بهینه‌سازی تولید آنزیم آلکالین پروتئاز به سویه‌ای از جنس *Bacillus* جدا شده از خاک

معصومه انوری[۱]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۰
تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۶

چکیده

۲۲ سویه باکتری قلیادوست از خاک‌های نمکی قلیایی استان گیلان در محیط milk Agar به‌منظور بررسی توانایی تولید آنزیم آلکالین پروتئاز جداسازی شد. از میان باکتری‌های جداسازی شده، اعضای جنس باسیلوس بیشترین توانایی تولید را نشان دادند. بررسی اثر درجه‌ی حرارت، زمان انکوباسیون، منبع کربن، ازت و pH نشان داد که بهترین شرایط تولید، به‌ترتیب در ۴۰ °C به‌مدت ۲۰ ساعت با استفاده از ۱/۵٪ گلوکز (وزنی به حجمی)، ۱٪ سولفات آمونیوم (وزنی به حجمی) و pH = ۹/۵ است.

واژه های کلیدی: *آلکالین پروتئاز، گونه‌ی باسیلوس، قلیادوست.*

مقدمه

آنزیم‌ها در صنایع و نیز مصرف خانگی کاربرد گسترده‌ای دارند. از میان آن‌ها پروتئازهای میکروبی یکی از سه نوع مهم گروه‌های آنزیم‌های حقیقی هستند و قریب به ۶۰ درصد از فروش کلّی آنزیم‌ها را در بازار به خود اختصاص می‌دهند. پروتئاز میکروبی بر حسب pH ای که در آن حداکثر فعالیت را دارند، شامل انواع اسیدی خنثی و قلیایی است. پروتئازهای قلیایی در دترجنت‌های خانگی، فرآوری مواد غذایی، استفاده در صنایع دارویی، کاغذسازی، فیلم‌های پرتونگاری x و... کاربرد گسترده‌ای دارند (Mukherjee et al., 2008, Rai et al., 2009). گونه‌های جنس باسیلوس بهترین منابع تجاری برای تولید آلکالین پروتئازها دانسته می‌شوند (Sundararajan et al., 2011) و استفاده از باسیلوس‌ها برای تولید آنزیم پروتئاز بارها گزارش شده است (Haddar et al., 2009).

به خوبی روشن شده است، تولید پروتئازهای خارج سلولی به‌وسیله‌ی میکروارگانیسم‌ها، به اجزای محیط کشت، به‌ویژه نوع منابع کربن و ازت و فاکتورهای مؤثر محیطی، چون درجه‌ی حرارت، pH، زمان انکوباسیون، هوادهی و میزان تلقیح بستگی دارد (Haddar et al., 2010). با توجه به اینکه قریب به ۳۰ تا ۴۰ درصد از هزینه‌های تولید صنعتی آنزیم به محیط رشد اختصاص دارد،

۱. استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت anvari@yahoo.com

بهینه‌سازی ترکیب محیط بسیار مهم و ضروری است (Kirk et al., 2002)؛ بنابراین افزایش تولید پروتئاز میکروبی تنها با بهینه‌سازی ترکیب محیط میسر است. نمی‌توان فرمولی ثابت برای تمام باکتریهای تولیدکننده تعیین کرد. هر سویه برای ماکزیمم تولید آنزیم، نیازهای خاصی دارد (Gupta et al. 2002).

اثر شرایط محیط بر تولید آنزیم‌های پرتئولیتیک خارج سلولی نقشی مهم در القاء یا مهار تولید آنزیم‌ها دارد (Wang et al. 2007). تولید پروتئازها به دسترسی به منابع کربن و ازت در محیط نیاز دارد که بر سنتز آنزیم اثرات تنظیمی بگذارند (Chu et al. 1992).

