

## جداسازی و شناسایی باکتری کریزئوباکتریوم ایندولوجنس سویه BYK27 مولد پروتاز از

## پساب کارخانه شیر پگاه کرمان

یاسمین بین‌آبادی، عبدالحمید نمکی شوشتری\* و ارسطو بدویی دلفارد

کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۷

## چکیده

پروتازها از جمله مهم‌ترین آنزیمهای صنعتی هستند که حدود ۶۵ درصد از بازار جهانی آنزیمهای صنعتی و حدود ۲۵ درصد از تولید کل آنزیمها را به خود اختصاص داده‌اند. پروتازها در صنایع مختلف از جمله افزودنیهای شوینده‌ها، تیمار فاضلاب، بازیافت نقره و در صنایع غذایی، چرم‌سازی، بازیافت نقره از فیلمهای عکس‌برداری با اشعه ایکس و داروسازی کاربرد دارند. در این تحقیق باکتری مولد آنزیم پروتاز از پساب کارخانه شیر پگاه کرمان جداسازی شد. ایجاد هاله در اطراف کلنیهای رشد کرده در محیط حاوی اسکیم میلک آگار (۵ درصد) نشانگر فعالیت پروتولیتیک می‌باشد. سویه دارای بالاترین فعالیت پروتازی از لحاظ بیوشیمیایی و مولکولی (توالی‌یابی ژن 16S rRNA) شناسایی شد که *Chryseobacterium indologenes* می‌باشد. پروتاز تولیدی توسط این سویه در سه مرحله رسوب‌گذاری با آمونیوم سولفات، دیالیز در بافر تریس ۳۵ میلی مولار و کروماتوگرافی تعویض یونی Q-سفاروز به طور نسبی خالص‌سازی شد. میزان فعالیت پروتازی با استفاده از روش زایموگرافی مورد تایید قرار گرفت. این آنزیم دارای بیشترین فعالیت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، pH ۸ و بیشترین پایداری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، pH ۸-۹ می‌باشد. تریتون X-100 و شوینده تجاری تاز باعث افزایش فعالیت و پایداری فعالیت پروتازی شدند. آنزیم پروتاز تولید شده در غلظت شوری ۱ درصد بیشترین فعالیت پروتازی را نشان می‌دهد. این نتایج خاطرنشان می‌سازد که این آنزیم قابلیت استفاده در بیوتکنولوژی از جمله در صنایع شوینده، فرآوری گوشت و سنتز ترکیبات با ارزش را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پروتاز، پساب، کریزئوباکتریوم ایندولوجنس، فعالیت و پایداری

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۳۲۲۲۰۳۲، پست الکترونیکی: badoei@uk.ac.ir

## مقدمه

پروتازها از جمله آنزیمهای هیدرولیز کننده هستند که پیوند پپتیدی بین دو اسیدآمینو در یک زنجیره پلی پپتیدی را می‌شکنند. این آنزیمها از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی قابل دستیابی هستند ولی به علت رشد سریع میکروبوها، رشد و کشت آنها در فضای کم و امکان دستکاری ژنتیکی آنها برای تولید آنزیمهایی با خواص جدید ارجحیت با منابع میکروبی است (۸). پروتازها بر اساس محل واکنش، جایگاه فعال و شرایط محیطی واکنش تقسیم‌بندی می‌شوند (۱۱، ۱۲ و ۱۳).

آنزیمهای پروتولیتیک مهم‌ترین آنزیمهای صنعتی هستند که حدود ۶۰ درصد از بازار جهانی آنزیم صنعتی را به خود اختصاص داده‌اند (۱۴). پروتازها آنزیمهایی با پیشینه تاریخی در کاربردهای غذایی و دارویی هستند و در صنایع دیگری چون چرم‌سازی، شوینده‌های تجاری، سنتز پپتیدهای زیست‌فعال (۳۶) و بازیافت نقره از فیلم عکس برداری با اشعه X (۲۲) کاربرد دارند. آنزیم پروتازی که

می‌آید (۳۱). لجن فعال، یکی از روش‌های تصفیه پساب خانگی و صنعتی است. در فرآیند لجن فعال WAS (Waste activated sludge) محصول جانبی اصلی می‌باشد. هزینه فرآوری و حذف WAS ۵۰ درصد از کل هزینه فرآیند تصفیه را شامل می‌شود. پروتئین‌ها ترکیب آلی عمده WAS هستند (۱۹). آنزیم پروتئاز می‌تواند محتوای جامد WAS را کاهش داده و از تشکیل بیوفیلم جلوگیری کند و حذف پاتوژنها را با شکستن سلولها تسریع بخشد (۲۸). از پساب صنایع مختلف که غنی از پروتئین باشد می‌توان به عنوان سوبسترای ارزان قیمت برای تحریک و القای تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتریها استفاده کرد، به عنوان مثال از پساب صنایع کشاورزی جهت تولید پروتئاز استفاده می‌شود (۳۷). همچنین حضور باکتریهای مولد آنزیمهای هیدرولیتیک مثل پروتئازها در پساب سبب احیای ترکیبات مفیدی چون آمینواسیدها، افزایش روند تجزیه ذرات آلی و افزایش میزان تولید بیوگاز در روند تجزیه بی‌هوازی می‌گردد (۲۹).

جنس باکتری *Chryseobacterium* متعلق به خانواده *Flavobacteriaceae* می‌باشد و گونه‌های مختلفی از آن تاکنون شناسایی شده‌اند مانند: *C. gleum*، *C. indologenes*، *C. bovis*، *C. meningosepticum*، *C. indolotheticum*، *C. taeanense*، *C. scopthalmum* (۲۶). این باکتری گرم منفی، نامتحرک، فاقد اسپور و گرانول درون سلولی، هوازی، شموارگانوتروفیک و دارای رنگدانه زرد متمایل به نارنجی و کلنیهای کروی، درخشان و صاف است. برخی از گونه‌های این باکتری مقاوم به سرما هستند (۱۸). در مورد باکتری *C. gleum* علاوه بر تولید متالوپروتئاز گزارش شده است که این باکتری توانایی تولید سولفوباکتین A را نیز دارا می‌باشد (۳۰). *C. taeanense* TKU001 توانایی تولید پروتئاز مقاوم به حلال آلی و سورفاکتانت را دارد (۴۲). *C. indologenes* TKU014 پروتئازی با فعالیت کراتینولیتیکی و الاستولیتیکی تولید می‌کند که برای استفاده در صنعت کاراست (۴۱). در تحقیق انجام شده باکتری

در شوینده‌ها به کار می‌رود باید نسبت به عوامل سفیدکننده، اکسیدکننده و سورفاکتانت‌هایی که در ترکیب شوینده قرار دارند مقاوم باشد و در گرما تخریب نشود. این آنزیم با قدرت تجزیه لکه‌های پروتئینی سبب بهبود کیفیت شستشو می‌گردد. باسیلوس سوبتیلیوس با تولید آنزیم پروتئاز قلیایی به نام سابیلیزین در این صنعت پیشرو است (۱۹، ۲۰ و ۲۱). ترکیب عمده مو و پوست، پروتئین می‌باشد. روند تهیه چرم شامل مراحل مختلفی چون خیساندن، موزدایی و دباغی است که در گذشته از مواد شیمیایی چون سولفید سدیم استفاده می‌شده که سبب آلودگی می‌گردیده است. هدف از خیساندن، تورم پوست حیوان بوده که با قلیا انجام می‌شده است. پروتئازهای قلیایی جذب آب را تسریع کرده و زمان لازم برای خیساندن را کاهش می‌دهند و با تجزیه پروتئین فولیکول مو، سبب جداسازی مو از پوست می‌شوند. پروتئاز مورد استفاده در این صنعت می‌بایست به شرایط قلیایی سازگار باشد زیرا گاهی از مواد قلیایی برای کمک به روند انحلال پروتئین ریشه مو استفاده می‌شود. باسیلوس سرئوس از جمله میکروارگانیسمهای مورد استفاده در این صنعت است (۴، ۱۲، ۳۴ و ۳۹). آنزیم پروتئاز در صنایع غذایی بسیار پرکاربرد است. کازئین پروتئین اصلی شیر است. برای تهیه فرآورده‌های لبنی چون پنیر، پروتئین باید لخته شود. بنابراین از عوامل کواگوله کننده شیر مثل پروتئازها استفاده می‌شود. این آنزیمها در دسته آسپارتیک پروتئازها هستند (۳۳). در صنایع نان این آنزیم کاربرد دارد زیرا پروتئین عمده گندم، گلوتن است و این پروتئین توسط آنزیم پروتئازی که از *آسپرژیلوس* تولید می‌شود هیدرولیز شده و به صورت پروتئین فرآوری شده در نان مورد استفاده قرار می‌گیرد که جذب آن برای انسان راحت‌تر است (۱۶ و ۱۷). یک مثال از کاربرد آنزیم پروتئاز در داروسازی محلول شستشوی لنزهای تماسی است. در محلولهای شستشوی لنزهای تماسی از آنزیم سابیلیزین استفاده می‌شود که از باکتری *Bacillus sp. 158* به دست

پرایمرها ۵۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه و دمی‌فعالیت آنزیم پلی‌مراز ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۹۰ ثانیه و برای تکثیر نهایی از دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۸ دقیقه استفاده شد. سپس محصول PCR توالی‌یابی گردید و با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژنی از طریق الگوریتم NCBI BLAST مقایسه شد.

