مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره اول (پیاپی ۲۲) بهار ۱۳۹۴
صفحات ۶۳-۵۴

Original Article

تولید پروتئاز قلیایی توسط *باسیلوس تیکیولنسس* سویه FJSH2 جدا شده از فاضلاب کشتارگاه دام جیرفت

ارسطو بدویی دلفارد*[۱]، پروین امیری[۲]، نرجس رمضانی پور[۳]، زهرا کرمی[۱]، بتول قنبری[۴]

[۱] استادیار، دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست شناسی، [۲] کارشناس ارشد، دانشگاه پیام نور تهران، گروه بیوشیمی، [۳] کارشناس ارشد، دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست شناسی، [۴] مربی، دانشگاه پیام نور مرکز جیرفت، گروه زیست شناسی

چکیده

سابقه و هدف: پروتئازها پرمصرف ترین آنزیم های صنعتی هستند که کاربردهای زیادی در زیست فناوری دارند. به طوری که حدود ٦٠ درصد از بازار جهانی آنزیم های صنعتی را به خود اختصاص داده اند. پروتئازهای قلیایی به دلیل مقاوم بودن در pH قلیایی و حضور عوامل سورفاکتانت یا اکسیدکننده بسیار مهم می باشند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی سویه مولد پروتئاز از فاضلاب کشتارگاه دام جیرفت انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت مقطعی بر روی نمونه های فاضلاب کشتارگاه دام شهرستان جیرفت انجام شد. سویه مولد پروتئاز در محیط اسکیم میلک آگار غربالگری گردید. ژن *16S rRNA* با روش PCR تکثیر و سپس تعیین توالی گردید. پروتئاز با روش رسوب دهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یونی به طور نسبی خالص سازی شد. در ادامه ویژگی های بیوشیمیایی پروتئاز تخلیص شده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج تعیین توالی نشان داد که سویه جداسازی شده با قرابت ۱۰۰ درصدی به *باسیلوس تیکیولنسس* تعلق دارد. پروتئاز تخلیص شده حداکثر فعالیت و پایداری را در pH معادل ۹ و درجه حرارت ٤٠ درجه سیلیسیوس نشان داد. مقادیر *Km* و *Vmax* بر اساس معادله لاین ویربرگ به ترتیب ٦/٧٧ mg/ml و ٦٤/٩٤ U/ml/min به دست آمد. پایداری پروتئاز در حضور حلال های آلی سیکلوهگزان و DMSO به میزان ۱/۸ و ۲/٤ برابر با افزایش همراه بود.

نتیجه گیری: فعالیت و پایداری قابل توجه پروتئاز در شرایط قلیایی و در حضور حلال های آلی نشان دهنده پتانسیل قابل توجه این آنزیم برای استفاده در صنعت می باشد.

واژگان کلیدی: پروتئاز قلیایی، فاضلاب، غربالگری، *باسیلوس تیکیولنسس*.

دریافت مقاله: تیر ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۳

مقدمه

پروتئازها شامل گروه خیلی بزرگ و پیچیده ای از آنزیم ها می باشند که استفاده گسترده ای در صنایع مختلف دارند (۱ و ۲). پروتئازها به دلیل تنوع بیوشیمیایی و کاربردهای گسترده در صنایع چرم سازی، غذایی، پزشکی، شوینده و فرآیندهایی مانند تیمار فاضلاب، بازیافت نقره، تولید پروتئین هیدرولیز شده، بیوسنتز، تجزیه زیستی و بیوترانسفورمیشن اهمیت دارند. آنها در خواصی مانند ویژگی های سوبسترا، جایگاه فعال و عمل کاتالیزوری pH و دمای بهینه و پایداری متفاوت هستند (۳). پروتئازها بر اساس مکانیسم پروتئولیتیک و گروه عاملی در جایگاه فعال، به چهار گروه، سرین پروتئاز، آسپارتیک پروتئاز، سیستئین پروتئاز و متالوپروتئاز تقسیم می شوند. همچنین بر اساس دامنه pH به گروه های پروتئاز اسیدی (۲ تا ۵)، پروتئاز خنثی (حدود ۷) و پروتئاز قلیایی (۸

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه شهید باهنر، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۳٤۳۳۲۰۲۰٤٤ پست الکترونیک: badoei@uk.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

تا ۱۲) طبقه بندی می شوند. منابع اصلی تولید پروتئازها از حیوانات، گیاهان و باکتری ها قارچ ها و غیره می باشند. اما تولید آنزیم ها از منابع گیاهی و حیوانی به دلیل شرایط آب و هوایی و موضوعات وابسته به آن، محدود است (٦-٤). منابع میکروبی یک قلمرو بزرگ در تولید انواع پروتئاز اسیدی، خنثی و قلیایی را شامل شده است. پروتئازهای قلیایی به دلیل مقاوم بودن، پایداری و فعالیت در شرایط سخت مانند pH قلیایی و حضور عوامل سورفاکتانت یا اکسیدکننده ها بسیار مهم می باشند (۷). از میان باکتری ها، گونه های *باسیلوس* (*Bacillus*) از نظر تولید پروتئازهای خارج سلولی حائز اهمیت می باشند. در میان میکروارگانیسم های موجود در فاضلاب ها، باکتری ها از اهمیت بیشتری برخوردار هستند و به دلیل نقش آنها در تجزیه و تثبیت مواد آلی در طبیعت و در سیستم های تصفیه ایی بیشتر مورد توجه و مطالعه می باشند (۸). تاکنون پروتئازهای قلیایی از گونه های متعددی مانند *باسیلوس آموی وروس* (*Bacillus amovivorus*)، *باسیلوس پومیلوس* (*Bacillus pumilus*)، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*)، *باسیلوس کواگولانس* (*Bacillus coagulans* PSB-07) و *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis* RSP-09-37) جداسازی و شناسایی شده است (۱۰-۲).

