مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره چهارم (پیاپی ۳۳) زمستان ۱۳۹۶
صفحات ۳۳۲-۳۲۲

Original Article

جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست نسبی تولید کننده پروتئاز از خاک های شور

نیلوفر قربانی رز[۱]، مریم قانع*[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های نمک دوست نسبی منابع بسیار خوبی برای تولید آنزیم‌هایی هستند که نه تنها در برابر غلظت‌های مختلف نمک پایدارند، بلکه دارای فعالیت بهینه در محدوده وسیعی از pH و دما هستند. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری‌های نمک دوست نسبی تولید کننده پروتئاز از خاک‌های شور استان البرز انجام شد.

مواد و روش‌ها: غربالگری باکتری‌های نمک دوست تولید کننده پروتئاز با استفاده از محیط اسکیم میلک آگار دارای ۵ درصد نمک انجام شد. فعالیت آنزیمی با روش رنگ سنجی ارزیابی شد و اثر عوامل مختلف مانند دما، pH و غلظت‌های مختلف نمک بر فعالیت آنزیمی بررسی گردید. همچنین شناسایی سویه با روش‌های بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی صورت گرفت.

یافته ها: در مجموع ۱۱ سویه نمک دوست با فعالیت پروتئولیتیکی جدا شد. از این میان سویه B8 با بزرگ‌ترین هاله پروتئولیز و میزان فعالیت U/mL ۳/۲ برای مطالعات بیشتر انتخاب گردید. این آنزیم فعالیت بهینه را در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، pH ۷/۵ و غلظت ۰/۵-۰ مولار نمک نشان داد. اگرچه در غلظت‌های بالاتر نمک (تا ٤ مولار) فعالیت همچنان باقی می‌ماند. آنزیم در محدوده وسیعی از pH فعال بود و در pH ۹/۵، ٦۰ درصد فعالیت آنزیم حفظ می‌شد. آنالیز فیلوژنتیکی بر مبنای توالی *16S rRNA* نشان داد که سویه متعلق به جنس *هالوموناس* است. این سویه با نام *Halomonas* sp. strain HM_NG2 در بانک ژن ثبت گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که پروتئاز تولید شده توسط سویه جدا شده در این تحقیق به دلیل پایداری حرارتی نسبی و ویژگی هالوآلکالوفیلی می‌تواند کاندید مناسبی برای کاربردهای زیست فناوری باشد.

واژگان کلیدی: پروتئاز، سنجش آنزیمی، *هالوموناس*.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹٦ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹٦

مقدمه

پروتئازها آنزیم هایی هستند که باعث هیدرولیز پروتئین می شوند و به آنها آنزیم های پروتئولیتیک یا پروتئیناز نیز می گویند. این آنزیم ها بر اساس ساختار و خواص جایگاه اتصال به گروه های سرین پروتئاز، متالو پروتئاز، آسپارتیک پروتئاز و سیستئین پروتئاز تقسیم می شوند. پروتئازها یکی از مهم ترین گروه آنزیم های صنعتی هستند و پروتئاز تجارتی حدود ٦۰٪ کل فروش آنزیم را به خود اختصاص می‌دهد (۱).

این آنزیم‌ها علاوه بر اینکه به عنوان افزودنی در شوینده‌ها به کار می روند، در صنایع مختلف مانند صنایع غذایی، دارویی، چرم و تشخیص پزشکی نیز مورد استفاده قرار می گیرند (۲). پروتئازها را می‌توان از انواع موجودات مانند گیاهان، جانوران، باکتری‌ها و آرکی‌ها به دست آورد. با این وجود پروتئازهای میکروبی نسبت به سایر پروتئازها برتری دارند. زیرا میکروب‌ها برای رشد به فضای اندکی نیاز دارند، به سرعت رشد می‌کنند و از لحاظ ژنتیکی به آسانی قابل تغییر بوده و امکان به دست آوردن آنزیم‌هایی با خواص تغییر یافته که به لحاظ زیست فناوری برای صنعت مناسب باشد، فراهم می‌آید (۳).

*) آدرس برای مکاتبه: اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۲۱۵٦۳۵۸۱۰۵ پست الکترونیک: maryamghaneh@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

از آنجایی که اغلب فرآیندهای صنعتی در شرایط ناملایم از لحاظ دما، pH و نمک صورت می گیرد، آنزیم‌های میکروبی باید فعالیت بهینه را در محدوده وسیعی از دما، pH و غلظت نمک داشته باشند. میکروارگانیسم‌هایی که در محیط های شور زندگی می کنند منبع مناسبی برای تولید این آنزیم ها هستند. میکروارگانیسم های نمک دوست، میکروارگانیسم هایی هستند که می تواند در محدوده وسیعی از غلظت نمک زندگی کنند (۳-۳۰٪) و بر اساس میزان نمک مورد نیاز به نمک دوست ضعیف، نمک دوست نسبی و نمک دوست شدید تقسیم می‌شوند و شامل باکتری‌ها و آرکی‌ها می‌شوند (٤).

این میکروارگانیسم ها در باتلاق های نمکی، اکوسیستم های دریایی، دریاهای بسیار شور، استخرهای تبخیر نمک و معادن نمکی زندگی می کنند (٥). تاکنون باکتری های نمک دوست فراوانی از مناطق مختلف جداسازی شده اند و کاربردهای زیست فناوری آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است. از آن جمله می توان به توانایی این باکتری ها در تجزیه ترکیبات شیمیایی سمی (٦)، تولید بتاکاروتن (۷)، پلی هیدروکسی آلکانوآت (۸) و محلول های سازگار اسمزی (۹) اشاره نمود. انواعی از فرآورده های زیست فناوری مانند باکتریورودوپسین، هالورودوپسین، پلیمرهای زیستی، بیوسورفکتانت ها، اگزوپلی ساکاریدها، طعم دهنده ها و داروهای ضد تومور به وسیله باکتری‌های نمک دوست تولید می‌شود (۱۰).