هدف از انجام این تحقیق جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم آلکالین پروتئاز از خاک‌های قلیایی، بررسی شرایط تولید و بهینه‌سازی این شرایط و معرفی بهترین محیط به‌منظور تولید آنزیم بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و غربالگری میکرو ارگانیسم‌ها: در مجموع تعداد ۵۰ نمونه خاک قلیایی مناطق لوشان، منجیل و رودبار استان گیلان برای جداسازی باکتری‌های قلیادوست در محیط milk Agar حاوی skim (۱۰۰ g/l) و عصاره‌ی مخمر (۱۰ g/l) با ۹ = pH کشت داده شد.

۵ سویه که از نظر تولید آنزیم واکنش مثبت (تشکیل هاله) نشان دادند، برای آزمایش‌های بعدی شناسایی شد.

شناسایی باکتری‌ها : برای این کار از کلنی‌ها لام گرم تهیه شد و شکل، آرایش و نتایج واکنش گرم بررسی شد. همچنین لام مربوط به رنگ‌آمیزی اسپور تهیه شد. سایر آزمایشات تأییدی انجام‌شده، شامل آزمایش ژلاتیناز، احیای نیترات، هیدرولیز نشاسته، وژپروسکوئر و تخمیر قندها بود (Altschul et al. 1997).

بررسی تولید آنزیم: این سویه‌ها دوباره در محیط حاوی تولید آنزیم کشت داده شد. برای این کار یک میلی‌لیتر از کشت باکتری‌های فوق به ارلن‌های ml ۲۵۰، شامل کازئین (۱۰ g/l)، عصاره‌ی مالت (۱۰ g/l)، پپتون (۱۰ g/l) و کربنات سدیم (۱۰ g/l) با ۹ = pH به مدت ۲۴ ساعت در ۳۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور ۲۵۰ rpm (تحت شیکر) گرم‌خانه‌گذاری شدند؛ سپس کشت‌ها در ۸۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ و فعالیت آنزیم در سوسپانسیون رویی بدون سلول اندازه‌گیری شد (Singh et al. 2004). از میان باکتری‌های موضوع آزمایش، سویه‌ای که بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان داد، برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد.

بهینه‌سازی تولید آنزیم: برای بررسی اثر زمان انکوباسیون بر تولید آنزیم، کشت‌هایی از سویه‌ی باکتریایی جداسازی شده در محیط فوق در شرایط دمایی ۳۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۹ = pH از ۴۸-۵ ساعت انجام شد؛ بدین ترتیب که در فواصل زمانی معین از فرایند تخمیر نمونه‌گیری شد و فعالیت آنزیم ارزیابی شد.

در مرحله‌ی بعد برای بررسی اثر دما بر بهینه‌سازی تولید آنزیم، آزمایش‌هایی در حرارت‌های ۴۵-۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در محیط کشت تولید آنزیم و در pH=۹ انجام شد. آزمایش‌های بعدی برای بهینه‌سازی pH از ۱۲-۸ در محیط کشت تولید آنزیم در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد؛ سپس در شرایط بهینه اثر استفاده از منابع کربن، یعنی قندهای ساکاروز، گلوکز، فروکتوز و لاکتوز (۱/۵٪ وزنی به حجمی) و عصاره‌ی مخمر (۱٪ وزنی به حجمی) همراه با پپتون (۰/۵٪ وزنی به حجمی)، همچنین منابع ازتِ نیترات آمونیوم، سولفات آمونیوم و کازئین (۱٪ وزنی به حجمی) بررسی شد (Dutta et al., 2004; Potumarthi et al., 2007; Uyar et al., 2004).

ارزیابی عملکرد آنزیم: فعالیت پروتئولیتیک آنزیم با استفاده از سوبسترا، کازئین انجام شد (Yanga et al., 2000). کازئین در بافر یک مولار Tris-HCl و (pH = ۹) در غلظت ۱/۵٪ حل شد. سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از ۴۵۰ µl سوبسترا و ۵۰ µl از سوسپانسیون رویی حاصل از سانتریفوژ در pH = ۹ انجام شد. مخلوط واکنش در ۴۵°C به‌مدت ۲۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری شد و واکنش با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر اسید تری کلرو استیک ۱۰٪ به پایان رسید. سپس نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و پس از آن، رسوب حذف از محلول رویی برای ارزیابی استفاده شد.

تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز بر اساس آزادسازی تیروزین از محلول رویی انجام شد (Yanga et al., 2000). هر واحد فعالیت آنزیم به‌صورت مقدار آنزیمی تعریف شد که می‌توانست ۱ میکروگرم تیروزین را در هر دقیقه در ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد آزاد کند.

نتایج

تنها در مورد ۵ سویه از ۲۲ سویه باکتری‌های قلیادوست در اطراف کلنی‌های محیط milk Agar، هاله‌ی شفاف مشاهده شد. این سویه‌ها شناسایی شد و با توجه به این که همگی از اعضا و جنس باسیلوس بودند، یکی از جدایه‌های مطالعه‌ی بعدی انتخاب شدند.

اثر زمان: گرچه تولید در کل فرایند تخمیر از ۴۸-۵ ساعت مشاهده شد؛ بیشترین تولید تقریباً در مرحله‌ی انتهای فاز لگاریتمی (نزدیک به ۲۰ ساعت پس از شروع) مشاهده شد (نمودار شماره‌ی ۱).

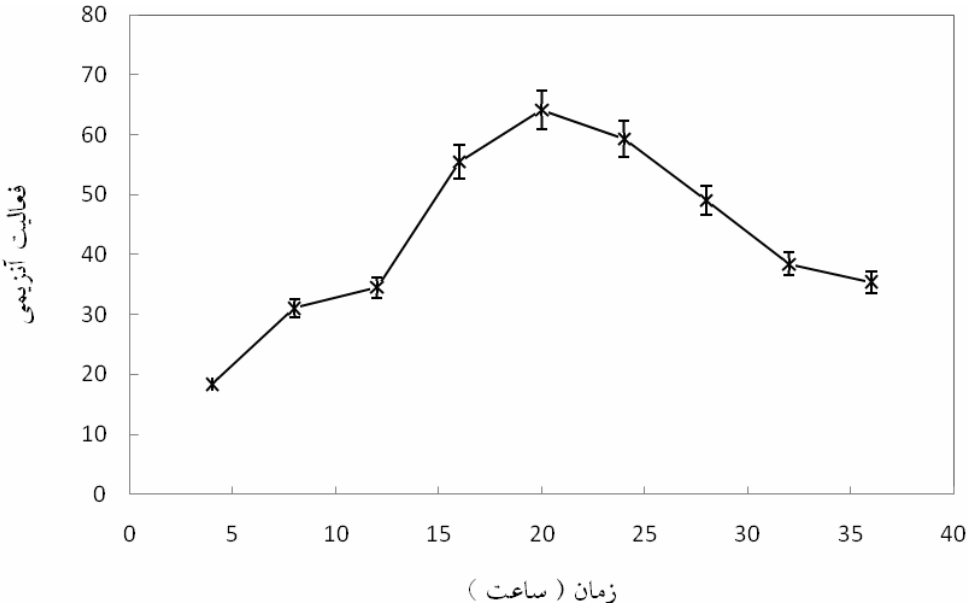
اثر pH و درجه‌ی حرارت: نتایج نشان داد که باکتری در pH = ۹/۵ و در درجه‌ی حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین آنزیم را تولید کرد. (نمودار شماره‌ی ۲).

اثر منبع کربن : گرچه اعضای مختلف جنس باسیلوس می‌توانند انواعی از منابع کربن را مصرف کنند؛ا بهترین منبع کربن در میان منابع استفاده شده، گلوکز و سپس به‌ترتیب فروکتوز و مانیتول بودند (جدول شماره‌ی ۱).

