

## بهینه‌سازی تولید یک آنزیم پروتئاز خارج سلولی قلیادوست مقاوم به حلال آلی ترشح شده از یک سویه باسیلوس

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

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

### 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 آب گرم جداسازی شد و در محیط غنی شده با سیکلوهاگزان (۳۰٪) و تولون (۱۰٪) 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-سفراز به شکل جزئی 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 از جمله زمان گرماگذاری، دما، اسیدیته، منابع کربن و منابع نیتروژن آزمایش شد. بیش‌ترین بازده رشد باکتریایی و تولید پروتئاز پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۷ زمانی که محیط کشت توسط منبع کربنی سوکروز و منبع نیتروژن عصاره مخمر ۵ درصد غنی شده بود، مشاهده شد. این پروتئاز بیش‌ترین فعالیت را در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۱۰ نشان داد و توسط اتیلن دی‌آمین تترا 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 ۱۰٪ (v/v) از تولون، متانول، اتانول و دی‌اتیل‌اتر افزایش یافت. بنابراین، آنزیم می‌تواند به‌عنوان یک بیوکاتالیست قوی در صنایع و بیوتکنولوژی به کار گرفته شود.

**کلمات کلیدی:** پروتئاز، باسیلوس، حلال آلی، تخلیص



## 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 به خود 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 اکتینومیسیت‌ها 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 زیست‌کاتالیزورهای 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 داده شده‌اند. میکروب‌های متعلق به گروه‌های مختلف برای تولید طیف وسیعی از پروتئازها شناخته شده که آنزیم‌های صنعتی مهم با تقاضای بازار رو به افزایش عمدتاً از گروه باسیلوس مشتق می‌شوند که مقدار قابل توجهی پروتئازهای خارج سلولی را با چندین جنبه کاربردی ترشح می‌کنند. سرین پروتئازهای شبه‌سابتلیزین (E.C.3.4.21) عمدتاً از سویه‌های باسیلوس، برخی از گسترده‌ترین آنزیم‌های مورد بررسی هستند (Leunissen و Siezen, ۱۹۹۷). باسیلوس‌ها خواص فیزیولوژیکی کاملاً متنوعی مثل توانایی تجزیه سوبستراهای مختلف مشتق شده از منابع گیاهی و جانوری از جمله سلولز، نشاسته، پروتئین‌ها، آگار، هیدروکربن‌ها و نیز سوخت‌های زیستی را نشان می‌دهند (Lutz و همکاران, ۲۰۰۶). پروتئازهای خارج سلولی هم‌چنین به‌منظور کمک به تجزیه پروتئین در فرایندهای صنعتی مختلف به‌طور تجاری مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Takagi و Kumar, 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 محیط‌های با آب محدود یافت شده‌است. مزایای بسیاری در ارتباط با کاربرد آنزیم‌ها برای سنتز آلی از جمله گزینش فضایی، اختصاصیت، شرایط واکنش غیرآبی و غیره وجود دارد (Maurer, ۲۰۰۴). اخیراً باکتری‌های مقاوم به حلال به‌عنوان گروه نسبتاً جدیدی از میکروارگانیسم‌های حدی با توانایی منحصر به فرد 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 این حال، 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 از نظر 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 آنزیم‌هم‌چون پایداری در حضور غلظت‌های مختلف حلال‌های آلی، اسیدیته و دمای بهینه برای فعالیت، اثر مهارکننده‌ها تعیین شد که در صورت 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

شده با تولون و سیکلوهاگزان جداسازی شدند. به این صورت که تولون و سیکلوهاگزان در غلظت‌های نهایی ۱۰ و ۳۰ درصد (v/v) به ترتیب 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 به منظور جلوگیری از تبخیر حلال آلی با درپوش chloroprene-rubber مسدود شد (Karami و Badoei-Dalfard، ۲۰۱۳). پس از آن فلاسک‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور بر دقیقه انکوبه شدند. سپس سویه‌ها به منظور سازش با حلال‌های آلی به همان شرایط کشت انتقال یافتند. نمونه‌های کشت تکرار شده، رقیق شده و روی پلیت‌های اسکیم میلک آگار (Skim Milk Agar) پخش شدند و سپس کلنی‌های رشد یافته به وسیله 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. به این صورت که کلنی‌ها روی محیط SMA کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 مورد نظر که روی محیط نوترینت آگار رشد کرده بود برداشته و به محیط مایع پیش‌کشت منتقل شد. سپس در انکوباتور شیکردار با شیک دورانی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از تکثیر باکتری در محیط پیش‌کشت، به میزان ۵ تا ۱۰ درصد حجم محیط تولید، در شرایط استریل از محیط پیش‌کشت به محیط تولید انتقال داده شد. سپس محیط‌های تولید به منظور تولید آنزیم پروتئاز در انکوباتور شیکردار با شیک دورانی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور بر دقیقه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند.

