مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
جلد چهار، شماره چهار- ب، زمستان ۱۳۸۴، ۳۱۹-۳۱۲

تولید و خالص‌سازی آنزیم پروتئاز قلیایی از باسیلوس قلیادوست جدا شده از خاک

حمیدرضا فلاحت‌پیشه[۱]، دکتر محمود جلالی[۲]، دکتر ناصر بادامی[۳]، نادیا مردانی[۴]

دریافت مقاله:۱۳۸٤/٦/۲ اصلاح نهایی: ۱۳۸٤/۹/۱٤ پذیرش مقاله: ۱۳۸٤/۹/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: پروتئازها جزو مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند پروتئازهای قلیایی در ترکیب شوینده‌ها استفاده می‌شوند. از آن‌جایی که مقاومت در برابر حرارت و محیط قلیایی دو خصوصیت مهم آنزیم‌ها به هنگام افزودن به ترکیب پاک کننده‌ها است لذا جستجو برای یافتن منابع آنزیمی و آنزیم‌های قلیایی دارای اهمیت بسیاری می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی جداسازی باسیلوس قلیادوست از خاک و امکان تولید آنزیم پروتئاز قلیایی از سوش جدا شده و خالص‌سازی آنزیم تولید شده بود.

مواد و روش‌ها: عملیات جداسازی و تخلیص باسیلوس قلیا دوست از نمونه‌های خاک با استفاده از کشت در محیط اختصاصی با هدف شناسایی فعالیت پروتئازی اولیه و سپس تخلیص سویه‌های دارای فعالیت پروتئازی انجام گردید. پس از آن گونه باسیلوس ۵-۲ در محیط مناسب با شرایط معین کشت داده شد. و خالص‌سازی آن از طریق: ۱- رسوب‌دهی فاز آنزیمی از طریق اشباع‌سازی با آمونیوم سولفات ۵۵٪. ۲- تغلیظ توسط اولترافیلتراسیون ۳- کروماتوگرافی تعویض کاتیونی توسط رزین کربوکسی‌متیل سلولز صورت گرفت. در تمام مراحل فعالیت پروتئاز قلیایی از طریق هیدرولیز سوبسترای کازئین درpH۱۰ برای مدت زمان مشخص و سپس اندازه‌گیری محصول پروتئولیز(میزان معادل تیروزین) در طول موج ۲۷۵ نانومتر انجام می‌گرفت.

یافته‌ها: با مقایسه خصوصیات بیوشیمیایی و تاکسونومیک، باسیلوس ۵-۲ با باسیلوس آلکالوفیلیک تطابق داشت. هم‌چنین این سویه در pHهای قلیایی دارای فعالیت پروتئولیتیک و آمیلولیتیک بود ولی فعالیت ژلاتینولیتیک نداشت. پیشرفت خالص سازی با روش الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید (PAGE) بررسی و جرم ملکولی آنزیم با روش SDS-PAGE و با کمک استانداردهای پروتئینی معادل ۲۴۷۰۰ دالتون معین گردید.

نتیجه‌گیری: پس از اتمام خالص‌سازی راندمان کل ۲۴٪ و مرتبه خالص‌سازی ۵۰ بار تعیین شد که راندمان خالص‌سازی نهایی به دست آمده مشابه راندمان به دست آمده در سایر تحقیقات بود. به نظر می‌رسد ملکول این آنزیم یک ملکول منومر باشد چون میزان تحرک الکتروفورتیک تک باندهای به دست آمده در PAGE و SDS-PAGE مشابه یکدیگر بود.

