فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۳۷- ۴۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۰۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

# جداسازی، شناسایی و تعیین خصوصیت پروتئاز مقاوم به حلال آلی در *Bacillus* sp. DAF-01

**ارسطو بدویی دلفارد:** استادیار بیوشیمی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، badoei@uk.ac.ir *
**مصطفی امیری بهرامی:** دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، amiri8033@yahoo.com
**علی ریاحی مدوار:** استادیار بیوشیمی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، riahi.ali@gmail.com **
**زهرا کرمی:** استادیار بیوفیزیک، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، zkarami.z@gmail.com
**محمد علی ابراهیمی:** استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، ebrahimi_mpn@yahoo.com

## چکیده

**مقدمه:** باکتری‌های مقاوم به حلال جزو گروه کمابیش جدیدی از باکتری‌های اکسترموفیل هستند که توانایی تولید پروتئازهایی مقاوم به حلال آلی را با کاربرد استفاده در بیوتکنولوژی صنعتی، برای تولید ترکیبات با ارزش دارند. از این رو، یافتن این باکتری‌ها به تازگی مورد توجه ویژه محققان قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق، از چشمه آب گرم گور، واقع در شهرستان جیرفت، نمونه برداری شد. نمونه‌ها در محیط حاوی سیکلوهگزان و تولوئن به مدت سه روز کشت داده شدند. غربال‌گری باکتری‌های مولد پروتئاز روی محیط جامد اختصاصی SKM (Skim milk agar) بر اساس قطر هاله، انجام شد. بهترین گونه باکتریایی توسط روش ۱۶S rDNA شناسایی و میزان فعالیت پروتئازی در دماهای مختلف، اسیدیته و حلال‌های آلی بررسی شد.

**نتایج:** نتایج حاصل از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشان دادند که گونه فوق، ۹۷ درصد به گونه *Bacillus niacini* شباهت دارد. مطالعات آنزیمی نشان داد که این آنزیم در گستره دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت پروتئازی دارد که بیشترین آن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گزارش می‌شود. علاوه بر این، بیشترین فعالیت پروتئازی نیز در محدوده اسیدیته‌های ۸ تا ۹ و بیشترین پایداری در اسیدیته ۹ گزارش می‌شود. بررسی فعالیت پروتئازی در حضور حلال‌های آلی متانول، تولوئن، DMF، ایزوپروپانول و سیکلوهگزان نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیمی باقی مانده نسبت به نمونه فاقد حلال آلی بیش از ۸۰ درصد است.

**بحث و نتیجه‌گیری:** قابلیت‌های گرما دوست بودن، فعالیت در اسیدیته‌های قلیایی و پایداری در حضور حلال‌های آلی این پروتئاز اهمیت درخور توجهی برای استفاده در صنایع مختلف را دارد.

**واژه‌های کلیدی:** پروتئاز، حلال آلی، گرما دوست، غربال‌گری

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
** گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

**مقدمه**

میکروارگانیسم‌ها مهم‌ترین و عمده‌ترین منبع تولید آنزیم‌ها محسوب می‌شوند. در صنعت منابع گیاهی و جانوری به ترتیب تنها ۸ و چهار درصد از کل آنزیم‌های مورد استفاده را شامل می‌شوند و سایر آنزیم‌های مورد استفاده خاستگاه میکروبی دارند (۱). جالب است که بیشتر آنزیم‌های میکروبی قابل تجاری شدن، در تعداد معدودی از جنس‌های قارچی و باکتریایی یافت می‌شوند که در اکثر موارد، شناخته شده‌ترین آن‌ها به گونه‌های باکتریایی *باسیلوس*[1] و *سودوموناس*[2] متعلق هستند (۱-۳).

*باسیلوس*‌ها، تولیدکننده اصلی بیشتر پروتئازهای تجاری هستند (۳ - ۵). با وجود این، یافتن آنزیم‌هایی با خصوصیات ویژه، همواره مورد توجه دانشمندان بوده و باعث شده آن‌ها منابع پروتئازی جدیدی با خصوصیات و عملکردهای متنوع را جستجو کنند. پروتئازها در صنایع متعدد از جمله سنتز پپتید، فرآوری پروتئین، غذایی، دارویی و شوینده، کاربردهای فراوانی دارند. این آنزیم‌ها در محیط آبی پیوند پپتیدی را هیدرولیز کرده و در عدم حضور آب، باعث تشکیل پیوند پپتیدی می‌شوند (۶ و ۷). به طور کلی، از مزیت‌های استفاده از آنزیم‌ها در حضور حلال‌های آلی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: افزایش حلالیت سوبستراهای غیرقطبی، تغییر جهت تعادل ترمودینامیکی به سمت سنتز به جای هیدرولیز، محدود شدن واکنش‌های جانبی وابسته به آب، تغییر در سوبسترا و انتخاب‌گری کایرالیته مورد نیاز در صنایع شیمیایی و دارویی، افزایش پایداری دمایی، حذف آلودگی میکروبی و این‌که آنزیم‌ها را می‌توان به طور مستقیم در فرایند شیمیایی بعدی یا جدید استفاده کرد. با وجود این مزیت‌ها، حلال‌های آلی با جدا کردن مولکول‌های آب پروتئین، باعث تخریب ساختار سه بعدی و دناتوره شدن پروتئین می‌شوند و استفاده از آن‌ها در محیط حلال آلی همواره با این چالش بزرگ همراه است (۸ - ۱۰). از این رو، تلاش‌های زیادی برای پایدارسازی پروتئازها در حضور حلال‌های آلی، از جمله بهینه سازی شرایط محیط فعالیت آنزیمی (مهندسی محیط) و بهینه‌سازی پایداری خود آنزیم (مهندسی پروتئین) انجام شده است (۱۱).

