Archive of SID

بهینه‌سازی تولید یک آنزیم پروتئازخارج سلولی قلیادوست مقاوم به حلال آلی ترشح شده از یک سویه باسیلوس

- **شهره محمدی**: گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
- **مریم مهرابی***: گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: آبان ١٣٩٨

چکیده

هدف در این پژوهش بهینه‌سازی تولید آنزیم پروتئاز قلیادوست مقاوم به حلال آلی از یک سویه باسیلوس و تعیین خصوصیات آنزیم می‌باشد. در این پژوهش یک سویه باسیلوس از چشمه آب‌گرم جداسازی شد و در محیط غنی شده با سیکلوهگزان (٣٠٪) و تولوئن (١٠٪) رشد یافت. باکتری‌های تولیدکننده پروتئاز با استفاده از کلنی‌های رشد یافته روی پلیت‌های اسکیم میلک آگار (SMA) جداسازی شدند. آنزیم پروتئاز در روش دو مرحله‌ای شامل رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز به شکل جزیی تخلیص شد. در نهایت یکی از کلنی‌ها به‌عنوان بهترین سویه با فعالیت پروتئازی معرفی شد. برای بهینه‌سازی محیط کشت باکتری برای تولید حداکثر پروتئاز فاکتورهای مختلف ازجمله زمان گرماگذاری، دما، اسیدیته، منابع کربن و منابع نیتروژن آزمایش شد. بیش‌ترین بازده رشد باکتریایی و تولید پروتئاز پس از ٧٢ ساعت گرماگذاری در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ٧ زمانی که محیط کشت توسط منبع کربنی سوکروز و منبع نیتروژن عصاره مخمر ٥ درصد غنی شده بود، مشاهده شد. این پروتئاز بیش‌ترین فعالیت را در دمای ٥٠ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ١٠ نشان داد و توسط اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) مهار شد، اما توسط مهارکننده‌های سرین پروتئاز تحت تأثیر قرار نگرفت که پیشنهاد می‌کند این آنزیم یک متالوپروتئاز است. فعالیت آنزیم در حضور غلظت ١٠٪ (v/v) از تولوئن، متانول، اتانول و دی‌اتیل‌اتر افزایش یافت. بنابراین، آنزیم می‌تواند به‌عنوان یک بیوکاتالیست قوی در صنایع و بیوتکنولوژی به‌کار گرفته شود.

کلمات کلیدی: پروتئاز، باسیلوس، حلال آلی، تخلیص

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m.mehrabi@razi.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اصطلاح پروتئاز به گروهی از آنزیم‌ها اشاره دارد که شکست پیوندهای پپتیدی را در سوبستراهای پروتئینی کاتالیز می‌کنند. پروتئازها یکی از مهم‌ترین گروه آنزیم‌های صنعتی هستند که تقریباً ۶۰ درصد بازار کل آنزیم را به‌خود اختصاص داده‌اند (Sawant و Nagendran، ۲۰۱۴). تقاضا برای آنزیم‌های صنعتی به‌ویژه با منشأ میکروبی با توجه به کاربردهای آن‌ها در انواع وسیعی از فرایندها در حال افزایش است. پروتئازهای میکروبی تقریباً ۴۰ درصد فروش آنزیم کل جهان را شامل می‌شوند (Padmapriya و همکاران، ۲۰۱۲). سرین پروتئازهای قلیایی برجسته‌ترین گروه پروتئازهای تولیدشده توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمر و اکتینومیست‌ها هستند. آنزیم‌های تولید شده از منابع میکروبی مزایای بیش‌تری نسبت به همسان‌های آن‌ها از منابع گیاهی و جانوری دارند. این مزایا شامل هزینه‌های تولید کم‌تر، امکان تولید در مقیاس بزرگ در فرمنتورهای صنعتی، محدوده وسیع ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی، امکان دستکاری ژنتیکی، عدم اثرات ناشی از فصل و کشت سریع می‌شود. این ویژگی‌های بالا، آنزیم‌های میکروبی را زیست کاتالیزورهای مناسبی برای کاربردهای صنعتی مختلف می‌سازند (Sawant و Nagendran، ۲۰۱۴). مزیت دیگر آنزیم‌های میکروبی این است که اکثر آن‌ها در طبیعت خارج سلولی هستند. این امر سهولت جداسازی آن‌ها به شکل خالص را افزایش می‌دهد (Gupta و همکاران، ۲۰۱۲). اگرچه منابع میکروبی زیادی برای تولید پروتئازها وجود دارد، تنها تعداد کمی به‌عنوان تولیدکننده‌های تجاری تشخیص داده‌شده‌اند. میکروب‌های متعلق به گروه‌های مختلف برای تولید طیف وسیعی از پروتئازها شناخته شده که آنزیم‌های صنعتی مهم با تقاضای بازار رو به افزایش عمدتا از گروه باسیلوس مشتق می‌شوند که مقدار قابل توجهی پروتئازهای خارج سلولی را با چندین جنبه کاربردی ترشح می‌کنند. سرین پروتئازهای شبه سابتلیزین (E.C.3.4.21) عمدتاً از سویه‌های باسیلوس، برخی از گسترده‌ترین آنزیم‌های مورد بررسی هستند (Siezen و Leunissen، ۱۹۹۷). باسیلوس‌ها خواص فیزیولوژیکی کاملاً متنوعی مثل توانایی تجزیه سوبستراهای مختلف مشتق شده از منابع گیاهی و جانوری ازجمله سلولز، نشاسته، پروتئین‌ها، آگار، هیدروکربن‌ها و نیز سوخت‌های زیستی را نشان می‌دهند (Lutz و همکاران، ۲۰۰۶). پروتئازهای خارج سلولی هم‌چنین به‌منظورکمک به تجزیه پروتئین در فرایندهای صنعتی مختلف به‌طور تجاری مورد استفاده قرارگرفته‌اند (Kumar و Takagi، ۱۹۹۹). باسیلوس دو نوع عمده پروتئاز که عبارتند از یک سابتلیزین یا پروتئاز قلیایی و یک متالوپروتئاز یا پروتئاز خنثی را ترشح می‌کند. پروتئازها به‌عنوان یک جزء کلیدی در فرمولاسیون شوینده‌ها به‌منظور بهبود عملکرد شستشو برای استفاده در شستشوی خانگی برای تمیزکردن لنزهای تماسی یا دندان‌های مصنوعی استفاده می‌شوند. کاربرد آنزیم‌ها در شوینده‌ها مزایایی برای از بین بردن لکه‌ها در یک روش دوست‌دار محیط زیست با دوره کوتاه‌تر خیساندن و هم‌زدن دارد (Hamza، ۲۰۱۷). پروتئازها در سنتز آلی توجه زیادی را در سال‌های اخیر جذب کرده‌اند. تحت شرایط آبی طبیعی، پروتئازها واکنش هیدرولیز را کاتالیز کرده، اما عملکردهای برگشت‌پذیری برای پروتئازها مثل سنتز پپتیدها و استرها در محیط های با آب محدود یافت شده‌است. مزایای بسیاری در ارتباط با کاربرد آنزیم‌ها برای سنتز آلی ازجمله گزینش فضایی، اختصاصیت، شرایط واکنش غیرآبی و غیره وجود دارد (Maurer، ۲۰۰۴). اخیرا باکتری‌های مقاوم به حلال به‌عنوان گروه نسبتاً جدیدی از میکروارگانیسم‌های حدی با توانایی منحصربه‌فرد برای بقا در حضور حلال‌های آلی توجه بسیاری از محققان را جلب کرده‌اند. برخی از این میکروب‌ها به‌عنوان منابع آنزیم‌های مقاوم به حلال شناخته شده‌اند، اما تنها تعداد کمی گزارش در مقالات مربوط به غربالگری تولیدکنندگان پروتئاز مقاوم به حلال آلی در دسترس است. ضمناً، باکتری‌های مقاوم به حلال معمولاً پروتئاز را به‌میزان کم ترشح می‌کنند. با این‌حال، اگر پروتئازهای مقاوم به حلال بتوانند به‌میزان زیاد تولید شوند، برای کاربردهای صنعتی مناسب‌تر خواهند بود. در این پژوهش سعی شد تا با بررسی سویه‌های باکتریایی موجود در چشمه‌های آب‌گرم واقع در استان ایلام، شهرستان دهلران، میزان تولید پروتئاز در حضور حلال‌های آلی در این سویه‌ها ارزیابی شده و سویه‌ای که دارای بیش‌ترین قدرت در تولید پروتئاز در این شرایط بود، انتخاب شود. به‌دلیل این‌که منطقه ایلام دارای چشمه‌هایی با ویژگی‌های متفاوتی ازنظر درجه حرارت، غلظت یون‌های فلزی و مواد شیمیایی است احتمال یافتن سویه باکتریایی مقاوم به شرایط حدی جدید ممکن است. با انتخاب سویه برتر از نظر مقاومت در برابر حلال‌های آلی، در مرحله بعد پروتئاز مربوط به این سویه به‌طور جزئی تخلیص شده و برخی از خصوصیات آنزیم هم‌چون پایداری در حضور غلظت‌های مختلف حلال‌های آلی، اسیدیته و دمای بهینه برای فعالیت، اثر مهارکننده‌ها تعیین شدکه درصورت داشتن خصوصیات مطلوب و متفاوت با پروتئاز سویه‌های دیگر می‌تواند در برخی زمینه‌های صنعتی کاربرد داشته باشد. در این صورت این آنزیم می‌تواند به‌عنوان کاندیدایی برای مطالعات ساختاری، سینتیکی و هم‌چنین دستکاری‌های ژنتیکی به‌منظور تولید آنزیم‌هایی با کارایی بهتر مطرح شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از چشمه‌ها: در طی این تحقیق از چشمه آب‌گرم در استان ایلام که در فاصله سه کیلومتری از شهرستان دهلران در

