

جداسازی و بررسی میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در باسیلوس‌های جداسازی شده از چشمه‌های آب گرم محلات

- **سید داوود حسینی***: موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه اراک، ایران
- **مرضیه حصاری**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

چکیده

پروتئازها پرمصرف‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند که کاربردهای زیادی در زیست‌فناوری دارند. به طوری که حدود ۶۰ درصد از بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی را به خود اختصاص داده‌اند. میکروب‌ها به دلیل رشد سریع، سهولت کشت، دستکاری ژنتیکی در جهت تولید بهینه آنزیم، از منابع عمده تولید پروتئازها به‌شمار می‌روند. این مطالعه با هدف جداسازی گونه‌های باسیلوس گرمادوست مولد آنزیم پروتئاز از چشمه‌های آب گرم محلات واقع در استان مرکزی و ارزیابی قابلیت تولید آنزیم پروتئاز در این گونه‌ها انجام شده است. به منظور جداسازی و شناسایی اولیه میکروارگانیزم‌های دارای فعالیت پروتئولیتیک از محیط کشت Skim milk agar همراه با آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده شد. وجود ژن پروتئاز در گونه‌های باکتریایی با روش PCR بررسی گردید و جهت تشخیص گونه‌های باکتریایی ژن SfrRNA ۱۶ به روش PCR تکثیر و تعیین توالی گردید. سنجش فعالیت پروتئاز به روش لوری صورت گرفت و بهترین گونه باسیلوس از نظر فعالیت پروتئاز شناسایی گردید. ۹ گونه باکتریایی توسط تست‌های بیوشیمیایی به‌عنوان گونه‌های برتر مولد آنزیم پروتئاز جداسازی شدند. در بررسی بیان ژن پروتئاز و توالی یابی ژن SfrRNA ۱۶، ۷ گونه باکتریایی بیش‌ترین قرابت را با گونه‌های باسیلوس نشان دادند. در سنجش فعالیت آنزیم به ترتیب سه گونه باکتریایی DA3، DA2 و BN2 در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد و در pH معادل ۸ بیش‌ترین فعالیت را داشتند. با توجه به کاربردهای فراوان آنزیم پروتئاز در صنعت به نظر می‌رسد استفاده از سویه‌های محلی می‌تواند در دستیابی به تولید بالای آنزیم پروتئاز و بی‌نیازی کشور به واردات این محصول مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: آنزیم پروتئاز، پروتئولیتیک، باسیلوس، مقاومت گرمایی، جداسازی



مقدمه

در سال‌های اخیر شاهد افزایش اساسی در استفاده از آنزیم‌ها به‌عنوان کاتالیزورهای صنعتی بوده‌ایم. پروتئازها (پپتیداز یا پروتئیناز) گروه بزرگی از آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند (Yildirim و همکاران، ۲۰۱۷). پروتئازها از جالب‌ترین آنزیم‌های صنعتی تولیدشده توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و کپک‌ها می‌باشند (Haddar و همکاران، ۲۰۱۰). پروتئازها آنزیم‌هایی هستند که باعث تبدیل مولکول‌های پروتئین به پپتیدها و اسیدهای آمینه می‌گردند (Sharma و Tiwari، ۲۰۰۵). پروتئازها در صنایع متعدد از جمله سنتز پپتید، فرآوری پروتئین، غذایی، دارویی و شوینده‌ها کاربردهای فراوانی دارند. این آنزیم‌ها در محیط آبی پیوندهای پپتیدی را هیدرولیز کرده و در عدم حضور آب باعث تشکیل پیوند پپتیدی می‌شوند. با وجود تفاوت‌های بسیار از نظر شکل و عملکرد، اساس تجزیه پیوند پپتیدی توسط همه پروتئازها یکسان است. بیش‌تر پروتئازها در ابتدا به‌صورت یک پیش‌ساز غیرفعال به‌نام زی‌موزن می‌باشند که با تغییراتی در شرایط محیطی مانند اتصال یک مولکول کوچک (پپتید)، فعال می‌شوند (Schilling، ۲۰۰۸؛ Mamett و Craik، ۲۰۰۵). پروتئازهای میکروبی به‌طور طبیعی، خارج سلولی بوده و به‌طور مستقیم توسط تولیدکننده به محیط مایع ترشح می‌شوند. هم‌چنین پروتئازهای میکروبی به‌علت رشد سریع میکروبی‌ها، در مدت‌زمان نسبتاً کوتاهی با روش‌های تخمیری تولید می‌شوند. به همین دلیل است که نسبت به انواع حیوانی و گیاهی ارجحیت داشته و اکثر پروتئازهای موجود منشأ میکروبی دارند. در بین باکتری‌های تولیدکننده پروتئاز، باسیلوس‌ها به‌عنوان تولیدکنندگان اختصاصی پروتئازهای می‌باشند (Osouie و همکاران، ۲۰۰۷). باسیلوس سوبتیلیس یک باکتری خاکزی، گرم مثبت و میله‌ای شکل می‌باشد که به‌طور طبیعی مقادیر فراوانی از پروتئین‌های مختلف را با غلظت‌های بالا به درون محیط کشت ترشح می‌نماید. باسیلوس سوبتیلیس در برابر شرایط سخت محیطی مقاوم می‌باشد. گونه‌های باسیلوس هوازی یا سازگار با شرایط بی‌هوازی‌اند و شامل هر دو زندگی آزاد و ساپروفیت‌اند (Dubal و همکاران، ۲۰۰۸؛ Sekhon، ۲۰۱۰). در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی شناخته شده مانند اشرشیاکلی (*E. coli*)، باکتری باسیلوس سوبتیلیس به‌عنوان یک ارگانیسم GRAS (Generally recognized as safe) در نظر گرفته می‌شود. به‌همین دلیل امروزه این باکتری به‌عنوان یک میزبان مناسب به‌منظور کلون‌سازی و بیان ژن برای تولید پروتئین‌های هترولوگ ترشحي مورد توجه قرار گرفته است (Yaman و همکاران، ۲۰۰۴). هدف از این پژوهش جداسازی و غربالگری گونه‌های باسیلوس تولیدکننده پروتئاز مقاوم به گرما از چشمه‌های آب گرم محلات است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری‌های تولیدکننده پروتئاز مقاوم به گرما: نمونه‌های مورد بررسی از خاک ۵ چشمه آب گرم شهرستان محلات واقع در استان مرکزی جمع‌آوری گردید. از هر نمونه ۱ میلی‌لیتر برداشته و به فالکن حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی انتقال داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی حاوی هر نمونه برداشته و به فالکن حاوی محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) انتقال داده شد. سپس فالکن‌ها در انکوباتور ۴۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۴۰ به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. جهت غربالگری باکتری‌های ترموفیل اسپوردار از حمام آب گرم استفاده شد و محیط کشت حاوی نمونه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار داده شد. جهت تشخیص گونه‌های باسیلوس از خصوصیات مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی مرسوم استفاده شد. برای بررسی توانایی تولید آنزیم پروتئاز توسط گونه‌های باکتریایی جداسازی شده از محیط کشت ژلاتین آگار (مرک، آلمان) و اسکیم میلک آگار (های مدیا) استفاده شد (Baron و Finegold، ۱۹۹۰؛ Sneath و همکاران، ۱۹۸۴).