هدف از این پژوهش جداسازی و تعیین خصوصیت پروتئاز باکتریایی از فاضلاب کشتارگاه دام شهرستان جیرفت بود.

مواد و روش ها

الف) غربالگری و جداسازی باکتری مولد پروتئاز: در این مطالعه از ۵ مکان مختلف از فاضلاب کشتارگاه دام شهرستان جیرفت (28°40′41″N57°44′26″E) نمونه برداری صورت گرفت. نمونه ها در فلاسک استریل به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از رقیق سازی (10^{-4}) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت های حاوی اسکیم میلک آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. پلیت ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس برای تعیین فعالیت پروتئولیتیک گرماگذاری گردیدند. محیط کشت اسکیم میلک آگار شامل (gr): ۰/٦٨ اسکیم میلک، ۰/۵ میلک آگار و ۰/۲۵ آگار می باشد. ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی ها نشان دهنده فعالیت پروتئولیتیک می باشد (۹).

ب) آزمایشات فنوتیپی و بیوشیمیایی : بهترین سویه با قابلیت تولید پروتئاز از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. آزمون هایی مانند رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، SIM و اکسیداز نیز انجام شد.

ج) شناسایی مولکولی: به منظور استخراج DNA، باکتری های رشد یافته به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس با لوپ از سطح محیط کشت جمع آوری گردید و سوسپانسیونی از آن ها در آب مقطر استریل تهیه شد. جداسازی DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNAشرکت سیناژن صورت گرفت. به منظور تخمین کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده و نیز جذب محلول رقیق شده DNA (با رقت ۱۰۰)، میزان جذب در طول موج های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد و با استفاده از نسبت A280/A260 میزان خلوص آن ها تخمین زده شد. برای شناسایی گونه مورد نظر از روش مولکولی *16S rRNA* استفاده شد.

به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* از پرایمرهای رفت با توالی F: 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و پرایمر برگشت با توالی R: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3' (بیونیر، کره جنوبی) استفاده شد (٤).

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱ میکرولیتر dNTPs (۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Polymerase DNA Taq (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ پیکومول) و ۲ میکرولیتر DNA الگو انجام شد.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال در دمای

Archive of SID

www.SID.ir

۵۲ درجه سیلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۸ دقیقه انجام شد (۱۰). محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد منتقل و الکتروفورز گردید. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA خالص سازی شد. محصول PCR به منظور تعیین توالی به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال گردید.

د) تولید و جداسازی پروتئاز: به منظور تولید آنزیم، کلنی مورد نظر برای تکثیر بیشتر به محیط پیش کشت انتقال داده شد. این محیط شامل ۰/٦۵ گرم نوترینت براث (مرک، آلمان) و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر می باشد که بر روی pH ۷/۵ تنظیم گردید. نمونه ها به مدت ۱۲ تا ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماگذاری شدند. پس از رشد باکتری ها، محیط کشت اولیه حاوی باکتری به محیط تولید اضافه شد. این محیط شامل (g/l): ۰/٦۲۵ گلوکز، ۰/٦۲۵ سیتریک اسید، ۱/۲۵ عصاره مخمر (لیوفیلچم، ایتالیا)، ۱/۲۵ K_2HPO_4، ۰/۰۱۲۵ $MgSO_4$، ۰/۰۱۲۵ $CaCl_2$ و ۰/۱۲۵ NaCl (مرک، آلمان) بود. نمونه ها به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماگذاری گردید. به منظور جداسازی آنزیم ها، محیط کشت حاوی باکتری های تکثیر یافته به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سیلیسیوس در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. روماند حاوی آنزیم از رسوب جداسازی گردید (۱۰).

پروتئین های موجود در محیط کشت بر اساس پدیده رسوب دهی با نمک، با استفاده از نمک سولفات آمونیوم ۸۵ درصد رسوب داده شدند. با استفاده از سانتریفیوژ، پروتئین ها جمع آوری و در حداقل بافر حل شدند. سپس با کمک روش دیالیز نمک از محلول پروتئینی جداسازی گردیدند. تخلیص نسبی به وسیله ستون کروماتوگرافی تعویض یونی (Q-Sepharose) انجام شد. برای این منظور ابتدا ستون با ۱۰ میلی لیتر بافر تریس٤۰ میلی مولار pH-۵/۷ به تعادل رسید. محتوی کیسه دیالیز که شامل ۱ میلی لیتر آنزیم پروتئاز بود از روی ستون عبور داده شد. پس از شستشوی ستون با ۱۰ میلی لیتر بافر تریس pH ۷/۵، نمونه های متصل شده به ستون با ایجاد شیب نمکی NaCl (صفر تا ۰/۵ مولار) جداسازی شدند و فعالیت آنزیمی آنها اندازه گیری گردید.