همچنین انواع مختلفی از اگزوآنزیم ها از باکتری های نمک دوست جدا شده است که از لحاظ زیست فناوری بسیار حائز اهمیت می باشند (۱۱). این اگزوآنزیم‌ها ویژگی‌های بیوشیمیایی و ساختار منحصر به فردی دارند که در غلظت بالای نمک پایدار هستند (۱۲ و ۱۳). آنزیم های مشتق شده از نمک دوست ها ساختار منحصر به فرد و قدرت کاتالیکی دارند و فرآیندهای فیزیولوژیکی و میکروبیولوژیکی را در شرایط با غلظت نمک بالا انجام می‌دهند. برخی از این آنزیم‌ها در بیش از یک شرایط سخت پایدار هستند و در شرایطی که منجر به رسوب یا تقلیب اغلب پروتئین ها می شوند، پایدار و کارا هستند (۱۷-۱٤).

اغلب فرآیندهای صنعتی در شرایط فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای انجام می‌شوند و معمولا شرایط بهینه مورد نیاز برای فعالیت و پایداری آنزیم تامین نمی‌شود. بنابراین در این شرایط آنزیم‌هایی که بتوانند در محدوده وسیعی از pH، دما و غلظت های نمک فعال باشند بسیار با ارزش خواهند بود.

در این میان آنزیم های تولید شده توسط باکتری های نمک دوست نسبی از اهمیت بالاتری برخوردار هستند. نمک دوست های نسبی باکتری های اکستریموفیلی (extremophile) هستند که در محدوده وسیعی از غلظت های نمک زندگی می کنند و منبع چنین آنزیم‌هایی هستند (۱۸). جداسازی نمک دوست های نسبی و شدید که قادر به تولید آنزیم های هیدرولیتیکی هستند، این احتمال را فراهم می‌کند که آنزیم‌هایی به دست آید که دارای فعالیت بهینه در غلظت‌های مختلف نمک موجود در اغلب فرایندهای صنعتی باشند (۱۹ و ۲۰).

در حال حاضراکستریموزیم (extremozyme) یا آنزیم‌هایی که از باکتری های اکستریموفیل جدا می شود، جایگزین کاتالیزورهای شیمیایی در بسیاری از صنایع شامل صنایع کاغذ سازی، چرم، شوینده، داروسازی و صنایع غذایی شده‌اند (۲۱). از آنجایی که پروتئازهای نمک دوست ها به شرایط سخت محیطی سازگار شده‌اند، می توانند در فرآیندهای صنعتی که در شرایط سخت مانند دمای بالا و غلظت‌های بالای برخی حلال‌های آلی صورت می‌گیرد، به کار روند (۲۲).

ایران دارای محیط های پوشیده از نمک متنوعی است. این محیط ها شامل معادن نمکی، بیابان های نمکی رودخانه ها و دریاچه های پرشور است. اغلب مطالعات انجام شده بر روی باکتری های نمک دوست محدود به دریاچه های پرشور نظیر دریاچه بختگان، دریاچه آران و بیدگل، حوض سلطان و مهارلو می باشد. مطالعات بسیار اندکی بر روی باکتری های نمک دوست بومی خاک‌های شور در ایران صورت گرفته است (۱۸، ۲۰، ۲۱ و ۲۳). این امر سبب شده پتانسیل زیست فناوری باکتری‌های بومی این مناطق ناشناخته باقی بماند. با توجه به پتانسیل زیست فناوری بالای باکتری‌های نمک دوست و تنوع زیستی بالایی که در ایران وجود دارد، جداسازی و شناسایی

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری های نمک دوست با پتانسیل استفاده در صنعت برای توسعه دانش زیر بنایی کشور ضروری به نظر می‌رسد.
هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری های تولید کننده پروتئاز از خاک‌های نمکی در شهرستان کرج بود.

مواد و روش‌ها

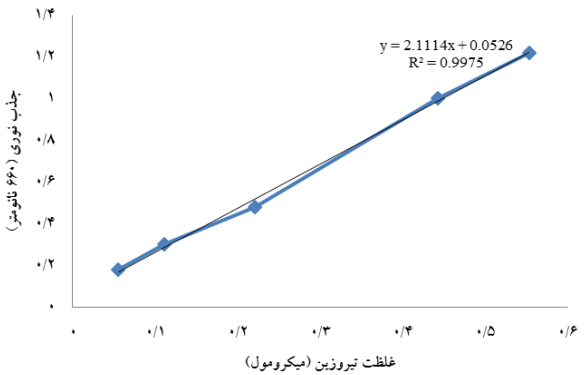
الف) جمع آوری نمونه و جداسازی سویه‌ها: نمونه برداری از خاک های نمکی جاده نظر آباد اشتهارد و روستای احمد آباد ماهدشت در شهرستان کرج انجام شد. نمونه‌های خاک از سطح دست نخورده زمین با استفاده از استوانه برش و بیلچه تهیه شد، به طوری که وضعیت اصلی خاک (ساختمان خاک) حفظ شود. نمونه‌ها از طریق ظروف شیشه‌ای استریل به آزمایشگاه منتقل و در کمتر از ٤ ساعت مورد آزمایش قرار گرفتند. برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها از نمونه‌های محیطی، یک گرم از خاک در ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی رقیق شد. مقدار ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون در محیط کشت پایه حاوی نمک دریایی شامل ۸/۱٪ NaCl، ۰/۷٪ $MgCl_2$، ۰/۹۶٪ $MgSO_4$، ۰/۰۳۶ $CaCl_2$، ۰/۲ KCl ، ۰/۰۰۶ $NaHCO_3$، ۰/۰۰۲۶ NaBr و ۰/۵٪ پپتون، ۱٪ عصاره مخمر و ۰/۱٪ گلوکز (مرک، آلمان) تلقیح شد (٢٤). پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سلیسیوس، تعداد ۲۰ کلنی منفرد متفاوت از نظر مورفولوژی انتخاب شدند. پس از تهیه کشت خالص، در محیط لوریا برتانی براث (مرک، آلمان) با ۱۵٪ گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند (۲۵).