**تعیین زمان بهینه گرماگذاری:** به منظور تعیین زمان بهینه برای تولید آنزیم پروتئاز، در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از محیط تولید برداشت صورت گرفته و سنجش فعالیت پروتئازی به روش لوری انجام شد (Lowry و همکاران، ۱۹۵۱). علاوه بر این به منظور بررسی میزان رشد باکتریایی در این زمان‌ها، OD<sub>600</sub> آن اندازه‌گیری شد.

**تعیین اسیدیته بهینه:** به منظور بررسی اثر اسیدیته روی رشد باکتریایی و تولید پروتئاز توسط ایزوله مورد نظر، محیط تولید در اسیدیته‌های بین ۴ تا ۹ تهیه شد و در زمان بهینه به دست آمده برداشت صورت گرفت و مورد سنجش فعالیت آنزیمی قرار گرفت. علاوه بر این به منظور

دامنه سیاه کوه و نزدیک به غار خفاش قرار دارد، واقع در غرب ایران با مختصات جغرافیایی (E ۲۲°۱۸'۴۷" N ۳۳°۴۲'۳۳")، نمونه‌برداری به عمل آمد. این چشمه دارای مناطقی به عمق بیش از ۸۰ سانتی‌متر می‌باشد و دو سر چشمه بزرگ دارد که حدود دویست متر از هم فاصله دارند. دمای این چشمه در هر دو سر چشمه بین ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۱). نمونه‌برداری از آب مناطق عمقی به همراه لجن‌های کف و اطراف چشمه و در مناطق مختلف چشمه صورت گرفت. نمونه‌های هر چشمه به صورت 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

به منظور 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. به منظور حفظ شرایط استریل در هنگام نمونه‌برداری باید از لوله‌های فالکون استریل شده استفاده نمود و دقت شود که نمونه‌برداری باید به سرعت 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



$1.0 \times 10^8$ ، ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه به منظور به دست 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٪):** عصاره آنزیمی خام در معرض رسوب‌دهی پروتئین کل با سولفات آمونیوم (۸۵٪) قرار گرفت. آمونیوم سولفات باید به آرامی و با به هم زدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به عصاره آنزیمی اضافه شود (این کار در مدت ۴-۳ ساعت انجام شد). بعد از اضافه کردن سولفات آمونیوم، رسوب حاصل به وسیله سانتریفوژ در  $1.5 \times 10^4$ ، ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد و در ۱۰ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۲۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۸ حل شد. **دیالیز نمونه:** به منظور آماده‌سازی اولیه کیسه‌های دیالیز، ابتدا غشاهای 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 به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده می‌شوند. پس از خالی کردن محلول، به آرامی (بدون وارد کردن آسیب به غشاهای کیسه‌های دیالیز با آب مقطر شسته می‌شوند. در مرحله بعد کیسه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱ میلی‌مولار EDTA جوشانده می‌شوند. این کیسه‌ها در محلول ۲۰٪ اتانول حاوی ۱٪ سدیم آزاید تا ۶ ماه در یخچال قابل نگهداری است. پس از آماده‌سازی کیسه‌های دیالیز، مخلوط به منظور جداسازی نمک در مقابل بافر Tris-HCl ۲۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۸ و با به هم زدن ثابت در ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از کیسه دیالیز با قطر منافذ ۱۰۰۰-۱۴۰۰۰ دیالیز شد. به منظور دیالیز بهتر، بافر مورد نظر در طول این مدت ۳ مرتبه تعویض شد.

**بارگذاری نمونه روی ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE سفارز:** محلول آنزیمی دیالیز شده روی ستون DEAE- سفارز (۲/۵ سانتی‌متر  $\times$  ۱۰ سانتی‌متر) بارگذاری شد. این ستون قبل از بارگذاری به خوبی 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. جذب فرکشن‌های جمع‌آوری شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. عمل شستشوی ستون با بافر مربوطه تا رسیدن جذب فرکشن‌ها به صفر ادامه پیدا کرد. سپس به منظور 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