بررسی وجود ژن پروتئاز: جهت بررسی وجود ژن پروتئاز در گونه‌های باکتریایی مورد نظر از روش مولکولی PCR ژن پروتئاز استفاده شد. ابتدا باکتری بر روی محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کشت باکتریایی به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتی‌فیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. استخراج DNA باکتریایی با استفاده از کیت استخراجی شرکت سینا کلون (Cat.No.881613) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ بررسی گردید. پرایمرهای مربوط به ژن پروتئاز قلیایی به‌صورت زیر طراحی شدند (سیناژن، ایران). پرایمر رفت با توالی و پرایمر برگشت با توالی F: 5'-AGGAGGACAGGCGATGGCGCAGTCCGTG- 3' R: 5'-AAATGGATCCTTACTGAGCTGCCGCCTGTAC- 3' (Takenaka و همکاران، ۲۰۱۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میلی مولار) و ۳ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD C1000) با شرایط دمایی ۵ دقیقه و اسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۴ چرخه شامل و اسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، طولی شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طولی

جداسازی و خالص سازی نسبی پروتئاز: جهت خالص سازی

پروتئاز، به محلول آنزیمی حاصله به آرامی محلول آمونیوم سولفات ۷۵ درصد (مرک، آلمان) اضافه کرده تا زمانی که محلول اشباع شود. محلول را کم کم هم زده تا پروتئین موجود در آن رسوب کند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۰ هزار g سانتریفیوژ کرده سپس رسوب حاصل را در بافر فسفات ۰/۵ میلی مول بر لیتر، با pH معادل ۷ به آرامی حل کرده و جهت تغلیظ محلول و جداسازی نمک حاصل با استفاده از کیسه دیالیز شرکت سیتومتین ژن (Cat.No. (TUB 2012، دیالیز شد (Pant و همکاران، ۲۰۱۵). تخلیص نسبی به وسیله ستون کروماتوگرافی تعویض یونی (Q-Sepharose) انجام شد. برای این منظور ابتدا ستون با ۱۰ میلی لیتر بافر تریس ۴۰ میلی مولار با pH=۷/۵ به تعادل رسید. محتوی کیسه دیالیز که شامل ۱ میلی لیتر آنزیم پروتئاز بود از روی ستون عبور داده شد. پس از شستشوی ستون با ۱۰ میلی لیتر بافر تریس pH=۷/۵، نمونه های متصل شده به ستون با ایجاد شیب نمکی NaCl (صفر تا ۰/۵ مولار) جداسازی شدند و فعالیت آنزیمی آن ها اندازه گیری شد (بدویی دلفار و همکاران، ۱۳۹۴).