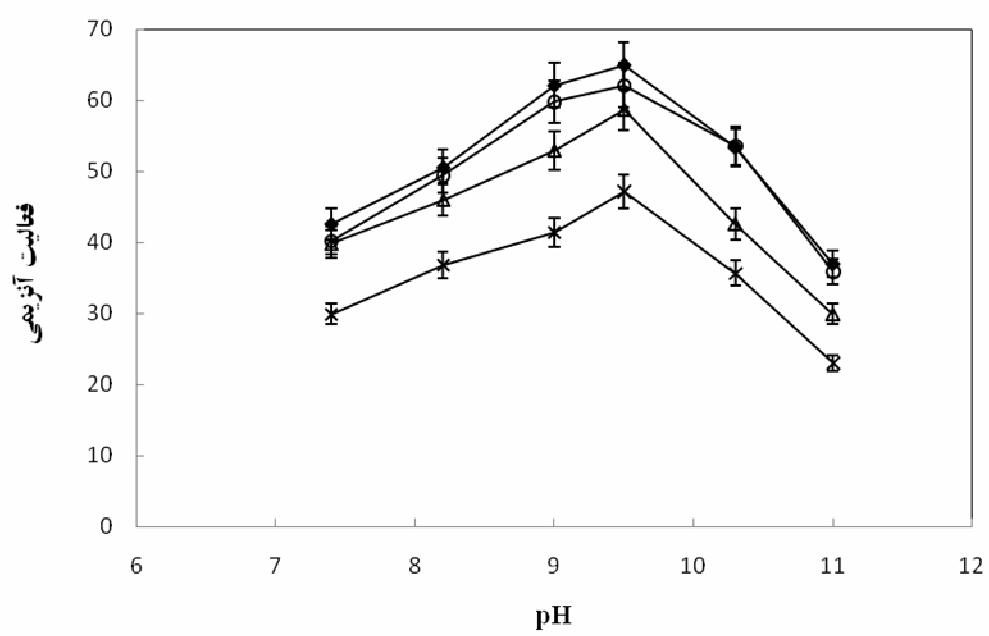
درباره‌ی اثر منابع معدنی و آلی نیتروژن، در میان منابع معدنی سولفات آمونیوم و در میان منابع آلی، مجموعه‌ی عصاره‌ی مخمر و پپتون بهترین نتایج را نشان دادند (جدول شماره‌ی ۱).

جدول شماره‌ی ۱. اثر منابع کربن و ازت بر تولید آنزیم آلکالین پروتئاز با جدایه‌ی باسیلوس در pH=۹/۵ و ۴۰°C در مدت ۲۰ ساعت گرم‌خانه‌گذاری

منبع کربن (٪۱/۵ w/v)	فعالیت آنزیمی ($U\ ml^{-1}\ min^{-1}$)	منبع ازت (٪۱ w/v)	فعالیت آنزیمی ($U\ ml^{-1}\ min^{-1}$)
ساکاروز	۴۲/۵۵	NH_4NO_3	۵۵/ ۲۰
فروکتوز	۵۹/۸۰	NH_4Cl	۵۵/۸۹
مانیتول	۴۳/۹۳	$NaNO_3$	۵۸/۱۹
گلوکز	۶۴/۶۳	$NH_4H_2PO_4$	۵۴/۷۴
مالتوز	۴۱/۸۶	$(NH_4)_2SO_4$	۷۰/۸۴
لاکتوز	۴۲/۵۵	پپتون	۵۷/۰۴
		کازئین	۵۶/۱۲
		پپتون + عصاره‌ی مخمر (٪۰/۵ w/v)	۶۵/۵۵



نمودار شماره‌ی ۱. اثر زمان کشت بر تولید آنزیم آلکالین پروتئاز بر حسب ($U\ ml^{-1}\ min^{-1}$) با جدایه‌ی باسیلوس



نمودار شماره‌ی ۲. اثر pH و درجه‌ی حرارت (°C) بر تولید آنزیم آلکالین پروتئاز بر حسب ($U\ ml^{-1}\ min^{-1}$) با جدایه‌ی باسیلوس ۳۵ (○)، ۴۰ (♦)، ۴۵ (Δ) و ۵۰ (×)

بحث

یکی از عوامل مهم تأثیرگذار بر تولید آنزیم‌ها به روش تخمیر، زمان است. در این تحقیق ماکزیمم تولید آنزیم ۲۰ ساعت پس از شروع فرآیند مشاهده شد؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد که بیشترین تولید با فاز لگاریتمی رشد مرتبط است. در این زمینه سایر محققان نیز نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند (Uyar et al., 2004).