**تولید پروتئاز:** برای بهینه‌سازی تولید پروتئاز از محیط کشتی با ترکیب عصاره مخمر ۰/۰۶ درصد، NaCl ۰/۱ درصد و گلوکز ۱ درصد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۹ استفاده شد. ۵۰ میلی‌لیتر از این محیط کشت را در ارلنهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و ۵ میلی‌لیتر از کشت مایع نوترینت براث حاوی باکتری را به آن تلقیح کرده و در انکوباتور ۴۰ درجه با ۱۵۰ دور قرار گرفت. هر ۱۲ ساعت یکبار در طول ۹۶ ساعت از محیط کشت برداشت شد. این محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ (MPW-35IR) شده و سوپ رویی محلول برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. تمام این اندازه‌گیریها سه بار تکرار شده و میانگین آنها در نظر گرفته شد. تأثیر pH، دما، نمک، منبع نیتروژن و کربن بر روی میزان تولید پروتئاز در آزمایشات جداگانه‌ای سنجیده شده‌اند. تنظیم pH با pH متر (720P) قبل از اتوکلاو شدن (اتوکلاو ایران طب زعیم) صورت گرفت. منبع کربن جداگانه استریل شده و پس از اتوکلاو شدن محیط کشت به آن اضافه شد.

**سنجش پروتئاز:** اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز با روش Todd (۴۰) صورت گرفت: ۲۰۰ میکرولیتر از سوپ رویی محیط کشت سانتریفیوژ شده با ۱۰۰ میکرولیتر محلول کازئین ۱ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه بن ماری قرار گرفت. برای متوقف کردن فعالیت آنزیم، ۳۰۰ میکرولیتر TCA (تری کلرواستیک اسید) ۱۰ درصد به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن مخلوط واکنش

*C. indologenes* strain BYK27 که از پساب صنایع شیر و لبنیات جدا شده است به عنوان باکتری تولید کننده پروتئاز شناخته شده که قابلیت استفاده در بیوتکنولوژی را داراست.

## مواد و روشها

**جداسازی میکروارگانیسمهای مولد آنزیم پروتئاز: نمونه-** های پساب کارخانه شیر پگاه کرمان با مختصات جغرافیایی (30°14'39"N 57°5'33"E) که از شش محل متفاوت جمع آوری شده در فلاسکهای حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شد، سپس در رفتهای ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ با آب مقطر استریل رقیق گردید و در ارلنهای حاوی محیط کشت نوترینت براث (لیوفلیچم) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباتور (JAL TAJHIZ-JISL10) با دور ۱۵۰ غنی‌سازی شد. به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از این کشتها روی پلیتهای حاوی محیط کشت اسکیم میلک (کیولب) کشت داده شد. پلیتها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه انکوبه شدند و ارگانیسمی که بزرگترین هاله را در اطراف خود ایجاد کرده بود برای مطالعات بیشتر انتخاب شده و استوکهایی از آن در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

**شناسایی سویه باکتریایی انتخاب شده:** سویه باکتریایی انتخاب شده بر اساس شاخصه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز، آزمون SIM و تخمیر قند، هیدرولیز نشاسته، ژلاتین و کازئین تعیین ویژگی شد. برای شناسایی دقیق‌تر باکتری از طریق مولکولی اقدام شد، بدین صورت که با استفاده از روش PCR، ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای Forward: 5'-AGT TTG ATC CTG GCT 3' - CAG - 5' و پرایمر Reverse: 5' - T<sub>m</sub> = 53/7 °C با 3' - GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-5' T<sub>m</sub> = 53/4 °C با ۸) تکثیر شد. مراحل انجام PCR به صورت زیر می‌باشد: دمای اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه و دمای اتصال

الکتروفورز پروتئینها از هم جدا می‌شوند. پروتئین دارای فعالیت پروتئاز سبب هیدرولیز کازئین موجود در ژل شده و باند روشن ایجاد می‌کند.

**تعیین ویژگیهای بیوشیمیایی آنزیم پروتئاز: تأثیر pH و دما بر روی فعالیت و پایداری آنزیم:** pH بهینه برای آنزیم با اندازه‌گیری فعالیت و پایداری آن در pHهای مختلف از ۳ تا ۱۱ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشخص شد. بافرهای مورد استفاده برای pHهای مختلف شامل گلیسین (۳-۴) و (۱۱-۱۲)، سدیم استات (۴-۵)، سدیم فسفات (۵-۷) و تریس (۱۰-۸) می‌باشند. دمای بهینه برای آنزیم پروتئاز از طریق اندازه‌گیری فعالیت و پایداری آنزیم در pH ۸ و در محدوده دمایی ۹۰-۲۰ تعیین گردید.

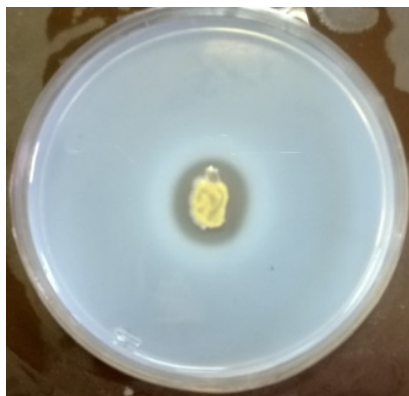
**تأثیر یونهای فلزی روی فعالیت و پایداری آنزیم:** برای بررسی تأثیر یون روی فعالیت و پایداری آنزیم پروتئاز، محلولهای یونی زیر با غلظت ۱۰ mM استفاده شد:  $\text{FeSO}_4\text{-NaCl-KCl-MnSO}_4\text{-ZnSO}_4\text{-CaCl}_2\text{-CuSO}_4\text{-CoCl}_2$ . برای سنجش فعالیت، محلول یونی به مخلوط در حال واکنش آنزیم اضافه گردید و سپس فعالیت آنزیم سنجیده شد. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت باقیمانده یا پایداری آنزیم، ابتدا آنزیم را با محلول یونی در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردیده، سپس سوبسترا اضافه شد و واکنش صورت گرفت. فعالیت باقیمانده آنزیم میزان پایداری آن را نشان می‌دهد (۳۸).

**تأثیر ترکیبات مختلف و شوینده‌های تجاری روی فعالیت و پایداری آنزیم:** با توجه به بازدارنده‌ای که روی آنزیم اثر می‌کند نوع آنزیم را می‌توان تخمین زد. متالوپروتئاز با EDTA، سرین پروتئاز با PMSF، سیستئین پروتئاز با IAA و آسپارتیک پروتئاز با Pepstatin A مهار می‌شوند (۴۲). روش سنجش تأثیر این عوامل مشابه محلولهای یونی است. ترکیبات EDTA، Triton X<sub>100</sub> و SDS در غلظت ۰/۱ درصد، عامل اکسید کننده H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در

در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده تا تمام پروتئینهای تجزیه نشده شده رسوب کنند. جذب سوپ رویی در طول موج ۲۸۰ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر (WPA Biowave II) خوانده شد. در نمونه شاهد، آنزیم در پایان واکنش و پس از افزودن TCA به محیط واکنش اضافه شد. هر واحد فعالیت آنزیم مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزاد کردن ۱ میکروگرم تیروزین در ۱ دقیقه است (۲۴ و ۲۵).