واژه‌های کلیدی: پروتئاز قلیایی، باسیلوس قلیادوست، خالص‌سازی، فعالیت ویژه آنزیمی

۱- (نویسنده مسئول) کارشناس ارشد گروه آموزشی بیوشیمی و عضو هیأت علمی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۲۲۳۷۶۴۲۶-۰۲۱، فاکس: ۲۲۳۶۰۶۶۰-۰۲۱، پست الکترونیکی: hfalahatpishe@yahoo.com
۲- دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- کارشناس گروه آموزشی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:16 IRST on Tuesday December 12th 2017

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:16 IRST on Tuesday December 12th 2017

مقدمه

پروتئازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند که تقریباً ۶۰٪ فروش آنزیم دنیا به آن‌ها اختصاص دارد [۱] از این میان پروتئازهای قلیایی به صورت اختصاصی به فرمول پاک کننده‌ها افزوده می‌شوند. در مقایسه با پروتئازهای با منشأ قارچ و یا جانوری انواع تهیه شده از باکتری‌ها دارای اهمیت بیشتری هستند [۲]. پروتئازهای به کار گرفته شده در ترکیب پاک کننده‌ها لزوما می‌بایستی دارای فعالیت آنزیمی بالا در محدوده وسیعی از pH و درجه حرارت باشند بنابراین جستجو برای یافتن و تخلیص آنزیم‌های پروتئولیتیک که هر دو خاصیت را توام با هم داشته باشند از اهمیت خاصی برخوردار است. از ۱۹۷۵ تا به امروز رده‌های گوناگونی از باسیلوس‌های قلیا دوست شناسایی و قدرت تولید پروتئازهای قلیایی در آن‌ها بررسی شده است [۹-۲] بیشتر باسیلوس‌های تولید کننده پروتئازها هتروتروفیک هستند بنابراین به خوبی روی محیط‌های کشت گوناگون رشد می‌کنند. تولید آنزیم توسط رده‌های گوناگون قویا به ترکیب محیط کشت وابسته است [۱۰] اما تنوع محیط کشت برای تولید پروتئازها زیاد می‌باشد و گزارش‌ها در مورد کارهای مناسب‌سازی محیط کشت تا به حال ناچیز و محدود بوده است [۱۴-۱۱]. از مهم‌ترین آلکالین پروتئازها که تابحال تولید شده‌اند می‌توان به سوبتیلیسین BPN از باسیلوس لیکنیفورمیس [۱۶-۱۵] سوبتیلیسین کارلسبرگ از باسیلوس لیکنیفورمیس [۱۷] سوبتیلیسین آمیلوساکاریتیکوس از باسیلوس آمیلوساکاریتیکوس [۱۹-۱۸] و سوبتیلیسین E از باسیلوس سوبتیلیس [۲۱-۲۰] اشاره نمود. سوبتیلیسین‌ها در pHهای ۱۰ – ۸/۵ دارای بیشترین فعالیت هستند [۲]. انواع پروتئازهای قلیایی دارای محدوده pH فعالیت بالاتری نسبت به سوبتیلیسین‌ها می‌باشند [۲۳-۲۲]. هدف از انجام این مطالعه جدا کردن یک گونه باسیلوس قلیادوست از خاک با قدرت تولید آنزیم پروتئاز قلیایی و شناسایی آن درحد امکان می‌باشد هم‌چنین از آنجایی که بر اساس نظریه و در و هوریکوشی بیشتر میکروارگانیسم‌های قلیا دوست می‌توانند پروتئاز قلیایی نیز تولید نمایند [۲۴] اقدام به تولید و خالص‌سازی پروتئاز قلیایی نیز خواهیم نمود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، در ابتدا ۱ گرم از نمونه خاک با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل پس از مخلوط شدن به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سوسپانسیون حاصله را تا دمای آزمایشگاه خنک می‌کنیم و در شرایط استریل در پلیت حاوی محیط کشت اختصاصی جداسازی آلکالوفیلیک باسیلوس‌ها کشت داده و در ۳۰°C درجه برای ۳-۲ روز و یا ۳۷ °C درجه برای یک روز انکوبه نمودیم [۷]. بعد از این مدت کلنی‌هایی که اطراف آن‌ها یک لایه شفاف تشکیل شده بود به نشانه وجود خاصیت پروتئازی جدا شد. سپس ازهر یک از ۴ کلنی به دست آمده کشت ذخیره (stock culture) تهیه و شناسایی باکتری‌های جدا شده انجام گردید [۲۵]. به منظور خالص‌سازی آنزیم تولیدی ۲۵ میلی‌لیتراز محیط کشت مایع اصلی (نشاسته ۵ گرم، کاز آمینواسید ۰/۳ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، K2HPO4 ۰/۱گرم، MgSO4 .7H2O ۰/۰۲ گرم۹۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه و pH۱۰/۵ با بیکربنات سدیم (۱۰٪) داخل ارلن‌های (۲۵۰cc) ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع تلقیح در شرایط کاملاً استریل اضافه شد پس از آن برای ۳۶ ساعت عملیات همزنی در ۴۰°C-۳۷ و با rpm ۱۲۵ در شیکر انکوباتور انجام شد سپس توسط سانتریفوژ یخچال‌دار MSE HIGH SPEED 25 در ۴ °C- و ۱۰۰۰۰×g محتویات مخلوط شده سلول‌ها و سایر اجزای سلولی از بخش آنزیمی و پروتئینی جدا گردیدو فعالیت آلکالین پروتئازی و میزان پروتئین کل در آن اندازه‌گیری شد. فعالیت آلکالین پروتئازی بر اساس روش هیگاهارا و همکاران [۲۶] اندازه‌گیری گردید. بر این اساس فعالیت پروتئاز قلیایی عبارتست از میزان آنزیمی که می‌تواند در مدت ۱ دقیقه محصول هیدرولیزی معادل ۱ میکروگرم تیروزین (با اندازه‌گیری در ۲۷۵ نانومتر) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در pH۱۰ (بافر بورات– NaOH) و با به کار بردن کازئین به عنوان سوبسترارا تولید نماید. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کل موجود در هر محیط کشت از روش لووری