سنجش فعالیت پروتئاز: بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز بر اساس

روش رنگ سنجی پروتئین ها به روش لوری (Lowry) انجام شد. از مخلوط حاوی ۰/۵ میلی لیتر ژلاتین ۰/۶۵ درصد به عنوان سوبسترا و ۱ میلی لیتر از محلول رویی به عنوان منبع آنزیم برای سنجش فعالیت پروتئاز استفاده شد. مخلوط حاصل در انکوباتور ۴۷ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه قرار داده شد. بعد ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۱۰ میلی مول بر لیتر (مرک، آلمان)، به مخلوط واکنش اضافه شد تا فعالیت آنزیمی پایان یابد. مخلوط واکنش در ۵ هزار دور برای ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی جمع آوری شد. ۲ میلی لیتر از محلول رویی و ۵ میلی لیتر از محلول قلیایی (Na₂CO₃) ۵۰۰ میلی مول بر لیتر (مرک، آلمان) و ۱ میلی لیتر از معرف فولین فنل (Folin and ciocalteus phenol reagent) ۲۵ درصد (سیگما آلد ریچ، آمریکا) را با هم مخلوط کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی قرار داده شد. فعالیت پروتئاز در طول موج ۶۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer) خوانده شد. این واکنش در ۶ دوره زمانی و هر ۱۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در این قسمت نمونه شاهد شامل ۲ میلی لیتر آب مقطر، ۵ میلی لیتر کربنات سدیم و ۱ میلی لیتر معرف فولین فنل بود.

$$\text{حجم کل سنجش} \times \text{میزان تیروزین آزاد شده برحسب میکرو مول} = \frac{\text{مقدار استفاده شده در رنگ سنجی} \times \text{مدت زمان سنجش} \times \text{مقدار آنزیم استفاده}}{\text{آنزیم}} (u/ml)$$

یک واحد از فعالیت پروتئاز به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزادسازی یک میکرو مول تیروزین در هر میلی لیتر تعریف می شود (Pant و همکاران، ۲۰۱۵، Starcher، ۲۰۰۱).

شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگارز ۱ درصد منتقل و الکتروفورز گردید. محصول PCR به منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی ارسال و دریافت گردید.

شناسایی گونه های باکتریایی به روش مولکولی: برای

شناسایی گونه های باکتریایی مورد نظر از روش مولکولی PCR ژن ۱۶S rRNA استفاده شد. به منظور تکثیر ژن 16S rRNA از پرایمرهای رفت با توالی 5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3' و پرایمر برگشت با توالی 3'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC -5' (شرکت ماکروژن، کره جنوبی) استفاده شد (Navarrete و همکاران، ۲۰۱۳؛ Sizova و همکاران، ۲۰۱۲). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتر شامل ۱۲/۵ میکرو لیتر Master mix 2x (شرکت پیشگام)، ۱/۲۵ میکرو لیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول) و ۴ میکرو لیتر DNA الگو انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD C1000) با شرایط دمایی ۵ دقیقه و اسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل اسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگارز ۱ درصد منتقل و الکتروفورز گردید. محصول PCR به منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی ارسال گردید. نتایج حاصل از توالی یابی توسط نرم افزار MEGA7 با توالی های موجود در بانک ژنی و با استفاده از BLAST مقایسه شدند و نوع باکتری ها در سطح گونه مشخص شد.

کشت باکتری جهت تولید پروتئاز: برای تولید پروتئاز، کلنی

باکتری مورد نظر ابتدا در محیط کشت نوترینت برات (مرک، آلمان) کشت داده شد و در انکوباتور ۴۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. بعد از انکوباسیون، مقدار ۱۵۰ میکرو لیتر از این محیط کشت باکتریایی در محیط کشت تولید (Omidinia و همکاران، ۲۰۱۲) که شامل ۰/۵ گرم گلوکز، ۰/۷۵ گرم پیتون، ۰/۵ گرم MgSO₄، ۰/۵ گرم K₂HPO₄ و ۰/۱ گرم FeSO₄ (مرک، آلمان) می باشد، تلقیح داده شد و در انکوباتور ۴۷ درجه سانتی گراد همراه شیکر (Shaker) با ۱۵۰ دور برای ۷۲ ساعت قرار داده شد. بعد از انکوباسیون، کشت حاصل در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰ هزار g سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ رسوب ایجاد شده دور ریخته شد و محلول رویی حاصل جهت جداسازی و سنجش کمی پروتئاز مورد استفاده قرار گرفت (Mehta و همکاران، ۲۰۰۶).



نتایج

از مجموع ۵ نمونه خاک جمع‌آوری شده از چشمه‌ها، ۱۵ نمونه باکتریایی ترموفیل با استفاده از حمام آب گرم جداسازی شد. پس از کشت نمونه‌ها در محیط Skim milk agar، نمونه‌های باکتریایی که بهترین هاله شفاف (شکل ۱) را ایجاد کرده بودند، جداسازی و به‌عنوان سویه‌های برتر مولد پروتئاز انتخاب گردیدند.



شکل ۱: ایجاد هاله شفاف توسط سویه جداسازی شده در محیط اختصاصی اسکیم میلک آگار

ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: ارزیابی ویژگی‌های ظاهری و میکروسکوپی نشان داد که نمونه‌های باکتریایی مولد پروتئاز دارای کلنی‌های سفید- صورتی یا قرمز رنگ و موکوئیدی می‌باشند. رنگ‌آمیزی گرم نیز نشان‌دهنده وجود باسیل‌های گرم مثبت بوده است. نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی (جدول ۱) نشان داد که از بین نمونه‌های باکتریایی جداسازی شده ۹ گونه باکتریایی متعلق به جنس باسیلوس می‌باشند.