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

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

**انتخاب بهترین منبع کربن:** غلظت ۱٪ (w/v) هر کدام از منابع کربن (سوکروز، گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز، مالتوز و نشاسته) تهیه شد و به طور جداگانه اتوکلاو گردید. بعد از اتوکلاو این منابع به محیط تولید فاقد سوکروز اضافه شدند. بعد از تکثیر باکتری در محیط پیش‌کشت، به میزان ۵ تا ۱۰ درصد حجم محیط تولید، در شرایط استریل از محیط پیش‌کشت به محیط تولید انتقال داده شد. محیط‌های با منابع کربن مختلف حاوی باکتری به مدت 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:** به منظور تعیین بهترین منبع نیتروژن، عصاره مخمر در محیط تولید با منابع نیتروژن دار آلی و معدنی مختلف (پپتون، تریپتون، کازئین محلول قلیایی، اسکیم میلک، آمونیوم سولفات و اوره) با غلظت ۵٪ (w/v) جایگزین شد. این منابع به طور جداگانه اتوکلاو شده و به محیط تولید اضافه شدند. بعد از تکثیر باکتری در محیط پیش‌کشت، به میزان 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 به مدت 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.

#### 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 به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بعد از این زمان، به میزان 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 به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. ۸۰۰ میلی‌لیتر (۲۰۰ میلی‌لیتر در هر فلاسک ارلن مایر) محیط کشت باکتریایی آماده شده، در

رسانده شد. در نهایت سوبسترای کازئین ۲٪ (w/v) برای هر نقطه از اسیدپته در بافر مربوط به آن اسیدپته تهیه شد. فعالیت باقی مانده آنزیم در هر اسیدپته مطابق روش استاندارد سنجش فعالیت اندازه گیری 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 گلايسين-NaOH ۵۰ میلی مولار با اسیدپته ۱۰ (آنزیم در این بافر بیشترین فعالیت را دارد) بررسی شد. دمای بهینه آنزیم پروتئاز در شرایط سنجش استاندارد با اندازه گیری فعالیت در دماهای مختلف (۲۰، ۳۰، ۳۷، ۴۰، ۵۰، ۶۰) تعیین شد. آنزیم و سوبسترای کازئین قبل از سنجش (به مدت ۱۰ دقیقه) و در طول سنجش در دمای مربوطه گرم شدند. حداکثر فعالیت آنزیم ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و سایر نتایج براساس آن مقایسه شدند.

**اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت پروتئازی آنزیم:** فعالیت آنزیمی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی مولار از برخی مهارکننده‌ها (PMSF، Phenylmethylsulfonyl fluoride به عنوان مهارکننده سرین پروتئازها، Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA مهارکننده متالوپروتئازها)  $\beta$ -مرکاپتو اتانول (مهارکننده سیستئین پروتئازها) مورد بررسی قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم و ۱۰۰ میکرولیتر از این عوامل در دمای ۵۰°C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از گرماگذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط حاوی آنزیم برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای آن اضافه شد و واکنش آغاز گردید. سپس فعالیت آنزیم در شرایط سنجش استاندارد اندازه گیری شد. تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۶۰ نانومتر ثبت شد و فعالیت باقی مانده به دست آمد. فعالیت آنزیم در غیاب مهارکننده به صورت ۱۰۰٪ در نظر 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 مورد نظر از این حلال‌ها در بافر گلايسين NaOH ۵۰ میلی مولار با اسیدپته ۱۰ ساخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم و ۱۰۰ میکرولیتر از این عوامل در دمای ۵۰°C به مدت 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 اندازه گیری شد. تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۶۰ نانومتر ثبت شده و فعالیت باقی مانده به دست آمد. فعالیت آنزیم در غیاب مهارکننده به صورت ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد.

نمودارها با استفاده از برنامه Excel ۲۰۱۰ رسم شد.