باکتری‌های مقاوم به حلال آلی، گروه کمابیش جدیدی از میکروارگانیسم‌های اکسترموفیل هستند که به علت داشتن ویژگی‌های سازشی مثل مکانیسم‌های سریع ترمیمی غشا، پمپ‌های خارج کننده تولوئن، ایزومریزاسیون سیس‌ترانس اسیدهای چرب قادرند در شرایط نامساعد در حضور حلال‌های آلی زندگی کنند. علاوه بر این، آنزیم‌های موجود در این باکتری‌ها نیز فعالیت و پایداری خود را در حضور حلال‌های آلی حفظ می‌کنند (۱۲). پروتئازها پر مصرف‌ترین آنزیم‌های صنعتی می‌باشند که حدود ۶۰ درصد از بازار جهانی آنزیم‌ها را به خود اختصاص داده اند. از پروتئازهای مقاوم به حلال آلی برای سنتز ترکیبات با ارزش دارویی و صنعتی استفاده می‌شود. از این رو، یافتن باکتری‌های مولد پروتئاز مقاوم به حلال آلی، از جمله موضوع‌های جالب بوده که قابلیت‌های زیادی در بیوتکنولوژی صنعتی و دارویی دارد. یکی از مهم‌ترین این پروتئازها، پروتئاز PST-01 است که از باکتری *سودوموناس آریزونا* در سال ۲۰۰۱ جداسازی شد (۱۳). در حالی‌که نیمه عمر آن در عدم حضور حلال آلی ۹/۷ روز است، در حضور برخی حلال‌های آلی مثل متانول، ایزوپروپانول، اتیلن گلیکول بیشتر از ۵۰ روز گزارش شده است (۱۴). در این مقاله، یک باکتری مقاوم به حلال آلی مولد آنزیم پروتئاز از چشمه آب گرم گور[3]

در شهرستان جیرفت جداسازی شد. پروتئاز این باکتری با آمونیوم سولفات ۶۰ درصد به طور مختصر خالص‌سازی و سپس خصوصیات بیوشیمیایی آن، از جنبه کاربردهای بیوتکنولوژی بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی

تریس، تریپتون، عصاره مخمر و کازئین از شرکت لیوفیلچم[۴] (ایتالیا)، خریداری شد. مواد مورد نیاز برای PCR (10X PCR buffer)، (10mM) dNTP، $MgCl_2$ (20mM) و آنزیم Taq DNA polymerase از شرکت سیناژن و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. همین طور پرایمرهای مورد نیاز توسط شرکت بیونیر (کره) سنتز شد. حلال‌های آلی مورد نیاز از شرکت مرک خریداری شدند.

### غربال‌گری باکتری‌های مولد پروتئاز مقاوم به حلال آلی

نمونه برداری از چشمه آب گرم گور با دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در آزمایشگاه در محیط نوترینت براث حاوی ۳۰ درصد سیکلوهگزان و تولوئن به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (برای جلوگیری از تبخیر حلال آلی) کشت داده شد. پس از این مدت، پنج میلی‌لیتر از این محیط برداشته و به محیط تازه حاوی ۳۰ درصد سیکلوهگزان و تولوئن تلقیح شد (۱۵). پس از ۲۴ ساعت رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط برداشته و روی محیط جامد اختصاصی SKM کشت داده شد. گونه باکتریایی که بیشترین هاله را پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون نشان می‌داد به عنوان سوش بهینه مولد پروتئاز مقاوم به حلال آلی انتخاب شد.

### شناسایی سویه

از روش مولکولی ۱۶S rDNA برای شناسایی گونه مورد نظر استفاده شد (۱۶). ابتدا باکتری روی محیط نوترینت آگار کشت چمنی داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد.

باکتری‌های رشد یافته به کمک لوپ از سطح محیط کشت جمع آوری و سوسپانسیونی از آن در آب مقطر استریل تهیه شد. با سانتریفیوژ سوسپانسیون حاصل در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در دور ۸۰۰۰g رسوب باکتری به دست آمد. جداسازی DNA ژنومی با استفاده از کیت سیناژن انجام شد. به منظور تخمین کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده، جذب محلول رقیق شده DNA (با رقت ۱۰۰) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. با استفاده از رابطه $\text{Conc. DNA } (\mu g/ml)=50.d.A_{260}$ و نسبت $A_{260}/A_{280}$ به ترتیب غلظت DNA و میزان خلوص آن تخمین زده شد (۱۷). پرایمرها مطابق با پرایمرهای عمومی برای تکثیر ژن ۱۶S rDNA به شکل زیر طراحی شدند (۱۶): پرایمر Forward: 5' -AGT TTG ATC CTG GCT CAG – 3' با $T_m$ = 53/7 ºC و Reverse primer: 5' -GGC/T TAC CTT GTT ACG ACT T-3' با $T_m$ = 53/4 ºC. واکنش PCR مطابق با برنامه ذیل انجام شد: ۱) دمای اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، برای مدت پنج دقیقه؛ ۲) ۳۰ سیکل که هر کدام شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد ، ۴۵ ثانیه و ۵۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۹۰ ثانیه؛ ۳) برای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد، برای مدت ۸ دقیقه. محصول PCR پس از الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد با استفاده از کیت استخراج DNA خالص‌سازی

