Archive of SID

بهینه سازی تولید پروتئاز حاصل از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* در محیط کشت مایع

اسرین ایرانی [1]،سید محسن اصغری [2,*] و هادی رهاننده [3]

1- گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه گیلان

*2- نویسنده‌ی مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه گیلان، (sm_asghari@guilan.ac.ir.)

3- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد رشت

چکیده

به منظور جداسازی باکتری باسیلوس سابتیلیس، نمونه برداری از خاک مناطق مختلف باغات چای انجام گرفت. بر اساس تهیه سری رقت خاک، باکتری‌های موجود روی محیط غذایی آگار کشت داده شدند. براساس مورفولوژی کلونی‌های تشکیل شده، سویه ها جداسازی و در یخچال نگهداری شدند و براساس تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. سویه‌های جداسازی شده برای تعیین تولید پروتئاز روی محیط کشت حاوی کازئین کشت داده شدند. سویه RH-18 بزرگترین هاله را در محیط کشت کازئین تشکیل داد و برای تولید پروتئاز در محیط کشت مایع انتخاب گردید. جهت تولید پروتئاز از محیط کشت حداقل حاوی KH_2PO_4 ‰0/5، $MgSO_4 \times 7H_2O$ ‰0/5، $FeSO_4$ ‰0/001 و گلوکز 1% استفاده شد. جهت افزایش تولید پروتئاز عناصر مهم تولید همانند منبع نیتروژن، pH، دما و زمان مورد بررسی قرار گرفتند. در میان سه منبع پروتئینی پپتون، کازئین و پروتوزپپتون، پروتوزپپتون بیشترین تاثیر را در افزایش تولید آنزیم داشت. در pHهای 7/5 ، 8 و 8/5 بیشترین میزان تولید در pH 8 مشاهده شد. میزان تولید آنزیم در طی مدت 16 ساعت بررسی گردید، بعد از 12 ساعت تلقیح محیط کشت، تولید به حداکثر میزان رسیدبهترین دمای تولید پروتئاز $32\ ^{\circ}c$ تعیین شد.

واژگان کلیدی: تولید پروتئاز، باسیلوس سابتیلیس، محیط کشت، خصوصیات بیوشیمیایی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پروتئاز ها جزء مهمترین دسته از آنزیم های صنعتی محسوب می‌شوند و با توجه به کاربرد های فراوان آنها در کشاورزی و صنایع مختلف حائز اهمیت می باشند ، لذا تولید آن ها از یک میکرو ارگانیسم و تعیین خصوصیات آن ها، علاوه بر استفاده از نوع وحشی آنها موجب می شود که درک درستی از ساختمان آن ها پیدا کرده و زمینه انجام مهندسی پروتئین روی این آنزیم ها به منظور افزایش پایداری حرارتی آن ها و یا کارایی کاتالیتیکی شان و در نتیجه تولید انبوه آن ها برای کاربرد های صنعتی فراهم شود واز این نظر بسیار مهم می باشند. در میان ارگانیسم های تولید کننده پروتئاز، باکتری ها بیشترین کاربردهای بیوتکنولوژیکی را داشته و در میان آنها، گونه های باسیلوس، تولید کننده های اختصاصی پروتئاز های خارج سلولی محسوب می شوند که کاربردهای زیادی را در صنایع دارویی،چرم سازی، صنایع مواد شوینده، مواد غذایی و بسیاری از صنایع پردازشی دیگر دارند.در این مطالعه یک پروتئاز خارج سلولی متعلق به سویه باسیلوس سابتیلیس، از این باکتری جدا سازی شد . به این منظور، بهینه سازی شرایط محیط تولید انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از باغ‌های چای و جداسازی باکتری‌های خاک

خاک منطقه ریزوسفر از منطقه چای‌کاری شهرستان‌های لاهیجان، رشت و فومن در استان گیلان جمع‌آوری شد. هر 3 نمونه که از پای بوته-های چای برداشت شده بود را با یکدیگر مخلوط کرده، 20 گرم خاک با 500 میلی‌لیتر آب مقطر سترون کاملا مخلوط شد. سپس به روش سری رقت با اضافه کردن 1cc از مخلوط در9cc آب مقطر استریل تا 5 مرحله رقیق شد.100 میکرولیتراز هر رقت به محیط کشت آگار مغذی منتقل و پس از 48 ساعت نگهداری در دمای 28°C، نماینده پرگنه‌هایی که از نظر شکل و رنگ در محیط آگار مغذی متفاوت بودند انتخاب و درون لوله آزمایش حاوی آگار مغذی، خالص سازی گردیده و کدگذاری شدند.