ب) بررسی تولید آنزیم پروتئاز : برای بررسی تولید آنزیم پروتئاز، باکتری‌ها در محیط کشت اسکیم میلک آگار حاوی ۱۰ درصد پودر اسکیم میلک (Quelab، کانادا)، ۵ درصد NaCl و ۲ درصد آگار کشت داده شدند (۱۸). pH محیط قبل از مرحله استریل کردن ۷/۲ تنظیم شد. نمونه‌ها به مدت ٤٨ تا ۷۲ ساعت در ۳۰ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. هاله شفاف اطراف خط کشت، نشانه هیدرولیز پروتئین می‌باشد. سویه‌ای که هاله بزرگتری داشت برای مطالعات بعدی انتخاب گردید.

ج) آماده سازی باکتری برای تولید پروتئاز و سنجش فعالیت آنزیمی: در ابتدا یک لوپ پر از باکتری مورد نظر به یک فلاسک ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت پایه منتقل شد و به صورت شبانه در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس در rpm ۲۰۰ گرماگذاری شد. سپس از کشت شبانه به میزان ۵٪ در فلاسک ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۸۰ میلی لیتر محیط کشت یاد شده واجد ۲٪ کازئین (مرک، آلمان) تلقیح گردید و به مدت ٤٨ ساعت در شرایط مشابه گرماگذاری شد. در ادامه محیط کشت یاد شده در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس از روماند به عنوان محلول آنزیمی استفاده شد (٢٦). فعالیت پروتئولیتیک با استفاده از کازئین به عنوان سوبسترا با روش پیشنهاد شده توسط کونیتز (Kunitz) و همکاران با تغییرات اندک تعیین گردید (۲۷).
واکنش در یک لوله دارای ٤٨٠ میکرولیتر از (W/V) ۱٪ کازئین در بافر ۲۰ میلی مولار Tris-HCl (pH ۸/۵)، ۵۰ میلی مولار NaCl، ۰/۵ میلی مولار $CaCl_2$ (مرک، آلمان) و ۲۰ میکرولیتر از روماند حاوی آنزیم در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. واکنش با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ درصد تری کلرو استیک اسید (TCA) (سیگما، آمریکا) در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه متوقف شد. سپس در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از مایع روماند به یک لوله منتقل و ۱/۵ میلی لیتر از محلول Na_2CO_3 و ۰/۵ میلی لیتر از معرف فولین (سیگما، آمریکا) به آن اضافه گردید. سپس ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد. در نهایت جذب نوری در طول موج ٦٦٠ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Beckman، آمریکا) قرائت گردید. غلظت تیروزین آزاد شده بر اساس منحنی استاندارد تیروزین بررسی شد. برای رسم منحنی استاندارد، ابتدا محلول استاندارد ۱/۱ mM تیروزین (مرک، آلمان) تهیه و سپس در هر لوله مقادیر ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/٤، ۰/۵ میلی لیتر از محلول یاد شده اضافه شد و با آب مقطر به حجم ۲ میلی لیتر رسانده شد. سپس ۵ میلی لیتر کربنات کلسیم و ۱ میلی لیتر معرف فولین اضافه گردید. پس از گرماگذاری در ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ دقیقه جذب

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: منحنی استاندارد تیروزین.

نوری تیروزین در طول موج ٦٦٠ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد تیروزین رسم شد (نمودار ۱).

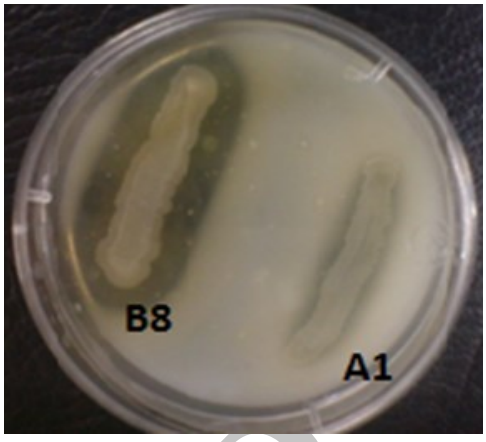
د) بررسی اثر عوامل مختلف بر فعالیت آنزیم: اثر دما بر فعالیت آنزیمی با گرماگذاری آنزیم و سوبسترا در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). برای این منظور مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای ٤٠، ٥٠ و ٦٠ درجه سلسیوس گرماگذاری شد و سپس فعالیت آنزیمی مطابق روش استاندارد یاد شده تعیین شد. اثر pH بر فعالیت آنزیمی با انکوبه کردن مخلوط واکنش در گستره های مختلف pH (۱۲-۵)، در بافرهای ۱ مولار استات سدیم (pH ٤-٥/٥)، ۰/۱ مولار فسفات سدیم (pH ٦-٧/٥) و ۰/۱ مولار Tris-HCl (pH ۸-۹) مورد آزمون قرار گرفت. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۱۹۰ میکرولیتر از هر یک از بافرهای یاد شده مخلوط شدند. پس از گرماگذاری به مدت ۱ ساعت در ۲۵ درجه سلیسیوس فعالیت آنزیمی اندازه گیری گردید. اثر غلظت‌های مختلف نمک بر روی فعالیت پروتئازی در حضور غلظت های ٤-۰ مولار نمک در مخلوط واکنش آنزیمی تعیین شد (۱۸).