www.SID.ir

Archive of SID

دامنه سیاه کوه و نزدیک به غار خفاش قرار دارد، واقع درغرب ایران با مختصات جغرافیایی (E``۲۲,۶``N ۴۷°۱۸ ،(۳۲°۴۲`۳۳,۸``N ۴۷°۱۸``۲۲,۶``E)، نمونه‌برداری به‌عمل آمد. این چشمه دارای مناطقی به عمق بیش از ۸۰ سانتی‌متر می‌باشد و دو سرچشمه بزرگ دارد که حدود دویست متر از هم فاصله دارند. دمای این چشمه در هر دو سرچشمه بین ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل۱). نمونه‌برداری از آب مناطق عمقی به‌همراه لجن‌های کف و اطراف چشمه و در مناطق مختلف چشمه صورت گرفت. نمونه‌های هر چشمه به‌صورت جداگانه در داخل فالکون ریخته شده و درب آن‌ها بسته شد. فالکون‌ها در داخل فلاسک‌های محتوی آب گرم قرار داده شد و با ریختن آب گرم در داخل فلاسک، دمای آن در حدود دمای چشمه‌ها ثابت نگه‌داشته شد. با رسیدن به آزمایشگاه، نمونه‌ها داخل بن‌ماری در دمای چشمه‌ها نگه‌داری شدند.

شکل ۱: موقعیت جغرافیایی منطقه چشمه آب گرم قیر در شهرستان دهلران واقع در استان ایلام

به‌منظور غربالگری و جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به حلال و تولیدکننده پروتئاز مراحل زیر انجام شد:

جداسازی اولیه باکتری‌ها: نمونه‌ها از آب سطح چشمه‌ها و رسوبات کف آن‌ها جمع‌آوری شده و درون لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. برای حفظ دمای طبیعی نمونه‌ها در هنگام حمل آن‌ها از فلاسک حاوی آب چشمه، که دمای آن کنترل می‌شد، استفاده شد. به‌منظور حفظ شرایط استریل در هنگام نمونه‌برداری باید از لوله‌های فالکون استریل شده استفاده نمود و دقت شود که نمونه‌برداری باید به‌سرعت بعد از بازکردن درب لوله‌های فالکون انجام شده و پس از انجام کار درب آن‌ها بلافاصله محکم بسته شود.

انتخاب سویه باکتریایی مقاوم به حلال آلی و تولیدکننده پروتئاز: سویه‌های مقاوم به حلال آلی توسط محیط کشت لوریا- برتانی غنی شده با تولوئن و سیکلوهگزان جداسازی شدند. به این صورت که تولوئن و سیکلوهگزان در غلظت‌های نهایی ۱۰ و ۳۰ درصد (v/v) به‌ترتیب و بعد از اتوکلاو محیط به آن اضافه شدند. مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از این محیط‌ها در فلاسک‌های کشت به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر ریخته شده و درب فلاسک به‌منظور جلوگیری از تبخیر حلال آلی با درپوش chloroprene-rubber مسدود شد (Badoei-Dalfard و Karami، ۲۰۱۳). پس ازآن فلاسک‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت دردمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور بر دقیقه انکوبه شدند. سپس سویه‌ها به‌منظور سازش با حلال‌های آلی به‌همان شرایط کشت انتقال یافتند. نمونه‌های کشت‌تکرارشده،رقیق‌شده و روی پلیت‌های اسکیم میلک آگار (Skim Milk Agar) پخش شدند و سپس کلنی‌های رشدیافته به‌وسیله تکرار کشت‌های خطی خالص شدند. پس از آن کلنی‌های خالص‌شده از نظر کیفی‌مورد بررسی‌قرارگرفته تا میزان‌تولیدپروتئاز توسط آن‌ها مشخص شود. به این صورت که کلنی‌ها روی محیط SMA کشت داده شده و دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. در این مرحله ۱۶ سویه مقاوم به حلال آلی شناسایی شد که ۸ سویه قادر به تولید پروتئاز بودند. در نهایت سویه‌ای که بیش‌ترین قطر هاله شفاف را تشکیل داد برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد. علاوه بر این میزان تولید پروتئاز توسط این سویه نیز بررسی شد.

تولید آنزیم و بهینه‌سازی شرایط محیط کشت: ابتدا یک لوپ از سوش موردنظر که روی محیط نوترینت آگار رشد کرده بود برداشته و به محیط مایع پیش‌کشت منتقل شد. سپس در انکوباتور شیکردار با شیک دورانی دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از تکثیر باکتری در محیط پیش کشت، به‌میزان ۵ تا ۱۰ درصد حجم محیط تولید، در شرایط استریل ازمحیط پیش‌کشت به محیط تولید انتقال داده شد. سپس محیط‌های تولیدبه‌منظور تولید آنزیم پروتئاز در انکوباتور شیکردار با شیک دورانی دردمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند.

تعیین زمان بهینه گرماگذاری: به‌منظورتعیین‌زمان‌بهینه‌برای تولید آنزیم پروتئاز، در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از محیط تولید برداشت صورت گرفته و سنجش فعالیت پروتئازی به‌روش لوری انجام شد (Lowry و همکاران، ۱۹۵۱). علاوه بر این به‌منظور بررسی میزان رشد باکتریایی در این زمان‌ها، OD_{600} آن اندازه‌گیری شد.

تعیین اسیدیته بهینه: به‌منظوربررسی‌اثراسیدیته‌روی رشد باکتریایی و تولید پروتئاز توسط ایزوله مورد نظر، محیط تولید در اسیدیته‌های بین ۴ تا ۹ تهیه شد و در زمان بهینه به‌دست آمده برداشت صورت گرفت و مورد سنجش فعالیت آنزیمی قرارگرفت. علاوه بر این به‌منظور

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی میزان رشد باکتریایی در این زمان‌ها، OD_{600} آن اندازه‌گیری شد. این کار سه مرتبه انجام شد و میانگین آن‌ها به‌عنوان میزان تولید آنزیم در هر اسیدیته ثبت گردید.

تعیین دمای بهینه: به‌منظور تعیین دمای بهینه برای تولید آنزیم پروتئاز، سویه‌ها درون محیط تولید در دماهای مختلف (۳۷، ۴۰، ۴۵، ۵۰ درجه سانتی‌گراد) و در اسیدیته و زمان بهینه قرارگرفتند. سپس فعالیت پروتئازی اندازه‌گیری شد. علاوه بر این به‌منظور بررسی میزان رشد باکتریایی در این زمان‌ها، OD_{600} آن اندازه‌گیری شد. این کار سه مرتبه انجام شد و میانگین آن‌ها به‌عنوان میزان تولید آنزیم در هر دما ثبت گردید.

انتخاب بهترین منبع کربن: غلظت ۱٪ (w/v) هرکدام از منابع کربن (سوکروز، گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز، مالتوز و نشاسته) تهیه شد و به‌طور جداگانه اتوکلاو گردید. بعد از اتوکلاو این منابع به محیط تولید فاقد سوکروز اضافه شدند. بعد از تکثیر باکتری در محیط پیش‌کشت، به‌میزان ۵ تا ۱۰ درصد حجم محیط تولید، در شرایط استریل از محیط پیش‌کشت به محیط تولید انتقال داده شد. محیط‌های با منابع کربن مختلف‌حاوی باکتری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور بر دقیقه انکوبه شده و سپس فعالیت پروتئازی و رشد باکتریایی اندازه‌گیری گردید. همه آزمایش‌ها سه مرتبه انجام شدند.