بررسی نتایج PCR: پس از انجام واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ژن *apr*، محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد بررسی گردید (شکل ۲). نتایج حاصل از بررسی ژل الکتروفورز حاکی از وجود باند ۱۵۰۰ bp در نمونه AN1 و باند ۱۲۰۰ در ۶ نمونه دیگر می‌باشد. نتایج نشان‌دهنده وجود ژن پروتئاز در ۷ نمونه مورد بررسی است. بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن پروتئاز با استفاده از نرم‌افزار مگا ۷ و با رسم دندروگرام به روش Maximum Likelihood صورت گرفت (شکل ۳). همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود دو نمونه BN2 و BN3 بیش‌ترین شباهت را دارند. توالی پروتئازی مورد مطالعه بیش‌ترین شباهت را با سویه *Bacillus SRC-006* sp. نشان می‌دهد.

مقایسه توالی *16S rRNA* نمونه‌های باکتریایی جداسازی شده با توالی‌های موجود در بانک ژنی انجام شد و نمونه‌های باکتریایی براساس آنالیز توالی ژنومی *16S rRNA* شناسایی شدند. درخت فیلوژنی

تأثیر pH در فعالیت و پایداری پروتئاز: ۵۰۰ میکرولیتر از

آنزیم نسبتاً خالص‌شده به یک میلی‌لیتر از بافر با pH مختلف و ۰/۵ میلی‌لیتر ژلاتین افزوده شد. بافرهایی که در این زمینه استفاده شد شامل ۰/۱ مول بر لیتر از بافر استات با pH ۵/۴، ۵/۸، ۵/۸، بافر فسفات با pH ۶، ۶/۴، ۶/۸، ۷/۴ و ۸ و بافر تریس با pH ۸/۶، ۸/۸ و ۹ می‌باشد. گرماگذاری محلول آنزیم و سوبسترا در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. سپس واکنش با افزودن ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۱۰ میلی‌مول بر لیتر متوقف شد. به‌عنوان شاهد، گرماگذاری محلول آنزیم و بافر بدون سوبسترا نیز به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر ژلاتین ۰/۶۵ درصد به مخلوط واکنش افزوده شد و فعالیت باقی‌مانده پروتئاز از نظر کمی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد (Pant و همکاران، ۲۰۱۵).

تأثیر دما در فعالیت و پایداری پروتئاز: ۵۰۰ میکرولیتر از

آنزیم نسبتاً خالص‌شده به یک میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر ژلاتین ۰/۶۵ درصد افزوده شد. گرماگذاری مخلوط آنزیم و سوبسترا به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس واکنش با افزودن ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۱۰ میلی‌مول بر لیتر به مخلوط متوقف و فعالیت باقی‌مانده پروتئاز اندازه‌گیری شد. به‌عنوان شاهد، مخلوط آنزیم و بافر بدون سوبسترا در دماهای مختلف گرماگذاری شد و بعد از ۳۰ دقیقه ۰/۵ میلی‌لیتر ژلاتین ۰/۶۵ درصد به آن اضافه شد و فعالیت باقی‌مانده پروتئاز مورد سنجش قرار گرفت. کلیه آزمایش‌های مربوط به فعالیت و پایداری آنزیم حداقل سه بار تکرار انجام شده است (Pant و همکاران، ۲۰۱۵).

تهیه منحنی استاندارد تیروزین: برای رسم منحنی استاندارد

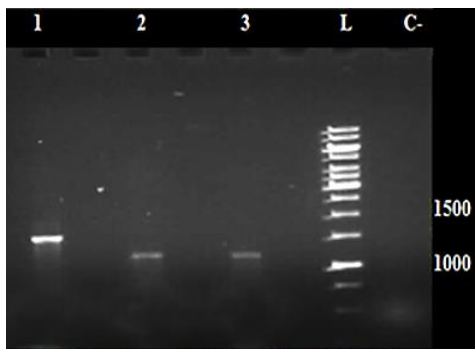
تیروزین، ۶ ویال تهیه و در ۵ عدد از آن‌ها به ترتیب ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر ال تیروزین (سیگما آلدریج، آمریکا) ریخته شد. سپس حجم هر ۶ ویال را توسط آب مقطر به ۲ میلی‌لیتر رسانده و ویال‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۴۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی در هر ویال ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم (Na_2CO_3) و بعد یک میلی‌لیتر معرف فولین فنل ۲۵ درصد (سیگما آلدریج، آمریکا) اضافه و برای انجام واکنش و تغییر رنگ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی قرار دادیم. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب هر ویال در ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد OD برحسب مقدار ال تیروزین از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد. ویال شماره ۶ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد که شامل ۲ میلی‌لیتر آب مقطر، ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم و یک میلی‌لیتر معرف فولین فنل بوده و فاقد تیروزین است (Enyard، ۲۰۰۸).

مربوط به این سویه‌ها، براساس مقایسه توالی *16S rRNA* چندین سویه مختلف باسیلوس بر مبنای روش Neighbor-Joining ترسیم شد. نتایج نشان داد که سویه‌های جداسازی شده در این مطالعه کاملاً مشابه بوده و براساس اطلاعات مربوط به توالی یابی ژن *16S rRNA* این سویه‌ها متعلق به جنس و گونه باسیلوس می‌باشند. مراحل ثبت توالی در بانک ژنی در حال انجام است.