ه) ویژگی‌های فنوتیپی و فیلوژنتیکی: به منظور شناسایی سویه تولید کننده پروتئاز، آنالیز فنوتیپی و ژنوتیپی انجام شد. مورفولوژی کلنی مانند رنگدانه، شکل کلنی و کدورت با کشت باکتری بر روی محیط پایه و پس از ۵ روز گرماگذاری در ۳۰ درجه سلیسیوس تعیین گردید (٢٤). برای بررسی رشد باکتری در غلظت های مختلف نمک از محیط پایه با غلظت‌های ۰/۵، ۲/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد از نمک دریایی استفاده شد (٢٤). رشد باکتری در در گستره های pH مختلف ۵، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ در محیط پایه مورد آزمون قرار گرفت. همچنین رشد باکتری در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۵ و ٤٥ درجه سلیسیوس در همان محیط مورد بررسی قرار گرفت و رشد قابل رویت پس از گذشت ۷ روز مثبت در نظر گرفته شد. تولید H_2S در محیط پایه حاوی ۰/۰۱ درصد سیستئین (مرک، آلمان) با یک نوار کاغذی آغشته به استات سرب که در دهانه لوله قرار داده شده بود، تعیین گردید (٢٤). تولید اسید از گلوکز، سوکروز، لاکتوز، مانوز و ترهالوز در محیط حاوی ۱۰ درصد از نمک‌های دریایی، ۱٪ پپتون، ۰/۵٪ عصاره مخمر، ۰/۰۰۱٪ فنل رد و ۱٪ از هر یک از قندهای یاد شده مورد آزمون قرار گرفت. احیای نیترات در محیط دارای ۰/۲٪ از KNO_3 انجام شد. هیدرولیز ژلاتین، نشاسته و کازئین و سایر آزمایشات بیوشیمیایی مطابق با روش ارائه شده توسط ونتوزا (Ventosa) انجام شد (٢٤). به منظور استخراج DNA الگو، یک کلنی منفرد از سویه جدا شده در ۵ میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (مرک، آلمان) در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به صورت شبانه کشت داده شد (۲۵). سپس استخراج DNA بر اساس دستورالعمل شرکت سازندهٔ کیت (Promega، امریکا) صورت گرفت. به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* از پرایمرهای عمومی با توالی های F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTC-3' و توالی R: 5'-AAGGAGGTGATCCAACC-3' استفاده شد (۲۸).

واکنش زنجیره ای پلی مراز (Polymerase Chain Reaction) (PCR) مطابق با روش‌های استاندارد با استفاده از ۵ میکرولیتر از بافر PCR (PCR buffer 10x)، ۱ میکرولیتر مخلوط هر ٤ داکسی نوکلئوتید ۳ فسفاته (dNTP)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۱ میکرولیتر DNA الگو (۵۰ نانو گرم) و ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم DNA پلی مراز Taq (سینا کلون، ایران) انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر (Peqlab، آلمان) با شرایط دمایی شامل ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه (۱ دوره)، ۹۰ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ٤٥ درجه سلیسیوس به مدت ٦٠ ثانیه، ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦٠ ثانیه (۳۰ دوره)، ۷۲ درجه

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: تولید پروتئاز بر روی محیط اسکیم میلک. ایجاد هاله شفاف اطراف خط کشت توسط دو سویه نمک دوست تولید کننده پروتئاز.

سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه (۱ دوره) انجام شد (۲۵).

محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (سیگما، آمریکا) با استفاده از دستگاه ژل داک (Geldoc) (Uvitech) مورد بررسی قرار گرفتند (۲۵). به منظور تخلیص محصولات PCR از کیت خالص سازی (فرمنتاز، تایلند) استفاده شد. در نهایت محصولات به منظور توالی یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند. توالی‌های ژن *16S rRNA* با استفاده از نرم افزار (Blast) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) با اطلاعات موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) مقایسه گردید.

و) آنالیز داده‌ها: تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده با استفاده از نسخه بیستم نرم افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شد.

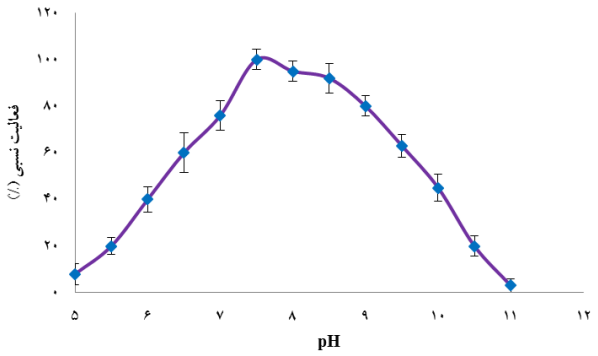
یافته‌ها

الف) جداسازی و خالص سازی باکتری‌های نمک دوست: در مرحله غربالگری، تعداد ۵۰ سویه نمک دوست نسبی از خاک‌های نمکی جاده نظر آباد اشتهارد و روستای احمد آباد ماهدشت در شهرستان کرج جداسازی گردید. از میان باکتری‌های جدا شده ۱۱ سویه توانایی تولید پروتئاز در محیط جامد حاوی اسکیم میلک را داشتند. در بین آنها سویه B8 بزرگ‌ترین هاله را تولید کرد، به همین دلیل برای مطالعات بعدی انتخاب گردید (شکل ۱). فعالیت آنزیمی محیط کشت عاری از سلول سویه B8 معادل ۳/۲ U/ml تعیین شد.