انتخاب بهترین منبع نیتروژن: به‌منظور تعیین بهترین منبع نیتروژن، عصاره مخمر در محیط تولید با منابع نیتروژن‌دار آلی و معدنی مختلف (پپتون، تریپتون، کازئین محلول قلیایی، اسکیم میلک، آمونیوم سولفات و اوره) با غلظت ۰/۵٪ (w/v) جایگزین شد. این منابع به‌طور جداگانه اتوکلاو شده و به محیط تولید اضافه شدند. بعد از تکثیر باکتری در محیط پیش‌کشت، به‌میزان ۵ تا ۱۰ درصد حجم محیط تولید، در شرایط استریل از محیط پیش‌کشت به محیط تولید انتقال داده شد. محیط‌های با منابع نیتروژن مختلف حاوی باکتری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گرادو ۱۲۰ دور بردقیقه انکوبه شده و سپس فعالیت پروتئازی و رشد باکتریایی اندازه‌گیری گردید. همه آزمایش‌ها سه مرتبه انجام شدند.

مراحل تخلیص آنزیم پروتئاز

آماده‌سازی عصاره آنزیمی خام: رشد باکتری در محیط پیش‌کشت با گرماگذاری در دور ۱۲۰ دور بر دقیقه، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بعد از این زمان، به‌میزان ۵ تا ۱۰ درصد حجم محیط تولید، در شرایط استریل از محیط پیش‌کشت به محیط تولید انتقال داده شده و در ۱۲۰ دور بر دقیقه، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. ۸۰۰ میلی‌لیتر (۲۰۰ میلی لیتر در هر فلاسک ارلن مایر) محیط کشت باکتریایی آماده شده، در ۱۰۰۰۰×g، ۴ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌منظور به‌دست آوردن مایع رویی کشت سانتریفوژ شد. این مایع رویی عصاره آنزیمی خام خارج سلولی است. رسوب حاوی بقایای سلولی حذف شد.

رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم(۸۵٪): عصاره‌آنزیمی‌خام‌درمعرض رسوب‌دهی پروتئین کل با سولفات آمونیوم (۸۵٪) قرارگرفت. آمونیوم سولفات باید به‌آرامی و با به‌هم زدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به عصاره آنزیمی اضافه شود (این کار در مدت ۴-۳ ساعت انجام شد). بعد از اضافه‌کردن سولفات آمونیوم، رسوب حاصل به وسیله سانتریفوژ در ۱۵۰۰۰×g، ۴ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد و در ۱۰ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۲۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۸ حل شد.

دیالیز نمونه: به‌منظور آماده‌سازی اولیه کیسه‌های دیالیز، ابتدا غشاها با دقت و با استفاده از دستکش پلاستیکی (بدون پودر) و قیچی تمیز در اندازه‌های مورد نظر بریده می‌شوند و در حجم زیادی از محلول ۱ میلی‌مولار EDTA و ۲ میلی‌مولار سدیم بی‌کربنات به‌مدت ۳۰ دقیقه جوشانده می‌شوند. پس از خالی‌کردن محلول، به‌آرامی(بدون‌واردکردن آسیب به غشاها) کیسه‌های دیالیز با آب مقطر شسته می‌شوند. در مرحله بعد کیسه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱ میلی‌مولار EDTA جوشانده می‌شوند. این کیسه‌ها در محلول ۲۰٪ اتانول حاوی ۰/۱٪ سدیم آزاید تا ۶ ماه در یخچال قابل نگه‌داری است. پس از آماده‌سازی کیسه‌های دیالیز، مخلوط به‌منظور جداسازی نمک در مقابل بافر Tris- HCl ۲۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۸ و با به‌هم زدن ثابت در ۴ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲۴ ساعت با استفاده از کیسه دیالیز با قطر منافذ ۱۰۰۰۰- ۱۴۰۰۰دیالیز شد. به‌منظور دیالیز بهتر، بافر موردنظر در طول این مدت ۳ مرتبه تعویض شد.

بارگذاری‌نمونه‌روی‌ستون‌کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE سفارز: محلول آنزیمی دیالیزشده روی ستون DEAE- سفارز (۲/۵ سانتی‌متر× ۱۰ سانتی‌متر) بارگذاری شد. این ستون قبل از بارگذاری به‌خوبی شستشو داده شد و با بافر Tris-HCl ۲۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸ به تعادل رسید. بعد از اتصال پروتئین‌ها، ستون با بافر مربوطه شستشو داده شد و فرکشن‌های با حجم ۲ میلی‌لیتر جمع‌آوری گردید. جذب‌فرکشن‌های‌جمع‌آوری شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. عمل‌شستشوی‌ستون‌بابافرمربوطه تا رسیدن جذب فرکشن‌ها به صفر ادامه پیدا کرد. سپس به‌منظور جداسازی پروتئین‌های متصل شده به ستون از شیب نمکی ناپیوسته ۱-۰ مولار NaCl (غلظت‌های نمکی در بافر مربوطه ساخته شدند) استفاده شد. فرکشن‌ها به حجم ۲ میلی‌لیتر جمع‌آوری گردید و علاوه بر قرائت جذب در ۲۸۰ نانومتر، فعالیت پروتئازی آن‌ها نیز در ۶۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.فرکشن‌های فعال از این مرحله جمع‌آوری و تا زمان استفاده برای

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایشات الکتروفورزی و تعیین خصوصیت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

روش سنجش فعالیت پروتئازی: سنجش فعالیت پروتئازی با استفاده از روش Matta و Punj (۱۹۹۸) با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای کازئین ۲٪ (در بافر گلایسین-NaOH، ۵۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۱۰) به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مدت، واکنش با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر TCA ۱۰٪ (w/v) متوقف شد. سپس محتویات ویال‌ها به‌خوبی ورتکس شده تا مخلوط شوند و در g×۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی بعد از سانتریفوژ به ویال حاوی ۵۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۰/۴ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو اضافه شد. مخلوط به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سرد شدن ویال‌ها در دمای اتاق جذب آن‌ها در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک بلانک مناسب به‌همین روش آماده شد با این تفاوت که آنزیم پس از افزودن TCA به مخلوط واکنش اضافه شد. سپس با استفاده از نمودار استاندارد مقدار ال- تیروزین آزاد شده برحسب میکروگرم اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم محاسبه شد. براساس تعریف یک واحد فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی، مقدار آنزیمی است که بتواند از سوبسترای کازئین یک میکروگرم ال- تیروزین در مدت واکنش (۱۰ دقیقه) و در شرایط آزمایش (دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۱۰) آزاد کند و واحد آن در میلی‌لیتر و در زمان ۱۰ دقیقه محاسبه می‌شود.

تعیین غلظت پروتئین: غلظت پروتئین کل نمونه توسط روش بردفورد با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد.

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم خالص شده

اثر اسیدیته بر فعالیت آنزیم: اثر اسیدیته بر فعالیت آنزیم در اسیدیته‌های مختلف، بین ۴ تا ۱۱ به فاصله ۱ واحد از یکدیگر اندازه‌گیری شد. در این آزمایش به‌دلیل این‌که فعالیت آنزیم در طیف وسیعی از اسیدیته بررسی می‌شود از بافر مخلوط استفاده شد. این بافر از ۴ جز با غلظت برابر (۵۰ میلی‌مولار) تشکیل شده است که عبارتند از: سدیم استات، دی‌سدیم‌هیدروژن فسفات، گلیسین و تریس. برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر از این بافر برای هر اسیدیته به‌طور جداگانه و در ظرف‌های مجزا، مقادیر ۰/۶۷ گرم سدیم استات، ۰/۷ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات، ۰/۳۷ گرم گلیسین و ۰/۶ گرم تریس، همراه با ۰/۱ گرم NaCl توزین شده و در حدود ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس اسیدیته با استفاده از HCl یا NaOH یک نرمال در نقطه مورد نظر تنظیم شد. پس از آن حجم محلول‌ها به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در نهایت سوبسترای کازئین ۲٪ (w/v) برای هر نقطه از اسیدیته در بافر مربوط به آن اسیدیته تهیه شد. فعایت باقی‌مانده آنزیم در هر اسیدیته مطابق روش استاندارد سنجش فعالیت اندازه‌گیری شد. حداکثر فعالیت آنزیم، ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و سایر نتایج براساس آن مقایسه شدند.