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

**روش سنجش فعالیت پروتئازی:** سنجش فعالیت پروتئازی با استفاده از روش Punj و Matta (۱۹۹۸) با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای کازئین ۲٪ (در بافر گلايسين-NaOH، ۵۰ میلی مولار، اسیدپته ۱۰) به مدت 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 به خوبی ورتکس شده تا مخلوط شوند و در ۱۰۰۰۰xg به مدت 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 به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سرد شدن ویال‌ها در دمای اتاق جذب آن‌ها در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. یک بلانک مناسب به همین روش آماده شد با این تفاوت که آنزیم پس از افزودن TCA به مخلوط واکنش اضافه شد. سپس با استفاده از نمودار استاندارد مقدار آل- تیروزین آزاد شده برحسب میکروگرم اندازه گیری و فعالیت آنزیم محاسبه شد. براساس تعریف یک واحد فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی، مقدار آنزیمی است که بتواند از سوبسترای کازئین یک میکروگرم آل- تیروزین در مدت واکنش (۱۰ دقیقه) و در شرایط آزمایش (دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، اسیدپته 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 اسیدپته بر فعالیت آنزیم:** اثر اسیدپته بر فعالیت آنزیم در اسیدپته‌های مختلف، بین ۴ تا ۱۱ به فاصله ۱ واحد از یکدیگر اندازه گیری شد. در این آزمایش به دلیل این که فعالیت آنزیم در طیف وسیعی از اسیدپته بررسی می‌شود از بافر مخلوط استفاده شد. این بافر از ۴ جز با غلظت برابر (۵۰ میلی مولار) تشکیل شده است که عبارتند از: سدیم استات، دی‌سدیم هیدروژن فسفات، گلیسین و تریس. برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر از این بافر برای هر اسیدپته به‌طور جداگانه و در ظرف‌های مجزا، مقادیر ۰/۶۷ گرم سدیم استات، ۰/۷ گرم دی‌سدیم هیدروژن فسفات، ۰/۳۷ گرم گلیسین و ۰/۶ گرم تریس، همراه با ۰/۱ گرم NaCl توزین شده و در حدود ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. سپس اسیدپته با استفاده از HCl یا NaOH یک نرمال در نقطه مورد نظر تنظیم شد. پس از آن حجم محلول‌ها به ۱۰۰ میلی لیتر



## نتایج

## کشت نمونه‌ها

## غربال کردن 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 به همان شرایط کشت با حلال‌های آلی سازش یافتند. نمونه‌های کشت تکرار شده، رقیق شده و روی پلیت‌های SMA پخش شدند و سپس کلنی‌های رشد یافته به وسیله 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 از دیگر ایزوله‌ها بهتر بود برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.



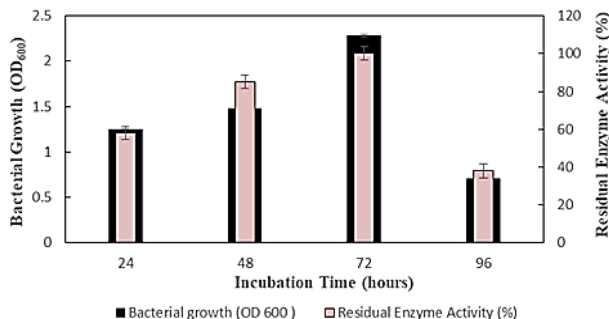
شکل ۲: بررسی کیفی تولید پروتئاز توسط باکتری روی محیط کشت SMA هاله شفاف هیدرولیز کازئین را به علت تولید پروتئاز توسط سویه نشان می‌دهد.

## بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری: ایزوله مورد نظر از 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. به منظور 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، در نظر گرفته شود. بهینه‌سازی شرایط محیط کشت باکتری برای تولید مقادیر بالای آنزیم حائز اهمیت است.

تعیین زمان بهینه گرماگذاری کشت: سوش مورد نظر علاوه بر آزمایش کیفی بر روی محیط SMA برای بررسی فعالیت پروتئازی، مورد آزمایش کمی نیز قرار گرفت. در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح، در شرایط استریل برداشت صورت گرفت و برداشت‌ها مورد سنجش فعالیت پروتئازی قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۳

نشان داده شده است باکتری در زمان ۷۲ ساعت گرماگذاری بیش‌ترین رشد سلولی و فعالیت پروتئازی را نشان داد.

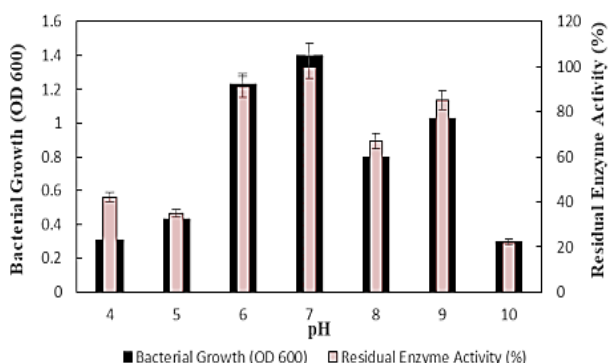


شکل ۳: نمودار تاثیر زمان گرماگذاری بر تولید آنزیم پروتئاز در محیط

کشت باکتری *Bacillus sp.*

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

تعیین اسیدیته بهینه کشت: تولید آنزیم در محیط‌های کشت با اسیدیته‌های مختلف نیز مورد بررسی قرار گرفت. از آن‌جا که در طی کشت باکتری به دلیل 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 استفاده گردید که در 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 اسیدیته‌های بالاتر و پایین‌تر میزان تولید آنزیم کاهش یافت (شکل ۴). 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.



