Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 4 (12-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Screening of Alkaline Protease-Producing *Streptomyces diastaticus* and Optimization of Enzyme Production

Elham Davoudi[1], Keivan Beheshti Maal[1], Hashem Nayeri[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Article Information

Article history:
Received:2014/03/18
Accepted:2014/05/20
Available online:2014/12/29

Article Subject:
Microbial Biotechnology

IJMM 1393; 8(4): P 50-58

Corresponding author at:

Mr. Keivan Beheshti Maal

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Email:
beheshtimaal@iaufala.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Alkaline proteases are used in pharmaceutical, film and photography, silk production and food, leather and detergent industries. *Actinomycetes* are gram positive bacteria that produce different enzymes such as proteases. The aims of this research were isolation of native alkaline protease-producing *Actinomycete* spp. from different soil samples as well as optimizing the conditions for enzyme production.

Materials and Methods: The different soil samples were collected from different locations of the provinces of Khouzestan, Chahar Mahalo Bakhtiari and Isfahan, Iran. After determining of the best alkaline protease producing species using Lowry method, the optimization of alkaline protease was performed.

Results: The alkaline protease producing *Actinomycete* spp. was isolated from soil. The most enzyme activity was measured in *S.diastat*icus. The best concentration of sucrose as the carbon source for the highest production of alkaline protease was 10 g/l. The optimum pH and temperature for the alkaline protease production by *S. diastaticus* were 10 and 30°C respectively. The maximum activity of alkaline protease was measured at 200 rpm as the best aeration speed.

Conclusions: This is the first report of alkaline protease production by *Streptomyces diastaticus* in Iran. The accomplished examinations in this research confirmed the previous theories of alkaline protease production by *Actinomycetes* relatively. Regarding the immense applications of alkaline proteases in several industries and isolation of a native alkaline protease producing *Actinomycete*, The production potential of this enzyme in our country could be accessible in the near future.

Key Words: *Actinomycetes*, Alkaline Protease, Optimization, *Streptomyces diastaticus*

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Dawoodi E, Beheshtimaal K, Nayeri H. Screening of Alkaline Protease-Producing Streptomyces diastaticus and Optimization of Enzyme Production. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (4) :50-58

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

غربال گری *استرپتومایسس دی استاتیکوس* مولد آنزیم پروتئاز قلیایی و بهینه سازی شرایط تولید آن

الهام داودی[۱]، کیوان بهشتی مآل[۲]، هاشم نیری[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۲/۱۰

پذیرش:۱۳۹۳/۰۵/۱۵

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۱۰/۱۰

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1393; 8(4): P 50-58

نویسنده مسئول:

آقای کیوان بهشتی مآل

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تلفن: ۰۹۱۳۳۱۴۹۱۸۳

پست الکترونیک:

beheshtimaal@iaufala.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: پروتئازهای قلیایی در صنایع مختلفی از جمله داروسازی، عکاسی، ابریشم، غذایی، چرم سازی، شوینده و ... کاربرد دارند. *اکتینومیست* ها باکتری هایی گرم مثبت هستند که آنزیم های مختلفی از جمله پروتئازها را تولید می کنند. هدف از این پژوهش غربال گری *اکتینومیست* های بومی مولد پروتئاز قلیایی از نمونه های خاک و بهینه سازی شرایط تولید آنزیم پروتئاز قلیایی آن ها می باشد.

مواد و روش کار: در این تحقیق *اکتینومیست* های مختلف از نمونه خاک مناطق استان های خوزستان، چهارمحال و بختیاری و اصفهان غربال گری شدند و پس از تعیین بهترین سویه های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی با سنجش به روش لوری، بهینه سازی شرایط تولید این آنزیم انجام گرفت.

یافته‌ها: از میان سویه های *اکتینومیست* مولد پروتئاز قلیایی غربال گری شده از خاک بیشترین فعالیت آنزیمی متعلق به سویه *استرپتومایسس دی استاتیکوس* بود. حداکثر فعالیت آنزیم در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر ساکارز بود. *pH* و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی به ترتیب *pH* برابر ۱۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس بود. حداکثر فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در سرعت هوادهی ۲۰۰ دور بر دقیقه اتفاق افتاد.

نتیجه‌گیری: این تحقیق اولین گزارش از تولید پروتئاز قلیایی توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در ایران است. آزمون های انجام شده در این تحقیق فرضیات بین المللی قبلی در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *اکتینومیست* ها را به طور نسبی تأیید نمود. با توجه به کاربردهای فراوان آنزیم پروتئاز قلیایی در صنایع مختلف و با توجه به جداشدن یک سویه بومی از *اکتینومیست* های مولد آنزیم مذکور می توان به تولید این آنزیم در کشور و فراهم شدن زمینه خودکفایی و جلوگیری از واردات روزافزون آن امیدوار بود.