اثر دما بر فعالیت آنزیم: اثر دماهای مختلف بر فعالیت پروتئازی با استفاده از بافر گلایسین-NaOH ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۱۰ (آنزیم در این بافر بیش‌ترین فعالیت را دارد) بررسی شد. دمای بهینه آنزیم پروتئاز در شرایط سنجش استاندارد با اندازه‌گیری فعالیت در دماهای مختلف(۲۰،۳۰،۳۷،۴۰،۵۰،۶۰) تعیین شد. آنزیم و سوبسترای کازئین قبل از سنجش(به‌مدت ۱۰ دقیقه)و در طول سنجش در دمای مربوطه گرم شدند. حداکثر فعالیت آنزیم ۱۰۰٪ درنظرگرفته شد و سایر نتایج براساس آن مقایسه شدند.

اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت پروتئازی آنزیم: فعالیت آنزیمی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار از برخی مهارکننده‌ها (PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride به‌عنوان مهارکننده سرین پروتئازها، EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid مهارکننده متالوپروتئازها) β- مرکاپتو اتانول (مهارکننده سیستئین پروتئازها) مورد بررسی قرار گرفت. ۱۰۰میکرولیتر محلول آنزیم و ۱۰۰ میکرولیتر از این عوامل در دمای ۵۰°C به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از گرماگذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط حاوی آنزیم برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به آن اضافه شد و واکنش آغاز گردید. سپس فعالیت آنزیم در شرایط سنجش استاندارد اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۶۰ نانومتر ثبت شد و فعالیت باقی‌مانده به‌دست آمد. فعالیت آنزیم در غیاب مهارکننده به‌صورت ۱۰۰٪ درنظر گرفته شد.

اثر حلال‌های آلی بر فعالیت پروتئازی آنزیم: فعالیت آنزیمی در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ درصد (v/v) از برخی حلال‌های آلی (اتانول، استون، تولوئن، دی‌اتیل‌اتر، سیکلوهگزان، کلروفرم، متانول و بوتانول) مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های موردنظر از این حلال‌ها در بافر گلایسین NaOH ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۱۰ ساخته شد. ۱۰۰میکرولیتر محلول آنزیم و ۱۰۰ میکرولیتر از این عوامل در دمای ۵۰°C به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از گرماگذاری ، ۱۰۰میکرولیتر از مخلوط حاوی آنزیم برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به آن اضافه شد و واکنش آغاز گردید. سپس فعالیت آنزیم در شرایط سنجش استاندارد اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۶۰ نانومتر ثبت شده و فعالیت باقی‌مانده به‌دست آمد. فعالیت آنزیم در غیاب مهارکننده به‌صورت ۱۰۰٪ درنظر گرفته شد.

نمودارها با استفاده از برنامه Excel ۲۰۱۰ رسم شد.

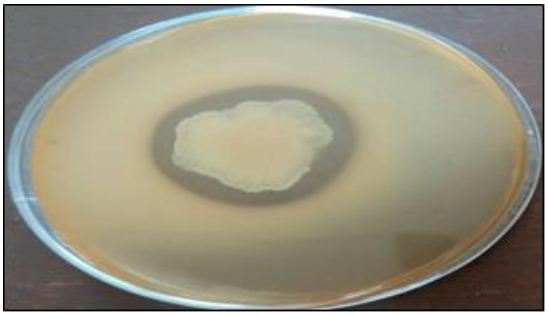
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

کشت نمونه‌ها

غربال‌کردن ایزوله‌های مقاوم به حلال و تولیدکننده پروتئاز: سویه‌های مقاوم به حلال آلی توسط محیط کشت لوریا- برتانی غنی شده با تولوئن و سیکلوهگزان جداسازی شدند. سپس کشت‌ها با تکرار انتقال به‌همان شرایط کشت با حلال‌های آلی سازش یافتند. نمونه‌های کشت تکرارشده، رقیق شده و روی پلیت‌های SMA پخش شدند و سپس کلنی‌های رشد یافته به‌وسیله تکرار کشت‌های خطی خالص شدند. پس از آن کلنی‌های خالص شده از نظر کیفی مورد بررسی قرار گرفته تا میزان تولید پروتئاز توسط آن‌ها مشخص شود در نهایت سویه‌ای که بیش‌ترین قطر هاله شفاف را تشکیل داد برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. در میان آن‌ها هاله روشن اطراف ایزوله شماره ۵ که از عمق چشمه یک جدا شده بود، از قطر بیش‌تری برخوردار بود (شکل ۲). بنابراین باتوجه به این‌که ایزوله شماره ۵، از نظر تولید پروتئاز ازدیگر ایزوله‌ها بهتر بود برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.

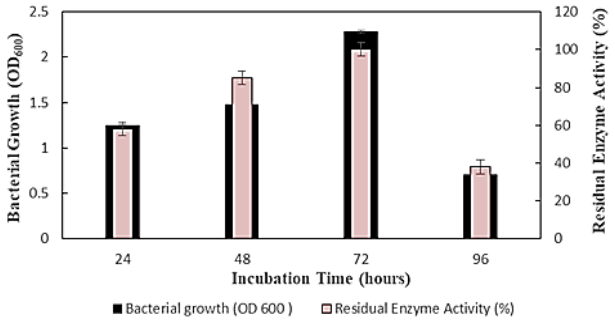


شکل ۲: بررسی کیفی تولید پروتئاز توسط باکتری روی محیط کشت SMA

هاله شفاف هیدرولیز کازئین را به‌علت تولید پروتئاز توسط سویه نشان می‌دهد.

بهینه سازی شرایط رشد باکتری: ایزوله مورد نظراز بین چندین ایزوله باسیلوس جدا شده از چشمه‌های آب گرم ایلام در غرب ایران که دمای بین ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد داشتند، جدا شده است. به‌منظور استفاده‌های بعدی از این ایزوله، در ابتدای کشت آن سعی می‌شد تا حد امکان شرایط دمایی و اسیدیته چشمه‌ای که از آن استخراج شده است، درنظر گرفته شود. بهینه‌سازی شرایط محیط کشت باکتری برای تولید مقادیر بالای آنزیم حائز اهمیت است.

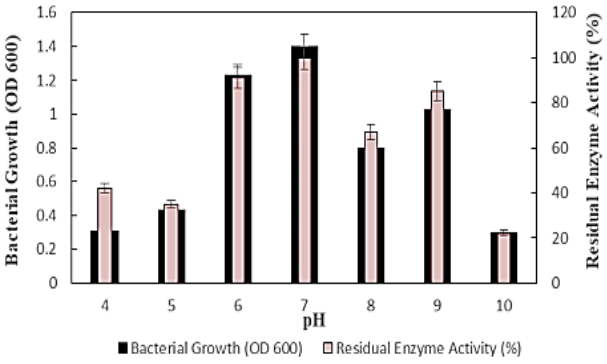
تعیین زمان بهینه گرماگذاری کشت: سوش موردنظر علاوه بر آزمایش کیفی بر روی محیط SMA برای بررسی فعالیت پروتئازی، مورد آزمایش کمی‌نیز قرارگرفت.در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح، در شرایط استریل برداشت صورت گرفت و برداشت‌ها مورد سنجش فعالیت پروتئازی قرارگرفتند. همان‌طورکه در شکل ۳ نشان‌داده‌شده است باکتری در زمان ۷۲ ساعت گرماگذاری بیش‌ترین رشد سلولی و فعالیت پروتئازی را نشان داد.



شکل ۳: نمودار تاثیر زمان گرماگذاری بر تولید آنزیم پروتئاز در محیط کشت باکتری *Bacillus* sp.

با توجه به شکل بیش‌ترین میزان تولید پروتئاز و رشد سلولی در زمان ۷۲ ساعت گرماگذاری به‌دست آمد.

تعیین اسیدیته بهینه کشت: تولید آنزیم در محیط‌های کشت با اسیدیته‌های مختلف نیز مورد بررسی قرار گرفت. از آن‌جاکه در طی کشت‌باکتری‌به‌دلیل متابولیسم باکتری و تغییر ترکیبات محیط کشت امکان تغییر اسیدیته محیط کشت وجود دارد، برای جلوگیری از این تغییر و از بین بردن خطا در تاثیر اسیدیته بر تولید پروتئاز، از بافر مخلوط ۵۰ میلی‌مولار (تریس، استات، فسفات و گلیسین) در محیط کشت استفاده‌گردیدکه‌در اسیدیته‌های مختلف بین ۱۰-۴ تنظیم شد. پس از ۷۲ ساعت (زمان بهینه گرماگذاری) از تلقیح ، فعالیت پروتئازی اندازه‌گیری شد. در باکتری مورد آزمایش حداکثر تولید پروتئاز مربوط به اسیدیته ۷ بود. در اسیدیته های بالاتر و پایین‌تر میزان تولید آنزیم کاهش یافت (شکل۴). این اسیدیته نزدیک به اسیدیته چشمه‌ای است که باکتری از آن جدا شده بود. احتمالاً در این اسیدیته، پروتئاز تولید شده پایداری بالایی دارد و رشد باکتری مناسب‌تر می‌باشد.