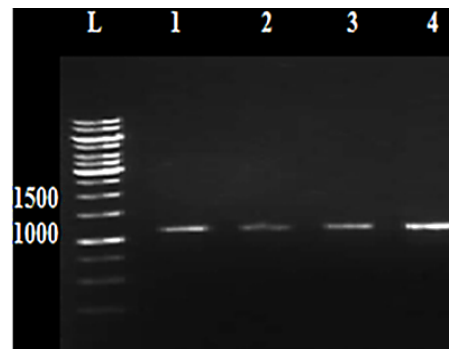
مربوط به این سویه‌ها، براساس مقایسه توالی *16S rRNA* چندین سویه مختلف باسیلوس بر مبنای روش Neighbor-Joining ترسیم شد. نتایج نشان داد که سویه‌های جداسازی شده در این مطالعه کاملاً مشابه

جدول ۱: خصوصیات بیوشیمیایی گونه‌های باکتریایی متعلق به جنس باسیلوس

مقاوم به پنی‌سیلین	β G β -Galactosidase	همولیز	تجزیه کازئین	تجزیه ژلاتین	آمیلاز	کاتالاز	رشد هوازی	VP Voges-Proskauer Test	تخمیر قند	نمونه
+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	AN1
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	BA1
+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	BN2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	BN3
-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	CA1
-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	CN1
±	+	+	+	+	+	+	+	-	+	DA1
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	DA2
±	-	+	+	+	+	+	+	-	+	DA3

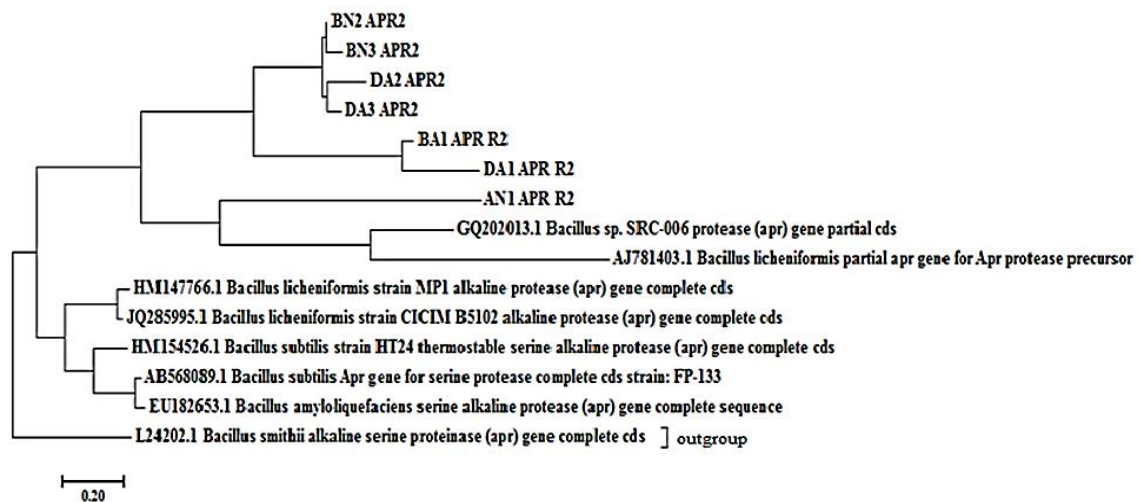


L: DNA Ladder 1kb Cat.No.SM1333
C: Negative control
1: AN1 amplicon, 1500bp
2: BA1 amplicon, 1200bp
3: DA1 amplicon, 1200bp



L: DNA Ladder 1kb Cat.No.SM1333
1: BN2 amplicon, 1200bp
2: BN3 amplicon, 1200bp
3: DA2 amplicon, 1200bp
4: DA3 amplicon, 1200bp

شکل ۲: بررسی محصول PCR ژن *apr* با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد



شکل ۳: دندروگرام ژن پروتئاز سویه‌های باسیلوس با استفاده از نرم‌افزار Mega7 به روش ML. Outgroup به همراه توالی‌های شناخته‌شده در بانک ژنی در یک سمت و توالی‌های مورد مطالعه نیز در سمت دیگر دندروگرام قرار گرفته‌اند.



