applied Sciences Research 1(1): 1-8.

13- Priest, F.G(1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus. Bacteriological Reviews. 41: 711-753.

14- Singh A, V.K. Ghosh, P. Ghosh, (1994) Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*, Letter of Applied Microbiology. *18* :177–180.

15- Tamilmani P., Umamaheswari A., Vinayagam A. and. Prakash B (2008). Production of an Extra Cellular Feather Degrading Enzyme by *Bacillus licheniformis* Isolated from Poultry Farm Soil in Namakkal District (Tamilnadu) International Journal of Poultry Science 7 (2): 184-188.

16- Ward, O.P. (1985) Proteolytic enzymes. *In*: M. Moo-Young ,Comprehensive Biotechnology. 3: 789-818.

17- Wellingta Cristina Almeida do Nascimento; Meire Lelis Leal Martins(2006)Studies on the stability protease from Bacillus sp. And its compatibility with commercial detergent. Brazilian Journal of Microbiology 37:307-311.

www.SID.ir

Archive of SID

18- Zvidzai C.J and. Zvauya R (2001)Purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus subtilis* CHZ1 isolated from a zimbawean hot spring. Journal of Food Biochemistry.25:1-13.

Effect of environmental and nutritional conditions on protease production by a *Bacillus* sp. isolated from soil sample of Lavizan jungle park

Akhavan Sepahy A.[1], Jabalameli L.[2] , Noohi A.[2] , and Jafari Aghdam J.[1]

[1] Microbiology Dept., Basic Science College, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, I.R. of IRAN

[2] Basic Science College, Islamic Azad University, Sciences And Researches Campus, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Soil samples of Tehran parks were screened for proteolytic *Bacilli*. 40 isolates were obtained from 5 soil samples, of which 18 isolates had the potential of producing proteases based on screening on skim milk agar. By comparing the diameter of clear zones, one of the isolates obtained from Lavizan park , in north east of Tehran ,was selected for further experimental studies. This isolate was identified as *Bacillus sp. CR-179* based on cellular morphology , gram staining, biochemical test, and finally partial sequence of 16S rDNA .Various nutritional and environmental parameters affected protease production by Bacillus sp. Protease production by this Bacillus cultivated in liquid cultures containing 1% starch as a carbon source and 0.4% corn steep liquor as a nitrogen source reached a maximum at 24 h, with levels of 340.908U/mL. Starch and maltose were the best substrates for enzyme production while some pure sugars such as fructose, glucose and sucrose could not influence production of protease. Among various organic nitrogen sources corn steep liquor, which is commercial , was found to be the best substrate followed by yeast extract, whey protein and beef extract. *Bacillus sp. CR-179* Could not utilize urea as an inorganic nitrogen source to grow and produce protease. The optimal pH and optimal temperature of enzyme production were 8.0 and 45°C , respectively. Studies on enzymatic characterization revealed that crude protease showed maximum activity at pH 9.0 and 60°C, indicating the enzyme to be thermo-alkaline protease .

Keywords : Protease, Proteolytic *Bacilli* , Enzymatic characterization

www.SID.ir