شد. سپس توالی DNA با استفاده از توالی یاب DNA توسط بیونیر (کره) تعیین شد.

**تولید آنزیم و خالص سازی جزیی**

محیط پیش کشت شامل ترکیبات زیر است:

Nutrient broth (8 g/L), soya meal (17 g/L), peptone (10 g/L), tryptone (10 g/L), NaCl (5 g/L)

اسیدیته این محیط‌های کشت قبل از اتوکلاو به ۶/۸ رسانده شد. محیط کشت تولید آنزیمی شامل: Yeast extraet (17 g/l) tryptone (10 g/L), NaCl (5 g/L) بود. اسیدیته این محیط‌های کشت، قبل از اتوکلاو به ۷ رسانده شد (۱۸). ۴۸ ساعت پس از تلقیح محیط تولید به وسیله محیط پیش کشت، محیط کشت حاوی باکتری تکثیر یافته را به مدت ۱۰ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد با دور ۵۰۰۰g سانتریفوژ کرده و به محلول رویی که به ظرف دیگری منتقل شده بود، محلول PMSF (فنیل متیل سولفونیل فلورایـد) اضافه شد؛ به‌طوری که غلظت نهایی آن در محیط یک میلی‌مولار باشد. به محلول رویی در حال هم زده شدن آمونیوم سولفات اضافه شد تا به ۶۵ درصد درجه اشباع برسد. سپس به مدت پنج ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از سپری شدن این زمان در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب حاصل در حداقل حجم بافر ۲۰ میلی‌مولار تریس با اسیدیته ۷/۸ حل شد. محلول پروتئینی غلیظ شده حاوی فعالیت پروتئازی، حداقل سه بار در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در حضور این بافر دیالیز و برای مطالعات آنزیمی استفاده شد.

**اندازه گیری فعالیت پروتئازی**

فعالیت پروتئازی با استفاده از سوبسترای کازئین به عنوان سوبسترای طبیعی مطالعه شد. هیدرولیز کازئین توسط محلول آنزیمی با اندازه‌گیری جذب در ۲۸۰ نانومتر به روش نقطه پایان اندازه‌گیری شد. محلول واکنش ۵۰۰ میکرولیتر شامل: ۲۵۰ میکرولیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸، ۲۰۰ میکرولیتر محلول کازئین ۲ درصد و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی بود. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد تری‌کلرو استیک اسید (TCA) افزوده و در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. محلول رویی حاوی اسیدهای آمینه هیدرولیز شده سوبسترای کازئین است که جذب آن در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد(۱۹). در تمامی واکنش‌ها از محلول شاهد استفاده شد که قبل از افزودن آنزیم، محلول TCA اضافه می‌شد. آزمایشات سه بار تکرار و انحراف معیار آنها محاسبه شد.

**تعیین زمان و اسیدیته بهینه برای تولید آنزیم**

به منظور یافتن زمان بهینه تولید پروتئاز، تولید آنزیم در زمان‌های متعدد پس از کشت (از طریق سنجش فعالیت آنزیمی) بررسی و نیز اثر اسیدیته در تولید پروتئاز مطالعه شد. به این منظور، محیط تولید در اسیدیته‌های متعدد بین ۵ تا ۸ تهیه و استفاده شد.

**تعیین خصوصیات آنزیمی**

**اندازه گیری فعالیت و پایداری در اسیدیته‌های مختلف**

برای تعیین اسیدیته بهینه برای عملکرد آنزیم، بافر مخلوط حاوی ۵۰ میلی‌مولار بافرهای زیر تهیه شد:

Glysine (2-4), acetate-Na (4-6), phosphate-Na (6-8), Tris-base (8-10), Glycine (10-12). سپس با رساندن اسیدیته محیط واکنش آنزیمی به اسیدیته‌های مورد نظر، فعالیت آنزیم در آن اسیدیته‌ها اندازه گیری شد.

### بررسی فعالیت و پایداری پروتئاز در دماهای مختلف

بررسی فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف طبق روش استاندارد انجام شد با این تفاوت که در هر بار از یک دمای انکوباسیون متفاوت (۲۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. بیشترین فعالیت آنزیمی به دست آمده، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته و میزان فعالیت در سایر دماها نسبت به آن سنجیده می‌شود. برای تعیین پایداری، آنزیم‌ها در دماهای ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از انکوباسیون نمونه برداری انجام و به مدت ۲۰ دقیقه در یخ قرار داده شدند. سپس میزان فعالیت آنزیمی باقی مانده طبق روش استاندارد اندازه‌گیری شد.