وارد (Ward) و همکاران (۱۹۸۶) نیز بیشترین تولید آنزیم درباره‌ی از گونه‌های مختلف جنس باسیلوسِ اواخر فاز لگاریتمی گزارش کرده‌اند. به‌نظر می‌رسد تولید با تغییرات تولید پروتئین‌ها در فرایند اسپورولاسیون ارتباط دارد.

درباره‌ی درجه‌ی حرارت و pH، محققان محدوده‌های گوناگونی برای تولید بهینه‌ی آنزیم ذکر کرده‌اند؛ بهترین درجه‌ی حرارت ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و بهترین مقادیر pH، بین ۱۱-۹ گزارش شده است (Chi et al., 2007; Elibol et al., 2005; Uyar et al., 2002).

شن (Sen) و همکاران (۱۹۹۳) گلوکز را بهترین منبع کربن برای تولید آنزیم دانسته‌اند و سایر محققان نیز بر نقش فزاینده‌ی گلرکز نسبت به سایر منابع کربن تأکید کرده‌اند. نتایج تحقیق نیز این مدعا را تأیید می‌کند. بسیاری از محققان سعی کرده‌اند علاوه بر منابع ازت، مانند عصاره‌ی مخمر، پپتون و... اثبات کنند که این آنزیم از گلوکز و نشاسته نیز تولید می‌شود؛ اما درباره‌ی استفاده از منابع کربن و انرژی ارزان‌قیمت تاکنون تحقیقات زیادی انجام نشده است (Johnvesly et al., 2001). گرچه در برخی موارد ثابت شده است که استفاده از منابع کربن

ترکیبی به نسبت یک سوبسترای منفرد، مثل گلوکز یا لاکتوز از نظر تولید محصول کارایی بهتری دارد، اما هزینه‌های تولید را افزایش می‌دهد (Hanlon et al., 1982).

استفاده از منابع مختلف معدنی و آلی ازت نشان‌دهنده‌ی برتری سولفات آمونیوم در بین منابع معدنی ازت استفاده‌شده و همچنین عصاره‌ی مخمر به همراه پپتون در میان منابع ازت استفاده‌شده بود. فوجی وارا (Fujiwara) و همکاران (۱۹۹۱) نیز منابع ازت را بهترین منابع برای تولید آنزیم دانسته‌اند. منابع ازت آلی و معدنی مختلفی برای تولید پیشنهاد شده است. اخیراً در برخی تحقیقات استفاده‌ی مخلوط حاصل از هیدرولیز پروتئین ماهی، منبع ازت شناخته شده است (Ghorbel et al., 2005; Triki-Ellouz et al., 2003).

می‌توان چنین نتیجه گرفت که برای تولید آنزیم آلکالین پروتئاز در ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH = ۹/۵ در مدت ۲۰ ساعت از شروع فرآیند در محیط حاوی منابع کربنِ ۱/۵٪ (وزنی به حجمی) گلوکز و ازتِ ۱٪ سولفات آمونیوم، جدایه‌ی موضوعِ آزمایش انتخاب مناسبی بود. طبعاً برای بررسی استفاده از این سوش با کارکرد تولیدکننده‌ی صنعتی به تحقیقات بیشتری نیاز است.

سپاس‌گزاری

از یاری بی‌دریغ حوزه‌ی محترم معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، به‌ویژه آقای دکتر امیر تیموری معاون محترم واحد و آقای دکتر ترکاشوند مدیر محترم پژوهشی واحد و همچنین از کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی، آقای مهندس صفری و خانم مهندس پورخلیلی به‌خاطر ایجاد بستر و تأمین فضا و ملزومات لازم برای انجام این تحقیق صمیمانه سپاس‌گذاری می‌کنم.