شرایط رشد باکتری *Basillus subtilis* برای تولید آنزیم پروتئاز

ابتدا باکتری روی محیط کشت NA رشد داده شد، سپس به محیط کشت LB انتقال داده و به مدت 24 ساعت در دمای 32 °C روی انکوباتور شیکر دار با 190 rpm قرار داده شد. بعد از 24 ساعت به نسبت حجمی 1% از آن به محیط کشت زیر تلقیح گردید. محیط کشت تولید شامل: پپتون 0/5%، KH2PO4 0/5%، MgSO4 × 7H2O 0/5%، Fe2SO4 0/001% و گلوکز 1% یا گلوکز 0,5% بود. برای منبع پروتئین ازمنابع مختلف (پپتون0/5%، کازئین0/5% ، پروتوزپپتون 0/5%) پروتئین استفاده شد. pH محیط روی 7/5، 8 و 8/5 تنظیم شد. گلوکز 1% که از فیلتر Millipore عبور داده شده به محیط اضافه شد. دمای انکوباتورشیکردار روی 37 °C ،32 ، 28 تنظیم وتحت این شرایط 16 ساعت باکتری رشد داده شد.

سنجش فعالیت آنزیم

سانتریفیوژ باکتری‌های رشد کرده با 5000 rpm به مدت 20 دقیقه انجام و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد.100میکرولیتر از محلول آنزیمی به150 میکرولیتر محلول کازئین 2%، تهیه شده در بافر تریس، اضافه گردید و بمدت 15 دقیقه در بن ماری در دمای 37 °C نگهداری شد. سپس 250 میکرولیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید10% (Trichloroacetic acid, TCA) به مخلوط واکنش اضافه گردید تا واکنش متوقف شده و همچنین کازئین‌های هیدرولیز نشده رسوب کند. پس از گذشت30 دقیقه در دمای4 °C، سانتریفیوژ مخلوط واکنش در 14680rpm به مدت 3 دقیقه انجام و جذب 280 نانومتر را خواندیم. مخلوط مشابهی با این تفاوت که 10% TCA ابتدا به محلول آنزیمی افزوده شده و سپس سوبسترارا به آن می افزائیم، بعنوان شاهد در نظر گرفته شد.

تغلیظ آنزیم

پس از گذشت 12 ساعت از تلقیح باکتری به محیط تولید، سانتریفیوژ در 5000 rpm به مدت 20 دقیقه انجام شد.سپس محلول رویی حاصل روی استیرر در دمای0°C قرار داده شد و نمک آمونیوم سولفات با غلظت نهایی 80 درصد به آن اضافه گردید و پس از30 دقیقه، این محلول

www.SID.ir

Archive of SID

توسط سانتریفیوژ یخچال دار در 5000rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد که رسوب حاصل حاوی آنزیم تغلیظ شده بود. سپس سنجش فعالیت آنزیمی در حضور و عدم حضور PMSF انجام شد.

دیالیز

پس از تغلیظ آنزیم، به منظور برداشت نمک آمونیوم سولفات استفاده شده،1000میکرو لیتر از رسوب حاصل از تغلیظ را درون کیسه دیالیز ریخته و از 1 لیتر بافر دیالیز (حاوی Tris bafer ,20mM-$Cacl_2$,5Mm) با pH 8 استفاده گردید. بعد از 12 ساعت، سنجش فعالیت آنزیمی برای نمونه دیالیز شده (در حضور و عدم حضور PMSF) با 1 mM PMSF صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی گرم و اسپور

پس از تهیه گسترش، مقداری رنگ کریستال ویوله روی لام ریخته، پس از 1 دقیقه آن را با آب مقطر شستشو دادیم.چند قطره از محلول ید را روی گسترش پخش نموده با آب مقطر شستیم.محلول رنگ بر الکل روی گستره ریخته و پس از 1 دقیقه لام را شستیم.سطح گسترش را با سافرانین پوشاندیم و بعد از 30- 60 ثانیه، لام شسته شد. جهت رنگ آمیزی اسپور پس از تهیه گسترش روی لام، رنگ مالاشیت سبزراروی آن ریخته و به مدت4 الی 5 دقیقه حرارت دادیم.پس از شستن لام با آب مقطر، سافرانین را روی آن ریخته و پس از 1دقیقه آنرا شستشو دادیم.