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:16 IRST on Tuesday December 12th 2017

(Lowry) استفاده گردید. منحنی استاندارد توسط آلبومین سرم گاوی (BSA) رسم و غلظت محلول پروتئینی مجهول از طریق آن معین گردید [۲۷]. فعالیت ویژه آنزیمی میزان فعالیت آنزیم به کل پروتئین موجود در محیط است که در هر لحظه می‌توان با تقسیم کردن فعالیت پروتئاز قلیایی (APU) بر میزان پروتئین (mg) به دست آورد [۲۸].

خالص‌سازی آنزیم آلکالین پروتئاز: تمام مراحل خالص‌سازی در°C ۴ انجام گرفت. به ۱۲۲ میلی‌لیتر از محلول آنزیمی به دست آمده پودر سولفات آمونیوم آن قدر اضافه شد تا درصد اشباعیت آن به ۵۵٪ رسید [۳]. رسوب حاصله با سانتریفوژ دور بالا یخچال‌دار جدا و دوباره در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و با pH۷/۵ بارامی حل گردید و توسط روش اولترافیلتراسیون یا دیالیز تحت خلا (cut off<10000) ضمن کاهش حجم تا ۱۰میلی‌لیتر و تغلیظ نمونه قدرت یونی آن نیز کاهش داده شد [۲۸]. در مرحله آخر ۲ میلی‌لیتر از این محلول به ستون کروماتوگرافی به ابعاد (۳۰Cm×۲/۵Cm) حاوی رزین از قبل آماده شده کربوکسی‌متیل سلولز تزریق گردید پس از شستشوی ستون با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و با pH۷/۵ و جهت عملیات جداسازی آنزیم متصل شده به رزین، با افزودن نمک KCl (۰/۵مولار) به بافر فسفات شستشو دهنده فراکسیون‌های حاصله در حجم‌های ۲ میلی‌لیتری و تا ۸۰ میلی‌لیتر (۴۰ لوله) توسط دستگاه فراکشن کالکتور جمع گردید. پس از اندازه‌گیری فعالیت آلکالن پروتئازی و غلظت پروتئین کل فراکسیون‌های حاوی آنزیم جدا و با هم مخلوط شدند و سپس دوباره اولترا فیلتره شد و در نهایت ۱ میلی‌لیتر نمونه آنزیمی خالص به دست آمد.