ساخته شده، از باکتری‌ها و قارچ‌ها مشتق شده‌اند. در بین باکتری‌ها، گونه‌های باسیلوس تولیدکنندگان ویژه پروتئازهای قلیایی هستند (Haddar و همکاران، ۲۰۱۰). می‌توان براساس تست‌های بیوشیمیایی و خصوصیات مورفولوژیکی، باسیلوس‌ها را از سایر گونه‌های نزدیک تشخیص داد. در این تحقیق ۷ سویه باسیلوس ترموفیل مولد پروتئاز از چشمه‌های آبگرم محلات جداسازی شدند. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که این باکتری‌ها با انواع گونه باسیلوس قرابت دارند. با بررسی تست‌های بیوشیمیایی همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در این سویه‌ها تقریباً مشابه است. نواحی *tRNA* ۱ نواحی حفاظت شده (Conserve) و بسیار کم تغییری در گونه‌های مختلف پروکاریوتی نسبت به نواحی دیگر کروموزومی هستند و خاص هر گونه می‌باشند. تغییرات فنوتیپی که نتیجه تغییرات ژنوتیپی به علت جهش می‌باشد، کار تشخیص به روش بیوشیمیایی را مشکل کرده است، بنابراین شناسایی گونه‌های باسیلوس براساس توالی *tRNA* ۱ روش مناسبی است. نتایج حاصل در این زمینه با مشاهدات بدویی دلفارد و همکاران (۱۳۹۴) تطابق داشت. میکروارگانیسم‌های ترموفیل و هیپرترموفیل توانایی تولید طیف گسترده‌ای از آنزیم‌های گرمادوست را دارند. این آنزیم‌ها در کاربردهای صنعتی به شدت مورد توجه‌اند (Abdel-Naby و همکاران، ۲۰۱۷). سویه‌های باسیلوس از نظر تولید تجاری پروتئاز به‌ویژه پروتئازهای قلیایی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. پروتئاز جداسازی شده از سویه‌های باسیلوس بیشترین فعالیت و پایداری خود را در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد نشان دادند. پروتئاز جداسازی شده از باسیلوس پومیلوس (*Bacillus pumilus*) با فعالیت بهینه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (Mehak و همکاران، ۲۰۱۶؛ Feng و همکاران، ۲۰۰۱). Joo و Chang (۲۰۰۵) یک پروتئاز قلیایی از *Bacillus clausii* L-52 با دمای بهینه حدود ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد را گزارش نموده‌اند. پروتئاز جداسازی شده از *B. pumilus* D-6 فعالیت بهینه خود را در ۵۰ درجه سانتی‌گراد نشان داده است (Bajaj، ۲۰۱۳). در مطالعه حاضر حداکثر فعالیت و پایداری پروتئاز سویه‌های جداسازی شده در pH معادل ۸ گزارش گردید. این یافته با سایر مطالعات انجام شده که پایداری بهینه پروتئاز سویه‌های *B. RV. B2. 90* و *B. licheniformis* در pH برابر ۸ گزارش شده است، همخوانی دارد (Suganthi و همکاران، ۲۰۱۳؛ Vijayalakshmi و همکاران، ۲۰۱۱). فعال بودن آنزیم‌ها در این محدوده، نشان از ویژگی قلیایی آن‌ها دارد که این موضوع در بیوتکنولوژی قابل توجه است. این ویژگی برای استفاده از پروتئاز قلیایی به‌عنوان افزودنی مواد شوینده مهم می‌باشد، زیرا مواد شوینده رخت‌شویی به‌طور کلی در محدوده pH ۸ تا ۱۲ فعالیت دارند (Ehiosun و Olajuyigbe، ۲۰۱۳؛ Manni و همکاران، ۲۰۱۰). یکی دیگر از عوامل مؤثر در فعالیت آنزیم، زمان

بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز: نتایج حاصل از بررسی فعالیت

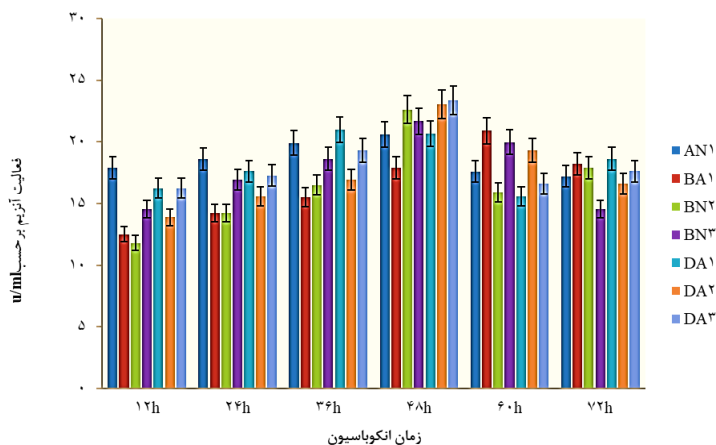
آنزیم در ۶ دوره زمانی انکوباسیون در دماهای مختلف و انواع pH نشان می‌دهد که باگذشت زمان فعالیت آنزیم افزایش یافته سپس شروع به کاهش می‌نماید. هم‌چنان‌که در شکل ۴ و جداول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، در اکثر گونه‌ها در زمان ۴۸ ساعت دوره انکوباسیون بیشترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز مشاهده می‌شود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز به ترتیب در نمونه‌های DA3، DA2 و BN2 با مقادیر ۲۳/۴ u/ml، ۲۳ u/ml و ۲۲/۶ u/ml در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۸ در ۴۸ ساعت انکوباسیون با دور ۱۵۰ مشاهده می‌شود.

جدول ۲: بررسی تاثیر PH بر میزان فعالیت آنزیم پروتئاز

PH/Sample	۹	۸/۶	۸	۷/۴	۵/۵	۴
DA3	۱۷/۶	۱۶/۶	۲۳/۹	۱۹/۳	۱۷/۳	۱۶/۳
DA2	۱۶/۶	۱۹/۳	۲۳/۰	۱۶/۹	۱۵/۶	۱۳/۹
AN1	۱۷/۲	۱۷/۶	۲۰/۶	۱۹/۹	۱۸/۶	۱۷/۹

جدول ۳: بررسی تاثیر دما بر حسب سانتی‌گراد بر میزان فعالیت آنزیم پروتئاز

Temp/Sample	۵۵	۵۰	۴۵	۴۰	۳۵
BA1	۲۰/۹	۱۷/۹	۱۵/۵	۱۴/۲	۱۲/۵
DN2	۱۵/۹	۲۲/۶	۱۶/۵	۱۴/۲	۱۱/۸
BN3	۲۰/۰	۲۱/۷	۱۸/۶	۱۶/۹	۱۴/۶