### بررسی پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی در دمای اطاق

برای بررسی پایداری آنزیم در حلال‌های آلی در دمای اطاق، غلظت (V/V) ۴۰ درصد از حلال‌های آلی دی متیل فورمامید، متانول، ایزوپروپانول، کلروفرم، سیکلو هگزان در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس و با اسیدیته مورد نظر تهیه شد. سپس مقدار مساوی از این حلال و آنزیم در یک میکروتیوپ با هم مخلوط شد. مقدار غلظت نهایی حلال در زمان انکوباسیون (V/V) ۲۰درصد بود. سپس میکروتیوپ‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. پس از این مدت، میزان فعالیت باقی مانده آنزیم در آن‌ها ارزیابی شد (۲۰). مقدار غلظت نهایی حلال (V/V) دو درصد بود.

## نتایج

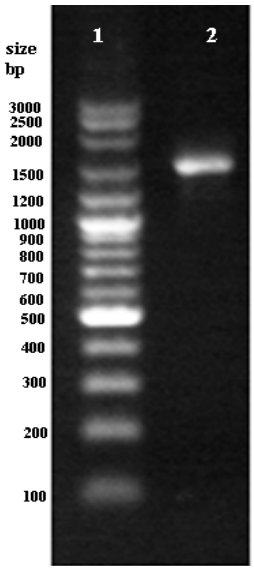
### غربال‌گری و شناسایی گونه باکتری مولد پروتئاز مقاوم به حلال آلی

چشمه آب گرم گور دارای دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۵ است که در جنوب استان کرمان و در شهرستان جیرفت واقع شده است. نمونه‌های آب برداشته شده از دهانه چشمه به محیط کشت حاوی ۳۰ درصد تولوئن و ۱۰ درصد سیکلوهگزان تلقیح شدند. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض شد. نمونه‌ها روی محیط جامد SKM (Skim milk agar) کشت داده شدند و باکتری‌هایی که پس از ۴۸ ساعت در اطراف کلونی هاله ایجاد کرده بودند مقایسه شدند. گونه باکتریایی که بیشترین هاله را در اطراف کلونی نشان داده بود به‌عنوان بهترین سوش انتخاب شد (شکل ۱) و بر روی آن مطالعه شد.

شکل ۱- غربال‌گری باکتریایی *Bacillus* sp. DAF-01 مولد پروتئاز روی محیط SKM

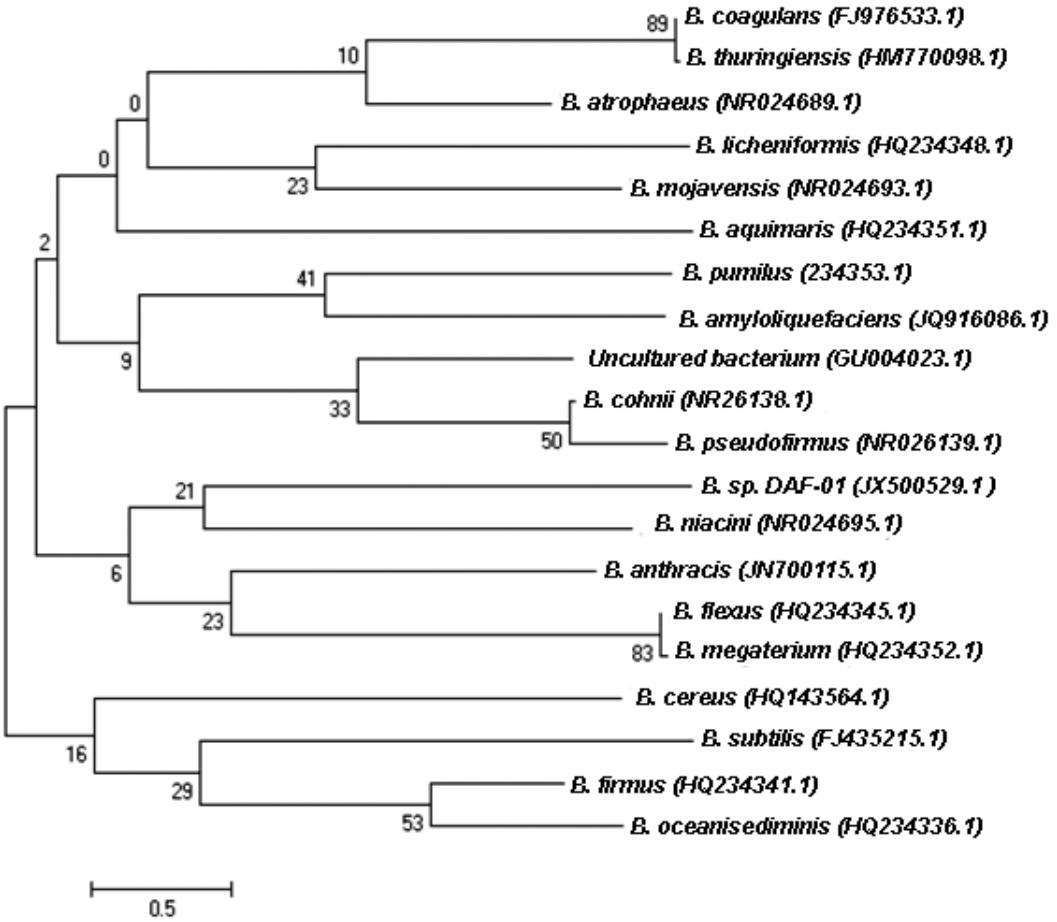
### تعیین گونه میکروارگانیسم با استفاده ۱۶S rDNA