برای تشخیص خالص بودن نمونه آنزیمی از روش پلی‌آکریل‌آمید ژل الکتروفورز در شرایط دناتوره نشده (PAGE) استفاده گردید [۲۸]. تعیین جرم ملکولی به وسیله پلی‌آکریل‌آمید ژل الکتروفورز و در حضور سدیوم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) انجام شد. استانداردهای پروتئینی استفاده شده برای رسم دیاگرام کالیبراسیون عبارت بودند از: لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ ۴،۱۴KDa کربنیک انهیدراز ۲۹ KDa، اوالبومین ۴۳ KDa و سرم آلبومین گاوی ۶۸ KDa. پس از الکتروفورز ژل حاصله توسط کوماسی بلو بریلیانت و نیز توسط تیترات نقره بروش پلی‌کروماتیک رنگ‌آمیزی می‌گشت [۲۸].

نتایج

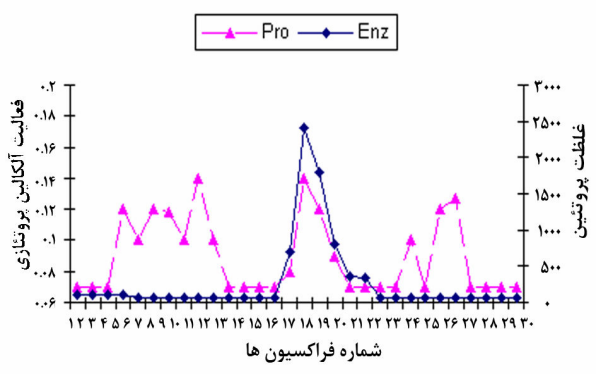
پس از مشخص شدن باسیلوس ۵-۲ به عنوان سوش مناسب، برخی از خصوصیات تاکسونومیک و بیوشیمیایی آن بررسی گردید به طور مثال شکل اسپورها کروی نبود و اسپورانژیا متورم به نظر نمی‌آمد. به برخی آزمایش‌های بیوشیمیایی از جمله: تست کاتالاز و رشد در pH بالاتر از ۱۰ جواب مثبت و به سایر آزمایشات شامل تست‌های v-g تولید اسید از گلوکز تولید گاز از گلوکزاستفاده از سیترات احیای نیترات و رشد در دمای بالاتر از ۵۰°°C پاسخ منفی داد. هم‌چنین به هر سه آزمایش هیدرولیز کازئین ژلاتین و نشاسته در pH۷ پاسخ منفی و در pH۱۰ به هیدرولیز نشاسته و کازئین پاسخ مثبت و به هیدرولیز ژلاتین پاسخ منفی داد. پس از آن خصوصیت تولید آنزیم آلکالین پروتئاز آن بررسی گردید. فعالیت ویژه آنزیمی سوش ۵-۲ در این مرحله معادل ۲۸۲۹ APU/mg تعیین گردید (جدول ۱).

پس از اشباع‌سازی محلول آنزیمی با آمونیوم سولفات ۵۵٪ حدود ۷۰٪ از کل آنزیم و ۴/۷٪ از کل پروتئین موجود در فاز رسوب قرار گرفت با درصد اشباعیت ۵۵٪ راندمان خالص‌سازی برای این مرحله حدود ۶۲٪ بود (جدول ۱).