شکل ۴: مقایسه فعالیت آنزیم در ۷ سویه برتر مولد پروتئاز در ۶ زمان مختلف با حداقل ۳ تکرار برای هر نمونه

بحث

جداسازی و غربالگری میکروارگانیسیم‌ها به‌طور طبیعی در زیستگاه‌هایی رخ می‌دهد که انتظار می‌رود آنزیم‌هایی با ویژگی‌های خاص ارائه دهند. آنزیم‌های میکروبی در بیوتکنولوژی مدرن از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردارند و اکثر آنزیم‌های صنعتی که تا این تاریخ



۳. **De Azeredo, L.; Freire, D.; Soares, R.; Leite, S. and Coelho, R., 2004.** Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces sp.* isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 34, No. 3, pp: 354-358.
۴. **Dubal, S.A.; Tilkari, Y.P.; Momin, S. and Borkar, I.V., 2008.** Biotechnological routes in flavour industries. *Eendo*. pp: 14-15.
۵. **Feng, Y.; Yang, W.; Ong, S.; Hu, J. and Ng, W., 2001.** Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain. *Applied microbiology and biotechnology*. Vol. 57, No. 1-2, pp: 153-160.
۶. **Haddar, A.; Fakhfakh-Zouari, N.; Hmidet, N.; Frikha, F.; Nasri, M. and Kamoun, A.S., 2010.** Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol. 110, No. 3, pp: 288-294.
۷. **Mehak, B.; Rameshwar, T.; Puneet, K.; Lata, N. and Pratyooosh, S., 2016.** An Alkaline Protease from *Bacillus pumilus* MP 27: Functional Analysis of Its Binding Model toward Its Applications As Detergent Additive. Vol. 7, 1195 p.
۸. **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*. Vol. 98, No. 2, pp: 491-497.
۹. **Kuberan, T.; Sangaralingam, S. and Thirumalaiarasu, V., 2010.** Isolation and optimization of Protease producing Bacteria from Halophilic soil. *Journal of the belgian society of radiology*. Vol. 1, No. 3, pp: 163-174.
۱۰. **Kumar, R. and Vats, R., 2010.** Protease production by *Bacillus subtilis* immobilized on different matrices. *New York Science Journal*. Vol. 3, No. 7, pp: 20-24.
۱۱. **Marnett, A.B. and Craik, C.S., 2005.** Papa's got a brand new tag: advances in identification of proteases and their substrates. *Trends in biotechnology*. Vol. 23, No. 2, pp: 59-64.
۱۲. **Manni, L.; Jellouli, K.; Ghorbel-Bellaaj, O.; Agrebi, R. and Haddar, A., 2010.** An oxidant-and solvent-stable protease produced by *Bacillus cereus* SV1: application in the deproteinization of shrimp wastes and as a laundry detergent additive. *Applied biochemistry and biotechnology*. Vol. 160, No. 8, pp: 2308-2321.
۱۳. **Mehta, V.J.; Thumar, J.T. and Singh, S.P., 2006.** Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresource technology*. Vol. 97, No. 14, pp: 1650-1654.
۱۴. **Navarrete, A.A.; Barreto, C.C.; Arnaldo, M. and Tsai, S.M., 2013.** Molecular detection on culture medium of Acidobacteria from Amazon soils. *Microbiology Discovery*. Vol. 1, No. 1, pp: 1-9.
۱۵. **Olajuyigbe, F.M. and Ehiosun, K.I., 2013.** Production of thermostable and organic solvent-tolerant alkaline protease from *Bacillus coagulans* PSB-07 under different submerged fermentation conditions. *African journal of biotechnology*. Vol. 12, No. 21, pp: 3341-3350.
۱۶. **Omidinia, E.; Mashayekhi Mazar, F.; Shahbaz Mohammadi, H.; Ebrahimi-Rad, M. and Gregorian, A., 2012.** Isolation, purification and characterization of a thermophilic alkaline protease from *Bacillus subtilis* BP-36. *Journal of Sciences*. Vol. 23, No. 1, pp: 7-13.
۱۷. **Oskouie, S.F.G.; Tabandeh, F.; Yakhchali, B. and Eftekhari, F., 2007.** Enhancement of alkaline protease

انکوباسیون می‌باشد. در زمان انکوباسیون میزان فعالیت آنزیم طی فاز نمایی رشد باکتری افزایش می‌یابد و در فاز سکون و مراحل بعد از آن هم‌زمان با کاهش رشد باکتری میزان فعالیت آنزیم نیز کاهش می‌یابد (Vijayalakshmi و همکاران، ۲۰۱۱). دگرگونی ساختار آنزیم و یا کاهش مواد غذایی قابل دسترسی توسط میکروارگانسیم می‌تواند از دلایل کاهش تولید و فعالیت آنزیم باشد (De Azeredo و همکاران، ۲۰۰۴). در سوبیه‌های مورد مطالعه، حداکثر تولید و فعالیت آنزیم در ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب در سه نمونه DA3 (۲۳/۴ u/ml)، DA2 (۲۳ u/ml) و BN2 (۲۲/۶ u/ml) مشاهده شد. آنزیم پروتئاز نمونه‌های باسیلوس سوبتیلیس tk1 و tk2 بیش‌ترین میزان تولید و فعالیت خود را در ۲۴ ساعت انکوباسیون نشان دادند (Kuberan و همکاران، ۲۰۱۰). هم‌چنین در مطالعه Kumar و همکاران (۲۰۱۰) بیش‌ترین میزان تولید و فعالیت آنزیم پروتئاز (۱۰/۸ u/ml) در ۲۴ ساعت انکوباسیون مشاهده شد. در این پژوهش، ۷ سوبیه باسیلوس مولد پروتئاز از چشمه‌های آب گرم جداسازی و شناسایی شدند. آنزیم پروتئاز جداسازی شده از این سوبیه‌ها در pH قلیایی و دمای بالا از فعالیت و پایداری قابل توجهی برخوردار بود. این نتایج نشان‌دهنده پتانسیل قابل توجه این آنزیم استخراجی از سوبیه‌های بومی برای استفاده در صنایع مختلف می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل محترم موسسه واکسن و سرم سازی رازی واحداراک به‌دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