**جداسازی و خالص سازی نسبی پروتئاز:** پیش‌کشت نوترینت براث حاوی باکتری به یک لیتر از محیط کشت بهینه تلقیح شده و ۴۸ ساعت در انکوباتور ۴۰ درجه با دور ۱۵۰ rpm قرار گرفت. سپس در دمای ۴ درجه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شده تا سلولهای باکتری جدا شود. برای جداسازی پروتئینها از سوپ رویی باید تغلیظ صورت بگیرد به این صورت که به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول، ۵۷ گرم سولفات آمونیوم (مرک) جهت رسوب گذاری پروتئینها اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه قرار گرفت تا کاملاً پروتئینها نشست کنند، سپس در دمای ۴ درجه و دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ صورت گرفته، رسوب جدا شده و در بافر حل شد. برای جداسازی نمک آمونیوم سولفات از پروتئینها دیالیز در بافر تریس ۳۵ mM در ۷/۵ pH صورت گرفت. محلول دیالیز شده از ستون کروماتوگرافی Q-سفاروز به (۵×۱ cm) عبور داده شد. فرکشنهای کروماتوگرافی جمع آوری شده و فعالیت آنزیمی آنها بررسی شد. برای جداسازی فرکشن حاوی پروتئین با فعالیت آنزیمی آن را در معرض سوبسترا قرار داده و فعالیت آنزیمی سنجیده شد و فرکشن حاوی بیشترین میزان آنزیم تحت مطالعات بعدی قرار گرفت.

**زایموگرافی:** زایموگرافی یک تکنیک مبتنی بر الکتروفورز برای آنزیمهای هیدرولیز کننده است. میزان خلوص پروتئاز با روش SDS-PAGE اندازه‌گیری شد. ژل الکتروفورز با سوبسترای کازئین (۰/۱ درصد) غنی شده و با انجام



شکل ۱- هاله شفاف پیرامون سویه BYK27 حاصل از فعالیت

پروتولیتیک در محیط اسکیم میلک آگار

جدول ۱- ویژگی‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی

نتایج	تست‌های بیوشیمیایی
-	رنگ آمیزی گرم
+	کانالاز
+	اکسیداز
+	تخمیر گلوکز
-	تولید SH <sub>2</sub>
-	حرکت
-	هیدرولیز ژلاتین
+	هیدرولیز نشاسته
+	هیدرولیز کازین
میله ای	شکل باکتری
زرد متمایل به نارنجی	رنگدانه

**جداسازی پروتئاز:** سوپ رویی محیط کشت سانتریفیوژ شده، حاوی آنزیم خام بوده که با استفاده از نمک آمونیوم سولفات رسوب‌گذاری می‌شود. سپس با دیالیز در بافر تریس ۳۰mM در pH ۷/۵ و پس از آن با عبور از ستون کروماتوگرافی Q-سفاروز جداسازی صورت گرفت. محلول دیالیز شده با سرعت ۲ml/min بر روی ستون ریخته شد. ستون کروماتوگرافی با بافر Tris-HCl ۳۵ میلی مولار با pH ۷/۸ به تعادل رسیده بود. ستون دارای بار مثبت است پس ابتدا پروتئینهای متصل نشده جمع‌آوری شدند. با اعمال شیب غلظت نمکی ۱ مولار (۰-۱۰۰ درصد) پروتئینهای متصل شده که بار منفی داشتند جدا شدند. از فرکشنهای ۲ میلی‌لیتری در طول موج ۲۸۰ nm

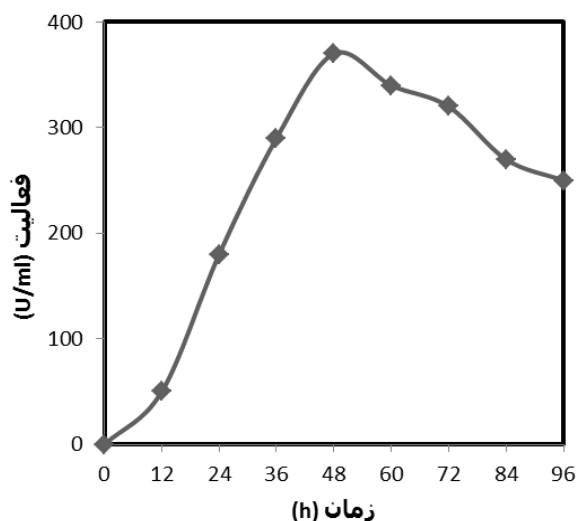
غلظت ۱ درصد و شوینده‌های تجاری دریا، برف، تاژ، کف، بانو و شوما در غلظت ۱ درصد مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی فعالیت آنزیم، محلولها به مخلوط واکنش اضافه شده و سپس فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان فعالیت باقیمانده ابتدا آنزیم با محلول مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گشت، سپس با افزودن سوبسترا مسیر واکنش ادامه یافته و با اندازه‌گیری فعالیت باقیمانده میزان پایداری مشخص شد.

## نتایج

**جداسازی و شناسایی باکتری تولیدکننده پروتئاز:** سویه BYK27 هاله شفاف بزرگی روی محیط اسکیم میلک تولید کرده که نشان‌دهنده تولید آنزیم پروتئاز می‌باشد (شکل ۱). سویه BYK27 به لحاظ مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تعیین ویژگی شد که نتایج آن در جدول ۱ آمده است. برای شناسایی دقیق این سویه ژن 16S rRNA توالی‌یابی شد که ۱۰۰ درصد یکسانی با *Chryseobacterium indologenes* داشته و با دیگر گونه‌ها مانند *C. ginsengisoli* و *C. arthrosphaerae* ۹۸ درصد شباهت دارد. توالی ژن 16S rRNA سویه *C. indologenes* BYK27 در بانک ژنی Gene bank تحت عدد دسترسی KM878674 ثبت شد.

**بررسی تولید پروتئاز در طی زمان:** برای به دست آوردن زمان لازم برای رسیدن به میزان حداکثر تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتری رسم منحنی تولید لازم است. در شکل ۲ منحنی تولید باکتری طی ۹۶ ساعت آورده شده است. بر این اساس باکتری از زمان تلقیح (ساعت صفر) به مدت ۴۸ ساعت روند صعودی در میزان تولید پروتئاز خود داشت. طبق نتایج حاصل از پنجمین برداشت از محیط کشت در ۴۸ امین ساعت از دوره رشد، میزان جذب سوسپانسون باکتریایی در طول موج ۲۸۰ nm به بالاترین میزان خود رسید. فعالیت آنزیم خام در این مرحله (U/ml) ۳۷۰ بود.

گرفته و فعالیت باقیمانده آنزیم سنجیده شد (۹ و ۱۰). پروتئاز BYK27 در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین مقاومت حرارتی را نشان داد (شکل ۵). در دمای ۵۰ درجه  $73 \pm 0.2$  درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد و در دماهای بالاتر از ۷۰ درجه بیش از  $50 \pm 0.3$  درصد از پایداری خود را از دست داد.



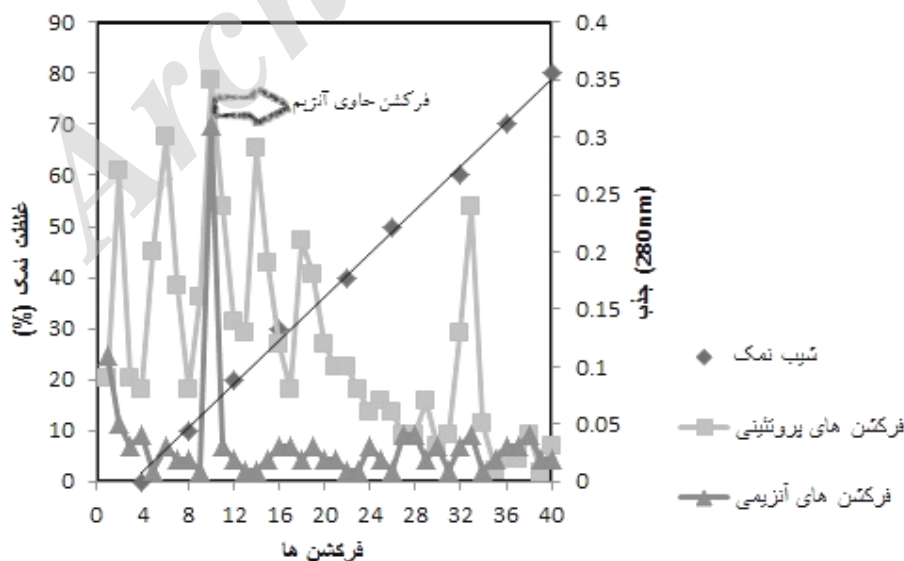
شکل ۲- منحنی زمان بهینه تولید آنزیم توسط باکتری

جذب گرفته شد و فرکشن‌های حاوی پروتئین مشخص شدند. ۴۰ فرکشن جمع‌آوری شد که ۱۲ عدد از آنها حاوی پروتئین بودند (شکل ۳). از فرکشن‌های حاوی پروتئین، فعالیت آنزیمی گرفته شد. فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم با تکنیک زایموگرافی نیز بررسی شد (۳۲).