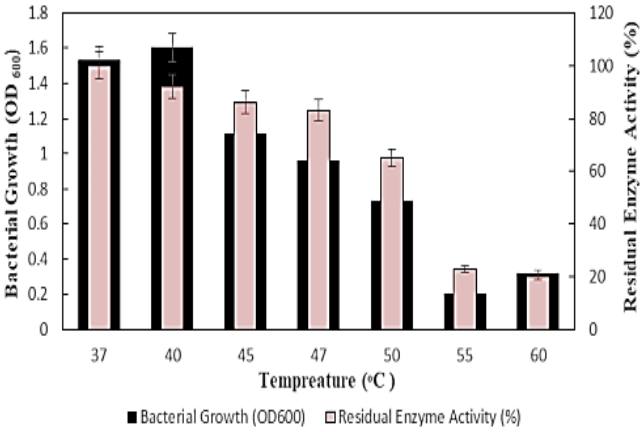
شکل ۴: نمودار تاثیر اسیدیته بر تولید آنزیم پروتئاز در محیط کشت باکتری

همان‌طورکه در شکل نشان داده شده است باکتری بیش‌ترین میزان تولید پروتئاز و نیز رشد سلولی را در اسیدیته ۷ داشت.

www.SID.ir

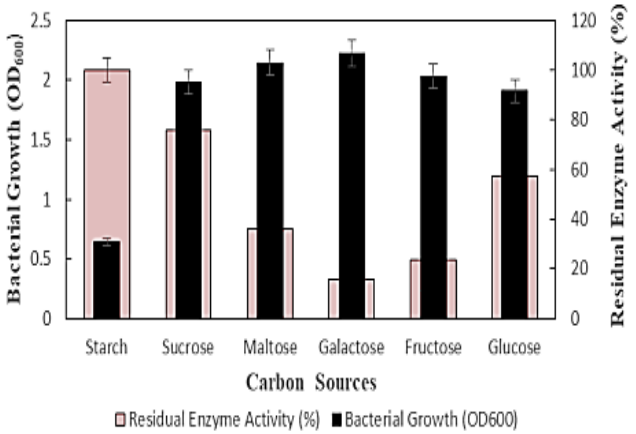
Archive of SID

تعیین دمای بهینه کشت: به‌منظور تولید مقدار زیاد آنزیم باید دمای بهینه برای تولید هم به‌دست آید. برای این‌کار، باکتری‌های رشدکرده در محیط پیش‌کشت، به محیط تولید افزوده شده و در دماهای بین ۳۷ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. اسیدیته محیط تولید ۷ انتخاب شد و پس از ۷۲ ساعت از زمان تلقیح برداشت صورت گرفت و فعالیت پروتئازی اندازه‌گیری شد.نتایج نشان داد که بیش‌ترین تولید آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است و تولید آنزیم در دمای بین ۳۷ تا ۴۷ درجه سانتی‌گراد (شکل ۵) مناسب است. در دمای ۵۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد باکتری رشد اندکی دارد و با تعداد اندک باکتری در محیط کشت، تولید آنزیم بسیار کم است.



شکل ۵: نمودار تاثیر دما بر تولید آنزیم پروتئاز در محیط کشت باکتری *Bacillus* sp.

باکتری بیش‌ترین میزان تولید پروتئاز را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارد. در محدوده دمایی ۳۷ تا ۴۷ درجه سانتی‌گراد تولید پروتئاز توسط ایزوله مناسب است.

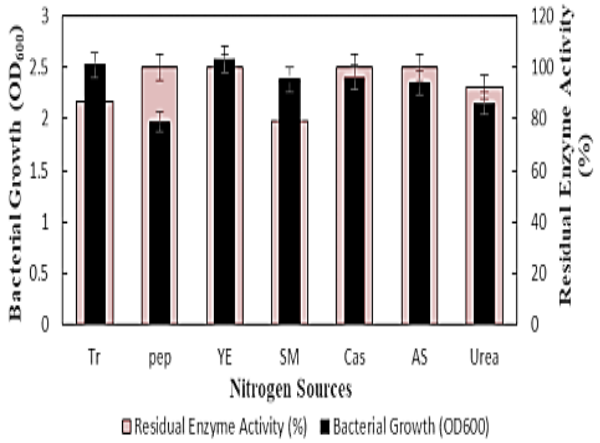


شکل ۶: اثر منابع کربن (۰/۵٪ w/v) بر رشد باکتری و تولید پروتئازهای قلیایی توسط ایزوله

نمونه‌ها بعد از گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت و ۱۲۰ دور بر دقیقه، به‌منظور تعیین میزان رشد باکتریایی و فعالیت پروتئاز قلیایی بررسی شدند.

اثر منابع کربن و نیتروژن برتولید پروتئاز توسط ایزوله: تأثیر منابع کربن ازجمله مونو، دی و پلی ساکاریدها بر رشد سلول و تولید پروتئاز قلیایی بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر منابع کربن مختلف بر تولید پروتئاز خارج سلولی توسط ایزوله متفاوت است. همان‌طورکه در شکل۶ نشان داده شده است میزان تولید پروتئاز توسط ایزوله در حضور نشاسته و سوکروز به‌ترتیب بسیار بالاتر از سایر منابع بوده و در حضور گالاکتوز از دیگر منابع بسیارکم‌تر است.

تأثیر منابع نیتروژن مختلف بر رشد سلول و تولید پروتئاز قلیایی با استفاده از محیط تولید حاوی سوکروز به‌عنوان منبع کربن بررسی شد. نتایج نشان داد که ایزوله در تمام منابع نیتروژن آلی و معدنی تولید پروتئاز خوبی داشته است به‌طوری‌که در عصاره مخمر، پپتون، کازئین محلول قلیایی و سولفات آمونیوم به‌مقدار مساوی موجب تولید بیش‌ترین میزان پروتئاز شده است (شکل ۷).



شکل ۷: اثر منابع نیتروژن مختلف بر رشد باکتری و فعالیت پروتئازی

Tr :Tryptone ،pep :Peptone.:YE Yeast Extract ،SM :Skim Milk ،Cas: Casein ،AS : Ammonium Sulfate

تشخیص جنس باکتری: به‌منظور تشخیص جنس ایزوله شماره ۵ ابتدا آزمایش گرم انجام گرفت و مشخص شد که این ایزوله گرم مثبت است(شکل۸). در مرحله بعدی آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی روی این ایزوله انجام گرفت. نتایج نشان دادکه این ایزوله کاتالاز مثبت بوده و توانایی هیدرولیز نشاسته و کازئین را دارد اما آزمون هیدرولیز ژلاتین آن منفی بود. ایزوله در دماهای ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد توانایی رشد دارد. نتایج این آزمایش‌ها با استفاده از منابع موجود از جمله راهنمای برگی که در آن نتیجه این تست‌ها برای جنس‌های باکتریایی مختلف آورده شده است نشان می‌دهد که ایزوله ۵ به جنس باسیلوس اختصاص دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۸: تصویر میکروسکوپ نوری گونه باکتریایی از جنس *Bacillus* sp. پس از رنگ‌آمیزی گرم

رنگ بنفش سویه نشان‌دهنده گرم مثبت بودن آن است.

تخلیص و سنجش فعالیت پروتئازی آنزیم: در این پژوهش از روش‌های رسوب‌دهی با سولفات‌آمونیوم، دیالیز و کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE-سفارز برای تخلیص آنزیم استفاده شد. عصاره آنزیمی خام‌خارج سلولی در معرض رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم (۸۵٪) قرار گرفت. همان‌طورکه در جدول ۱ نشان داده شده است بازده و مرتبه تخلیص بعد از این مرحله به‌ترتیب ۷۴٪ و ۲/۱۷ بود. در شکل ۹ کروماتوگرام نتایج حاصل از ستون کروماتوگرافی نشان داده شده است که‌دارای یک قله قبل از اعمال شیب نمکی و دو قله با فعالیت پروتئازی بالابعد از نمک است. محلول آنزیمی حاصل از این مرحله دارای فعالیت ویژه ۳۵۰/۹۱، مرتبه تخلیص ۸/۳۶ و بازده ۳۸٪ بود (جدول ۱).