کلمات کلیدی : *استرپتومایسس دی استاتیکوس*، اکتینومیست ها، آنزیم پروتئاز قلیایی، بهینه سازی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

اکتینومیست ها که رشته ای ترین باکتری ها هستند شامل گروه های ۲۹-۲۲ کتاب برجی می باشند و فیلامنت های شاخه دار به قطر ۱- ۰/۵ میکرون تشکیل می دهند. آن ها اساساً هوازی هستند اما بعضی جنس ها، بی هوازی اختیاری یا اجباری اند. این پروکاریوت ها، کموهتروتروف هستند و با استفاده از منابع انرژی متنوع شامل پلیمرهای پیچیده تغذیه می کنند. *اکتینومیست* ها باکتری های گرم مثبت با محتوای G+C بالای ۵۵ درصد هستند که به آرامی به صورت میسلیوم های شاخه دار رشد می کنند. روی محیط های باکتریولوژیک معمول که در آزمایشگاه استفاده می شود مثل نوترینت آگار، تریپتیکاز سوی آگار و برین هارت اینفیوژن آگار رشد می کنند. آن ها شامل دامنه ی گسترده ای از باکتری ها هستند و نقش فعالی را در چرخه ی طبیعی بازی می کنند (۱). این پروکاریوت ها دارای ویژگی های مشترک با باکتری ها و قارچ ها هستند. از جمله مواد

تولیدی توسط *اکتینومیست* ها آنتی بیوتیک، رنگدانه، ژئوسمین و آنزیم می باشد (۱-۹). *استرپتومایسس* جنس بزرگی از *اکتینومیست* ها می باشد (۵). ۷۵٪ از پادزیست‌های جدا شده از *اکتینومیست* ها، توسط جنس *استرپتومایسس* تولید می شود (۱۰). این جنس به دلیل ترشح آنتی بیوتیک ها و پروتئازها توجه زیادی را به خود معطوف داشته است. (۱۱).

اکتینومیست ها یکی از گروه های اصلی جمعیت خاک را تشکیل داده اند و در خاک های قلیایی زندگی می کنند (۳، ۴، ۱۲). پروتئازها از جمله آنزیم های میکروبی هستند که در صنایع گوناگون کاربرد داشته، با توجه به استفاده فراوان در حذف آلاینده های محیطی و پیشبرد فرآیندهای صنعتی، توجه زیادی را به خود معطوف داشته اند. پروتئازهای قلیایی به عنوان پروتئازهایی تعریف شده اند که در pH خنثی تا قلیایی فعال هستند (۱۳). پروتئازهای قلیایی یا سابتیلیزین (Subtilisin) (E.C. 3.4.21.14) یک گروه مهم فیزیولوژیکی تجاری از آنزیم ها هستند که به طور اولیه در دترجنت ها استفاده می شوند. آن ها نقش کاتالیتیکی خاصی را در هیدرولیز پروتئین ها بازی می کنند (۱۴). بیشترین فعالیت پروتئازهای قلیایی در محدوده pH=۸-۱۳ است (۱۵).

مهم ترین باکتری های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی شامل *استرپتومایسس آلبیدوفلاووس*، *استرپتومایسس ولگاریس* (۱۶)، *سلولزی میکروبیوم سلولانس* (۱۷)، *باسیلوس سابتیلیس* (۱۸) ، *باسیلوس لیکنی فورمیس* (۱۹) می باشند. مهم ترین قارچ های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی شامل: *آسپرژیلوس نایجر* (۲۰) و *آسپرژیلوس نیدولانس* (۲۱) *آسپرژیلوس اوریزائه* (۲۲) می باشند. مهم ترین مخمرهای مولد آنزیم پروتئاز قلیایی شامل: *آئروبازیدیوم پلولانس* (۲۳)، *یاروویا لیپولیتیکا* (۲۴) و *کاندیدا اوله‌آ* (۲۵) می باشند. آنزیم پروتئاز قلیایی در صنایع گوناگون از جمله صنایع دباغی، صنایع دترجنت، بازیافت نقره، صنایع غذایی، صنایع ابریشم، عکاسی، داروسازی و تصفیه پساب کاربرد دارد (۱۴، ۱۷، ۲۶) این پژوهش با هدف غربال گری و شناسایی سویه های *اکتینومیست* برتر مولد آنزیم پروتئاز قلیایی و تعیین شرایط بهینه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) غربال گری اکتینومیست ها

در این تحقیق از خاک های مناطق مسجد سلیمان و شط شیمبار در خوزستان، کاج و شهرکرد در چهارمحال و بختیاری و اصفهان نمونه برداری انجام شد. مقدار یک گرم از هر نمونه خاک الک شده به لوله های حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر در شرایط استریل اضافه شد تا رقت ۰/۱ به دست آید. پس از تهیه رقت های متوالی مقدار ۱ میلی لیتر از هر یک از رقت ها روی پلیت های حاوی محیط کشت YS آگار به روش چمنی کشت داده شدند. پس از آن به مدت ۱۲۰-۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی های رشد کرده مورد ارزیابی قرار گرفت. (۲۷).

ب) غربال گری اکتینومیست های مولد پروتئاز قلیایی

تعیین کیفی فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی با ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی های رشد کرده روی محیط کشت YS میلک آگار صورت گرفت. به منظور غربال گری جدایه های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی ابتدا هر یک از جدایه ها روی محیط کشت پپتون آگار کشت داده شدند. جدایه هایی که به خوبی روی محیط پپتون آگار رشد کردند روی محیط کشت های YS میلک آگار به صورت خطی کشت داده شد و پس از انکوباسیون آن ها برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس ایجاد هاله شفاف اطراف آن ها بررسی شد.