#### ویژگی‌های آنزیم پروتئاز: تأثیر دما بر فعالیت و پایداری

پروتئاز: آنزیمها به طور عمده ماهیت پروتئینی دارند و درجه حرارت روی عملکرد و ساختار آنها مؤثر است. جهت تعیین درجه حرارت مناسب برای عملکرد آنزیم، محلول واکنش در دماهای مختلف از ۲۰-۹۰ درجه قرار گرفته و میزان فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. دمای بهینه برای فعالیت پروتئاز سویه BYK27، ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۴) و در دماهای ۲۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درجه دارای  $73 \pm 0.2$  درصد،  $84 \pm 0.1$  درصد،  $52 \pm 0.2$  درصد و  $26 \pm 0.3$  درصد فعالیت پروتئازی می‌باشد.

همان‌طور که پیشتر ذکر شد میزان حرارت روی ساختار آنزیمها اثر دارند و ممکن است در اثر حرارت ساختمان پروتئینی آنزیم به هم ریخته و کارایی‌اش را از دست بدهد. برای بررسی میزان پایداری آنزیم در برابر حرارت آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای مختلف از ۲۰-۹۰ درجه قرار



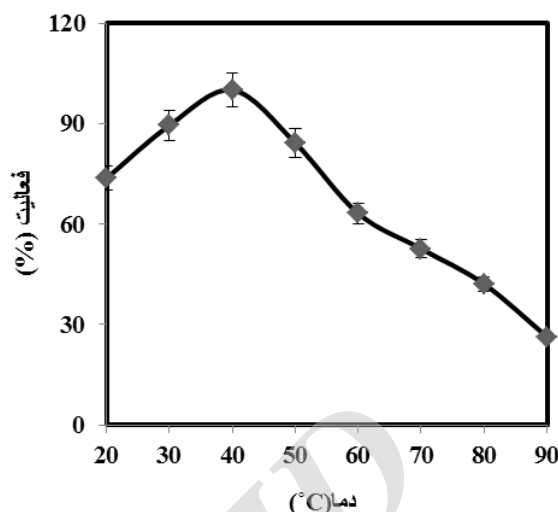
شکل ۳- منحنی کروماتوگرام حاصل از بارگذاری محتویات کیسه دیالیز روی ستون Q-سفاروز

دمای اتاق قرار گرفته، اندازه‌گیری شد. پایداری آنزیم مورد آزمایش در گستره ۸-۹ بوده و در pHهای ۱۰ و ۱۱ به ترتیب فعالیت باقی‌مانده آنزیم به میزان  $18 \pm 0.3$  درصد و  $35 \pm 0.2$  درصد کم شد. در محدوده pH اسیدی ۳ و ۴ نیز پایداری آنزیم پروتئاز به میزان  $56 \pm 0.4$  درصد و  $45 \pm 0.3$  درصد کاهش یافت (شکل ۷).

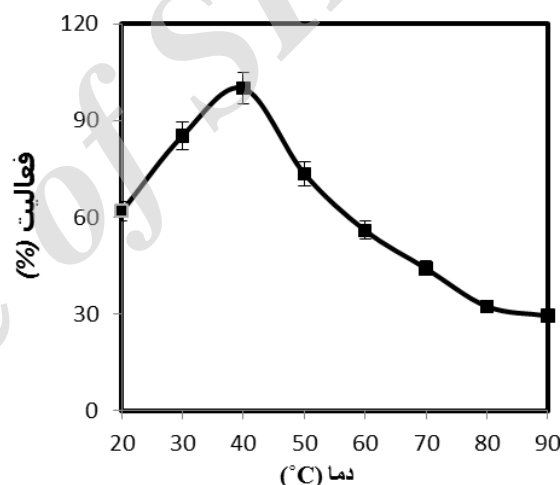
**تأثیر یونهای فلزی بر فعالیت و پایداری پروتئاز: تأثیر یونهای فلزی در غلظت ۱۰ mM روی فعالیت آنزیم پروتئاز BYK27 در pH ۸ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با شاهد بدون محلول یونی بررسی شد. بر اساس نتایج حاصل، یون  $K^+$  دارای بیشترین اثر محرک بر روی فعالیت آنزیم با افزایش  $58 \pm 0.3$  درصد بود. یونهای  $Ca^{2+}$  و  $Co^{2+}$  نیز سبب افزایش  $35 \pm 0.1$  درصد و  $11 \pm 0.2$  درصد فعالیت آن شدند. این در حالی است که یونهای  $Na^+$  و  $Cu^{2+}$  اثر بازدارندگی به میزان  $12 \pm 0.2$  درصد و  $18 \pm 0.4$  درصد داشته و یون  $Zn^{2+}$  به میزان  $30 \pm 0.2$  درصد کاهش فعالیت آنزیم بود (جدول ۲).  $Ca^{2+}$  متالوآنزیمها را در برابر تخریب حرارتی حفظ کرده، ساختمان سوم آنزیم را پایدار کرده و از آن در برابر اتوپروتئولیز محافظت می‌کند. یونهای  $Ca^{2+}$  و  $Zn^{2+}$  القاء‌کننده و بازدارنده هستند (۳۲).**

جدول ۲- تأثیر یونهای فلزی بر روی فعالیت و پایداری آنزیم

یونهای فلزی	فعالیت	پایداری
No Ion	100	100
NaCl	$88.24 \pm 0.2$	$114.29 \pm 0.3$
KCl	$158.82 \pm 0.3$	$147.62 \pm 0.4$
MnSO4	$70.59 \pm 0.3$	$85.71 \pm 0.1$
MgSO4	$76.47 \pm 0.5$	$95.24 \pm 0.3$
ZnSO4	$70.59 \pm 0.2$	$80.95 \pm 0.5$
CaCl2	$135.29 \pm 0.1$	$119.05 \pm 0.4$
CuSO4	$82.35 \pm 0.4$	$90.48 \pm 0.3$
CoCl2	$111.76 \pm 0.2$	$95.24 \pm 0.2$
FeSO4	$94.12 \pm 0.3$	$119.05 \pm 0.2$



شکل ۴- دمای بهینه برای فعالیت آنزیم



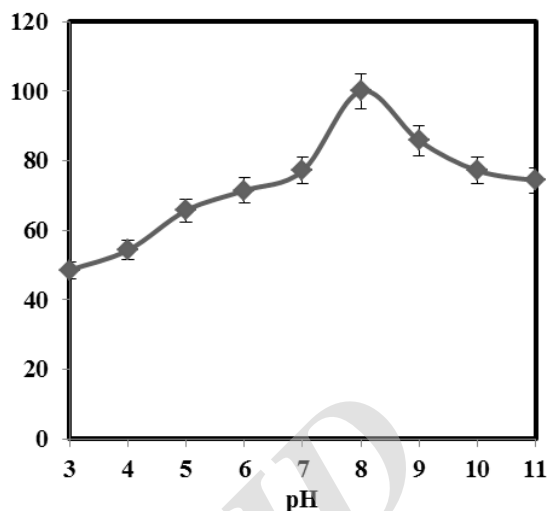
شکل ۵- دمای بهینه برای پایداری آنزیم

**تأثیر pH بر فعالیت و پایداری پروتئاز: برای بررسی تأثیر pH روی فعالیت پروتئازی، این آنزیم به همراه سوپسترا به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در معرض pHهای مختلف در محدوده ۳-۱۱ قرار گرفت و میزان فعالیت آن سنجیده شد. پروتئاز BYK27 در محدوده pH ۷-۹ فعالیت داشته و pH بهینه برای فعالیت آن ۸ بود (شکل ۶). فعالیت آنزیم در محدوده pH اسیدی ۳ و ۴ به میزان  $52 \pm 0.3$  درصد و  $46 \pm 0.2$  درصد و در گستره  $pH > 9$  بیش از  $20 \pm 0.3$  درصد کاهش یافت. برای سنجش میزان پایداری آنزیم در pHهای مختلف، فعالیت باقیمانده آنزیمی را که در معرض pHهای مختلف به مدت ۳۰ دقیقه در**