۱. بدویی‌دلفارد، ا؛ امیری، پ؛ رضانی‌پور، ن؛ کرمی، ز. و قنبری، ب.، ۱۳۹۴. تولید پروتئاز قلیایی توسط باسیلوس تیکیولنسوس سویه *FJSH2* جداشده از فاضلاب کشتارگاه دام جیرفت. *مجله دنیای میکروب‌ها*. سال ۸، شماره ۱، صفحات ۵۴ تا ۶۳.
۲. **Abdel-Naby, M.A.; Ahmed, S.A.; Wehaidy, H.R. and El Mahdy, S.A., 2017.** Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of stabilized *Bacillus stearothermophilus* alkaline protease. *Int J Biol Macromol*. Vol. 96, pp: 265-271.
۳. **Bajaj, B.K. and Jamwal, G., 2013.** Thermostable alkaline protease production from *Bacillus pumilus* D-6 by using agro-residues as substrates. *Advances in Enzyme Research*. Vol. 1, No. 2, pp: 30-36.
۱. **Baron, E.J. and Finegold, S.M., 1990.** Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 8nd Ed. The Mosby Company, C.V. St. Louis, Baltimore, Philadelphia, Toronto. pp: 451456.
۲. **Cupp-Enyard, C., 2008.** Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *JoVE*. Vol. 19, pp: 899.



- production by *Bacillus clausii* using Taguchi experimental design. African journal of biotechnology. Vol. 6, No. 22, pp: 2559-2564.
۱۸. **Pant, G.; Prakash, A.; Pavani, J.V.P.; Bera, S. and Deviram, G.V.N.S., 2015.** Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. Journal of taibah university for science. Vol. 9, No. 1, pp: 50-5۵.
 ۱۹. **Schilling, O. and Overall, C.M., 2008.** Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. Nature biotechnology. Vol. 26, No. 6, pp: 685-694.
 ۲۰. **Sekhon, B.S., 2010.** Food nanotechnology—an overview. Nanotechnology, science and applications. Vol. 3, No. 1, pp: 1-15.
 ۲۱. **Sharma, A. and Tiwari, R., 2005.** Extracellular enzyme production by environmental strains of *Serratia spp.* isolated from river Narmada. Indian journal of biochemistry and biophysics. Vol. 42, No. 3, pp: 178-۱۸۱.
 ۲۲. **Sizova, M.V.; Hohmann, T.; Hazen, A.; Paster, B.J.; Halem, S.R.; Murphy, C.M.; Panikov, N.S. and Epstein, S.S.; 2012.** New Approaches for Isolation of Previously Uncultivated Oral Bacteria. Applied and environmental microbiology. Vol. 78, No. 1, pp: 194-203.
 ۲۳. **Sneath, P.H.A.; Sharpe, M.E. and Holt, J.G., 1984.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. First Ed. Vol. 2, The Williams & Wilkins Company, 428 E. Preston St, Baltimore, USA. pp: 1104-1139.
 ۲۴. **Starcher, B., 2001.** A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. Analytical biochemistry. Vol. 292, No. 1, pp: 125-129.
 ۲۵. **Suganthi, C.; Mageswari, A.; Karthikeyan, S.; Anbalagan, M.; Sivakumar, A. and Gothandam, K.M., 2013.** Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. Vol. 11, No. 1, pp: 47-52.
 ۲۶. **Takenaka, S.; Yoshida, N.; Yoshida, K.; Murakami, S. and Aoki, K., 2011.** Molecular cloning and sequence analysis of two distinct halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* FP-133. Bioscience, biotechnology and biochemistry. Vol. 75, No. 1, pp: 148-151.
 ۲۷. **Vijayalakshmi, S.; Venkat Kumar, S. and Thankamani, V., 2011.** Optimization and cultural characterization of *Bacillus RV. B2. 90* producing alkalophilic thermophilic protease. Research Journal of Biotechnology. Vol. 6, pp: 26-32.
 ۲۸. **Yamane, K.; Bunai, K. and Kakeshita, H., 2004.** Protein traffic for secretion and related machinery of *Bacillus subtilis*. Bioscience, biotechnology and biochemistry. Vol. 68, No. 10, pp: 2007 -2023.
 ۲۹. **Yildirim, V.; Baltaci, M.O.; Ozgencli, I.; Sisecioglu, M.; Adiguzel, A. and Adiguzel, G., 2017.** Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C¹: a potential additive for detergents. J Enzyme Inhib Med Chem. Vol. 32, pp: 468-477.