ج) سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی

سنجش پروتئاز قلیایی بر اساس روش لوری انجام شد. ۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع تلقیح شده با نمونه با سرعت ۲۵۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی لیتر از محلول رویی با یک میلی لیتر همان محلول کازئین ۲٪ با pH=۱۱ (سوبسترا) ترکیب شد و لوله حاوی آنزیم و سوبسترا برای مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از افزودن ۲ میلی لیتر محلول ۰/۴ مولار تری کلرواستیک اسید به منظور توقف واکنش، لوله ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. سپس به یک میلی لیتر از محلول رویی، مقدار ۵ میلی لیتر محلول کربنات سدیم (Na_2CO_3) ۰/۴ مولار و یک میلی لیتر

معرف فولین سیوکالتوس فنل (Sigma۴۷۶۲۴۱، آمریکا) با رقت ۰/۱ اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۴۰ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی قرار داده شد. در صورت وجود اسید آمینه L ـ تیروزین در محلول تغییر رنگ معرف فولین سیوکالتوس فنل (Sigma۴۷۶۲۴۱، آمریکا) از زرد به آبی تیره مشاهده می شود. رنگ آبی ایجاد شده در طول موج ۶۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(UNIC-UV-2100، آمریکا) خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی مقدار آنزیمی است که بتواند از سوبسترای کازئین، یک میکروگرم L-تیروزین در مدت واکنش و تحت شرایط آزمایش آزاد نماید و واحد آن در میلی لیتر و در مدت زمان محاسبه می شود (U/ml/10min)(۲۸).

د) بررسی غلظت های مختلف ساکارز در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

ابتدا محیط تولید آنزیم محیط گلوکز براث ساخته شد و غلظت های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز به هر یک از ارلن ها اضافه شد. پس از افزودن آب مقطر به میزان لازم، محیط کشت ها آماده شدند. پس از پنبه گذاری درب ارلن ها، محیط ها در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس ، فشار ۱۰ اتمسفر و مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس تعداد $۱۰^{۸}$× ۱/۵ باکتری مطابق استاندارد ۰/۵ مک فارلند، به هر یک از ارلن های حاوی محیط گلوکز براث اضافه شد. ارلن ها درون انکوباتور شیکردار با سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از مدت ۷۲ ساعت سنجش آنزیمی به روش لوری برای ۵ میلی لیتر از محتویات ارلن ها انجام شد و جذب نوری حاصل از آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر خوانده شد.

ه) اثر pH های مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

به منظور بررسی اثر pH های مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی ابتدا محیط های گلوکز براث ساخته شدند. پس از افزودن آب مقطر به میزان لازم، محیط کشت ها آماده شدند و با استفاده از محلول سود (NaOH) یک نرمال و اسید کلریدریک یک مولار pH این محیط ها روی ۶، ۷، ۸ ، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ تنظیم شد. از دستگاه pH متر که با بافرهای استاندارد ۴ و ۷ کالیبره شده بود برای تنظیم pH استفاده شد. پس از آماده شدن محیط ها و تنظیم pH آن ها و پس از پنبه گذاری درب ارلن ها، محیط ها در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس ، فشار ۱۰ اتمسفر و مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شدند. تعداد $۱۰^{۸}$× ۱/۵ باکتری مطابق استاندارد ۰/۵ مک فارلند، به هر یک از ارلن های حاوی محیط گلوکز براث اضافه شد و درون انکوباتور شیکردار با سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از مدت ۷۲ ساعت جذب نوری حاصل از آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر خوانده شد.

و) اثر دماهای مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

به منظور بررسی دماهای مختلف در تولید پروتئاز قلیایی ابتدا محیط های گلوکز براث ساخته شدند. پس از افزودن آب مقطر به میزان لازم، محیط کشت ها آماده شدند و پس از پنبه گذاری درب ارلن ها، محیط ها در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس، فشار ۱۰ اتمسفر و مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس تعداد $۱۰^{۸}$× ۱/۵ باکتری به هر یک از ارلن های حاوی محیط گلوکز براث تلقیح شد و درون انکوباتورهای شیکردار با دور یکسان و دماهای متفاوت ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از مدت ۷۲ ساعت سنجش آنزیمی به روش لوری برای ۵ میلی لیتر از محتویات ارلن ها انجام شد و جذب نوری حاصل از آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر خوانده شد.

ح) اثر سرعت های هوادهی در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

به منظور ارزیابی اثر هوادهی روی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی، محیط های گلوکز براث تهیه شد و پس از پنبه گذاری درب ارلن ها، محیط ها در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس ، فشار ۱۰ اتمسفر و مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس معادل $۱۰^{۸}$× ۱/۵ باکتری به هر یک از ارلن های حاوی محیط گلوکز براث تلقیح شد و درون انکوباتورهای شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با سرعت های ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ دور بر دقیقه هوادهی شدند.