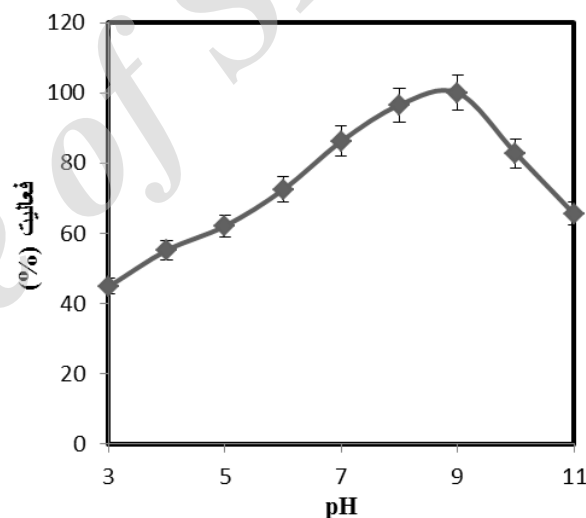
**تأثیر ترکیبات مختلف بر فعالیت و پایداری پروتئاز:**

ترکیبات مختلف مانند بازدارنده‌ها سبب تغییراتی در میزان فعالیت آنزیم پروتئاز می‌شوند که گاهی اثر افزایش‌دهنده و گاهی اثر کاهش‌دهنده دارند. برای بررسی این اثر، آنزیم در طول مدت زمان واکنش با سوبسترا در معرض انواع مختلف ترکیبات قرار گرفته و میزان اثر این مواد در مقایسه با شاهدی که بدون محلول بازدارنده یا ترکیب دیگری است سنجیده شد. از میان انواع ترکیباتی که مورد آزمایش قرار گرفت تریتون X-100 به میزان  $5 \pm 0.2$  درصد سبب افزایش فعالیت آنزیم شد.  $H_2O_2$  به میزان  $6 \pm 0.3$  درصد از فعالیت آنزیم را کاهش داد و دیگر ترکیبات مثل SDS و EDTA باعث کاهش بیش از  $55 \pm 0.4$  درصد از میزان فعالیت آنزیم گردیدند (شکل ۸). میزان پایداری آنزیم پروتئاز در برابر انواع ترکیبات باید سنجیده شود زیرا گاهی این مواد سبب تغییر ساختار آنزیم می‌گردند. بدین منظور ابتدا آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت ترکیبات مختلف در دمای اتاق قرار گرفته و سپس فعالیت باقیمانده در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد این آزمایش فاقد ماده بازدارنده یا ترکیب دیگری بود. در رابطه با آنزیم مورد آزمایش تریتون X-100 به میزان جزیبی  $8 \pm 0.2$  درصد پایداری را افزایش دادند.  $H_2O_2$  به میزان  $9 \pm 0.3$  درصد از پایداری آنزیم کاسته و SDS باعث کاهش  $25 \pm 0.5$  درصد از پایداری آنزیم شد. EDTA تا  $50 \pm 0.3$  درصد سبب کاهش پایداری آنزیم شد (شکل ۸).

**تأثیر شوری بر فعالیت و پایداری پروتئاز:** برای بررسی اثر شوری روی فعالیت آنزیم باکتریایی محلولهای نمکی با غلظتهای مختلف از ۰-۲۵ درصد در مجاورت آنزیم در حال واکنش قرار گرفته و تأثیر آن روی فعالیت آنزیم سنجیده شد. در غلظت ۱ درصد نمک آنزیم ۱۰۰ درصد فعالیت خود را دارا بود. در غلظتهای ۳، ۵ و ۱۰ درصد، کاهش فعالیت آنزیم از  $14 \pm 0.2$  درصد تا  $48 \pm 0.2$  درصد مشخص شد (شکل ۹). میزان پایداری و مقاومت آنزیم در برابر نمک مهم است. برای سنجش میزان پایداری، آنزیم



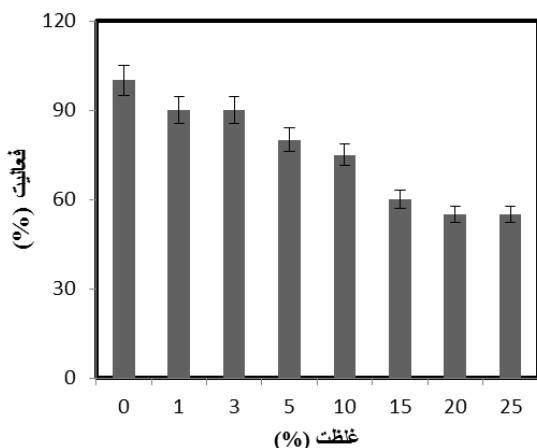
شکل ۶- بهینه pH برای فعالیت آنزیم



شکل ۷- pH بهینه برای پایداری آنزیم

میزان پایداری آنزیم در برابر یونهای مختلف از طریق مجاورت آنزیم با محلولهای یونی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و اندازه‌گیری میزان فعالیت باقی مانده در مقایسه با شاهد فاقد محلول یونی به دست آمد (۹). یون  $K^+$  به میزان  $47 \pm 0.4$  درصد باعث افزایش پایداری شد. یونهای  $Fe^{2+}$  و  $Na^+$  بیش از ۱۰ درصد پایداری آنزیم را افزایش دادند، در حالی که یون  $Zn^{2+}$  با کاهش  $20 \pm 0.5$  درصدی فعالیت، دارای بیشترین اثر بازدارندگی بود (جدول ۲).

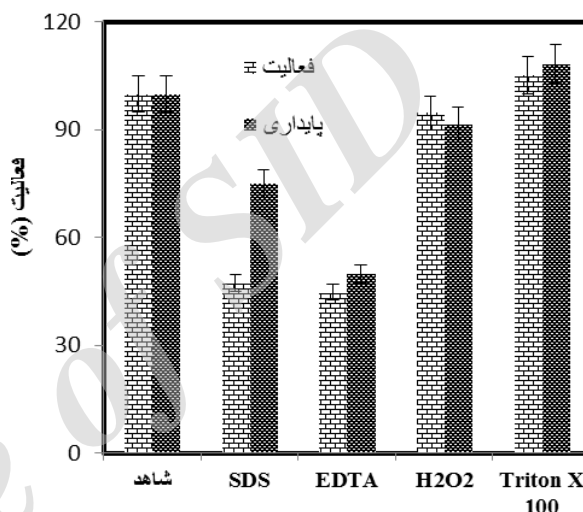




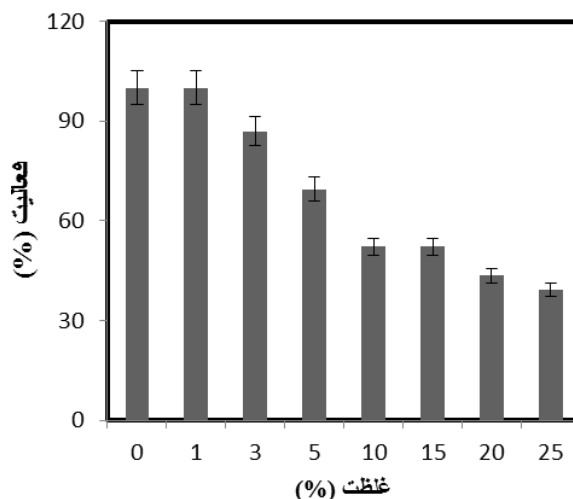
شکل ۱۰- تأثیر غلظتهای مختلف نمک روی پایداری آنزیم

تأثیر شوینده‌های تجاری بر فعالیت و پایداری پروتئاز: به منظور کاربرد آنزیم پروتئاز در انواع شوینده‌ها و پودرهای تجاری باید میزان فعالیت آنها در حضور عوامل شوینده بررسی شود. بدین منظور آنزیم در طول مدت زمان واکنش در مجاورت انواع مختلف پودرهای لباسشویی تجاری با غلظت ۱ درصد قرار گرفت. پودر تاژ سبب افزایش  $15 \pm 0.2$  درصد میزان فعالیت آنزیم گشت و در حضور پودر شوما آنزیم کاهش  $37 \pm 0.3$  درصد فعالیت را از خود نشان داد (شکل ۱۱). پودرهای تجاری به سبب عوامل سفیدکننده، اکسیدکننده ممکن است سبب تغییر در میزان پایداری آنزیم شوند. برای سنجش میزان پایداری آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت انواع پودرهای تجاری با غلظت ۱ درصد در دمای اتاق قرار گرفته و سپس میزان فعالیت باقی مانده در مقایسه با شاهد بدون محلول حاوی شوینده سنجیده شد. از میان انواع مختلف پودرهای مورد آزمایش پودر تاژ سبب افزایش  $4 \pm 0.1$  درصد میزان پایداری آنزیم شد و انواع دیگر پودر مانند برف و دریا سبب کاهش به ترتیب  $2 \pm 0.2$  درصد و  $10 \pm 0.2$  درصد پایداری شدند، در حالی که پودر شوما باعث کاهش  $48 \pm 0.2$  درصد پایداری آنزیم شد (شکل ۱۲).