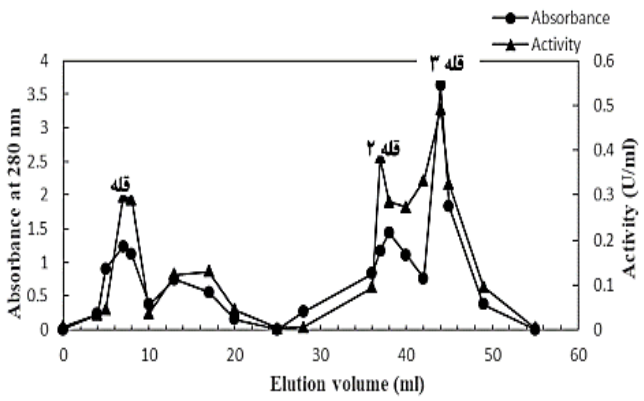
ژل الکتروفورز برای تمام فرکشن‌ها انجام شد. شکل ۱۰ نتایج الکتروفورز مربوط به مایع رویی محیط کشت و دو قله دارای بیش‌ترین فعالیت پروتئازی مربوط به غلظت‌های نمکی ۰/۴ و ۰/۵ از ستون اول کروماتوگرافی را نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌کنید کروماتوگرافی تعویض آنیونی قادر به تخلیص جزیی آنزیم شده است.

مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم پروتئاز

بررسی اثر اسیدیته بر فعالیت و پایداری آنزیم: در بررسی اثر اسیدیته بر فعالیت آنزیم، همان‌طورکه در شکل ۱۱مشخص شده است، آنزیم در اسیدیته ۱۰ بیش‌ترین فعالیت را دارد. هم‌چنین آنزیم در محدوده اسیدیته بین ۷ تا ۱۱ نیز فعالیت بالایی را نشان داد.

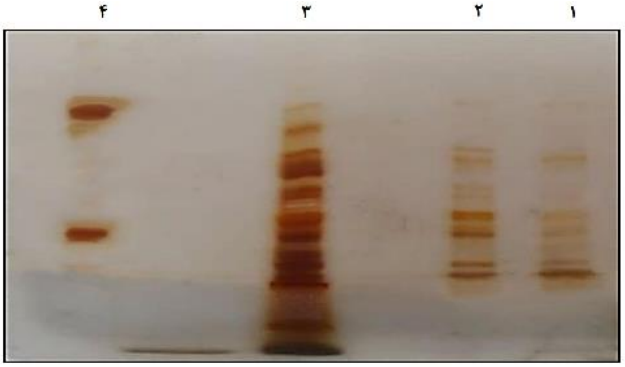
جدول ۱: مراحل تخلیص آنزیم پروتئاز مربوط به باکتری *Bacillus* sp. DEM05

مرحله تخلیص	فعالیت کل (U/mL)	پروتئین کل (mg/mL)	فعالیت ویژه(U/mg)	بازده (٪)	مرتبه تخلیص
مایع رویی محیط کشت	۳۹۹۵	۹۵/۲	۴۱/۹۶	۱۰۰	۱
سولفات آمونیوم (۸۵٪)	۲۹۶۰	۳۲/۵	۹۱/۰۸	۷۴	۲/۱۷
ستون کروماتوگرافی DEAE- سفارز	۱۵۴۴	۴/۴	۳۵۰/۹۱	۳۸	۸/۳۶



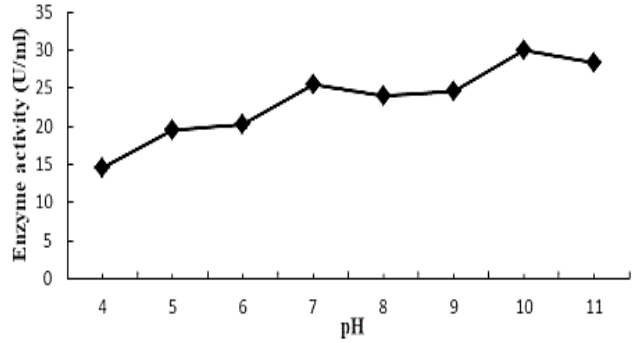
شکل ۹: کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز

جدا شدن پروتئین‌های متصل شده بعد از اعمال غلظت ۰ تا ۱ مولار نمک NaCl را نشان می‌دهد. در این شکل، پروتئین‌های متصل نشده قبل از شروع غلظت نمکی از ستون خارج شده‌اند که به‌صورت قله۱ در نمودار مشاهده می‌شوند. پروتئاز به ستون متصل شده‌است (قله ۳و۲) و با استفاده از غلظت نمک۰/۴ تا ۰/۵ مولار از ستون خارج می‌شود.



شکل ۱۰: ژل الکتروفورز مربوط به فراکشن‌های جمع‌آوری شده پس از کروماتوگرافی تبادل آنیونی و غلظت نمک ۰-۱ مولار

۱: فرکشن دارای فعالیت پروتئازی بالا مربوط به خروجی ستون با غلظت نمکی ۰/۵. ۲: فرکشن دارای فعالیت پروتئازی بالا مربوط به خروجی ستون با غلظت نمکی ۰/۴. ۳: مایع رویی محیط کشت. ۴:مارکروزن مولکولی (کربنیک انیدراز (۲۹ کیلودالتون) و سرم آلبومین (۶۶ کیلو دالتون).



شکل ۱۱: اثر اسیدیته بر فعالیت پروتئاز

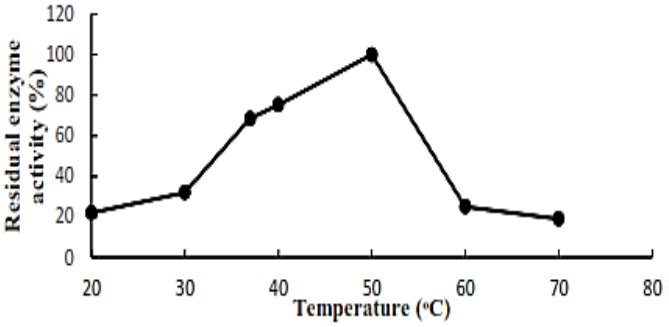
اثر اسیدیته‌های مختلف از ۴ تا ۱۱ بر فعالیت پروتئازی بررسی شد. همان‌طورکه در شکل نشان داده شده است بیش‌ترین فعالیت پروتئازی در اسیدیته ۱۰ مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

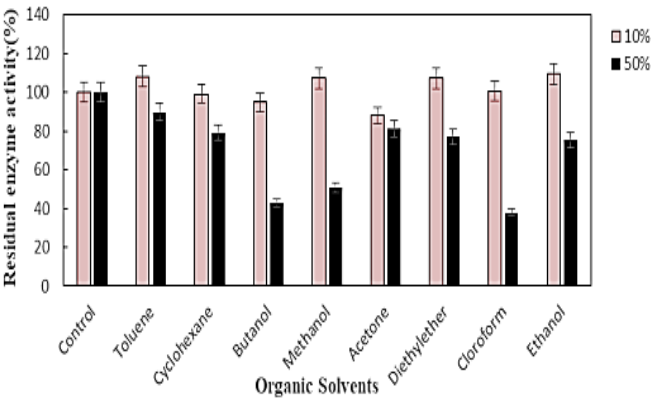
بررسی‌اثردما برفعالیت و پایداری آنزیم: اثردما بر فعالیت پروتئازی با اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف از ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد آزمایش شد. دمای بهینه این آنزیم ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۱۲).

بررسی اثر حلال‌های‌آلی بر فعالیت آنزیم: نتایج حاصل از بررسی غلظت‌های ۱۰٪ و ۵۰٪ (v/v) حلال‌های‌آلی مختلف نشان داد که آنزیم در برابر غلظت ۱۰٪ از این حلال‌ها فعالیت خود را تقریباً حفظ کرده است. فعالیت باقی‌مانده آنزیم در برابر غلظت ۱۰٪ کلروفرم و سیکلوهگزان تحت تأثیر قرار نگرفته، در برابر اتانول، تولوئن، متانول و دی‌اتیل‌اتر افزایش یافته و در حضور استون و بوتانول به‌ترتیب ۸۸٪ و ۹۴٪ بود. فعالیت آنزیمی درحضور غلظت ۵۰٪ از تولوئن، استون، سیکلوهگزان، دی‌اتیل‌اتر، اتانول، متانول، بوتانول و کلروفرم به‌ترتیب ۹۰٪، ۸۱٪، ۷۹٪، ۷۷٪، ۷۵٪، ۵۰٪، ۴۲٪ و ۳۸٪ بود. فعالیت باقی‌مانده آنزیم در حضور حلال‌های‌آلی در شکل ۱۳ نشان داده شده است.