ه) تعیین ویژگی های بیوشیمیایی پروتئاز: فعالیت پروتئازی در دماهای مختلف (۳۰ تا ۹۰ درجه سیلیسیوس با توالی ۱۰ درجه) بررسی گردید. مخلوط واکنش استاندارد شامل ۲۵۰ میکرولیتر بافر تریس ۱۰ میلی مولار pH-۷/۵، ۱۳۰ میکرولیتر سوبسترا (محلول کازئین ۱/۵ درصد) (لیوفیلچم، ایتالیا) و ۲۰ میکرولیتر آنزیم بود. میکروتیوپ ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماگذاری شدند. پس از این مدت ٤۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد TCA (تری کلرو کربوکسیلیک اسید) افزوده شد تا عملکرد آنزیم متوقف گردد. سپس رسوب حاصله با سانتریفیوژ با دور g ۱۲۰۰۰ جداسازی شد. جذب روماند در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید. در تمامی واکنش ها از محلول شاهدی استفاده شد که آنزیم پس از افزودن TCA به مخلوط واکنش افزوده شده بود. منحنی فعالیت آنزیمی بر حسب دماهای مختلف رسم گردید. پایداری دمایی آنزیم پروتئاز با گرماگذاری آنزیم در طیف دمایی مختلف ۳۰ تا ۹۰ درجه سیلیسیوس با توالی ۱۰ درجه به مدت ۱ ساعت انجام شد. فعالیت باقی مانده آنزیم بر اساس روش استاندارد اندازه گیری گردید (۱۱). فعالیت آنزیمی در حضور غلظت های مختلف سوبسترا نیز اندازه گیری و مقادیر پارامترهای K_m و V_{max} نیز بر اساس رابطه لاین ویربرگ تعیین شد.

فعالیت پروتئازی در مقادیر مختلف pH با استفاده از یک بافر

رابطه لاین ویربرگ:

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m+[S]}{V_{max}[S]}=\frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}$$

مخلوط شامل تریس باز، سدیم فسفات، سدیم استات و گلیسین با غلظت ۱۰۰ میلی مولار محاسبه شد. فعالیت آنزیمی نمونه ها با استفاده از سوبسترای کازئین ۱/۵ درصد و در شرایط استاندارد انجام گرفت. منحنی فعالیت آنزیمی بر حسب pH رسم گردید. پایداری pH پروتئاز با گرماگذاری آنزیم در بافر مخلوط با pH های مختلف در محدوده ۳ تا ۱۲ به مدت

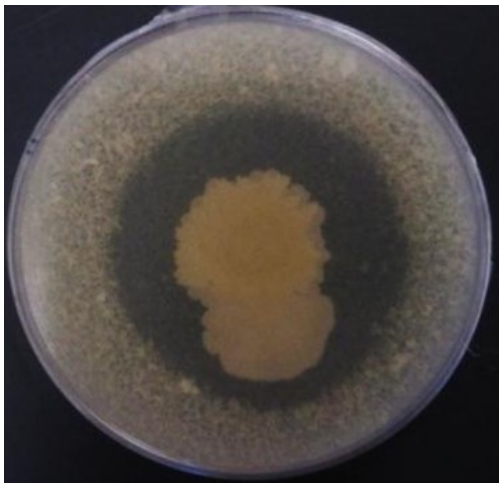
Archive of SID

www.SID.ir

یک ساعت در دمای اتاق انجام شد. سپس میزان فعالیت باقی مانده پروتئازی بر اساس شرایط استاندارد اندازه گیری گردید (۱۲).

تاثیر یون های $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $MgSO_4$ و ترکیبات $CaCl_2$, $CoCl_2$, $HgCl_2$, KCl, NaCl بر روی تولید پروتئاز SDS, EDTA, H_2O_2, 2.M.E, T.X100 مورد بررسی قرار گرفت. این ترکیبات در غلظت ۵ میلی مولار در بافر تریس با pH ۷/۵ تهیه شدند. فعالیت آنزیم در محلول واکنش فاقد این یون ها ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. به منظور بررسی اثر یون های فلزی بر روی پایداری پروتئاز، آنزیم به مدت ۱ ساعت در حضور یون ها و ترکیبات مختلف در غلظت ۵ میلی مولار در دمای اتاق گرماگذاری و در نهایت فعالیت باقی مانده آنزیم مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت پروتئازی در عدم حضور ترکیب به عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (۱۳).

غلظت مورد نظر از حلال های آلی مختلف (متانول، ۱-بوتانول، ایزوپروپانول، تولوئن، کلروفرم، دی اتیل اتر، DMSO و سیکلوهگزان) در بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۷/۵ تهیه شد. فعالیت پروتئازی با استفاده از سوبسترای کازئین ۱/۵ درصد و در حضور حلال های آلی مختلف



شکل ۱: ایجاد هاله شفاف توسط سویه جداسازی شده در محیط اختصاصی اسکیم میلک آگار. قطر هاله باکتریایی از لبه کلنی تا لبه هاله در نظر گرفته شده است.