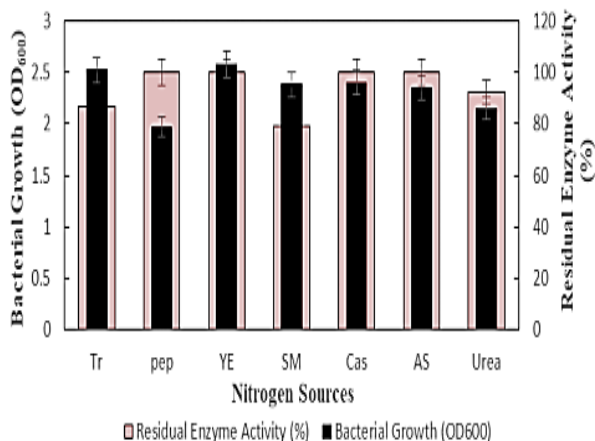
شکل ۴: نمودار تاثیر اسیدیته بر تولید آنزیم پروتئاز در محیط کشت باکتری

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



اثر منابع کربن و نیتروژن بر تولید پروتئاز توسط ایزوله: تأثیر منابع کربن از جمله 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. همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است میزان تولید پروتئاز توسط ایزوله در حضور نشاسته و سوکروز به ترتیب بسیار بالاتر از سایر منابع بوده و در حضور گالاکتوز از دیگر منابع بسیار کم‌تر است.

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

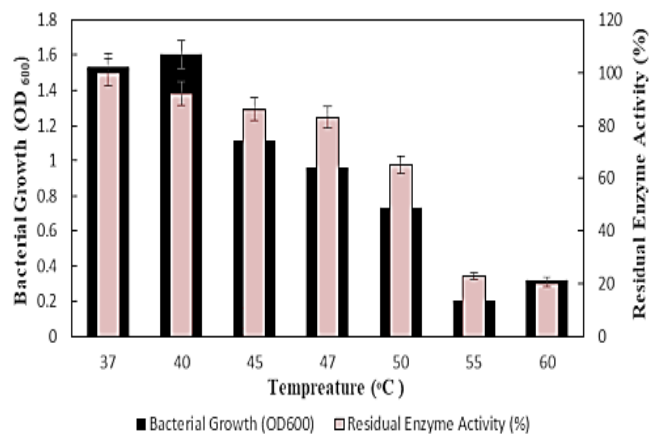


شکل ۷: اثر منابع نیتروژن مختلف بر رشد باکتری و فعالیت پروتئازی

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

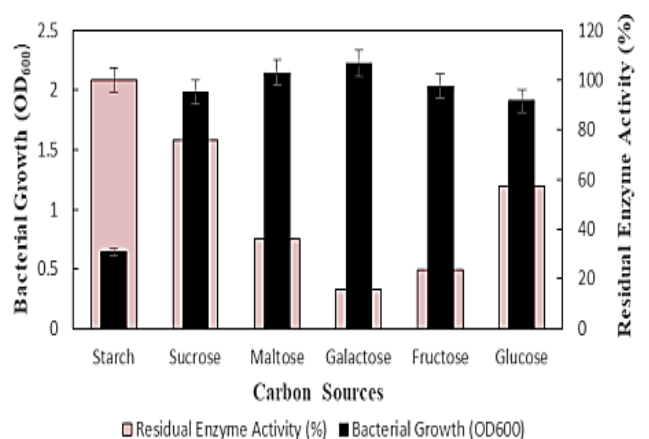
تشخیص جنس باکتری: به منظور تشخیص جنس ایزوله شماره ۵ ابتدا آزمایش گرم انجام گرفت و مشخص شد که این ایزوله گرم مثبت است (شکل ۸). در مرحله بعدی آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی روی این ایزوله انجام گرفت. نتایج نشان داد که این ایزوله کاتالاز مثبت بوده و توانایی هیدرولیز نشاسته و کازئین را دارد اما آزمون 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 برگری که در آن نتیجه این تست‌ها برای جنس‌های باکتریایی مختلف آورده شده است نشان می‌دهد که ایزوله ۵ به جنس باسیلوس اختصاص دارد.

تعیین دمای بهینه کشت: به منظور تولید مقدار زیاد آنزیم باید دمای بهینه برای تولید هم به دست آید. برای این کار، باکتری‌های رشد کرده 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 رشد اندکی دارد و با تعداد اندک باکتری در محیط کشت، تولید آنزیم بسیار کم است.



شکل ۵: نمودار تأثیر 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.