تعیین گونه باکتریایی با استفاده از اطلاعات حاصل از ۱۶S rDNA انجام می‌شود (۱۶). برای تهیه DNA ژنومی باکتری از کیت استخراج DNA سیناژن استفاده شد و DNA تکثیر یافته با استفاده از PCR (شکل ۲)، توسط کیت تخلیص DNA از شرکت سیناژن تخلیص شد و سپس برای تعیین توالی به شرکت بیونیر (کره) ارسال شد.




شکل ۲- محصول PCR ژن ۱۶S rDNA باکتری *Bacillus* sp. DAF-01 (چاهک شماره ۲) و DNA ladder (چاهک شماره ۱).

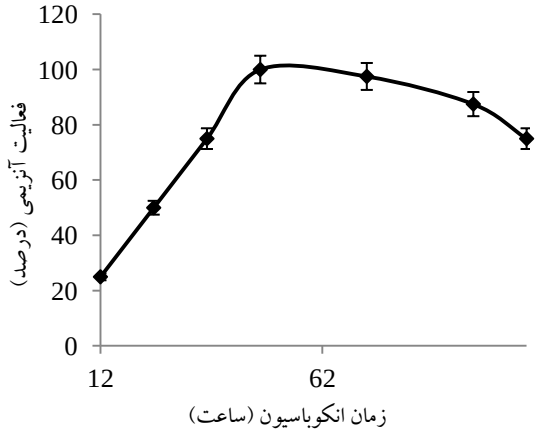
بعد از تعیین توالی محصول PCR در مقایسه با سایر ژن‌های ۱۶S rDNA درخت فیلوژنتیکی برای آن رسم شد. رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA4 و مقایسه توالی ۱۶S rDNA باکتری *Bacillus* sp. DAF-01 با ۱۹ گونه‌های باسیلوس موجود در مرکز ملی بیوتکنولوژی[5] انجام شده است (۲۱ و۲۲). نتایج حاصل از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشان دادند که گونه فوق به گونه *Bacillus niacini* نزدیک است که میزان شباهت نوکلئوتیدی آنها ۹۷ درصد می‌باشد (شکل ۳). عدد دسترسی توالی نوکلئوتیدی ارائه شده در بانک ژنی، تحت عنوان JX500529 است.




شکل ۳- درخت فیلوژنی باکتری مولد پروتئاز باکتریایی مقاوم به حلال آلی جدا شده از چشمه آب گرم

## بهینه سازی شرایط تولید آنزیم

از آن‌جا که زمان انکوباسیون تأثیر مهمی بر میزان ترشح آنزیم دارد، در ابتدا این متغیر بررسی شد. در این تحقیق، فعالیت آنزیم پس از گذشتن زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اندازه گیری شده است. نتایج نشان می‌دهد که در زمان ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون تولید آنزیم به حد اکثر مقدار خود می‌رسد(شکل ۴).



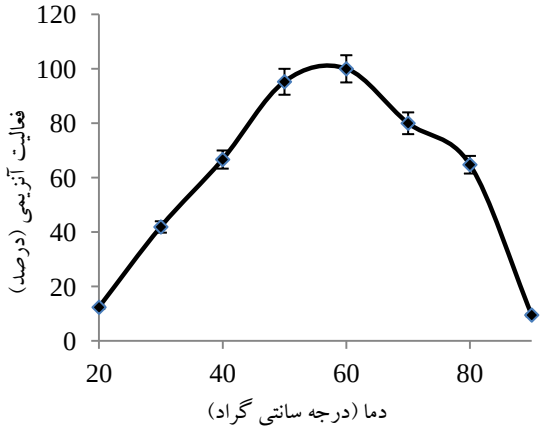

شکل ۴- بهینه سازی زمان تولید پروتئاز باکتریایی *Bacillus* sp. DAF-01

تولید آنزیم در محیط‌های با اسیدیته مختلف نیز بررسی شد. در محیط کشت تولید از بافر فسفات استفاده شد که در اسیدیته‌های مختلف بین ۵ تا ۸ تنظیم شده بود. پس از ۴۸ ساعت از تلقیح محیط تولید توسط باکتری تکثیر یافته در محیط پیش کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محیط‌های کشت سانتریفوژ شده و فعالیت پروتئازی در شرایط استاندارد بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین تولید به اسیدیته ۷ مربوط است. از این رو، در مراحل بعدی برای تولید آنزیم پروتئاز، اسیدیته محیط به ۷ رسانده شد و مدت زمان کشت در محیط تولید ۴۸ ساعت انتخاب شد.

## تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم پروتئاز

بررسی فعالیت و پایداری پروتئاز در دماهای مختلف

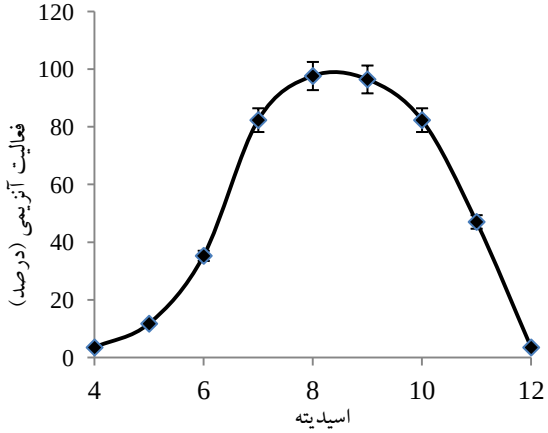
میزان فعالیت آنزیمی در دمای ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد اندازه گیری شد که در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که این آنزیم در گستره دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد فعال است و بیشترین فعالیت در دمای ۶۰ تا ۷۰درجه سانتی‌گراد است که این فعالیت به زیستگاه طبیعی باکتری که در دمای ۶۲ است نزدیک است.




شکل ۵- میزان فعالیت آنزیمی را در زمان‌های مختلف نتایج نشان می دهد که این آنزیم بیشترین فعالیت را در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد.

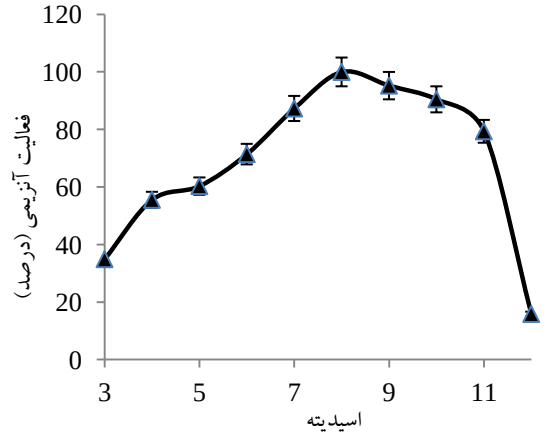
## اندازه گیری فعالیت و پایداری در اسیدیته‌های مختلف

برای مطالعه اثر اسیدیته بر فعالیت پروتئازی، پروتئاز دراسیدیته‌های مختلف انکوبه شده و فعالیت آن اندازه‌گیری شده است. نتایج نشان داد که این آنزیم در محدوده وسیعی از اسیدیته فعال بوده و بیشترین فعالیت خود را در محدوده اسیدیته‌های ۸ تا ۹ نشان می‌دهد (شکل ۶).




شکل ۶- فعالیت پروتئازی *Bacillus* sp. DAF-01 در حضور اسیدیته‌های مختلف

علاوه بر این، پایداری اسیدیته این آنزیم نیز پس از انکوبه کردن به مدت ۳۰ دقیقه در اسیدیته‌های مختلف نیز بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که پایداری بهینه این پروتئاز در اسیدیته ۸ است (شکل ۷). قبل و بعد از این اسیدیته نیز پایداری کاهش می‌یابد که تاکیدی بر خاصیت قلیایی آن دارد.




شکل ۷- پایداری پروتئاز *Bacillus* sp. DAF-01 در حضور اسیدیته‌های مختلف

## بررسی حلال‌های آلی روی فعالیت و پایداری پروتئاز

فعالیت آنزیمی باقی مانده پس از ۳ ساعت انکوباسیون در حضور ۲۰ درصد حلال آلی نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت پروتئازی در حضور حلال‌های آلی DMF و متانول (به ترتیب ۱۰ و ۲۵ درصد) بیش از نمونه کنترل فاقد حلال است. در حضور سایر حلال‌ها نیز، میزان فعالیت آنزیمی باقی مانده بیش از ۸۵ درصد است(جدول ۱).

جدول ۱- میزان فعالیت پروتئازی پس از ۳ ساعت انکوباسیون در حضور ۲۰ درصد حلال‌های آلی

| Organic solvent | Remaining activity (%) |
|---|---|
| No O. S. | 100 |
| DMF | 110 |
| Isopropanol | 86 |
| Cloroform | 94 |
| Methanol | 125 |
| Cyclohexane | 92 |

## بحث و نتیجه‌گیری

بیشترین فعالیت پروتئاز مورد مطالعه در دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد است که قابلیت استفاده از این آنزیم گرمادوست را در صنعت نشان می‌دهد. دمای بهینه پروتئاز جدا شده از باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*[۶] PE-11، ۶۰ درجه سانتی‌گراد است. دمای بهینه یک پروتئاز قلیایی از *باسیلوس استئاروترموفیلوس*[۷] AP-4، نیز ۵۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (۱۸ و ۲۳). در حالی که جو[۸] و همکاران یک پروتئاز قلیایی با دمای بهینه حدود ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد را گزارش کرده اند (۲۴). گوربل[۹] و همکاران نیز یک پروتئاز از *باسیلوس سرئوس* با دمای بهینه ۶۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند (۲۵).