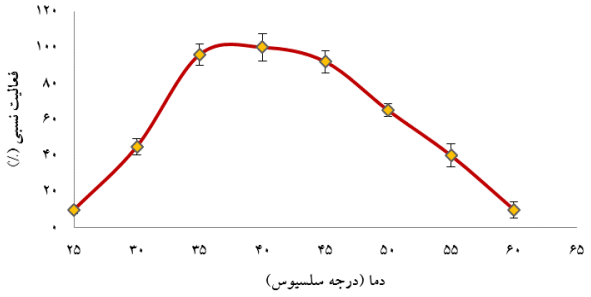
ب) تاثیر عوامل مختلف بر فعالیت آنزیم پروتئاز: تاثیر pH بر روی عملکرد آنزیم پروتئاز در نمودار ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه بهترین pH برای فعالیت آنزیم پروتئاز تولید شده توسط سویه جدا شده، برابر با ۷/۵ بود. بیش از ۹۰٪ فعالیت آنزیم تا ۸/۵ pH حفظ می شد. همچنین اختلاف معنی داری بین فعالیت آنزیم در اسیدیته ۸ و ۸/۵ وجود نداشت.

تاثیر دما بر روی فعالیت آنزیم پروتئاز در سویه جدا شده در نمودار ۳ نشان داده شده است. همانطور که نشان داده شده است فعالیت آنزیم در دمای بالاتر از ۳۰ درجه سلیسیوس به سرعت افزایش می‌یابد. همچنین بهترین دما برای فعالیت آنزیم ۴۰ درجه سلیسیوس بود و ۹۲٪ فعالیت آنزیم در دمای ۴۵ درجه سلیسیوس باقی ماند.

تاثیر غلظت‌های مختلف نمک بر روی فعالیت آنزیم در نمودار ٤ نشان داده شده است. فعالیت بهینه آنزیم در غلظت ۰/۵–۰



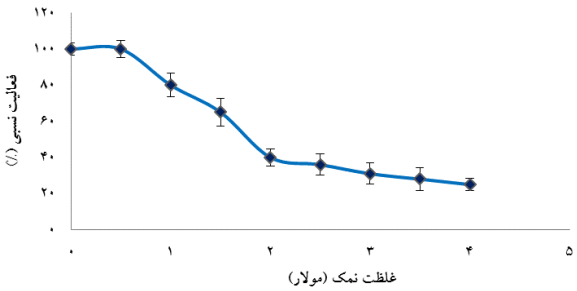
نمودار ۲: تاثیر pH بر روی فعالیت آنزیم پروتئاز در سویه B8. مقادیر نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار ۳ آزمون مستقل است.



نمودار ۳: تاثیر دما بر فعالیت آنزیم پروتئاز در سویه B8. مقادیر نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار ۳ آزمون مستقل است.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ٤: تاثیر غلظت‌های مختلف نمک بر فعالیت آنزیم پروتئاز در سویه B8. مقادیر نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار ۳ آزمون مستقل است.

مولار نمک مشاهده شد. اختلاف معنی داری بین فعالیت آنزیم در غلظت‌های صفر و ۰/۵ مولار نمک وجود نداشت. فعالیت آنزیم تا غلظت ٤ مولار نمک همچنان باقی می‌ماند.

ج) شناسایی سویه جدا شده: ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سویه جدا شده بررسی شد. سویه جدا شده توانایی رشد در دمای ٤٥-۲۰ درجه سلسیوس را دارا بود و بهینه رشد در دمای ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس گزارش شد. همچنین این سویه در محدوده اسیدیته ۹-٦ رشد نمود. اسیدیته بهینه برای رشد معادل ۷/۵ بود. سویه جدا شده در غلظت ۱۵-۳٪ نمک رشد کرد و در محیط فاقد نمک رشدی مشاهده نشد. برخی از ویژگی‌های سویه B8 در جدول ۱ نشان داده شده است.

د) شناسایی مولکولی سویه جدا شده: تعداد ۱۱۵۰ نوکلئوتید از توالی ژن *16S rRNA* سویه جدا شده توالی یابی شد. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن نشان داد که سویه B8 متعلق به جنس *هالوموناس* (*Halomonas*) است. این باکتری به عنوان *هالوموناس* اس پی. سویه HM_NG2 (*Halomonas* sp. strain HM_NG2) معرفی شد و با شماره دسترسی KX683393 در بانک ژن ثبت گردید. مقایسه توالی به دست آمده با سایر توالی‌های موجود با استفاده از نرم افزار بلاست (Blast) نشان داد که سویه جدا شده ۹۹٪ با *هالوموناس الونگاتا* سویه I (*Halomonas elongata* strain I) مشابهت دارد. شکل ۲ موقعیت سویه جدا شده را در بین اعضای جنس *هالوموناس* در درخت فیلوژنتیکی نشان می دهد.

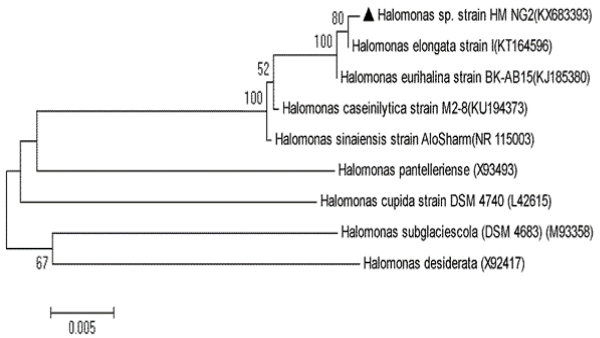
جدول ۱: مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه B8.