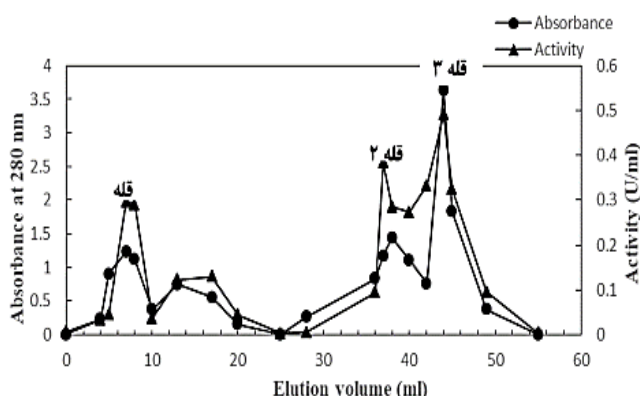


شکل ۶: اثر منابع کربن (w/v ۰/۰۵) بر رشد باکتری و تولید پروتئازهای قلیایی توسط ایزوله

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







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 به صورت ۱ قله در نمودار مشاهده می‌شوند. پروتئاز به ستون متصل شده‌است (قله ۲ و ۳) و با استفاده از غلظت نمک ۰/۴ تا ۰/۵ مولار از ستون خارج می‌شود.



شکل ۸: تصویر میکروسکوپ نوری گونه باکتریایی از جنس

*Bacillus sp.* پس از رنگ آمیزی گرم

رنگ بنفش سوپه نشان‌دهنده گرم مثبت بودن آن است.

### تخلیص و سنجش فعالیت پروتئازی آنزیم: در این پژوهش از

روش‌های رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم، دیالیز و کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز برای تخلیص آنزیم استفاده شد. عصاره آنزیمی خام خارج سلولی در معرض رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم (۰/۸۵٪) قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است بازده و مرتبه تخلیص بعد از این مرحله به ترتیب ۰/۷۴٪ و ۲/۱۷ بود. در شکل ۹ کروماتوگرام نتایج حاصل از ستون کروماتوگرافی نشان داده شده است که دارای 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 ۰/۳۸ بود (جدول ۱).

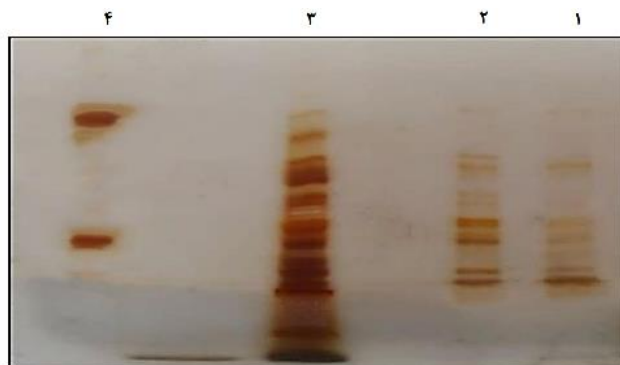
ژل الکتروفورز برای تمام فرکشن‌ها انجام شد. شکل ۱۰ نتایج الکتروفورز مربوط به مایع رویی محیط کشت و دو قله دارای بیش‌ترین فعالیت پروتئازی مربوط به غلظت‌های نمکی ۰/۴ و ۰/۵ از ستون اول کروماتوگرافی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید کروماتوگرافی تعویض آنیونی قادر به تخلیص جزئی آنزیم شده است.

### مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم پروتئاز

بررسی اثر اسیدیته بر فعالیت و پایداری آنزیم: در بررسی اثر اسیدیته بر فعالیت آنزیم، همان‌طور که در شکل ۱۱ مشخص 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.*

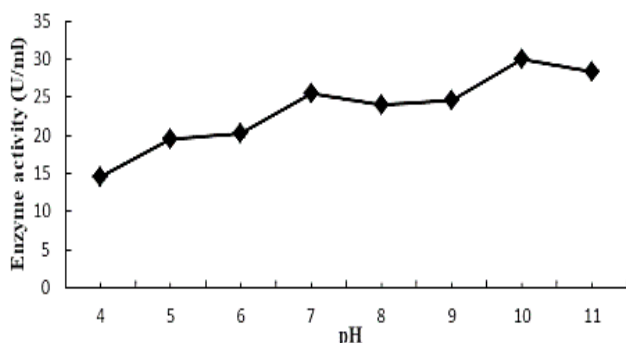
| DEM05                         |                  |                    |                    |           |             |
|-------------------------------|------------------|--------------------|--------------------|-----------|-------------|
| مرحله تخلیص                   | فعالیت کل (U/mL) | پروتئین 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 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 کیلودالتون)).