فعال بودن آنزیم در محدوده اسیدیته‌های بازی نشان از خاصیت قلیایی این آنزیم دارد که این موضوع از لحاظ بیوتکنولوژیکی قابل توجه است. اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیمی و اسیدیته بهینه برای پایداری آنزیمی به ویژگی‌های جایگاه فعال آنزیم از جمله رزیدوهای جایگاه فعال آنزیم وابسته است و تحت تاثیر ساختار آنزیم است. معمولا رابطه مستقیمی بین شرایط بهینه فعالیت آنزیمی و شرایط زیست باکتری وجود ندارد. پروتئازهای مقاوم به حلال از باکتری‌های سودوموناس *آریزونا*[۱۰] PseA و *باسیلوس سرئوس*[۱۱] BG1 نیز جداسازی شده که اسیدیته بهینه آن‌ها بین ۸ تا ۹ گزارش می‌شود. در حالی که در اسیدیته‌های بالاتر از ۱۰ فعالیت خود را به طور کامل از دست داده اند (۲۶ و ۲۷). بسیاری از پروتئازهای جدا شده از *باسیلوس*ها در اسیدیته‌های قلیایی فعالیت می‌کنند. سوبتیلیزین کارلسبرگ[۱۲] باکتری *باسیلوس لچنیفورمیس*[۱۳] فعالیت بهینه خود را در اسیدیته ۸ تا ۱۰ نشان می‌دهد (۱۲ و ۱۸).

پروتئاز *Bacillus* sp. DAF-01 در حضور تمامی حلال‌های مورد مطالعه، بیش از ۸۵ درصد از فعالیت پروتئازی خود را حفظ کرده است. این نتایج نشان از پایداری این پروتئاز در حضور حلال‌های آلی دارد. علاوه بر این، در حضور حلال آلی متانول نیز ۲۵ درصد افزایش فعالیت نشان می‌دهد. فعالیت پروتئاز *باسیلوس* گونه RN2 در حضور بنزن، دی اتیل اتر و استون به میزان ۱۰۸، ۱۰۲ و ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۱۲). پروتئاز HR-08 نیز در حضور حلال آلی ایزوپروپانول به میزان ۲۰ درصد افزایش فعالیت نشان می‌داد در حالی که در حضور حلال آلی پروپانول فعالیت آن کاهش نشان می‌داد (۱۸).

باکتری‌های مقاوم به حلال آلی به علت داشتن آنزیم‌هایی با مقاومت و کارایی بالا در حضور حلال‌های آلی مورد توجه ویژه قرار گرفته اند. در صورت یافتن پروتئاز مقاوم به حلال می‌توان بدون استفاده از روش‌های پر هزینه و زمان‌بر مهندسی پروتئین، بر چالش غیر فعال شدن پروتئازها در محیط حلال آلی غلبه کرد. نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری غربال شده مولد پروتئازی است که ویژگی‌های ممتازی مثل گرما دوست بودن، فعالیت در اسیدیته‌های بازی و پایداری قابل توجه در حضور حلال‌های آلی را دارد که هرکدام از آنها در بیوتکنولوژی سنتزی اهمیت در خور توجهی دارند. با توجه به این خصوصیات، این آنزیم می‌تواند در صنعت برای سنتز ترکیبات با ارزش دارویی و صنعتی در حضور حلال‌های آلی، استفاده شود.

## تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران (طرح پژوهشی شماره ۱/۳۱۲۱) و دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است که بدین‌وسیله از مسئولین محترم این سازمان ها سپاسگزاری می شود.

## References


(1) Bornscheuer U, Pohl M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5(2): 137-43.

(2) Bommarius AS, Riebel BR. *Biocatalysis: fundamentals and applications*. Weinheim: Wiley-VCH; 2007.

(3) Archer D. Enzyme production by recombinant *Aspergillus*. *Bioprocess Technol* 1994; 19: 373-93.

(4) Sheppard P, Grant F, Oort P, Sprecher C, Foster D, Hagen F, et al. The use of conserved cellulase family specific sequences to clone cellulase homologue cDNAs from *Fusarium oxysporum*. *Gene* 1994; 150(1): 163-67.

(5) Wahler D, Reymond J. Novel methods for biocatalyst screening. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5(2): 152–58.

(6) Rao M, Tanksala A, Ghatge M, Deshpande V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(3): 597-635.

(7) Kumar C, Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. *Biotechnol Adv* 1999; 17(7): 561–94.

(8) Clapes P, Torres-Luis J, Adlercreutz P. Enzyme peptide synthesis in low water content systems: preparative enzymatic synthesis of [Leu]-and [Met]-enkephalin derivatives. *Bioinorg Ned Chem* 1995; 3(3): 244-55.

(9) Ogini H, Ishikavawa H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J Biosci Bioeng* 2001; 91(2): 109-16.

(10) Mattos C, Ring D. Proteins in organic solvents. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11(6): 761- 4.

(11) Noriyuki D, Hiroyasu O. Organic solvent-tolerant enzymes**.** *Biochem Eng J* 2010; 48(3): 270–82.

(12) Sardessai Y, Bhosle S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnol Prog* 2004; 20(3): 655-60.