ویژگی ها	نتایج	ویژگی ها	نتایج
رنگ آمیزی گرم	-	مصرف گلوکز	–
مورفولوژی	باسیل	سوکروز	–
تولید H_2S	+	لاکتوز	–
حرکت	+	مانوز	–
کاتالاز	+	ترهالوز	+
اکسیداز	–	هیدرولیز نشاسته	+
رنگدانه	کرم	ژلاتین	+
احیای نیترات به نیتریت	+	کازئین	+
مصرف سیترات	+	اوره آز	–

بحث

تاکنون آنزیم های پروتئولیتیک زیادی از باکتری های نمک دوست شدید جداسازی شده است. تمامی این آنزیم‌ها برای فعالیت به غلظت‌های بالای نمک وابسته‌اند و در غلظت‌های بالای نمک فعال هستند. فعالیت اغلب پروتئازهای این گروه زمانی که آنزیم در معرض غلظت‌های پایین نمک قرار می‌گیرد به شدت کاهش می‌یابد (۲۹). بدین ترتیب توانایی باکتری‌های نمک دوست نسبی به دلیل توانایی آنها در رشد در محدوده وسیع نمک، آنها را برای کاربردهای زیست فناوری بسیار جذاب می‌کند (۵).

محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق برای غربالگری سویه‌های نمک دوست نسبی به دلیل وجود مقادیر محدود یون منیزیم امکان جداسازی این گروه از نمک دوست‌ها را افزایش



شکل ۲: درخت فیلوژنی که موقعیت سویه جدا شده را بر اساس توالی *16S rRNA* نشان می‌دهد. روش neighbor-joining برای رسم درخت استفاده شده است. شماره‌های دسترسی در پرانتز آمده است.

Archive of SID

www.SID.ir

می دهد (۲٤). بر اساس طبقه بندی کوشنر (Kushner) سویه جدا شده در این مطالعه در دسته نمک دوست‌های نسبی قرار گرفت (۳۰). زیرا این باکتری در غلظت ۳ تا ۱۵ درصد نمک رشد کرد، اما در محیط فاقد نمک رشدی نداشت.

بر اساس توالی ژن *16S rRNA* سویه جدا شده شباهت زیادی به اعضای جنس *هالوموناس* از خانواده *هالوموناداسه* (*Halomonadaceae*) داشت. خواص فیزیولوژی و بیوشیمیایی جدایه که در این تحقیق به دست آمده با خواص فیزیولوژی و بیوشیمیایی گزارش شده با جنس *هالوموناس* مطابقت دارد (۳۱). خانواده *هالوموناداسه* اول بار توسط فرانزمن (Franzman) معرفی گردید (۳۲). این خانوده متعلق به گاماپروتئوباکتری‌ها بوده و دارای ۱۰ جنس می باشد. اعضای این جنس از محیط های مختلف آبی و خاکی و اساساً از محیط‌های شور و پرشور و زیستگاه‌های قلیایی جدا شده است (۳۳). اعضای این جنس از دسته باکتری های نمک دوست نسبی هستند. سویه جدا شده در این تحقیق نیز از لحاظ رشد در غلظت های مختلف نمک با اعضای این خانواده مطابقت داشت.

یکی از مهم‌ترین ویژگی های هیدرولازهای تولید شده توسط نمک دوست‌ها آن است که این آنزیم‌ها نه تنها تحمل کننده نمک هستند، بلکه در دماهای بالا نیز پایدارند. به همین دلیل این آنزیم‌ها برای کاربردهای صنعتی ارزشمندتر هستند. دما نقش مهمی را در فعالیت و پایداری آنزیم ایفا می‌کند. هر آنزیم دارای دمای بهینه برای حداکثر فعالیت می باشد. مطالعات در مورد دمای بهینه فعالیت آنزیم نشان داد که پروتئاز تولید شده توسط سویه جدا شده بیشترین فعالیت را در دمای ٤٠ درجه سلسیوس داشت و در دمای ٤٥ درجه سلسیوس بیش از ۹۰ درصد فعالیت آنزیم حفظ می‌شد. دمای بهینه پروتئاز تولید شده توسط *هالوموناس ونتوزا* سویه *Halomonas venusta* SS5 (SS5) که از هند جدا شده نیز معادل ٤٠ درجه سلسیوس گزارش گردید (۳٤).

با این وجود پروتئاز تولید شده توسط *هالوباسیلوس کرجنسیس* (*Halobacillus karajensis*) و *سالینی ویبریو* (*Salinivibrio*) که به ترتیب از خاک و دریاچه مهارلو جدا شده بودند، حداکثر فعالیت را در دمای ۵۰ درجه سلسیوس نشان دادند (۱۵ و ۳۵). بنابراین پایداری حرارتی نسبتاً بالاتری داشتند. این درحالی است که پروتئاز تولید شده در تحقیق حاضر در دمای ۵۰ درجه سلسیوس نیز فعال بوده و ٦۰٪ فعالیت آنزیم در این دما حفظ شد. بنابراین آنزیم تولید شده در این تحقیق پایداری حرارتی نسبتا قابل ملاحظه‌ای داشت.

پروتئاز تولید شده در این تحقیق در محدوده وسیعی از pH (۱۰-٦) فعال بود و بیش از ٦۰٪ فعالیت را در pH ٦/۵ و ۹/۵ نشان داد. توانایی حفظ فعالیت آنزیم در محدوده وسیعی از pH، یکی از مهم‌ترین امتیازات برای کاربردهای صنعتی آنزیم است. در مقایسه با پروتئاز تولید شده توسط *هالوموناس مریدیان* (*H. meridian*) که بیشترین فعالیت را در pH ۷ داشت، پروتئاز تولید شده توسط سویه B8 در pH قلیایی فعالیت قابل ملاحظه‌ای داشت (۳٦).