ی) طراحی آزمایش به روش تاگوچی (Taguchi)

روش تاگوچی برای پارامترهای مهم و برجسته استفاده می شود. پس از تعیین پارامترهای موثر بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی، اثر چهار فاکتور دما، pH، منبع کربن و سرعت هوادهی در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در ۸ آزمایش بررسی شد که در جدول (۱) مشاهده می شود. برای فاکتورهای دما، میزان ساکارز و

سرعت هوادهی دو سطح و برای فاکتور pH چهار سطح تعیین شد. آزمایش ها طوری طراحی شدند که در هر آزمایش یکی از سطوح تعیین شده بر تولید آنزیم به صورت تصادفی قرار می گرفت و اثر فاکتورهای مختلف بر تولید آنزیم بررسی می شد. طراحی با استفاده از نرم افزار Qualiteck 4 انجام شد که در جدول (۲) نشان داده شده است.

م) آنالیز اطلاعات:

در مطالعه حاضر از نرم افزار آماری SPSS ، نسخه ۱۸ برای آنالیز آزمایش های تاگوچی اطلاعات به دست آمده از تأثیر متقابل فاکتورها با استفاده از آنالیز واریانس آنوا (ANOVA) داده ها آنالیز و تأثیر این فاکتورها بررسی شد.

ن) شناسایی جدایه برتر اکتینومیست مولد آنزیم پروتئاز قلیایی بر اساس تست های بیوشیمیایی

به منظور شناسایی جدایه های اکتینومیست بررسی ویژگی های مورفولوژیکی و همچنین تست های احیای نیترات، تخمیر مانیتول، تخمیر اینوزیتول، تخمیر ساکارز، تولید H_2S و هیدرولیز نشاسته انجام شدند.

جدول ۱: طراحی آزمون تاگوچی

سرعت هوادهی	میزان ساکارز	دما (°C)	pH	شرایط تعریف شده تاگوچی
۱۵۰	٪۱	۲۰	۸	آزمایش ۱
۲۰۰	٪۲	۳۰	۸	آزمایش ۲
۱۵۰	٪۲	۲۰	۹	آزمایش ۳
۲۰۰	٪۱	۳۰	۹	آزمایش ۴
۲۰۰	٪۱	۲۰	۱۰	آزمایش ۵
۱۵۰	٪۲	۳۰	۱۰	آزمایش ۶
۲۰۰	٪۲	۲۰	۱۱	آزمایش ۷
۱۵۰	٪۱	۳۰	۱۱	آزمایش ۸

جدول ۲: تعیین فاکتورهای مؤثر اصلی روی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در آزمون تاگوچی و تعیین سطح هر یک

فاکتور	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
دما (°C)	۲۰	۳۰	-	-
منبع کربن(ساکارز)	٪۱	٪۲	-	-
سرعت هوادهی(rpm)	۱۵۰	۲۰۰	-	-
pH	۸	۹	۱۰	۱۱

یافته ها

الف) غربال گری جدایه های مختلف *اکتینومیست*

از میان ۱۰ جدایه مختلف *اکتینومیست* غربال گری شده، ۶ جدایه روی محیط YS میلک آگار هاله شفاف با قطرهای متفاوت ایجاد کردند و برای این ۶ جدایه سنجش آنزیم انجام شد. فعالیت آنزیمی ۶ جدایه *اکتینومیست* شامل جدایه های ۲، ۴، ۷، ۸، ، ۹ و ۱۰ به ترتیب معادل (U/ml) ۶۰، (U/ml) ۲۰، ، (U/ml) ۴۴، (U/ml) ۵۱، (U/ml) ۳۵ و (U/ml) ۱۵۰، محاسبه شد.

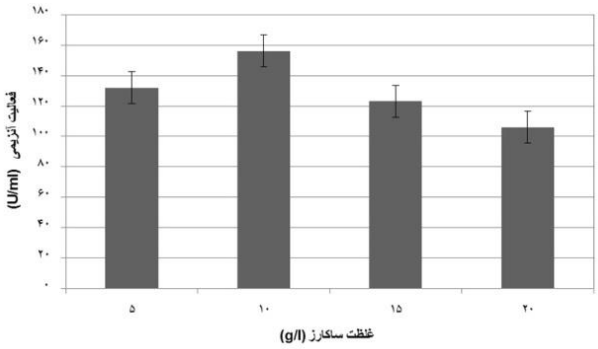
بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی مربوط به جدایه شماره ۱۰ بود و در ساعت ۷۲ و معادل (U/ml) ۱۵۰ محاسبه شد. خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی این جدایه در جدول (۳) نشان داده شده است.

جدول ۳: خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه برتر اکتینومیست مولد آنزیم پروتئاز قلیایی

	خصوصیات ماکروسکوپی	خصوصیات میکروسکوپی
جدایه ۱۰	کلنی هایی با اندازه متوسط، زرد رنگ برآمده، چروکیده، فرو رفته در سطح آگار و با بویی شبیه بوی خاک	میسلیوم های شاخه دار و منشعب

ب) بررسی غلظت های مختلف ساکارز در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