اندازه گیری شد. غلظت حلال آلی در زمان سنجش فعالیت پروتئازی ٤٠ درصد (v/v) می باشد. به منظور اندازه گیری پایداری در حضور حلال های آلی ۸۰ درصد، میکروتیوپ های حاوی آنزیم با بافر حاوی حلال های آلی مختلف (متانول، ۱-بوتانول، ایزوپروپانول، تولوئن، کلروفرم، دی اتیل اتر، DMSO و سیکلوهگزان) به مقدار مساوی در دمای اتاق به مدت یک ساعت گرماگذاری شدند. سپس میزان فعالیت باقی مانده پروتئازی در شرایط استاندارد اندازه گیری شد. در این شرایط غلظت حلال آلی در زمان سنجش فعالیت پروتئازی کمتر از ۵ درصد (v/v) می باشد (١٤).

و) آنالیز آماری: به منظور تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از توالی یابی از نرم افزار MEGA 5 و روش neighbor joining استفاده گردید.

یافته ها

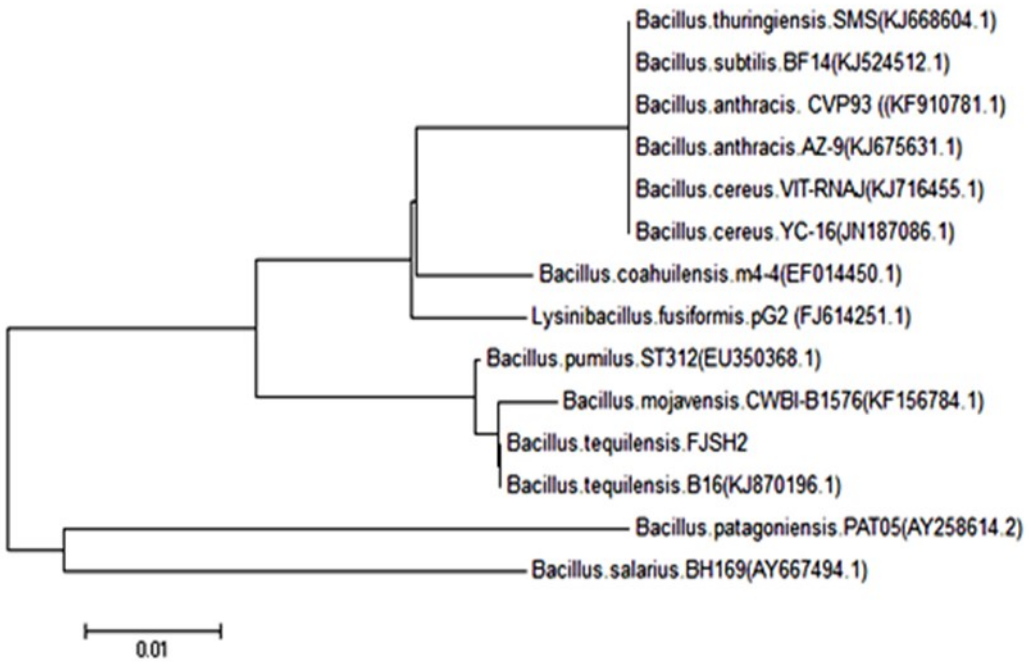
الف) غربالگری باکتری های مولد پروتئاز: در این مطالعه کلنی که بهترین هاله شفاف را در محیط اسکیم میلک آگار ایجاد کرده بود، جداسازی و به عنوان سوش بهینه مولد پروتئاز انتخاب گردید (شکل ۱).

ب) آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی: سویه باکتری مورد نظر یک باکتری گرم مثبت، میله ای، دارای آنزیم کاتالاز، متحرک بود. بر اساس اطلاعات مربوط به توالی یابی ژن *16S rRNA* این سویه متعلق به گونه *باسیلوس تیکیولینسس* (*Bacillus tequilensis*) و در بانک ژنی به ثبت رسید.

درخت فیلوژنی سویه مورد نظر در شکل ۲ آمده است. نتایج حاصل از تطبیق توالی و رسم درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA 5 با روش neighbor joining نیز تائید کننده این مطلب بود.

ج) تعیین ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم پروتئاز: پروتئاز سویه FJSH2 بیشترین فعالیت دمایی خود را در دمای ٤٠ درجه سیلیسیوس نشان داد. سپس با شیب کندی از ٤٠ تا ۹۰ درجه سیلیسیوس کاهش یافت. این آنزیم در دمای ۵۰ و ٦٠ درجه

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: درخت فیلوژنی باکتری *باسیلوس تیکیولینسس* با استفاده نرم افزار MEGA5.