به مدت ۳۰ دقیقه در معرض محلولهای نمکی با غلظتهای مختلف قرار گرفته و فعالیت باقی مانده آن در مقایسه با شاهد که فاقد محلول نمکی است سنجیده شد. از میان غلظتهای مختلف مورد آزمایش، غلظتهای ۲۰ و ۲۵ درصد نمک موجب کاهش  $45 \pm 0.3$  درصد پایداری آنزیم شدند و در غلظت ۱ درصد نمک، آنزیم  $90 \pm 0.1$  درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد (شکل ۱۰).



شکل ۸- تأثیر ترکیبات مختلف بر روی فعالیت و پایداری آنزیم

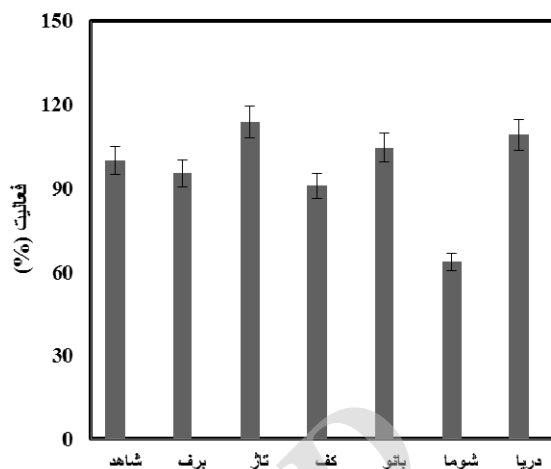


شکل ۹- تأثیر غلظتهای مختلف نمک روی فعالیت آنزیم

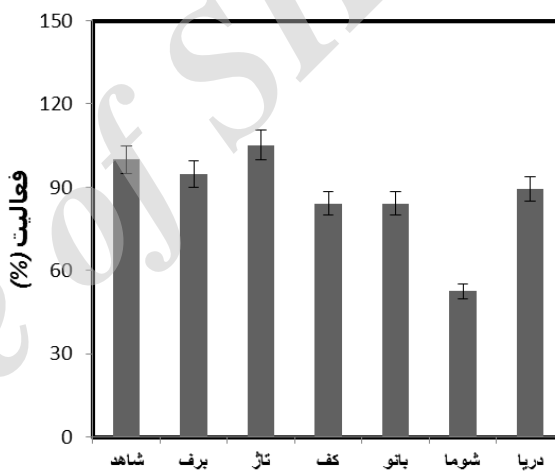
بیشترین فعالیت را داشتند (۶ و ۴۳). آنزیم پروتئاز باکتری *Chryseobacterium* L99 در دمای ۴۰ درجه و *Chryseobacterium* sp. Kf6 در دمای ۵۰ درجه بیشترین فعالیت را دارا بودند (۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱ و ۳۲). در مورد باکتریهای از همین جنس چادھاری و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که آنزیم باکتری *Chryseobacterium gleum* تا دمای ۵۰ درجه پایدار است (۳۰). در مورد پروتئاز باکتری *Chryseobacterium* L99 دمای ۶۰ درجه به عنوان حد پایداری توسط ال وی و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش شد (۲۷).

با توجه به pH بهینه برای فعالیت و پایداری پروتئاز مورد پژوهش می‌توان گفت که این آنزیم یک پروتئاز خنثی دوست است. در مورد فعالیت بهینه پروتئاز باکتری *Bacillus firmus* CAS7، pH توسط آنالامای و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش شد (۷). زامبر و همکاران در سال ۲۰۱۱، pH بهینه برای فعالیت پروتئاز *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 را، ۸ گزارش کردند (۴۳). pH بهینه برای فعالیت پروتئازی باکتریهای *Chryseobacterium taeanense* TKU001 و *Chryseobacterium indologenes* TKU014 به ترتیب ۷-۸ و ۷-۱۰ گزارش شد (۴۱ و ۴۲). برای پروتئاز باکتریایی *Botrytis cinerea* و *Pseudomonas aeruginosa* محدوده پایداری ۷-۹ pH گزارش شده است (۳ و ۴۳). چادھاری و همکاران در سال ۲۰۱۳ محدوده pH پایدار برای پروتئاز باکتری *Chryseobacterium gleum* را ۱۰-۶ ارائه دادند (۳۰).

یونها روی ساختار و متعاقبا فعالیت آنزیمها اثر دارند. یون  $K^+$  فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد. بررسیهای انجام شده توسط چادھاری و همکاران در سال ۲۰۱۳ روی *Chryseobacterium gleum* نشان داد که یونهای  $Fe^{2+}$  و  $Fe^{3+}$  بیشترین اثر افزایشنده و یون  $Cu^{2+}$  دارای بیشترین اثر بازدارنده روی پروتئاز هستند (۳۰). در مورد پروتئاز باکتری *Pseudomonas stutzeri* گزارشات چارترودی و



شکل ۱۱- تأثیر شوینده‌های تجاری مختلف روی فعالیت آنزیم



شکل ۱۲- تأثیر شوینده‌های تجاری مختلف روی پایداری آنزیم

## بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که دمای بهینه فعالیت این آنزیم ۴۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که با نتایج آنالامای و همکاران در مورد پروتئاز تولیدی توسط باکتری *Bacillus firmus* CAS7 مطابقت دارد (۷). آبییدی و همکاران در سال ۲۰۱۱ دمای ۵۰ درجه را به عنوان دمای بهینه برای آنزیم باکتری *Botrytis cinerea* که مقاوم به گرما است، ارائه دادند (۳). آنزیم پروتئاز باکتریهای *Bacillus koreensis* BK-P21A که یک باکتری گرم‌دوست است و *Pseudomonas aeruginosa* MCMB-327 به ترتیب در دماهای ۶۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد

پروتئاز باکتری *Chryseobacterium L99* EDTA در غلظت بالای ۱۰ mM سبب کاهش فعالیت آنزیمی شدند (۲۷).  $H_2O_2$  باعث افزایش پایداری آنزیم شد، در حالی که EDTA مقاومت پروتئاز را کاهش داد. در سال ۲۰۱۳ آنبو و همکاران نشان دادند که  $H_2O_2$ ، SDS و تریتون-۱۰۰ روی پایداری پروتئاز *Bacillus koreensis* BK-P21A اثر منفی دارد (۶). هدار و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که  $H_2O_2$  تا ۲۳ درصد باعث کاهش پایداری آنزیم حاصل از باکتری *Bacillus mojavensis* می‌شود (۱۵). طبق تحقیقات صورت گرفته توسط چادهاری و همکاران در سال ۲۰۱۳، SDS سبب کاهش ۵۰ درصد فعالیت باقیمانده پروتئاز باکتری *Chryseobacterium gleum* شده است (۳۰). در سال ۲۰۰۷ رایفل و همکاران در مورد پروتئاز *Chryseobacterium sp.Kr6* گزارش کردند که EDTA بیش از ۸۰ درصد تأثیر منفی بر روی پایداری آنزیم دارد (۳۲).