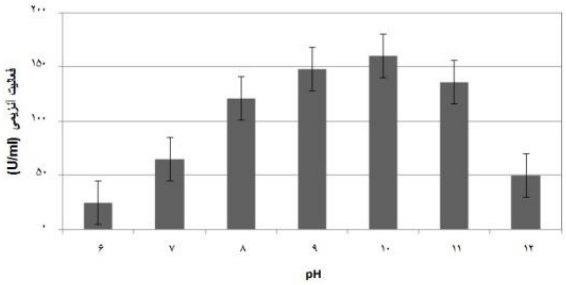
میزان فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در غلظت (g/l) ۵ ساکارز معادل (U/ml) ۱۳۲، در غلظت (g/l) ۱۵ ساکارز معادل (U/ml) ۱۲۳ و در غلظت (g/l) ۲۰ ساکارز معادل (U/ml) ۱۰۶ بود. بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در غلظت (g/l) ۱۰ ساکارز و برابر با (U/ml) ۱۵۶ بود. نتایج تأثیر غلظت های مختلف ساکارز در نمودار (۱) نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود در غلظت های بالاتر از (g/l) ۱۰ ساکارز، فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی کم شده است.



نمودار ۱: مقایسه تولید پروتئاز قلیایی توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در غلظت های مختلف ساکارز پس از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه

ج) اثر pH های مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

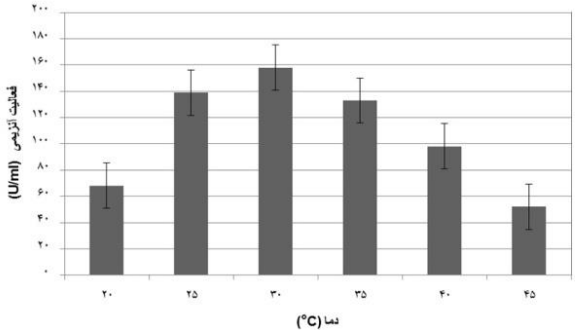
در این مرحله اثر pH های ۱۲-۶ بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی مورد بررسی قرار گرفت. در مورد *استرپتومایسس دی استاتیکوس* بیشترین فعالیت پروتئاز قلیایی در pH=۱۰ و معادل (U/ml) ۱۶۰ بود. در مورد pH های ۶ و ۷ فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی به ترتیب معادل (U/ml) ۲۴ و (U/ml) ۶۵ بود. کاهش در فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در pH=۶ به میزان ۸۵ درصد و در pH=۷ به میزان ۵۹/۳۷ درصد مشاهده شد. نتایج این آزمایش در نمودار (۲) نشان داده شده است.



نمودار ۲: مقایسه تولید پروتئاز قلیایی در pH های مختلف توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در زمان حداکثر تولید (۷۲ ساعت) در ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه

د) اثر دماهای مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی تولید شده توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سلسیوس به ترتیب معادل (U/ml) ۶۸، (U/ml) ۱۳۹، (U/ml) ۱۵۸، (U/ml) ۱۳۳، (U/ml) ۹۸ و (U/ml) ۵۲ بود. بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی تولید شده توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس معادل (U/ml) ۱۵۸ بود. نتایج این آزمایش در نمودار (۳) نشان داده شده است.

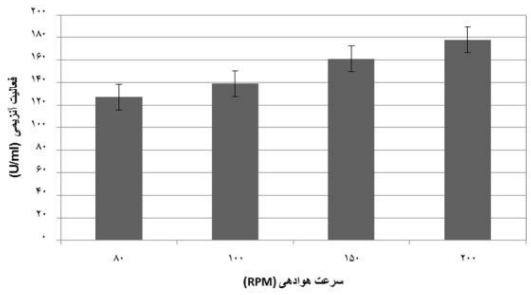


نمودار ۳: مقایسه تولید پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در دماهای مختلف پس از ۷۲ ساعت (زمان حداکثر تولید) با سرعت هوادهی ۱۰۰ دور بر دقیقه

ه) اثر سرعت های هوادهی مختلف در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

در این مرحله اثر سرعت های هوادهی مختلف در فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* مورد ارزیابی قرار گرفت.

در مورد *استرپتومایسس دی استاتیکوس* نیز بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در سرعت هوادهی ۲۰۰ دور بر دقیقه مشاهده شد که معادل (U/ml) ۱۷۸ بود. با کاهش سرعت هوادهی به ۱۵۰ دور بر دقیقه فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی (U/ml) ۱۶۱ به رسید. فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در سرعت های هوادهی ۸۰ و ۱۰۰ دور بر دقیقه به ترتیب معادل (U/ml) ۱۲۷ و (U/ml) ۱۳۹ بود. نتایج این آزمایش در نمودار (۴) نشان داده شده است.



نمودار ۴: مقایسه تولید پروتئاز قلیایی حاصل *از استرپتومایسس دی استاتیکوس* در سرعت های هوادهی مختلف پس از ۷۲ ساعت (زمان حداکثر تولید) در ۳۰ درجه سلسیوس

و) بهینه سازی شرایط با روش تاگوچی

همان طور که در بخش (ی) شرح داده شد. ۸ آزمایشی که توسط نرم افزار Qualiteck 4 طراحی شده بود انجام شد و تأثیر ۴ فاکتور دما، pH، سرعت هوادهی و غلظت ساکارز بررسی شد و مشخص شد که فاکتور pH به میزان ۳۷/۴۰٪ بیشترین تأثیر را در فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* داشت و فاکتور غلظت ساکارز و دما به میزان ۱۸/۰۹٪ کمترین تأثیر را در فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* داشتند که در جدول (۴) نشان داده شده است .