منابع

Altschul S.F., Madden T.L., Scha-Ver A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.; (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". Nucleic Acids Research. 25: 3389–3402.

Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F.; (2007). "Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*" Bioresource Technology. 98: 534–538.

Chu I.M., Lee C., Li T.S.; (1992). "Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416" Enzyme Microbial and Technology. 4: 55–61.

Dutta J.R., Dutta P.K., Banerjee R., (2004). "Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas sp.* using response surface and artificial neural network models" Process Biochemistry. 39: 2193–2198.

Elibol M., Moreira A.R.; (2005). "Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation" Process Biochemistry. 40: 1951–1956.

Fujiwara N., Yamamoto K., Masui A.; (1991). "Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film" Journal of Fermentation and Bioengineering. 72: 306-308.

Ghorbel S., Souissi N., Triki-Ellouz Y., Dufosse L., Guérard F., Nasri M.; (2005). "Preparation and testing of sardinella protein hydrolysates as nitrogen source for extracellular lipase production by *Rhizopus oryzae*" World Journal of Microbioligy and Biotechnology. 21: 33–38.

Gupta R., Beg Q.K., Khan S., Chauhan B.;(2002). "An overview on fermentation downstream processing and properties of microbial alkaline proteases", Applied Microbiology and Biotechnology. 60: 381–395.

Haddar A., Fakhfakh-Zouari N., Hmidet N., Frikha F., Nasri M., 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. 110: 288–294.

Haddar A., Bougatef A., Agrebi R., Sellami-Kamoun A., Nasri M.; (2009). "A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization", Process Biochemistry. 44: 29–35.

Hanlon G.W., Hodges N.A., Russel, A.D.; (1982). "The influence of glucose ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*" ,Journal of General Microbiology. 128: 845–851.

Johnvesly, B. Naik G.R.; (2001). "Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic Bacillus sp. JB-99 in a chemically defined medium", Process Biochemistry. 37: 139–144.

Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C.; (2002). "Industrial enzyme applications". Current Opining Biotechnology. 13: 345–351.

Mukherjee A.K., Adhikari H., Rai S.K.; (2008). "Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation" Biochemical Engineering Journal. 39: 353–361.

Potumarthi R., Subhakar C., Jetty A.; (2007). "Alkaline protease production

by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes", Biochemical Engineering Journal. 34: 185–192.

Rai S. K., Mukherjee A.K.; (2009). "Ecological significance and some biotechnological application of an organic -solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04" Bioresour Technology. 100: 2642–2645.

Sen S., Satyanarayana T.; (1993). "Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40". Industerial. Journal of Microbiology. 33: 43-47.

Singh J., Vohra R.M., Sahoo D.K.; (2004). "Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture", Process Biochemistry. 39: 1093–1101.

Sundararajan S., Kannan N., Chittibabu S.; (2011). "Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent" ,Journal of Bioscience and Bioengineering 111: 128–133.

Triki-Ellouz Y., Ghorbel B., Souissi N., Kammoun S., Nasri M.; (2003). "Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate", World Journal of Microbioligy and Biotechnology. 19: 41–45.

Uyar F., Baysal Z.; (2004). "Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus sp.* under solid state fermentation", Process Biochemistry. 39: 1893–1898.

Wang Q., Hou Y., Xu Z., Miao J., Li, G., (2007). "Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium Colwellia sp. NJ341 with response surface methodology", Bioresource Techno-logy. 99: 1926–1931.

Ward O.P.; (1986). Proteolytic enzymes. Pp. 789-815. in:M. Moo-Young (eds). Comprehensive Biotechnology, vol. III, Academic Press, New York.

Yanga J.K., Shihb I.L., Tzengc Y.M., Wanga S.L.; (2000). "Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes" Enzyme and Microbial Technology 26: 406–413.