آنزیم پروتئاز مورد مطالعه در این پژوهش در غلظتهای نمک بالاتر از ۱ درصد از میزان فعالیت و پایداری کاسته شد. در مورد پروتئاز تولید شده توسط *Bacillus sp.* جاین و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که غلظت بهینه نمک ۱ درصد بوده اما در غلظتهای ۹ درصد و ۲۴ درصد، آنزیم به میزان ۹۳ درصد و ۵۰ درصد فعالیت دارد (۲۰). طبق تحقیقات جوشی و همکاران در سال ۲۰۰۷ پروتئاز تولیدی *B. cereus* MTCC6840 در غلظت ۵ درصد نمک دارای بیشترین فعالیت بوده و در غلظتهای بیش از ۱۰ درصد فعالیت آن تا ۴۰ درصد کاهش می‌یابد (۲۳). آنزیم حاصل از *B. clausii* I-52 در غلظتهای ۱۰-۰ درصد دارای فعالیت بهینه می‌باشد (۲۲). بدویی دلفارد و کرمی در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که پروتئاز باکتری *Bacillus sp.JER02* در غلظت ۸ mM نمک دارای فعالیت بهینه است (۹). آناملای و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مورد آنزیم باکتریایی *Bacillus firmus* CAS7 نشان دادند که این آنزیم تا غلظت ۳۰ درصد نمک دارای مقاومت است (۷). آنزیم باکتری *B.*

همکاران در سال ۲۰۱۴ حاکی از این است که یون  $Mg^{2+}$  تا ۳۹ درصد باعث تحریک و یون  $Cu^{2+}$  تا ۸۹ درصد سبب بازدارندگی می‌شود (۱۱). همچنین فعالیت پروتئاز تولید شده توسط *Chryseobacterium L99* با یونهای  $K^+$  و  $Zn^{2+}$  افزایش یافته و با یون  $Ag^+$  از فعالیت آن به میزان زیادی کاسته می‌شود (۲۷). یون  $K^+$  باعث افزایش پایداری این آنزیم نیز شد. تحقیقات صورت گرفته توسط سیناه و کاره در سال ۲۰۱۳ روی *Bacillus* EMB9 نشان داد که یونهای  $Ca^{2+}$ ،  $Na^+$  و  $K^+$  باعث افزایش پایداری آنزیم می‌شوند (۳۵). بنا به گزارشات ویجایاراگاون و همکاران در سال ۲۰۱۳ یون  $Ca^{2+}$  در *Bacillus cereus* باعث افزایش پایداری می‌شود که به علت نقش آن در ساختار مولکولی آنزیم است (۴۰). وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که یونهای  $Fe^{2+}$  و  $Cu^{2+}$  سبب مهار کامل پروتئاز باکتری *Chryseobacterium taeanense* TKU001 می‌شود (۴۲). طبق تحقیقات رایفل و همکاران در سال ۲۰۰۷ یون  $Ca^{2+}$  به میزان زیادی باعث افزایش پایداری پروتئاز *Chryseobacterium sp.Kr6* شد (۳۲).

EDTA یک عامل کلاته کننده فلزات است و به عنوان مهارکننده متالوآنزیمها مطرح می‌شود. در این پژوهش EDTA نیمی از فعالیت آنزیم را کاهش داده است که احتمالاً شاهدی بر متالوآنزیم بودن پروتئاز مورد مطالعه است. از میان تحقیقات انجام شده توسط آیبیدی و همکاران در سال ۲۰۱۱ این نتایج حاصل آمده که EDTA سبب کاهش ۵ درصد فعالیت آنزیم پروتئاز باکتری *Botrytis cinerea* می‌شود (۳). همچنین زامبر و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش دادند که SDS و EDTA روی پروتئاز باکتری *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب ۴۵ درصد و ۲۵ درصد اثر بازدارندگی دارند (۴۳). طبق مطالعات چادهاری و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص گردید که EDTA بیشترین اثر مهاری را روی فعالیت پروتئازی باکتری *Chryseobacterium gleum* دارد و در حضور  $\beta$ -مرکاپتواتانول فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد (۳۰). در مورد

همکاران در سال ۲۰۱۱ پروتئاز تولیدی *B. cereus* SIU1 در مجاورت پودرهای شوینده Rin، Surf و Ariel در غلظت ۰/۱ درصد بیش از ۹۰ درصد پایداری دارد (۳۶).

### نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه سویه باکتریایی مولد آنزیم پروتئاز شناسایی شد که بر اساس ویژگیهای بیوشیمیایی و مولکولی مشخص شد که به جنس *Chryseobacterium* تعلق دارد. دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم پروتئاز حاصله ۴۰ درجه و pH ۸ بود. محدوده مقاومت حرارتی و pH این آنزیم به ترتیب ۴۰ درجه و pH ۸-۹ به دست آمد. یون فلزی  $K^+$  باعث افزایش میزان فعالیت و پایداری آنزیم پروتئاز گردید. از میان ترکیبات مورد آزمایش تریتون X-100 سبب افزایش میزان مقاومت و پایداری آنزیم شد. غلظتهای بیش از ۱ درصد از محلول نمک NaCl سبب کاهش پایداری و فعالیت پروتئاز شد. در حضور شوینده تاژ فعالیت و مقاومت این آنزیم افزایش یافت. این ویژگیها قابلیت استفاده از این آنزیم را در بیوتکنولوژی نشان می‌دهد. سایر آزمایشات برای بررسی قابلیت‌های بیوتکنولوژی این آنزیم از جمله میزان تجزیه لکه‌های خونی روی پارچه و لباس در حال انجام است.

### تشکر و قدردانی:

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان تشکر و قدردانی می‌کنند.

*cereus* SIU1 در غلظت ۰-۲ درصد دارای ۱۰۰ درصد پایداری است و در غلظت ۱۰ درصد میزان پایداری آن ۹۸ درصد کاهش می‌یابد (۳۶). جاین و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که پروتئاز تولید شده توسط *Bacillus sp.* در غلظت ۱۵ درصد دارای بیشترین پایداری است (۲۰). در یک تحقیق ۲۲ سویه نمک دوست نسبی و ۳۳ سویه تحمل‌کننده نمک مولد پروتئاز از تالاب پرشور اینچه برون توسط زرپرور و همکاران جداسازی و شناسایی شده است (۲). باباولیان و همکاران نیز ۲۰ سویه تولیدکننده پروتئاز نمک دوست از دریاچه نمک آران و بیدگل جداسازی و شناسایی نموده‌اند (۱).

پروتئاز حاصل از سویه BYK27 در حضور برخی پودرهای تجاری فعالیت و پایداری اش افزایش پیدا می‌کند. هدار و همکاران در سال ۲۰۱۰ ثابت کردند که آنزیم پروتئاز باکتری *Bacillus mojavensis* A21 در حضور پودرهای Axion و Ariel، ۱۰۰ درصد فعالیت دارد و در حضور پودرهای Nadhif، Dixan، New Det ۸۵، ۸۹ و ۸۲ درصد از فعالیت آنزیم باقی می‌ماند. این در حالی است که پودرهای Axion و Ariel موجب کاهش جزئی ۳ و ۴ درصد پایداری آنزیم پروتئاز این باکتری شده و پودر Nadhif کاهش ۲۵ درصد پایداری آنزیم را به همراه داشته است (۱۵). آدینارایانا و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش دادند که آنزیم حاصل از باکتری *B. subtilis* PE-11 در حضور شوینده‌های تجاری در غلظت ۰/۷ درصد به میزان ۸۷-۹۶ درصد پایداری دارد (۵). طبق گزارشات سینا و

### منابع

۲- زرپرور، پ.، آموزگار، م.ع.، فلاحیان، م.ع.، ۱۳۹۳. بررسی نوع زیستی باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قابل کشت در تالاب پرشور اینچه برون، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (زیست‌شناسی ایران). جلد ۲۷، شماره ۱، ۴۴-۵۶.

۱- باباولیان، ح.، آموزگار، م.ع.، پوربایبی، ا.ع.، ۱۳۸۸. شناسایی و تعیین خصوصیات باکتریهای نمک دوست تولیدکننده آنزیمهای هیدرولیتیک جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (زیست‌شناسی ایران) جلد ۲۲، شماره ۱، ۲۴-۴۶.

3- Abidi, F., Chobert, J., Haertle, Th., and Marzouki, M., 2011. "Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2

from *Botrytis cinerea*". Process Biochemistry, 46, 2301-2310.