ح) شناسایی جدایه برتر *اکتینومیست* مولد آنزیم پروتئاز قلیایی با استفاده از تست های بیوشیمیایی

شناسایی جدایه های مولد آنزیم پروتئاز قلیایی علاوه بر خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی بر اساس تست های بیوشیمیایی صورت گرفت که در جدول (۵) نشان داده شده است.

جدول ۵: تست های بیوشیمیایی انجام شده برای شناسایی جدایه برتر اکتینومیست مولد آنزیم پروتئاز قلیایی

تست بیوشیمیایی	*استرپتومایسس دی استاتیکوس*
تست لسیتیناز	–
احیای نیترات	–
تولید H_2S	+
تجزیه نشاسته	+
رشد در دمای ۴۵°c	–
تخمیر ساکارز	+
تخمیر مانیتول	+
تخمیر اینوزیتول	+

بحث

در این تحقیق جدایه مولد پروتئاز قلیایی با فعالیت آنزیمی معادل (U/ml)۱۵۰ از خاک جداسازی شد. در بررسی اثر غلظت های مختلف ساکارز در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی، با افزایش غلظت ساکارز به ۱۰ درصد تولید آنزیم به بالاترین میزان خود می رسید ولی افزایش غلظت ساکارز به بالاتر از این میزان تأثیری در افزایش تولید پروتئاز قلیایی نداشت. در تحقیقاتی که Tumar & Singh در سال ۲۰۰۷ انجام دادند در بین منابع کربنی مختلف بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی را در حضور ۱ درصد وزنی حجمی ساکارز مشاهده کردند (۲۹). در تحقیقاتی که Kathiresan and Manivannan در سال ۲۰۰۷ روی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از یک نمونه *استرپتومایسس* انجام دادند و Ningthoujam و همکاران در سال ۲۰۰۷ روی *نوکاردیوپسیس پراسینا* (HA-4) انجام دادند ساکارز را به عنوان بهترین منبع کربن معرفی کردند (۳۰ و ۳۱). Awad و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی را در *استرپتومایسس پسودوگریزئولوس* (NRC-15) در حضور کازئین مشاهده کردند

(۳۲). Verma و همکاران در سال ۲۰۱۳ روی چندین گونه *استرپتومایسس* کار کرده و بهترین منبع کربن برای بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی را ساکارز دانستند (۳۳). Abdelwahed و همکاران در سال ۲۰۱۴ بهترین منبع کربن برای *استرپتومایسس آمبوفاسینس* فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از را نشاسته در نظر گرفتند (۳۴). نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیقات Tumar & Singh در سال ۲۰۰۷ مطابقت داشت. در مرحله بعدی آزمایش اثر pH های ۶ تا ۱۲ روی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی بررسی شد. در تحقیق حاضر بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در pH=۱۰ مشاهده شد. بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در pH های مختلف عنوان شده است. Kathiresan and Manivannan در سال ۲۰۰۷، pH بهینه برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از یک گونه *استرپتومایسس* را ۸/۵ عنوان کردند (۳۰). Vishalakshi و همکاران در سال ۲۰۰۹ دریافتند که بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس گولبارجنسیس* در pH= ۹ می باشد (۳۵). در تحقیقاتی که Ahmad در سال ۲۰۱۱ انجام داد بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس آرانتیوگریزئوس* (EGS-5) را در pH= ۱۰-۱۰/۵ عنوان کرد (۳۶). Jani و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *ساکارومونوسپورا ویریدیس* (SJ-21) را در pH= ۹/۵ مشاهده کردند (۳۷). Mane و همکاران در سال ۲۰۱۳ دریافتند که بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس* (D_1) در pH=10 می باشد (۳۸). طبق تحقیقات قبلی دامنه pH مؤثر در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی دامنه ۱۲-۶ =pH می باشد زیرا *اکتینومیست* ها در دامنه pH قلیایی زندگی می کنند. در این تحقیق نیز بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در pH=۱۰ بود که با توجه به رشد *اکتینومیست* ها در pH قلیایی قابل توجیه است. در مرحله بعدی اثر دامنه دمای ۲۰ تا ۴۵ درجه سلسیوس در تولید پروتئاز قلیایی بررسی شد. بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بود. Kathiresan در سال ۲۰۰۷ دمای ۳۰ درجه سلسیوس را دمای بهینه برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی معرفی کردند (۳۰). Ahmed و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس آورمکتینوس* را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس مشاهده کردند (۳۹). Verma و همکاران در سال ۲۰۱۱ دمای بهینه برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *ترموآکتینومایسس* (RM-4) را دمای ۸۰ درجه سلسیوس معرفی کردند (۴۰). Jani و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *ساکارومونوسپورا ویریدیس* (SJ-21) را در دمای ۵۵ درجه سلسیوس مشاهده کردند (۳۷). در تحقیقاتی که Abdelwahed و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی *استرپتومایسس آمبوفاسینس* انجام دادند بیشترین تولید آنزیم پروتئاز قلیایی را در دمای ۳۰ درجه سلسیوس مشاهده کردند (۳۴). در این تحقیق جدایه مولد آنزیم پروتئاز قلیایی از خاک اصفهان جداسازی شد که رشد آن در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نیز با توجه به دمای اصفهان منطقی به نظر می رسید.