خواص بیوشیمیایی آنزیم مانند دما و الگوی pH بیانگر این مطلب است که آنزیم تولید شده یک آنزیم ترموآلکالوفیل با پایداری حرارتی نسبی است و از این لحاظ تقریبا با پروتئاز قلیایی *سالینو ویبریو*، *هالوباکتریوم کرجنسیس*، *هالوموناس ونتوزا* سویه SS5 و پروتئاز CP1 *سودوآلتروموناس* سویه CP76 (*Pseudoalteromonas* sp. strain CP76) شباهت دارد (۱۵، ۳٤، ۳۵ و ۳۷).

اغلب پروتئازهای تولید شده توسط نمک دوست ها بیشینه فعالیت را در حضور غلظت های بالای نمک نشان می دهند. پروتئاز تولید شده در این تحقیق حداکثر فعالیت را در غلظت ۰/۵ میلی مولار نمک نشان داد و ٦۰٪ فعالیت آنزیم در غلظت ۱/۵ مولار نمک مشاهده شد.

الگوی غلظت نمک در این باکتری با توجه به این که بیشینه فعالیت را حتی در شرایط بدون نمک هم نشان می‌دهد، بسیار با اهمیت می باشد و با اغلب سویه های نمک دوست نسبی متفاوت است (۱۵، ۳٤ و ۳۷). اما تا حدودی با *سالینوویبریو* سویه AF-2004 و *سالینوویبریو* سویه MS7 مشابهت دارد (۱۸ و ۳۵). این در حالی است که در نمک دوست‌های شدید در

Archive of SID

www.SID.ir

غیاب نمک، فعالیت آنزیم به طور غیر قابل برگشت از دست می‌رود (۳۸).

فرآیندهای صنعتی معمولاً در شرایط فیزیکی و شیمیایی مختلف انجام می‌شوند و اغلب در محدوده شرایط بهینه برای فعالیت و پایداری آنزیم قابل تنظیم نیستند. بنابراین پروتئاز جدا شده در این تحقیق با توجه به اینکه در محدوده وسیعی از pH، نمک و دما پایدار می‌باشد، می‌تواند گزینه‌ای مناسب برای استفاده در فرآیندهای صنعتی باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که سویه *هالوفیل* جدا شده، سویه‌ای مناسب برای تولید آنزیم پروتئاز می‌باشد. زیرا توانایی رشد این باکتری در غلظت های بالای نمک احتمال ایجاد آلودگی ثانویه در فرآیند تولید پروتئاز را کاهش می‌دهد. به علاوه آنزیم تولید شده توسط این سویه نیز به دلیل پایداری حرارتی و خواص هالوآلکالوفیل می تواند کاربرد فراوانی در زیست فناوری داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی واحد اسلامشهر به دلیل فراهم آوردن امکانات لازم برای اجرای این پژوهش کمال تشکر را دارد.

References

1. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62: 597-635.
2. Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 59(1): 15-32.
3. Josephine FS, Ramya VS, Neelam D, Ganapa SB, Siddalingeshwara KG, Venugopal N, Vishwanatha T. Isolation production and characterization of protease from *Bacillus* sp. isolated from soil sample. J Microbiol Biotech Res. 2012; 2(1): 163-168.
4. DasSarma S, DasSarma P. Halophiles. In: eLS. Wiley, Chichester. 2012.
5. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62: 504-544.
6. Bonfá MR, Grossman MJ, Piubeli F, Mellado E, Durrant LR. Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments. Biodegradation. 2013; 24(5): 699-709.
7. Naziri D, Hamidi M, Hassanzadeh S, Vahideh Tarhriz V, Maleki Zanjani B, Nazemyieh H, Hejazi MA, Hejazi MS. Analysis of carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126; an extremely halophilic Archeon from Urmia Lake. Adv Pharm Bull. 2014; 4(1): 61-67.
8. Rathi DN, Amir HG, Abed RM, Kosugi A, Arai T, Sulaiman O, Hashim R, Sudesh K. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simplified polymer recovery by a novel moderately halophilic bacterium isolated from hypersaline microbial mats. J Appl Microbiol. 2013; 114 (2): 384-395.
9. Shivanand P, Mugeraya G. Halophilic bacteria and their compatible solutes osmoregulation and potential applications. Curr Sci. 2011; 100(10): 1516-1521.
10. Mehta VJ, Thumar JT, Singh SP. Production of alkaline protease from an alkaliphilic *Actinomycetes*. Bioresour Technol. 2006; 97: 1650-1654.
11. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environ

Archive of SID

www.SID.ir

Technol. 2010; 31(8-9): 825-834.

12. Prakash P, Jayalakshmi SK, Prakash B, Rubul M, Sreeramulu K. Production of alkaliphilic, halotolerent, thermostable cellulase free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste: single step purification and characterization. World J Microbiol Biotechnol. 2012; 28(1): 183-192.

13. Karan R, Singh SP, Kapoor S, Khare SK. A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated *Geomicrobium* sp. EMB2 (MTCC 10310): production optimization by response surface methodology. N Biotechnol. 2011; 28(2): 136-145.

14. Lourdes MM, Perez D, Teresa GM, Mellado E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. Life. 2013; 3: 38-51.

15. Karbalaei-Heidari HR, Amoozegar MA, Hajighasemi M, Ziaee AA, Ventosa A. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009; 36: 21-27.

16. Shafiei M, Ziaee AA, Amoozegar MA. Purification and characterization of an organic- solvent-tolerant halophilic alpha amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. J Ind Microbiol Biotechnol. 2012; 38: 275-281.