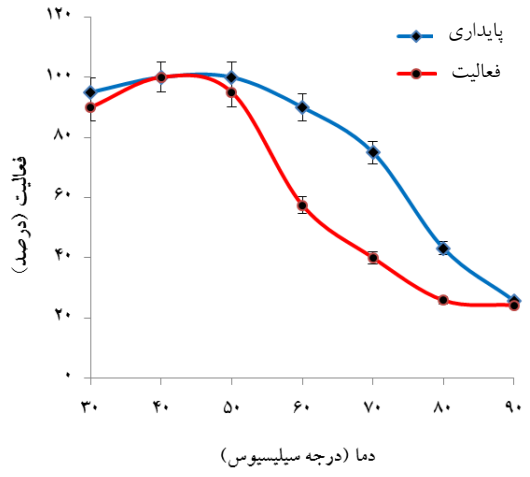
سیلیسیوس به ترتیب ٦٥ و ٦٠ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود (شکل ۳). نتایج حاصل از بررسی پایداری دمایی پروتئاز سویه FJSH2 نشان داد که این پروتئاز بیش از ۹۰ درصد پایداری خود را در محدوده دمایی ۳۰ تا ٦٠ درجه سیلیسیوس حفظ کرده است.

نتایج حاصل از فعالیت و پایداری پروتئاز سویه FJSH2 نشان داد که حداکثر فعالیت و پایداری این پروتئاز در pH ۹ می باشد و آنزیم حدود ۸۵ درصد فعالیت خود را در دامنه های pH ۸ تا ۱۰ حفظ کرده است. نتایج پایداری نشان داد که پروتئاز سویه FJSH2 فعالیت باقی مانده مطلوبی را در گستره pH ۷ تا ۹ داشته است و pH بهینه فعالیت آن در ۹ می باشد (شکل ٤).

نتایج حاصل از تاثیر غلظت های مختلف کازئین (صفر تا ۲ میلی مولار) بر فعالیت آنزیمی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس در شرایط استاندارد گرماگذاری و اندازه گیری شد. مقدار K_m و V_{max} پروتئاز سویه FJSH2 بر اساس معادله لاین ویربرگ به ترتیب ٦/۷۷ mg/ml و ٦٤/۹٤ U/ml/min به دست آمد.

نتایج بررسی فعالیت آنزیمی در حضور یون ها و سایر ترکیبات نشان داد که پروتئاز مورد بررسی در حضور $FeSO_4$ و $MgSO_4$ بیشترین فعالیت را نسبت به نمونه کنترل فاقد یون داشته است. همچنین فعالیت یون $ZnSO_4$ مشابه فعالیت نمونه کنترل گزارش شد. آنزیم در حضور یون ها و ترکیبات NaCl, $CoCl_2$, T.X100, $MnSO_4$ فعالیت خود را بین ٦۰ تا ۹۰ درصد حفظ نمود و کمترین فعالیت (٤۱٪) در حضور EDTA مشاهده گردید (شکل ۵).

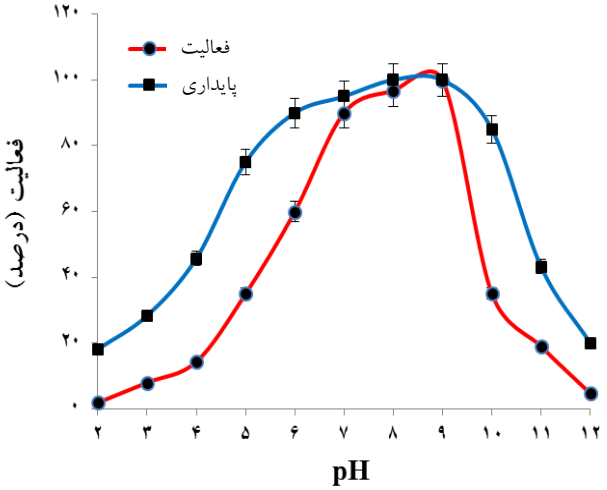
بررسی فعالیت پروتئازی در حضور حلال های آلی نشان داد که



شکل ۳: منحنی فعالیت و پایداری پروتئاز سویه FJSH2 در دماهای مختلف.

Archive of

www.SID.ir



شکل ٤: منحنی فعالیت و پایداری پروتئاز در pH های مختلف.

پروتئاز سویه FJSH2 حداکثر فعالیت خود را در حضور حلال های سیکلوهگزانول، ایزوپروپانول، DMSO و کلروفرم داشته است. کمترین فعالیت را حلال آلی تولوئن با مقدار ٥٦ درصد نشان داد. آنزیم در حضور حلال های آلی دی اتیل اتر، ۱-بوتانول و متانول فعالیت خود را به ترتیب تا ۸۷، ۸۷ و ۸۲ درصد حفظ نمود (شکل ٦). پایداری پروتئاز سویه FJSH2 در حضور حلال های DMSO، سیکلوهگزانول، ایزوپروپانول و دی اتیل اتر بیش از نمونه کنترل فاقد حلال بود. کمترین فعالیت باقی مانده (٥٦٪) مربوط به حلال آلی کلروفرم بود. آنزیم در حضور حلال های آلی متانول، ۱-بوتانول و تولوئن پایداری خود را به ترتیب تا ۸٤، ۷۷ و ٦۷ درصد حفظ نمود (شکل ٦).