شکل ۱۲: اثر دما بر فعالیت پروتئاز

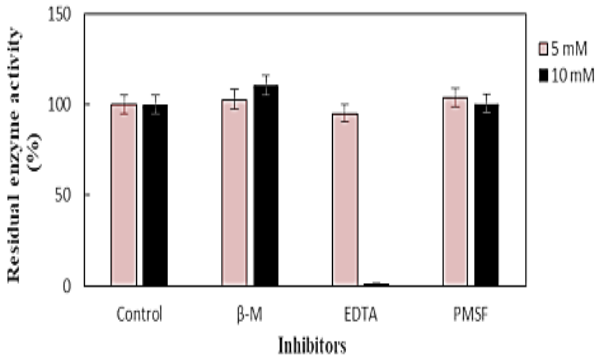
فعالیت آنزیمی در هر یک از دماهای فوق در اسیدیته ۱۰ بررسی شد و مشخص شد که آنزیم بیش‌ترین فعالیت را در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد دارد.



شکل ۱۳: اثر حلال‌های آلی بر فعالیت پروتئاز

آنزیم خالص شده با حلال‌های‌آلی مختلف (۱۰٪ (□) و ۵۰٪ (■) v/v در محلول آنزیم) در دمای ۵۰ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه پیش انکوبه شد و سپس فعالیت باقی‌مانده اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم در غیاب حلال آلی ۱۰۰٪ درنظر گرفته شد.

بررسی اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم: همان‌طورکه در شکل ۱۴ نشان داده شده است نتایج بررسی اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم مشخص کرد که آنزیم تقریباً ۹۹٪ از فعالیت خود را در غلظت ۱۰ میلی‌مولار EDTA از دست داده که نشان می‌دهد آنزیم خالص شده یک متالوپروتئاز است. فعالیت آنزیمی در غلظت ۱۰ میلی‌مولار بتا مرکاپتواتانول به‌مقدار کم نسبت به کنترل افزایش یافته است.



شکل ۱۴: اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت پروتئاز

هر یک از مهارکننده‌های PMSF, EDTA و β-M (در دو غلظت ۵ (□) و ۱۰ (■) میلی‌مولار) قبل از سنجش فعالیت، به‌مدت ۱۰ دقیقه با آنزیم در دمای ۵۰ °C انکوبه شدند و سپس فعالیت اندازه‌گیری شد. آنزیم در حضور غلظت ۱۰ میلی‌مولار EDTA به‌طور کامل مهار شد.

بحث

میکروارگانیسم‌های زنده در چشمه‌های آب‌گرم نه تنها در برابر دمای بالا، بلکه در برابر اسیدیته متفاوت محیط وترکیبات شیمیایی خاص مقاومند. در بین آنزیم‌های موجود، پروتئازهای قلیایی بیش‌تر مورد توجه قرارگرفته‌اند زیرا آن‌ها می‌توانند در برابر دمای بالا، تغییر اسیدیته و فلزات سمی مقاومت‌کنند و بنابراین می‌توانند به‌راحتی در محیط‌های پیچیده و مصنوعی رشد کنند. در حال حاضر تعداد زیادی از پروتئازهای قلیایی تجاری از گونه باسیلوس به‌دلیل توانایی درتولید مقدار زیاد پروتئاز قلیایی، داشتن فعالیت پروتئولتیک قابل توجه و پایداری در اسیدیته و درجه حرارت بالا به‌دست آمده است (Kalisz و Fisher، ۱۹۸۸). با توجه به تقاضای صنعت به پروتئازهای قلیایی بسیار فعال با ویژگی بالا و پایداری اسیدیته، دما و حلال‌های آلی، تحقیقات برای شناسایی آنزیم‌های جدید تداوم می‌یابد. با توجه به اهمیت‌یافتن آنزیم‌های‌جدیدبا درجه‌بالاتری از مقاومت در برابر شرایط حدی ازجمله حضور حلال‌های آلی، در پژوهش حاضر جداسازی باسیلوس مقاوم به حلال آلی قلیادوست تولیدکننده پروتئاز از چشمه آب گرم قیروان در استان ایلام و تخلیص پروتئاز مربوطه با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و تعیین خصوصیات آنزیمی آن انجام شد. ایجاد

www.SID.ir

Archive of SID

هاله‌شفاف اطراف کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت SMA تولید مقدار زیادی پروتئاز خارج سلولی را توسط این باکتری تایید کرد. شرایط بهینه برای رشد باکتریایی به‌منظور تولید بیش‌ترین مقدار پروتئاز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷ و ۷۲ ساعت گرماگذاری بود. ازجمله ویژگی‌های بارز پروتئاز خالص شده از این سویه به‌کار بردن روش‌های تخلیص ساده‌تر برای آن نسبت به پروتئازهای سایر سویه‌ها می‌باشد. به‌طوری‌که برای خالص‌سازی این پروتئاز تنها از دو مرحله: ۱. رسوب دهی با آمونیوم سولفات و ۲. ستون تعویض آنیونی DEAE- سفارز استفاده شد. نتایج، فعالیت پروتئازی فرکشن های جداسازی شده توسط غلظت ۰/۴ و ۰/۵ مولار NaCl پس از ستون DEAE- سفارز را تایید کرد و نیز بررسی الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید در شرایط واسرشتگی (SDS-PAGE) برای این فرکشن‌های دارای بیش‌ترین فعالیت پروتئازی، خالص‌سازی جزئی آنزیم پروتئاز را تایید کرد. Patel و همکاران (۲۰۰۵)، Venugopal و Saramma (۲۰۰۷)، Jellouli و همکاران (۲۰۱۱) به‌ترتیب موفق به جداسازی یک پروتئاز قلیایی از یک گونه باسیلوس قلیادوست، باسیلوس سیرکولانس ، باسیلوس لکنی فورمیس (Jellouli و همکاران، ۲۰۱۱) و پروتئاز خارج سلولی مقاوم به گرما از باسیلوس پلی میکسا (Jellouli و همکاران، ۲۰۱۱) شدند. محققان هم‌چنین پروتئاز بسیار قلیایی مقاوم به‌سورفاکتانت از یک گونه باسیلوس(Deng و همکاران، ۲۰۱۰)، و پروتئاز مقاوم به حلال و دترجنت را از باسیلوس سرئوس با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون نشان دادند (Sierecka، ۱۹۹۸). درگام بعدی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این پروتئاز مورد مطالعه قرارگرفت. نتایج‌نشان داد که پروتئاز خالص‌شده فعالیت‌بالایی در محدوده اسیدیته بین ۱۱-۷ دارد و بیش‌ترین میزان فعالیت آن در اسیدیته ۱۰گزارش شد. با توجه به مقالات پروتئازهای ترشح شده در شرایط قلیایی از باسیلوس سرئوس (El Hadj-Ali و همکاران، ۲۰۰۷) در اسیدیته ۸، از یک گونه باسیلوس گرمادوست(Ghorbel-Frikha و همکاران، ۲۰۰۵) در اسیدیته ۸/۵، از یک گونه باسیلوس گرمادوست و قلیادوست (Hutadilok-Towatana و همکاران، ۱۹۹۹)در اسیدیته ۹، از گونه‌های باسیلوس(Naidu و Devi، ۲۰۰۵)در اسیدیته ۹، از یک گونه باسیلوس (Kaur و همکاران، ۲۰۰۱) در اسیدیته ۹/۶، از باسیلوس مجاونسیس (Beg و Gupta، ۲۰۰۳) در اسیدیته ۱۰/۵، از یک گونه باسیلوس گرمادوست و قلیادوست(Johnvesly و Naik، ۲۰۰۱) در اسیدیته ۱۱، از باسیلوس کلوسی (Kumar و همکاران، ۲۰۰۴) در اسیدیته ۱۱/۵ جداسازی شدند. پروتئازهای تجاری از میکروارگانیسم‌های متنوع بیشینه فعالیت را در اسیدیته ۱۲-۸ نشان می‌دهند.