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:16 IRST on Tuesday December 12th 2017

جدول ۱: مراحل خالص سازی آنزیم آلکالین پروتئاز و نتایج هر مرحله

مراحل خالص‌سازی	حجم (ml)	APU	پروتئین (mg)	فعالیت ویژه APU/mg	مرتبه خالص‌سازی	درصد بازیافت
محلول رویی اولیه	۱۲۲	۲۳۷۹۱۱	۸۴/۱	۲۸۲۹	۱	۱۰۰
رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم ۵۵٪	۱۰	۱۴۷۸۵۷	۱/۸	۸۲۱۴۸	۲۹	۶۲
کروماتوگرافی تعویض کاتیونی با CM-Cellulos	۱	۵۷۴۲۰	۰/۴	۱۴۳۵۵۰	۵۰	۲۴

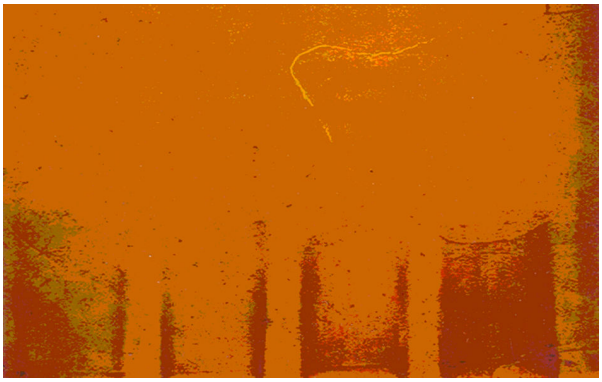


نمودار ۱: جداسازی بخش حاوی آنزیم آلکالین پروتئاز از سایر اجزای پروتئینی توسط کروماتوگرافی تعویض کاتیونی با رزین CM-Cellulos.

در این پژوهش با استفاده از یک ستون تعویض کاتیونی فراکسیون‌های ۲ میلی‌لیتری ۲۱ تا ۱۴ جمع‌آوری گردید و همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود جداسازی کافی و مناسب به نظر می‌رسد آنزیم تولیدی در این پژوهش نیز با ۵۰ مرتبه خالص‌سازی در نهایت راندمان خالص سازی ۲۴٪ را داشت. با روش SDS- PAGE وزن ملکولی این آنزیم ۲۴۷۰۰ دالتون تعیین گردید (شکل ۱)

شکل ۱: تعیین وزن مولکولی آنزیم آلکالین پروتئاز با روش SDS-PAGE

برای اثبات خالص‌سازی از روش پلی‌آکریل‌آمید ژل الکتروفورز (PAGE) استفاده گردید و تشکیل یک باند منفرد خلوص آن را اثبات کرد (شکل ۲).



شکل ۲: بررسی خلوص آنزیم خالص شده با روش ژل الکتروفورز (PAGE) پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو

بحث

با مقایسه باسیلوس ۵-۲ با باسیلوس‌های سوبتیلیس و آلکالوفیلیک از نظر تاکسونومیک و فیزیولوژیک می‌توان دید باسیلوس ۵-۲ دارای تشابه بیشتری با باسیلوس آلکالوفیلیک است. در مقایسه مشابهی که توسط آقای هیتومی و همکاران در ۱۹۹۴ انجام شد علی‌رغم این که باسیلوس جدا شده در pH۱۰ و درجه حرارت ۵۵ °C قادر به رشد و تولید آنزیم بود اما به خاطر برخی تشابهات هم‌چون نتیجه تست VP و تست احیا نیترات و تست استفاده از سیترات که همگی مثبت بودند باسیلوس KSM-K16 را به عنوان زیر رده باسیلوس سوبتیلیس در نظر گرفتند [۲۹]. در بررسی دیگری که در ۱۹۹۳ توسط فوجی وارا و همکاران صورت گرفت چون باسیلوس "B18 قادر به رشد در pH خنثی نبود به عنوان آلکالوفیلیک باسیلوس در نظر گرفته شد [۱۷]. چون باسیلوس ۵-۲ در PH خنثی قادر به رشد و تولید آنزیم نبود بنابراین می‌توان آن را به عنوان آلکالوفیلیک باسیلوس در نظر گرفت. برخی از گونه‌های باسیلوس آلکالوفیلوس در pHهای قلیایی دارای خاصیت ژلاتینولیتیک هستند [۳۰] اما باسیلوس ۵-۲