در مرحله بعدی اثر سرعت هوادهی روی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی ارزیابی شد. طبق تحقیق حاضر بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در سرعت هوادهی ۲۰۰ دور بر دقیقه بود. Ahmed و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی حاصل از *استرپتومایسس آورمکتینوس* را در محیطی که با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه هوادهی می شد عنوان کردند (۳۹). در تحقیقاتی که Ahmad در سال ۲۰۱۱ انجام داد نیز به این نتیجه رسید که *استرپتومایسس آرانتیوگریزئوس* (EGS-5) بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی را در محیطی که با سرعت ۱۸۰ هوادهی می شود دارد (۳۶). بیشتر جنس های *اکتینومیست* باکتری های هوازی بوده و در سرعت های هوادهی ۲۵۰-۲۰۰ دور بر دقیقه بیشترین رشد را خواهند داشت. افزایش سرعت هوادهی سبب افزایش بیوماس سلولی می شود و با افزایش تعداد میکروارگانیسم در واحد حجم مقدار تولید آنزیم پروتئاز قلیایی بیشتر خواهد بود. از این نظر نتایج به دست آمده در این تحقیق تأیید کننده نتایج قبلی بود. در این تحقیق به منظور ارزیابی تأثیر فاکتورهای مختلف روی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی *استرپتومایسس دی استاتیکوس* از طرح آماری تاگوچی استفاده گردید که در تحقیقات قبلی در زمینه تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در *اکتینومیست ها* کار نشده بود.

این تحقیق اولین گزارش از تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در ایران است. حداکثر فعالیت

آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *استرپتومایسس دی استاتیکوس* در غلظت (g/l)۱۰ ساکارز، pH=۱۰ دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت هوادهی ۲۰۰ دور بر دقیقه به دست آمد. با توجه به این که جدایه *استرپتومایسس دی استاتیکوس* از خاک اصفهان غربال گری شد به نظر می رسد استفاده از سویه های بومی می تواند در دست یابی به تولید بالای آنزیم پروتئاز قلیایی مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی و مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به دلیل همکاری صمیمانه کمال سپاس گزاری را دارند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Bergey s Manual of Systematic Bacteriology. Ninth edition. Williams and Wilkins USA. 1986. 605-619
2. Dastager SG, Wen JL, Dayanand A, Shu KT, Xin PT, Xiao YZ, Li X, Cheng L. Seperation identification and analysis of pigment (melanin) production in Streptomyces. Afr J of Biotech. 2006; 5(8): 1131-1134.
3. Arifuzzaman M, Khatun MR, Rahman H. Isolation and screening of actinomycetes from sundarbans soil for antibacterial activity. Afr J of Biotech .2010; 9(29):4615-4619.
4. Saravanakumar R, Moomeen HS, Ronald J, Kannan M. Control of fish bacterial pathogens antagonistic marine actinomycetes isolated from gullf of mannar coast. World J of Fish and Marine Sci. 2010; 2(4):275-279.
5. Raja A, Prabakarana P. Actinomycetes and drug an overview. Ame J of Drug Dis and Dev 2011; 1(2): 75-84.
6. Sharma D, Kaur T, Chadha BC, Manhas RK. Antimicrobial activity of actinomycetes against multidrug resistant Staphylococcus aureus E. coli and various other pathogen. Tro J of Pharm Res. 2011; 10(6): 801-808.
7. Shaaban MT, El-Sabbagh SMM, Alam A. Studies on an Actinomycete producing a melanin pigment inhibiting aflatoxin B1 production by Aspergillus flavus. Life Sci J. 2013; 10(1):1437-1448.
8. Gerber NN, Lechevalier HA. Geosmin an earthy smelling substance isolated from Actinomycetes. App Mic. 1965; 13: 935-938.
9. Mohanasrinivasan V, Sriramkalyal P, Ipsita N, Subathradevi C, Selvarajan E, Suganthi V, Jesmimah NS. Fermentative production of extracellular pigment from Streptomyces coelicolor MSIS1. Res J of Biotech. 2013; 8(4): 31-41.
10. Franco- Correa M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodriguez MX, Barea JM. Evalution of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. App Soil Eco. 2010; 45: 209-217.
11. Bressollier P Letourneau F Urdaci M Verneuil B. Purification and Characterization of a keratinolytic serine proteinase from Streptomyces albidoflavus. Ame Soc for Mic. 1999; 65: 2570-2576.
12. Jeffrey LSH. Isolation characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at semongok sarawak. Afr J of Biotech. 2008; 7(20): 3697-3702.
13. Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline protease molecular approaches and industrial applications. App Biotech. 2002; 59:15-32.
14. Kumar C, Takagi H. Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. Biotech Adv 1999; 17:561-594.
15. Rawlings ND, Barrett YA. Evolutionary families of peptidas. Biochem J. 1993; 290:205-218.
16. Elshafei H, Abdel-Aziz MS, Ahmed A, Abdalla AH. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium Streptomyces albidoflavus. Afr J of Biotech. 2010; 6: 125-142.
17. Santos LF, Sato HH. Production of alkaline protease from Cellulosimicrobium cellulans. Bra J of Mic. 2009; 40:54-60.
18. Kezia D, Rao MN, Naidu SV. Influence of various environmental parameters on protease secretion from Bacillus subtilis DKMNR. Int Res J of Pharm. 2011; 2(3): 178-182.
19. Nadeem M, Qazi JI, Baij S, Syed QA. Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by Bacillus licheniformis N-2. Food Tech and Biotech. 2008; 46(4):388-394.
20. Devi MK, Banu AR, Gnanaprabhal GR, Pradeep BV, Palaniswamy M. Purification characterization of alkaline protease enzyme from native isolate Aspergillus niger and compatibility with commercial detergent. Ind J of Sci and Tech. 2008; 1(7): 250-259.
21. Charles P, Devanathan V, Anbu P, Ponnus T, Wamy NM, Kalaichelvan TP, Hur KB. Purification characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from Aspergillus nidulans HA-10. J of Bas Mic. 2008; 48: 347-352.
22. Samarntarn W, Cheevadhanarak S, Tanticharoen M. Production of alkaline protease by genetically engineered Aspergillus oryzae U1521. J of Gen App Mic. 1999; 45:99-103.
23. Shafee N, Tan CC, Mohamad S, Rahman RNZ, Basri M, Salleh AB. Nutritional factors affecting organic solvent tolerant alkaline protease production by a new Bacillus cereus strain 146. Afr J of Mic Res. 2006; 3(9):491-497.
24. Chi Z, Ma C, Wang P, Li HF. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast Aureobasidium pullulans. J of Biore Tech. 2007; 98:534-538.
25. Akpinar O, Ucar F, Yalcin T. Screening and regulation of alkaline extracellular protease and ribonuclease production of Yarrowia lipolytica strains isolated and