محیط سیمون سیترات (S.C)

0,225 گرم سدیم سیترات درلوله آزمایش cc20 ریخته و به آن cc10 آب مقطر افزودیم پس ازاتو کلاو و بستن محیط کشت مایع در دمای اتاق، از استوک باکتری روی آن کشت داده و 24 h در انکو باتور در دمای 32^{oc} قراردادیم.

محیط نوترینت براث (Nutrient broth):

0,4 گرم از پودر نوترینت برا ث را در ارلن با حجم 500 cc ریخته پس از تنظیم pH روی عدد 5/7 ،با افزودن آب مقطر حجم نهایی محلول را به 50 cc رسا نده و پس از اتو کلاو و کشت باکتری داخل این محیط، آن به مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای 32 ° C با rpm=190 قرار داده شد.

آزمایش نمک 7%

طبق دستور بالا، 25 cc از محیط نو ترین برا ث تهیه کرده و به آن 1/75 گرم نمک کلرید سدیم افزوده شد. پس از اتو کلاو وکشت باکتری در این محیط آن را به انکوباتور با دمای 32 °c و rpm=190 منتقل کردیم.

نتایج و بحث

رنگ آمیزی : طبق انتظار، در رنگ آمیزی گرم، باکتری ها به صورت میله ای و به رنگ بنفش مشاهده شدند. در رنگ آمیزی اسپور، اسپورها سبز رنگ، به صورت داخلی، در مرکز و شکل آن به صورت ellipsoidal مشا هده گردید. درمحیط سیمون سیترات، تغییر رنگ از سبز به آبی مشاهده شد. در محیط نوترینت براث با pH=5 / 7 و آزمایش نمک 7%، باکتری در این محیط ها رشد کرد.

تولید ،تغلیظ و دیالیز آنزیم: میزان تولید آنزیم در طی مدت 16 ساعت بررسی گردید، پس از 12 ساعت از تلقیح محیط کشت، تولید به حداکثر رسید. برای تولید آنزیم از منابع مختلف کربنی می توان استفاده کرد، در این بررسی از گلوکز استفاده شد. به منظور بررسی اثرغلظت آن برمیزان تولید، از غلظت های 0,5 %و 1% آن استفاده شد که با توجه با نتایج به دست آمده (جدول 2و1)، این متغیر بر میزان تولید اثر داشته اما اثر آن ناجیز است:

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1: گلوکز 1%

	Activity
12 h	0.48
16h	0.39

جدول 2: گلوکز 0,5%

	Activity
12 h	0.52
13 h	0.48
16 h	0.42

پس از تغلیظ، سنجش فعالیت آنزیمی، انجام شدکه موجب افزایش 64,1%ای فعالیت برای رسوب شده و محلول رویی فعالیت 0,01%داشت (جدول3)، لذا این درصد آمونیوم سولفات به کار رفته برای تغلیظ آنزیم، مناسب بوده است. به منظورمطالعه ی آنزیمها ازمهار کننده های مختلف استفاده می شود که ما در این بررسی از PMSF (فنیل متیل سولفونات) استفاده کردیم که در صورتی که فقط آنزیم سرین پروتئاز در محلول انزیمی وجود داشته باشد، با به کار بردن PMSF، می بایست فعالیت آنزیمی مشاهده شده به صفر برسد اما اگر سرین پروتئاز در محلول آنزیمی وجود نداشته باشد، نتایج در حضور و عدم حضور PMSF ، می بایست یکسان باشد. در این بررسی (جدول 4) PMSF موجب کاهش 62,3% ای فعالیت مشاهده شده، گردیده و می توان اینطور بیان کرد که ما مخلوطی از هر دو نوع آنزیم سرین پروتئاز و متا لو پروتئاز را داریم.:

جدول3: تغلیظ با امونیوم سولفات

	Activity
قبل از تغلیظ	0.64
رسوب	1.78
رویی	0.01

جدول4: سنجش فعالیت آنزیمی در حضور و عدم حضور PMSF

	Activity
PMSF	0.45
No PMSF	1.19

پس از دیالیز، افزایش 51 % ای فعالیت آنزیم مشاهده شد که علت آن برداشت نمک و ری فلد شدن آنزیم است .(جدول 5) :

	Activity
With Pmsf	1.44
Without pms	2.33

جدول 5: دیا لیز

منابع

Adams,R.E.and JJ.Eichenmuller.1963.A bacterial infection of *Xiphinema americanum*. Phytopathology, 53: 745 (AbstOA.)

Adekoya,O.A.and I.Sylte.2009.The thermolysin family (M_4) of enzymes:therapeutic and biotechnological potential. Chem Biol Drug.73:7-16.

www.SID.ir