17. Siroosi M, Amoozegar MA, Khajeh K, Fazeli M, Rezaei MH. Purification and characterization of a novel extracellular halophilic and organic solvent-tolerant amylopullulanase from the haloarchaeon, *Halorubrum* sp. strain Ha25. Extremophiles. 2014; 18: 25-33.

18. Karbalaei-Heidari HR, Ziaee AA, Schaller J, Amoozegar MA. Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. Enzyme MicrobTechnol. 2007; 40: 266-272.

19. Sanchez-Porro C, Martin S, Mellado E, Ventosa A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J Appl Microbiol. 2002; 94: 295-300.

20. Makhdoumi KA, Amoozegar MA, Mahmodi KE. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. Int J Environ Sci Technol. 2011; 8: 705-714.

21. Rohban R, Amoozegar MA, Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake Iran. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009; 36: 333-340.

22. Schumacher K, Heine E, Hocker H. Extremozymes for improving wool properties. J Biotechnol. 2001; 89: 281-288.

23. Ghasemia Y, Rasoul-Aminia S, Ebrahiminezhad A, Aboozar Kazemi A, Shahbazi M, Talebnia N. Screening and isolation of extracellular protease producing bacteria from the Maharloo salt lake. Iran J Pharm Sci. 2011; 7(3): 175-180.

24. Ventosa A, Quesada E, Rodriguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative Rods. J Gen Microbiol. 1982; 128: 1959-1968.

25. Sambrok J, Russell DW, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. 4rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

26. Roayaie Ardakani M, Poshtkouhian A, Amoozegar MA, Zolgharnein H. Isolation of moderately halophilic *Pseudoalteromonas* producing extracellular hydrolytic enzymes from

Archive of SID

www.SID.ir

Persian Gulf. Ind J Microbiol. 2012; 52(1): 94-98.

27. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J Gen Physiol. 1947; 30: 291-310.

28. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for *16S rRNA*. Appl Environ Microbiol. 1993; 59: 695-700.

29. Adams MW, Kelly RM. Enzymes from microorganisms in extreme environments. Chem Eng News. 1995; 73: 32-42.

30. Kushner DJ. Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. In: Halophilic Bacteria. Rodrý´guez-Valera F. Boca Raton FL: CRC Press; 1988. p: 109-138.

31. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. New York: Springer-Verlag ; 2005.

32. Franzmann PD, Wehmeyer U, Stackebrandt E. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class Proteobacteria to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. Syst Appl Microbiol. 1998; 11(1): 16-19.

33. Sa´ nchez-Porro C, Kaur B, Mann H, Ventosa A. *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. Int J Sys Evol Microbiol. 2010; 60: 2768-2774.

34. Gupta S, Sharma P, Dev K, Sourirajan A. Halophilic bacteria of Lunsu produce an array of industrially important enzymes with salt tolerant activity. Biochem Res Int. 2016; 16: 1-10.

35. Shahbazi M, Talebnia N. Screening and isolation of extracellular protease producing bacteria from the Maharloo Salt Lake. Iran J Pharm Sci. 2011; 7(3): 175-180.

36. Anithajothi R, Nagarani N, Umagowsalya G, Duraikannu K, Ramakritinan CM. Screening, isolation and characterization of protease producing moderately halophilic microorganism *Halomonas meridiana* associated with coral mucus. Toxicol Environ Chemi. 2014; 96(2): 296-306.

37. Sánchez-Porro C, Mellado E, Bertoldo C, Antranikian G, Ventosa A. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. Extremophiles. 2003; 7: 221-228.

38. Vidyasagar M, Prakash S, Mahajan V, Shouche YS, Sreeramulu K. Purification and characterization of an halophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacterium* SP. TVSP101. Braz J Microbiol. 2009; 40: 12-19.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 4, January 2018

Original Article

Isolation and identification of moderately halophilic protease-producing bacteria from saline soils

Niloofar Ghorbani-raz[1], Maryam Ghane[2]

[1]M.Sc. student, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Islamshahr branch, Islamshahr, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Islamshahr branch, Islamshahr, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Moderate halophiles are excellent sources of enzymes that are not only salt- stable, but also have optimal activities at a wide range of pH and temperature. The aim of this study was the isolation of moderately halophilic protease-producing bacteria from saline soils in Alborz province.

Material & Methods: Screening of the protease- producing halophilic bacteria was carried out by skim milk agar containing 5% NaCl. Enzyme assay was investigated by the colorimetric method and the effect of various parameters such as temperature, pH, and different NaCl concentrations on enzyme activity were assessed. Identification of the isolates was carried out by biochemical as well as molecular methods.

Results: A total of 11 halophilic strains with proteolytic activity were isolated among which the strain B8 with higher clearance zone on skim milk agar and 3.2 Unit/mL supernatant activity was chosen for further analysis. The enzyme exhibited its optimal activity at the temperature of 40˚C, pH of 7.5 and NaCl concentration of 0-0.5 M, although at higher salinities (up to 3 M) activity was still remained. The enzyme was active at a broad pH range, keeping 60% of its activity at pH of 9.5. Phylogenetic analysis based on *16S rRNA* gene sequencing identified the isolate as *Halomonas*. It was deposited in GenBank, with the name of *Halomonas* sp. strain HM_NG2.

Conclusion: These findings suggest that the protease secreted by the isolate of this study could be a good candidate for biotechnological applications due to its moderate thermo-stability and halloalculophytic properties.

Keywords: Protease, Enzyme assay, *Halomonas*.

Correspondence to: Maryam Ghane

Tel: +98 2156358105

E-mail: maryamghaneh@yahoo.com

Journal of Microbial World 2018, 10(4): 322-332.

Archive of SID

www.SID.ir