(13) Ogino H, Watanabe F, Yamada M, Nakagawa S, Hirose T, Noguchi A, et al. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. *J Biosci Bioeng* 1999; 87(1): 61–8.

(14) Tang X, Pan Y, Li S, He B. Screening and isolation of an organic solvent-tolerant bacterium for high-yield production of organic solvent-stable protease. *Bioresour Technol*. 2008; 99(15): 7388-92.

(15) Badoei Dalfard A, Khajeh Kh, Soudi M R, Naderi-Manesh H, Ranjbar B, Sajedi HR. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzym Microb Technol* 2006; 39(7): 1409-16.

(16) Sambrook, J, Russell D. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. NewYork: Cold Spring Harbor: 2001.

(17) Moradian F, Khajeh K, Naderi-Manesh H, Sadeghizadeh M. Isolation, purification and characterization of a surfactants-, laundry detergents- and organic solvents-resistant alkaline protease from *Bacillus* sp. HR-08. Appl Biochem Biotechnol 2009; 159(1): 33-45.

(18) Pazhang M, Khajeh Kh, Ranjbar B, Hosseinkhani S. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of TLN. *J Biotechnol.* 2006; 127(1): 45-53.

(19) Badoei-Dalfard A, Khajeh K, Asghari SM, Ranjbar B, Karbalaei-Heidari HR. Enhanced activity and stability in the presence of organic solvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. *J Biochem* 2010; 148(2): 231–38.

(20) Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol Syst Biol* 2011; 7: 1-6.

(21) Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Bio Evo* 2007; 24: 1596-99.

(22) Adinarayana K, Ellaiah P, Prasad DS. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech*, 2003; 4(4): 440–8.

(23) Joo H-S, Park G-C, Kim KT, Paik SR, Chang C-S. Simple methods for alkaline protease purification from the polychaeta, *Periserrula leucophryna. Proc Biochem* 2001; 37: 299–303.

(24) Ghorbel B, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Stability studies of protease from Bacillus cereus BG1. *Enzym Microb Technol* 2003; 32(5): 513-8.

(25) Gupta A, Roy I, Khare SK, Gupta MN. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA, *J Chromatogr A*, 2005; 1069 (2):155-61.

(26) Shah K, Mody K, Keshri J, Jha B. Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. *J Mol Catal B: Enzym* 2010; 67(2): 85–91.

(27) Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *App Microbiol Biotech* 2002; 59:15-32.

---

[1]. *Bacillus*
[2]. *Pseudomonas*
[3]. Gever
[4]. liofilchem
[5]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov(NCBI)
[6]. Bacillus subtilis
[7]. Bacillus stearothermophilus
[8]. Joo
[9]. Ghorbel
[10]. Pseudomonas aeruginosa
[11]. Bacillus cereus
[12]. Subtilisin Carlsberg
[13]. Bacillus licheniformis

# Isolation, identification and characterization of organic solvent tolerant protease from *Bacillus sp.* DAF-01

**Arastoo Badoei-Dalfard** *
Assistant Professor of Biochemistry, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, badoei@uk.ac.ir
**Mostafa Amiri-Bahrami**
M.Sc. of Agriculture biotechnology, University of Payam-noor, Tehran, Iran, amiri8033@yahoo.com
**Ali Riahi-Madvar** **
Assistant Professor of Biochemistry, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, riahi.ali@gmail.com
**Zahra Karami**
Assistant Professor of Biophysics, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, zkarami.z@gmail.com
**Mohammad Ali Ebrahimi**
Assistant Professor of Agricultural biotechnology, University of Payam-noor,Tehran, Iran, ebrahimi_mpn@yahoo.com

## Abstract

**Introduction:** Organic solvent-tolerant bacteria are relatively novel extermophilic microorganisms, which can produce organic tolerant protease with capacity of being used in industrial biotechnology for producing high-value compounds. Therefore, finding of these bacteria has drawn much researchers attention nowadays.

**Materials and Methods:** In this project, samples were collected from a hot spring, located in Jiroft. Samples were incubated in medium supplemented with cyclohexane and toluene for 3 days. Screening of protease producing bacteria was performed on the specific media, SKM (Skim milk agar), based on clear area diameter. The best bacterium was identified based on 16s rDNA gene. Protease activity was considered in different temperatures, pH and organic solvents.

**Results:** Sequence alignment and phylogenetic tree results showed that this bacteria was closely related to *Bacillus niacini*, with 97% homology. Enzymatic studies showed that, this enzyme was active at a wide range of temperatures, 20-90 °C and it,s optimal activity was in 60 °C. In addition, maximum protease activity was obtained in the 8-9 range of pH, and optimal stability was also at pH 9.0. Protease activity in the presence of methanol, toluene, isopropanol, cyclohexane and DMF showed that, remaining activity was at least 80% compared to the control (without organic solvent)

**Discussion and Conclusion:** Thermopilic capacity, being active in alkaline protease and high protease stability in the presence of organic solvents all herald a remarkable application for using in different industries.

**Key words:** protease, organic solvents, thermopile, screening

* Corresponding Author
** Department of Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
**Received:** August 29, 2012/ **Accepted:** December 29, 2012