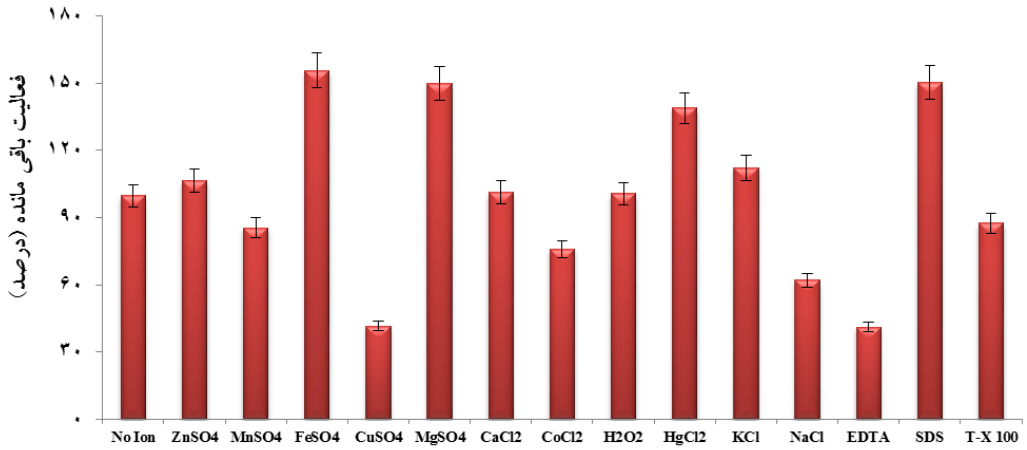
بحث

سویه های *باسیلوس* به دلیل قابلیت تولید بالای آنزیم از جمله پروتئازها از اهمیت ویژه ایی برخوردار هستند. از این بین، پروتئازهای قلیایی کاربردهای گسترده ایی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، شوینده و... دارا هستند.

در این پژوهش یک سویه *باسیلوس* مولد پروتئاز از فاضلاب کشتارگاه دام شهرستان جیرفت جداسازی گردید. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که این باکتری به *باسیلوس تیکیولینسس* قرابت دارد.

سویه های *باسیلوس* از نظر تولید تجاری پروتئاز به ویژه پروتئازهای قلیایی بسیار حائز اهمیت می باشند. پروتئاز سویه FJSH2 بیشترین فعالیت و پایداری دمایی خود را در دمای ٤۰ درجه سیلیسیوس نشان داد. این نتایج با فعالیت بهینه پروتئاز سویه های *باسیلوس سودوفرموس* (*B. pseudofirmus* SVB1) و *باسیلوس لتروسپوروس* (*Bacillus laterosporus*) مطابقت دارد (١٤ و ١٥).

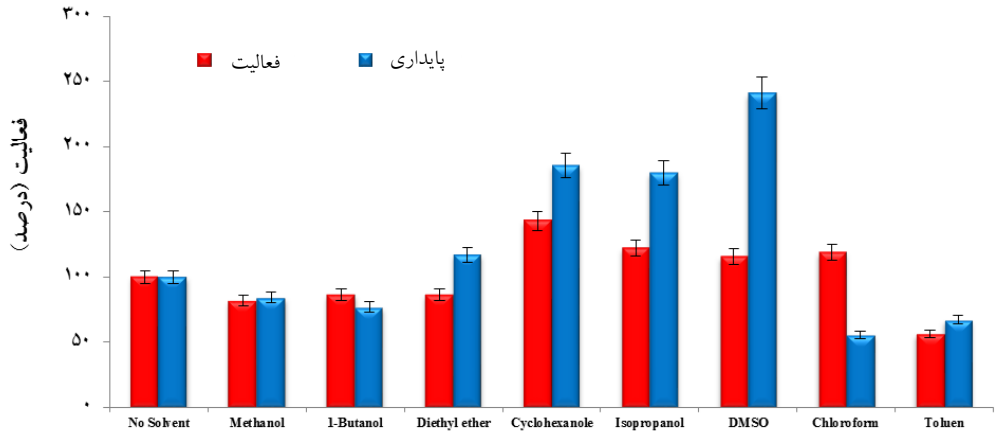
لازم به ذکر است که پروتئاز سویه *B. cereus* SIU1 بیشترین فعالیت خود را در دمای ٤٥ تا ٥٥ درجه سیلیسیوس نشان داده است (١٦). در مطالعه حاضر حداکثر فعالیت و پایداری پروتئاز سویه FJSH2 در pH معادل ۹ گزارش گردید. از این رو، این پروتئاز در گروه پروتئازهای قلیایی قرار می گیرد. این یافته با سایر مطالعات انجام شده که پایداری بهینه پروتئاز سویه های *B. cereus* SIU1 و *B. coagulans* PSB-07 در pH برابر ۹



شکل ٥: اثر یون های فلزی بر روی پایداری پروتئاز سویه FJSH2.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٦: فعالیت و پایداری پروتئاز سویه FJSH2 در حضور حلال های آلی.

گزارش شده است، هم خوانی دارد (٤ و ٦). فعال بودن آنزیم ها در این محدوده، نشان از ویژگی قلیایی آنها دارد که این موضوع در بیوتکنولوژی قابل توجه است. این ویژگی برای استفاده از پروتئاز قلیایی به عنوان افزودنی مواد شوینده مهم می باشد. زیرا مواد شوینده رخت شویی به طور کلی در محدوده pH ۸ تا ۱۲ فعالیت دارند (٤ و ۱۷).