identified from different cheese in Turkey. Spri. 2011; 61(4):904-915.
26. Nelson G, Young WT. Extracellular acid and alkaline protease from Candida olea. J of Gen Mic. 1987; 133:1461-1469.
27. Kay NB, Chandrashekhara Shamarez AM, Goudanavar PS, Manvi FV. Isolation and morphological characterization antibiotic producing actinomycetes. Trop J of Pharm Res. 2010; 9(3):231-236.
28. Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Rundall R. Protein measurement with folin phenol reagent. J of Bio and Chem. 1951; 193:265-275.
29. Tumar J, Singh SP. Secretion of an alkaline protease from a salt tolerant and alkaliphilic Streptomyces clavuligerus strain MIT-1. Bra J of Mic. 2007; 38:766-772.
30. Kathiresan K, Manivannan S. Production of alkaline protease by Streptomyces sp . isolated from coastal mangrove sediment. Res J of Env Sci. 2007; 1(4): 173-178.
31. Ningthoujam DS, Kshetri P, Sanasam S, Nimaichand S. Screening identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. World App Sci J. 2009; 7(7): 907-916.
32. Awad HM, Mostafa EE, Saad MM, Selim MH, Hassan HM. Patial purification and characterization of extracellular protease from a halophilic and thermotolerant strain Streptomyces pseudogrisiolus NRC-15. Ind J of Biochem and Bioph. 2013; 50: 305-311.
33. Verma J, Shikha, Modi DR, Saxena S. Characterization of novel alkaline protease producing Streptomyces from alkaline soil of Lucknow(UP) India. Int J Pharm Bio Sci. 2013; 4(2): 214-224.
34. Abdelwahed NAM, Danial EM, Elnaggar NE, Mohamed AA. Optimization of alkaline protease production by Streptomyces ambofaciens in free and immobilized form. Ame J of Biochem and Biotech. 2014; 10(1): 1-13.
35. Vishalakshi N, Lingappa k, Amena S, Prabhakar M, Dayanand A. Production of alkaline protease from Streptomyces gulbargensis and its application in removal of blood stains. Ind J of Biotech. 2009; 8: 280-285.
36. Ahmad MS. Production of thermostable alkaline protease from an alkaline resistant Streptomyces isolate EGS-5. Int J of Aca Res. 2011; 3: 5-10.
37. Jani SA, Chudasma CJ, Patel DB, Bhatt PS, Patel HN. Optimization of extracellular protease production from alkali thermo tolerant Actinomycetes Saccharomonospora viridis SJ-21. Bulletin of Env Pharm and life sci. 2012; 1(6):84-92.
38. Mane M, Mahadik K, Kokare C. Purification characterization and applications of thermostable alkaline protease from marine Streptomyces sp. D_1. Int J Pharm Bio Sci. 2013; 4(1): 572-582.
39. Ahmed SA, Aldomany RA, Elshayeb NMA, Radwan HH, Saleh SA. Optimization immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties. Res J of Agri and Bio Sci. 2008; 4(5): 434-446.
40. Verma A, Singh H, Singh R, Agarwal S. Potential of alkaline protease isolated from Thermoactinomyces sp RM4 as an alternative to conventional chemicals in leather industry dehairing process. Int J of Agril Env and Biotech. 2011; 4(2): 173-178.