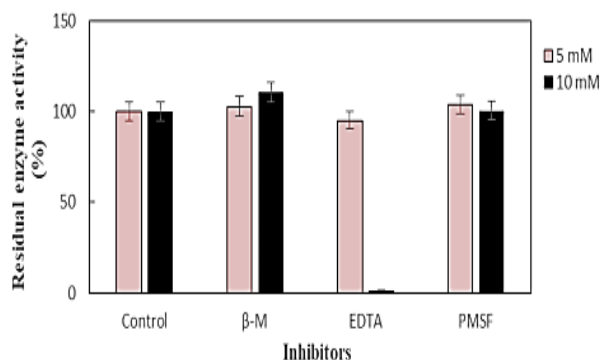
شکل ۱۱: اثر اسیدیته بر فعالیت پروتئاز

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





بررسی اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم: همان‌طور که 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 به مقدار کم نسبت به کنترل افزایش یافته است.



شکل ۱۴: اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت پروتئاز

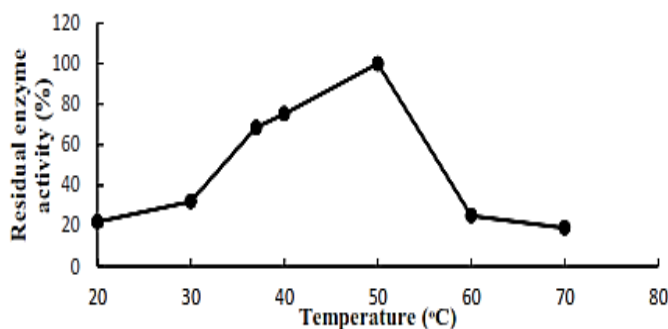
هر یک از مهارکننده‌های EDTA، PMSF و β-M (در دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) قبل از سنجش فعالیت، به مدت ۱۰ دقیقه با آنزیم در دمای ۵۰°C انکوبه شدند و سپس فعالیت اندازه‌گیری شد. آنزیم در حضور غلظت ۱۰ میلی‌مولار EDTA به‌طور کامل مهار شد.

## بحث

میکروارگانسیم‌های زنده در چشمه‌های آب گرم نه تنها در برابر دمای بالا، بلکه در برابر اسیدیته متفاوت محیط و ترکیبات شیمیایی خاص مقاومند. در بین آنزیم‌های موجود، پروتئازهای قلیایی بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند زیرا آن‌ها می‌توانند در برابر دمای بالا، تغییر اسیدیته و فلزات سمی مقاومت کنند و بنابراین می‌توانند به راحتی در محیط‌های پیچیده و مصنوعی رشد کنند. در حال حاضر تعداد زیادی از پروتئازهای قلیایی تجاری از گونه باسیلوس به دلیل توانایی در تولید مقدار زیاد پروتئاز قلیایی، داشتن فعالیت پروتئولیتیک قابل توجه و پایداری در اسیدیته و درجه حرارت بالا به دست 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 اهمیت یافتن آنزیم‌های جدید با درجه بالاتری از مقاومت در برابر شرایط حدی از جمله 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

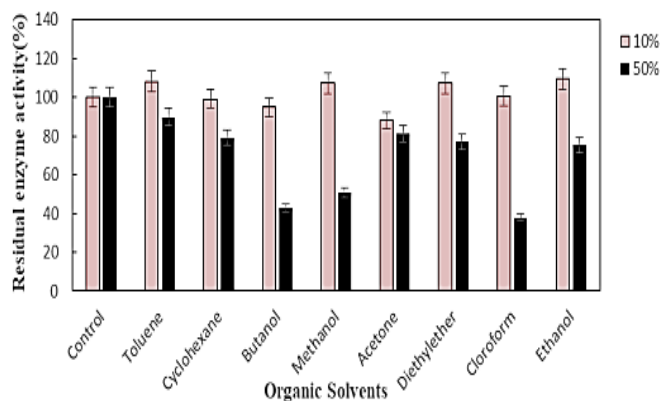
بررسی اثر دما بر فعالیت و پایداری آنزیم: اثر دما بر فعالیت پروتئازی با اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف از ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد آزمایش شد. دمای بهینه این آنزیم ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۱۲).

بررسی اثر حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیم: نتایج حاصل از بررسی غلظت‌های ۱۰٪ و ۵۰٪ (v/v) حلال‌های آلی 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 به ترتیب ۸۸٪ و ۹۴٪ بود. فعالیت آنزیمی در حضور غلظت ۵۰٪ از تولوئن، استون، سیکلوهگزان، دی‌اتیل‌اتر، اتانول، متانول، بوتانول و کلروفرم به ترتیب ۹۰٪، ۸۱٪، ۷۹٪، ۷۷٪، ۷۵٪، ۵۰٪، ۴۲٪ و ۳۸٪ بود. فعالیت باقی‌مانده آنزیم در حضور حلال‌های آلی 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 حلال‌های آلی مختلف (۱۰٪ و ۵۰٪) در v/v در محلول آنزیم در دمای ۵۰°C به مدت ۱۰ دقیقه پیش‌انکوبه شد و سپس فعالیت باقی‌مانده اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم در غیاب حلال آلی ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد.