بنابراین پروتئاز موردمطالعه در طیف پروتئازهای تجاری که پیش ازاین گزارش شده‌اند قرار می‌گیرد که این موضوع از لحاظ بیوتکنولوژی قابل‌توجه می‌باشد. پروتئاز مورد مطالعه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین فعالیت را از خود نشان داد. با توجه به مقالات پروتئازی توسط باسیلوس سیرکولانس در ۴۰°C (Venugopal و Saramma، ۲۰۰۷)، باسیلوس پلی میکسا در ۵۰°C (Matta و Punj ،۱۹۹۸)، گونه‌های باسیلوس در°C ۵۵ (Naidu و Devi، ۲۰۰۵)، یک گونه باسیلوس سرئوس (Ghorbel-Frikha و همکاران، ۲۰۰۵) و لاکتو باسیلوس هلونتیکوس (Valasakiو همکاران، ۲۰۰۸) در ۶۰°C، و باسیلوس گرمادوست سویه HUTBS71 (Akel و همکاران، ۲۰۰۹) در°C ۶۵، یک گونه باسیلوس گرمادوست و قلیادوست (Johnvesly و Naik، ۲۰۰۱) یک گونه باسیلوس گرمادوست (Kaur و همکاران، ۲۰۰۱) در °C ۷۰، و یک گونه باسیلوس گرمادوست و قلیادوست (Beg و Gupta، ۲۰۰۳) در °C ۷۵، به‌مقدار زیاد تولید شد. این ویژگی آنزیم می‌تواند سبب کاربرد گسترده آن در صنایع مختلف شود. پروتئاز خالص شده در برابر غلظت (v/v) ۱۰٪ حلال‌های آلی مختلف فعالیت خود را حفظ کرد و فعالیت پروتئازی دراتانول، متانول، تولوئن و دی اتیل اتر حتی بیش‌تر از مقدارکنترل بود. Shah و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که فعالیت پروتئازی به‌وسیله حلال‌های غیرقابل امتزاج درآب به‌جز بوتانول درمقایسه با حلال‌های قابل امتزاج درآب افزایش یافت.فعالیت پروتئازی درحضور دکان، هگزادکان، هگزان، سیکلواکتان، تولوئن و بنزن بالاتر بود. از طرف دیگر فعالیت پروتئازی در حضور حلال‌های قابل امتزاج درآب مانند اتانول (۷۰٪ فعالیت) و DMSO (۸۰٪ فعالیت) کاهش یافت. مهارکننده اختصاصی سرین پروتئازها (PMSF) بر فعالیت پروتئاز خالص شده در این تحقیق هیچ تاثیری نداشت، درحالی‌که آنزیم توسط غلظت ۱۰ میلی‌مولار EDTA تقریباً به‌طورکامل مهار شد که نشان می‌دهد این آنزیم یک متالو پروتئاز است. Matta و Punj (۱۹۹۸) نشان دادند که یک آنزیم پروتئاز جداسازی شده قویاً توسط عامل کلاته‌کننده فلز EDTA مهار شد. در تحقیق دیگری مشخص شد که کلاته‌کننده‌های فلز EDTA و ۱،۱۰-phenanthroline مهارقوی فعالیت آنزیمی‌را نشان‌دادند. این آنزیم‌های پروتئاز تا ۹۰٪ درحضور غلظت ۱۰ میلی‌مولار EDTA و ۱۰ میلی‌مولار ۱،۱۰-phenanthroline مهار شدند. بنابراین آن‌ها را می‌توان به‌عنوان متالوپروتئاز طبقه‌بندی کرد (Hawumba و همکاران، ۲۰۰۲). با توجه به پتانسیل بالای این آنزیم در تحمل شرایط حدی مانند دمای بالا، اسیدیته‌قلیایی و غلظت بالای حلال‌های آلی امکان کاربردهای صنعتی برای این آنزیم‌در پزشکی، بیوتکنولوژی و صنایع‌شوینده‌در آینده وجود خواهد داشت.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه رازی کرمانشاه به‌دلیل حمایت مالی در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

۱. **Akel, H.; Al-Quadan, F. and Yousef, T.K., 2009.** Characterization of a purified thermostable protease from hyperthermophilic Bacillus strain HUTBS71. Eur J Sci Res. Vol. 31, No. 2, pp: 280-288.

۲. **Badoei-Dalfard, A. and Karami, Z., 2013.** Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from Bacillus sp. JER02: activity optimization by response surface methodology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 89, pp: 15-23.

۳. **Beg, Q.K. and Gupta, R., 2003.** Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from Bacillus mojavensis. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 32, No. 2, pp: 294-304.

۴. **Deng, A.; Wu, J.; Zhang, Y.; Zhang, G. and Wen, T., 2010.** Purification and characterization of a surfactant stable high-alkaline protease from Bacillus sp. B001. Bioresource technology. Vol. 101, No. 18, pp: 7100-7106.

۵. **El Hadj-Ali, N.; Agrebi, R.; Ghorbel-Frikha, B.; Sellami Kamoun, A.; Kanoun, S. and Nasri, M., 2007.** Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated Bacillus licheniformis NH1. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 40, No. 4, pp: 515-523.

۶. **Ghorbel-Frikha, B.; Sellami-Kamoun, A.; Fakhfakh, N.; Haddar, A.; Manni, L. and Nasri, M., 2005.** Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Vol. 32, No. 5, pp: 186-194.

۷. **Gupta, R.; Beg, Q. and Lorenz, P., 2002.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Applied microbiology and biotechnology. Vol. 59, No. 1, pp: 15-32.

۸. **Hawumba, J.F.; Theron, J. and Brözel, V.S., 2002.** Thermophilic protease-producing *Geobacillus* from Buranga hot springs in Western Uganda. Current microbiology. Vol. 45, No. 2, pp: 144-150.

۹. **Hutadilok-Towatana, N.; Painupong, A. and Suntinanalert, P., 1999.** Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719. Journal of bioscience and bioengineering. Vol. 87, No. 5, pp: 581-587.

۱۰. **Jellouli, K.; Ghorbel-Bellaaj, O.; Ayed, H.B.; Manni, L.; Agrebi, R. and Nasri, M., 2011.** Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. Process Biochemistry. Vol. 46, No. 6, pp: 1248-1256.

۱۱. **Johnvesly, B. and Naik, G., 2001.** Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. Process biochemistry. Vol. 37, No. 2, pp: 139-144.

۱۲. **Kalisz, H. and Fisher, A., 1988.** Microbial Proteinases, Advances in Biochemical Engineering Biotechnology.

۱۳. **Kaur, S.; Vohra, R.; Kapoor, M.; Beg, Q.K. and Hoondal, G., 2001.** Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 17, No. 2, pp: 125-129.

۱۴. **Kumar, C.G.; Joo, H.S.; Koo, Y.M.; Paik, S.R. and Chang, C.S., 2004.** Thermostable alkaline protease from a novel marine haloalkalophilic *Bacillus clausii* isolate. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 20, No. 4, pp: 351-357.

۱۵. **Kumar, C.G. and Takagi, H., 1999.** Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. Biotechnology advances. Vol. 17, No. 7, pp: 561-594.

۱۶. **Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry. Vol. 193, pp: 265-275.

۱۷. **Lutz, G.; Chavarría, M.; Arias, M.L. and Mata-Segreda, J.F., 2006.** Microbial degradation of palm (*Elaeis guineensis*) biodiesel. Revista de biología tropical. Vol. 54, No. 1, pp: 59-63.

۱۸. **Matta, H. and Punj, V., 1998.** Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. International journal of food microbiology. Vol. 42, No.3, pp: 139-145.

۱۹. **Maurer, K.H., 2004.** Detergent proteases. Current opinion in Biotechnology. Vol. 15, No.4, pp: 330-334.

۲۰. **Naidu, K.S.B. and Devi, K.L., 2005.** Optimization of thermostable alkaline protease production from species of Bacillus using rice bran. African Journal of Biotechnology. Vol. 4, No.7, pp: 724-726.

۲۱. **Padmapriya, B.; Rajeswari, T.; Nandita, R. and Raj, F., 2012.** Production and purification of alkaline serine protease from marine Bacillus species and its application in detergent industry. European Journal of Applied Sciences. Vol. 4, No.1, pp: 21-26.

۲۲. **Patel, R.; Dodia, M. and Singh, S.P., 2005.** Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. Process Biochemistry. Vol. 40, No. 11, pp: 3569-3575.

۲۳. **Sawant, R. and Nagendran, S., 2014.** Protease: an enzyme with multiple industrial applications. World J Pharm Sci. Vol. 3, pp: 568-579.

www.SID.ir

Archive of SID

۲۴. **Shah, K.; Mody, K.; Keshri, J. and Jha, B., 2010.** Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 67, No. 1-2, pp: 85-91.

۲۵. **Sierecka, J.K., 1998.** Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*. The international journal of biochemistry & cell biology. Vol. 30, No. 5, pp: 579-595.

۲۶. **Siezen, R.J. and Leunissen, J.A., 1997.** Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. Protein science. Vol. 6, No. 3, pp: 501-523.

۲۷. **Valasaki, K.; Staikou, A.; Theodorou, L.G.; Charamopoulou, V.; Zacharaki, P. and Papamichael, E.M., 2008.** Purification and kinetics of two novel thermophilic extracellular proteases from *Lactobacillus helveticus*, from kefir with possible biotechnological interest. Bioresource technology. Vol. 99, No. 13, pp: 5804-5۸۱۳.

۲۸. **Venugopal, M. and Saramma, A., 2007.** An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. Indian journal of microbiology. Vol. 47, No. 4, 298 p.

www.SID.ir