- 4- Abraham, J., Gea, T., and Sanchez, A., 2014. "Substitution of chemical dehairing by proteases from solid-state fermentation of hair waste". *Journal of Cleaner Production*, 74, 191-198.
- 5- Adinarayana, K., Ellaiah, P., and Prasad, D.S., 2003. "Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11". *AAPS PharmSciTech*, 4, 440-448.
- 6- Anbu, P., 2013. "Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A)". *International Journal of Biological Macromolecules*, 56, 162-168.
- 7- Annamalai, N., Veeramuthu Rajeswari, M., Kumar Sahu, S., and Balasubramanian, Th., 2014. "Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from *Bacillus firmus* CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability". *Process Biochemistry*, 49, 1012-1019.
- 8- Asker, M., Mahmoud, M., Shebwy, Kh., and Abd el Aziz, M., 2013. "Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*". *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11, 103-109.
- 9- 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*, 89, 15-23.
- 10- Badoei Dalfard, A., Khajeh, Kh., Soudi, M.R., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., and Hassan Sajedi, R., 2006. "Isolation and biochemical characterization of Laccase and Tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium". *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1409-1416.
- 11- Chaturvedi, V., Bhange, Kh., Bhatt, R., and Verma, P., 2014. "Production of keratinases using chicken feather as substrate by a novel multifunctional stain of *Pseudomonas stutzeri* and its dehairing application". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 167-174.
- 12- George, N., Singh Chauhan, P., Kumar, V., Puri, N., and Gupta, N., 2014. "Approach to ecofriendly leather: characterization and application of an alkaline protease for chemical free dehairing of skins and hides at pilot scale". *Journal of Cleaner Production*, 79, 249-257.
- 13- Ghafoor, A., and Hasnain, Sh., 2010. "Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Bacillus subtilis* EAG-2 Strain Isolated from Ornamental Plant Nursery". *Polish Journal of Microbiology*, 59, 107-112.
- 14- Grzonka, Z., Janlowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowski, R., Lankiewicz, L., Wicz, W., Wiczerzek, E., Ciarkowki, J., Drabik, P., Janowski, R., Kozak, M., Jaskolski, M., and Grubb, A., 2001. "Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors". *Acta Biochimica Polonica*, 48, 2000-2020.
- 15- Haddar, A., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., and Nasri, M., 2010. "Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavensis* A21". *Biochemical Engineering Journal*, 51, 53-63.
- 16- Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., and Gharsallah, N., 2007. "Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1". *Process Biochemistry*, 42, 791-797.
- 17- Hamada, Sh., Suzuki, K., Aoki, N., and Suzuki, Y., 2013. "Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*". *Journal of Cereal Science*, 57, 91-97.
- 18- Hantsis-Zacharov, E., and Halpern, M., 2007. "*Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2344-2348.
- 19- Hee Lee, S., Wook Chung, Ch., Joon Yu, Y., and Ha Rhee, Y., 2009. "Effect of alkaline protease-producing *Exiguobacterium* sp. YS1 inoculation on the solubilization and bacterial community of waste activated sludge". *Bioresource Technology*, 100, 4596-4603.
- 20- Jain, D., Pancha, I., K.Mishra, S., Shrivastav, A., and Mishra, S., 2012. "Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergent". *Bioresource Technology*, 115, 228-236.
- 21- Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ben Ayed, H., 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*, 46, 1248-1256.

- 22- Joo, H.S., and Chang, C.S., 2005. "Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification". *Journal of Applied Microbiology*, 98, 491-497.
- 23- Joshi, G.K., Kumar, S., and Sharma, V., 2007. "Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 isolated from lake Nainital, Uttaranchal state, India". *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 773-779.
- 24- Joshi, S., and Satyanarayana, T., 2013. "Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*". *Bioresource Technology*, 131, 76-85.
- 25- Ke, Q., Chen, A., Minoda, M., and Yoshida, H., 2013. "Safety evaluation of a thermolysin enzyme produced from *Geobacillus stearothermophilus*". *Food and Chemical Toxicology*, 59, 541-548.
- 26- Lin, Y. T., Jeng, Y. Y., Lin, M. L., Yu, K. W., Wang, F. D., and Liu, Ch. Y., 2010. "Clinical and microbiological characteristics of *Chryseobacterium indologenes* bacteria". *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43, 496-505.
- 27- Lv, L-X., S, M-H., Li, Y-D., Min, J., Feng, W-H., Guan, W-J., and Li, Y-Q., 2010. "Production, characterization and application of a keratinase from *Chryseobacterium* 199 sp.nov". *Process Biochemistry*, 45, 1236-1244.
- 28- Maeda, T., Yoshimura, T., Garcia-Contreras, R., and I. Ogawa, H., 2011. "Purification and characterization of a serine protease secreted by *Brevibacillus* sp.KH3 for reducing waste activated sludge biofilm formation". *Bioresource Technology*, 102, 10650-10656.
- 29- Nabarlantz, D., Vondrysova, J., Jenicek, P., Stuber, F., Font, J., Fortuny, A., Fabregat, A., and Bengoa, Ch., 2012. "Hydrolytic enzymes in activated sludge: Extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication". *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 923-931.
- 30- N.Chaudhari, P., N.Chaudhari, B., and B. Chincholkar, S., 2013. "Iron containing keratinolytic metallo-protease produced by *Chryseobacterium gleum*". *Process Biochemistry*, 48, 144-151.
- 31- Pawar, R., Zambare, V., Barve, S., and Paratkar, G., 2009. "Application of Protease Isolated from *Bacillus* sp. 158 in Enzymatic Cleaning of Contact Lenses". *Biotechnology*, 8, 276-280.
- 32- Riffel, A., Brandelli, A., M.Bellato, C., H.M.F.Souza, G., N.Eberlin, M., and C.A.Tavares, F., 2007. "Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp.Kr6". *Journal of Biotechnology*, 128, 693-703.
- 33- Seker, S., Beyenal, H., Ayhan, F., and Tanyolac, A., 1998. "Production of microbial rennin from *Mucor miehei* in a continuously fed fermenter". *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 469-474.
- 34- Shrinivas, D., and Naik, G.R., 2011. "Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity". *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65, 29-35.
- 35- Sinah, R., and Khare, S.K., 2013. "Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Different role of metal ion in stability and activity". *Bioresource Technology*, 145, 357-361.
- 36- Sinagh, S., Sinagh, S., Tripathi, V., and Grag, S., 2012. "Purification, Characterization and secondary structure elucidation of a detergent stable, halotolerant, thermoalkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1". *Process Biochemistry*, 47, 1479-1487.
- 37- Soares de Castro, R. J., and Harumi Sato, H., 2013. "Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and  $\alpha$ -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design". *Industrial Crops and Products*, 49, 813-821.
- 38- Suganthi, A., Mageswari, S., Karthikeyan, M., Anbalagan, M., Sivakumar, A., and Gothandam, K.M., 2013. "Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltren sediments". *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11, pp. 47-52.
- 39- Sundararajan, Sh., Narasimhan Kannan, Ch., and Chittibabu, Sh., 2011. "Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 128-133.
- 40- Vijayaraghavan, P., Lazarus, S., and Prakash Vincent, S.G., 2014. "De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties". *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 27-34.

- 41- Wang, S., Hsu, W., Liang, T., Yen, Y., and Wang, Ch., 2008. "Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium". *Bioresource Technology*, 99, 5679-5686.
- 42- Wang, S., Yang, Ch., Liang, T., and Yen, Y., 2008. "Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001". *Bioresource Technology*, 99, 3700-3707.
- 43- Zambare, V., Nilegaonkar, S., and Kanekar, P., 2011. "A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization". *New Biotechnology*, 28,173-181.

## **Isolation and characterization of protease producing *Chryseobacterium indologenes* strain BYK27 from Kerman's dairy industry sewage**

**Beinabadi Y., Namaki-Soushtari A.H. and Badoei-Dalfard A.**

**Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran**

### **Abstract**

Proteases are one of the most important groups of industrial enzymes, constituting 65% of worldwide industrial enzyme marketing and around 25% of the total global enzyme production. Their use encompasses a great number of applications in different industrial sectors, such as detergent additives, in waste treatment processes, silver recovery and the food, leather, photographic and pharmaceutical industries. Protease producing bacteria were isolated from Kerman's dairy industry sewage with clear zone surrounding colony in Skimmed milk agar plate. Its biochemically tests and 16S rRNA gene sequencing showed that it is *Chryseobacterium indologenes* strain BYK27. The extracellular protease secreted by this strain partially purified by a combination of ammonium sulfate precipitation, dialysis in Tris-HCl buffer 35 mM and ion-exchange chromatography. The temperature and pH optima for activity of produced protease were 40°C, pH 8 and for stability were 40°C, pH 8-9. This enzyme was activated by K<sup>+</sup>, Triton X-100 and commercial detergent Tage. It was also active in 1% concentration of salinity. These results showed that protease BYK27 can be used in detergent industry, meat tenderization and peptide synthesis.

**Key words:** Activity; *Chryseobacterium indologenes*; Protease; Sewage and stability