قابل توجه 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 (Saramma و Venugopal، ۲۰۰۷)، باسیلوس پلی میکسا در ۵۰°C (Punj و Matta، ۱۹۹۸)، گونه‌های باسیلوس در ۵۵°C (Devi و Naidu، ۲۰۰۵)، یک گونه باسیلوس سرئوس (Ghorbel-Frikha و همکاران، ۲۰۰۵) و لاکتو باسیلوس هلونتیکوس (Valasaki و همکاران، ۲۰۰۸) در ۶۰°C و باسیلوس گرمادوست سویه HUTBS71 (Akel و همکاران، ۲۰۰۹) در ۶۵°C، یک گونه باسیلوس گرمادوست و قلیادوست (Johnvesly و Naik، ۲۰۰۱) یک گونه باسیلوس گرمادوست (Kaur و همکاران، ۲۰۰۱) در ۷۰°C و یک گونه باسیلوس گرمادوست و قلیادوست (Gupta و Beg، ۲۰۰۳) در ۷۵°C، به مقدار زیاد تولید شد. این ویژگی آنزیم می‌تواند سبب کاربرد گسترده آن در صنایع مختلف شود. پروتئاز خالص شده در برابر غلظت (۷/۷)٪ ۱۰٪ حلال‌های آلی مختلف فعالیت خود را حفظ کرد و فعالیت پروتئازی در اتانول، متانول، تولوئن و دی اتیل اتر حتی بیش‌تر از مقدار کنترل بود. Shah و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که فعالیت پروتئازی به وسیله حلال‌های غیرقابل امتزاج در آب به جز بوتانول در مقایسه با حلال‌های قابل امتزاج در آب افزایش یافت. فعالیت پروتئازی در حضور دکان، هگزادکان، هگزان، سیکلواکتان، تولوئن و بنزن بالاتر بود. از طرف دیگر فعالیت پروتئازی در حضور حلال‌های قابل امتزاج در آب 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، در حالی که آنزیم توسط غلظت ۱۰ میلی‌مولار EDTA تقریباً به‌طور کامل 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 مهار قوی فعالیت آنزیمی را نشان دادند. این آنزیم‌های پروتئاز تا ۹۰٪ در حضور 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 آنزیم در پزشکی، بیوتکنولوژی و صنایع شوینده در آینده وجود خواهد داشت.

هاله شفاف 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. از جمله 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 فرکشن‌های 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 به سورفاکتانت از یک گونه باسیلوس (Deng و همکاران، ۲۰۱۰)، و پروتئاز مقاوم به حلال و درجنت را از باسیلوس سرئوس با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون نشان دادند (Sierecka، ۱۹۹۸). در گام بعدی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این پروتئاز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئاز خالص شده فعالیت بالایی در محدوده اسیدیته بین ۷-۱۱ دارد و بیش‌ترین میزان فعالیت آن در اسیدیته ۱۰ گزارش 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 (Devi و Naidu، ۲۰۰۵) در اسیدیته ۹، از یک گونه باسیلوس (Kaur و همکاران، ۲۰۰۱) در اسیدیته ۹/۶، از باسیلوس مجاونسس (Gupta و Beg، ۲۰۰۳) در اسیدیته ۱۰/۵، از یک گونه باسیلوس گرمادوست و قلیادوست (Johnvesly و Naik، ۲۰۰۱) در اسیدیته ۱۱، از باسیلوس کلسی (Kumar و همکاران، ۲۰۰۴) در اسیدیته ۱۱/۵ جداسازی شدند. پروتئازهای تجاری از میکروارگانسیم‌های متنوع بیشینه فعالیت را در اسیدیته ۱۲-۸ نشان می‌دهند.

بنابراین پروتئاز مورد مطالعه در طیف پروتئازهای تجاری که پیش از این گزارش شده‌اند قرار می‌گیرد که این موضوع از لحاظ بیوتکنولوژی



## تشکر و قدردانی

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

## منابع

- 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 haloalkaliphilic *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.
  ۱. **Akel, H.; Al-Quadani, 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-Tawatana, N.; Painupong, A. and Suintanalert, 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



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: 5804-5812.
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.