علاوه بر این، استفاده از این پروتئازها در صنایع شوینده، چرم سازی، نساجی، عکاسی و کاربردهای پزشکی نیز اهمیت فراوانی دارد. سرعت یک واکنش آنزیمی به طور عمده به غلظت آنزیم و سوبستراهای مختلف مربوط به آن وابسته می باشد. مقدار K_m و V_{max} پروتئاز سویه FJSH2 بر اساس معادله لاین ویربرگ به ترتیب ٦/۷۷ mg/ml و U/ml/min ٦٤/۹٤ به دست آمد.

این یافته نشان می دهد که سرعت بیشینه پروتئاز مورد مطالعه ۱۱ واحد بیشتر از سرعت بیشینه پروتئاز سویه *B. pseudofirmus* SVB1 (۵۳/۸۳ U/ml/min) در مطالعه سن (Sen) و همکاران و تقریباً معادل سرعت بیشینه پروتئاز سویه *لاکتوباسیلوس برویس* (*Lactobacillus brevis*) (٦٦/٦٦ U/ml/min) در مطالعه فمی اولا (Femi-Ola) و همکاران می باشد (۱۸ و ۱۹).

یون های فلزی نقش مهمی را در حفظ ساختار جایگاه فعال آنزیم ها ایفا می کنند. پروتئاز سویه FJSH2 در حضور $FeSO_4$ و $MgSO_4$ بیشترین فعالیت را نسبت به نمونه کنترل فاقد یون نشان داد و کمترین فعالیت در حضور EDTA گزارش شد. گزارشات قبلی نشان داده است که یون های KCl, $BaCl_2$, $CuSO_4$, $ZnCl_2$, $HgCl_2$ موجب مهار پروتئاز سویه *B. laterospors* شده و در حضور یون های $CoCl_2$, $CaCl_2$ و $MnSO_4$ فعالیت پروتئازی افزایش یافته است (۲۰). مطالعات گوربل (Ghorbel) و همکاران در ۲۰۰۳ نشان داد که یون کلسیم نقش عمده ای در فعالیت دمایی بالای متالوپروتئاز سویه *B. cereus* BG1 دارد (۲۱).

مقاوم بودن پروتئازها در حضور حلال های آلی یک ویژگی کلیدی برای سنتز ترکیبات با ارزش دارویی و صنعتی محسوب می گردد. پروتئاز سویه FJSH2 فعالیت و پایداری قابل توجهی را در حضور حلال های سیکلوهگزانول، ایزوپروپانول، DMSO و کلروفرم نشان داد و در حضور سایر حلال های مورد مطالعه نیز حداقل ۵۰ درصد فعالیت خود را حفظ نمود.

این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه اولاجوئیگبه (Olajuyigbe) و همکاران در سال ۲۰۱۳ که در آن فعالیت پروتئاز سویه *B. coagulans* PSB-07 در حضور حلال آلی متانول تا ۷۰ درصد گزارش گردید، مشابه می باشد (٤). پروتئاز سویه *باسیلوس سرئوس* نیز در حضور حلال های آلی مختلف بنزن، تولوئن، گزیلن، استون و ایزوپروپانول مقاومت قابل توجهی را نشان می دهد (٦). همچنین گزارش شده است که پروتئاز سویه *B. licheniformis* 3C5 در حضور حلال آلی بوتانول ۲۰ درصد فعالیت خود را حفظ می نماید (۲۲).

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

در این پژوهش، یک سویه *باسیلوس تیکیولینسس* مولد پروتئاز قلیایی از فاضلاب گشتارگاه دام جداسازی و شناسایی گردید. آنزیم پروتئاز جداسازی شده از این سویه، ویژگی های قابل توجهی از جمله فعالیت و پایداری در pH های قلیایی، فعالیت در حضور غلظت های نمکی مختلف، فعالیت و پایداری قابل توجه در حضور حلال های آلی را دارا بود. این نتایج نشان دهنده پتانسیل قابل توجه این آنزیم برای استفاده در صنعت می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به دلیل حمایت مالی و همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Ibrahim ASS, EI-Shayeb NMA, Mabrouk SS. Isolation and identification of alkaline protease producing alkaliphilic bacteria from an Egyptian Soda Lake. J Appl Sci Res. 2007; 3(11): 1363-1368.

2. Sharmin S, Towhid-Hossain MD, Anwar MN. Isolation and characterization of a protease producing bacteria *Bacillus amovivorus* and optimization of some factors of culture condition for protease production. J Biol Sci. 2005; 5: 358-362.

3. Feng YY, Yang WB, Ong SL, Hu JY, Nig WJ. Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 57: 153-160.

4. Olajuyigbe FM, Ehiosun KI. Production of thermostable and organic solvent tolerant alkaline protease from *Bacillus coagulans* PSB-07 under different submerged fermentation conditions. Afri J Biotechnol. 2013; 12(21): 3341-3350.

5. Huang Q, Peng Y, Li X, Wang H, Zhang Y. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. Curr Microbiol. 2003; 46: 169-173.

6. Doddapaneni KK, Tatineni R, Rachcha RNVS, Anabrolu N, Mangamoori VNLN. Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*. Microbiol Res. 2009; 164: 383-390.

7. Joo HS, Chang CS. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. J Appl Microbiol. 2005; 98: 491-497.

8. Kaur S, Vohra RM, Kapoor M, Beg QK, Hoondal GS. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. World J Microbiol Biotechnol. 2001; 17: 125-129.

9. Nadeem M, Qazi JI, Syed Q, Gulsher M. Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations. Songklanakarin J Sci Technol. 2013; 35(2): 187-195.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Badoei-dalfard A, Karami Z. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: Activity optimization by response surface methodology. J Molecul Catal B: Enz. 2013; 89: 15-23.

11. Nihan ARABACI, Yasemin CAF, Yelis MAAŞOĞLU, Burhan ARIKAN. Partial purification and characterization of thermostable, alkaline and chelator resistant protease from a newly isolated *Bacillus* sp. CY7 and its potential applications in various industries. J Appl Biol Sci. 2013; 7 (2): 14-19.

12. Rahman RNZRA, Mahamad S, Salleh AB, Basri M. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. J Ind Microbiol Biotechnol. 2007; 34: 509-517.

13. Sareen R, Mishra P. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. Appl Microbiol Biotechnol. 2008; 79(3): 399-405.

14. Sen S, Venkata DV, Dutta K, Mandal B. Characterization of a novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus pseudofirmus* SVB1. Res J Microbiol. 2011; 6: 769-783.

15. Usharaniand BMM. Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. Global J Mol Sci. 2009; 4(2): 180-186.

16. Singh SK, Singh SK, Tripathi VR, Garg SK. An oxidant, detergent and salt stable alkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1. Afri J Biotechnol. 2011; 10(57): 12257-12264.

17. Manni L, Jellouli K, Ghorbel-Bellaaj O, Agrebi R, Haddar A, Sellami-Kamoun A, Nasri M. An oxidant- and solvent-stable protease produced by *Bacillus cereus* SV1: Application in the deproteinization of shrimp wastes and as a laundry detergent additive. Appl Biochem Biotechnol. 2010; 160; 2308-2321.

18. Sen SV, Dutta VDK, Mandal B. Characterization of a novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus pseudofirmus* SVB1. Res J Microbiol. 2011; 6: 769-783.

19. Femi-Ola TO, Oladokun DO. Partial purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Lactobacillus brevis*. Malaysian J Microbiol. 2012; 8(1): 1-5.

20. Usharani B, Muthuraj M, Kaur M, Dhillon S, Chaudhary K. Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. Global J Molecul Sci. 2009; 4: 180-186.

21. Ghorbel B, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. Enz Microb Technol. 2003; 32: 513-518.

22. Rachadech W, Navacharoen A, Ruangsit W, Pongtharangkul T, Vangnai A. An organic solvent-, detergent-, and thermostable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5. Microbiol. 2010; 79(5): 620-629.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 1, April 2015

Original Article

The production of alkaline protease by *Bacillus tequilensis* FJSH2 isolated from Jiroft's slaughterhouse wastes

Arastoo Badoei-dalfard[1], Parvin Amiri[2], Narjes Ramezanipour[3], Zahra Karami[1], Batool Ghanbari[4]

[1] Assistant Professors, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[2] M.Sc., University of Payam-noor, Tehran, Iran.
[3] M.Sc., Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[4] Lecturer, University of Payam-noor, Jiroft, Kerman, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Proteases are the most applied industrial enzymes usable in several biotechnological industries. These enzymes include approximately 60% of enzyme marketing worldwide. Alkaline proteases are the most important enzymes which are stable in the presence of alkaline pH, surfactant and oxidizing agents. This study was aimed to isolate and identify the protease producing bacteria from slaughterhouse wastes in Jiroft.

Materials & Methods: This cross - sectional study was performed on Jiroft's slaughterhouse wastes. The protease producing strain was screened on the skim milk agar media. The *16S rRNA* genes of the samples were obtained using PCR and sequencing. The protease enzyme was partially purified by ammonium sulphate precipitation, dialysis and ion exchange chromatography. Thereafter, The biochemical features of the enzymes were analysed.

Results: The gene sequencing study showed that the isolated strain were 100 % similar to *Bacillus tequilensis* species. The purified protease showed maximum activity and stability in pH 9 and 40°C. K_m and V_{max} values were obtained based on Linewewr berg equation 6.77 mg/ml and 64.94 U/ml/min, respectively. Protease stability was improved about 1.8 and 2.4 folds in the presence of cyclohexane and DMSO, respectively.

Conclusion: The activity and stability of this enzyme in alkaline pH and in the presence of organic solvents indicates its potential to be used in industries.

Keywords: Alkaline protease, Wastes, Screening, *Bacillus tequilensis.*

Correspondence to: Arastoo Badoei-dalfard

Tel: +983433202044

E-mail: badoei@uk.ac.ir

Journal of Microbial World 2015, 8(1): 54-63.

Archive of SID

www.SID.ir