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:16 IRST on Tuesday December 12th 2017

این خاصیت را از خود نشان نداد. بیشتر گونه‌های آلکالوفیلیک باسیلوس در pHهای قلیایی دارای فعالیت کازئینولیتیک هستند به طور مثال آلکالوفیلیک باسیلوس Y که توسط شیموگاکی و همکارانش در ۱۹۹۱جداشده است [۳۱] هم‌چنین برخی از گونه‌های استرپتومیسس دارای این فعالیت در pH قلیایی هستند [۲]. بیشترین فعالیت کازئینولیتیک باسیلوس ۵-۲ به شکل خالص نشده بیشتر در pH۱۱ دیده می‌شود اما برای بررسی بیشتر لازم است که آنزیم به شکل خالص شده مورد این بررسی قرار بگیرد. تولید آلکالین آمیلاز همراه با آلکالین پروتئاز در بسیاری از گونه‌های آلکالوفیلیک باسیلوس‌ها دیده شده است [۳۲]. باسیلوس ۵-۲ دارای فعالیت آمیلولیتیک خوبی در pHهای قلیایی است که احتمالاً آلکالین آمیلاز ترشح شده با هیدرولیز نشاسته (منبع کربنی) آن را به واحدهای قندی ساده‌تر از جمله گلوکز و یا مالتوز می‌شکنند تا به منظور تولید آلکالین پروتئاز به داخل سلول‌ها انتقال بیابند. با توجه به اینکه استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربنی می‌تواند منجر به وقوع پدیده توقف کاتابولیکی شود [۳۲] بنابراین استفاده از منابع کربنی پیچیده مثل نشاسته، Ground Barely، و یا حتی خود مالتوز به جای گلوکز توصیه شده است که در مورد باسیلوس ۵-۲ هم صادق است. راجاش پاتل و همکاران در سال ۲۰۰۵ میلادی به بررسی پروتئاز قلیایی تولید شده توسط یک گونه باسیلوس‌هالوآلکالوفیل که از نمک‌زارهای ایالت گجرات هند جدا شده بود اقدام نمودند. آن‌ها برای شناسایی رده باسیلوس از روش تعیین توالی نوکلئوتیدها و آمپلیفیکاسیون 16s RNA استفاده کردند و مشاهده نمودند که باسیلوس فوق (Ve-1) در مجاورت کازآمینو اسید بهترین شرایط را برای تولید آنزیم نشان داد و هم‌چنین گلوکز و آمونیاک باعث توقف تولید آنزیم پروتئاز قلیایی می‌گشت [۶]. در این مطالعه راندمان اشباع‌سازی محلول آنزیمی با نمک سولفات اآمونیوم ۵۵٪ معادل ۷۰٪ بود. شیموگاکی و همکاران از اشباع‌سازی ۷۰٪ با آمونیوم سولفات برای این مرحله استفاده کردند و راندمان خالص‌سازی آن‌ها حدود ۹۰٪ بود [۳۱]. یانگ یوم و همکاران از اشباع‌سازی ۸۰٪ استفاده کردند راندمان آن‌ها ۶۳٪ بود [۲] .ماتسوزاوا و همکاران از اشباع‌سازی ۹۵٪ بهره بردند که راندمان آن‌ها ۶۱٪ بود این طور به نظر می‌رسد اشباع‌سازی ۷۰٪ بهتر از سایر موارد باشد [۲۷]. در این مطالعه با بررسی درصدهای اشباعیت بالاتر از ۵۵٪ مشخص گردید که هر چند میزان آنزیم رسوب کرده افزایش می‌یافت اما از طرفی میزان پروتئین‌های مزاحم هم که جداسازی آن‌ها مشکل بود نیز در فاز آنزیمی افزایش می‌یابد. در برخی از کارهای تحقیقاتی مشابه استفاده از دو ستون تعویض یونی (کاتیونیک و آنیونیک) و یا (تعویض یونی و ژل فیلتراسیون) برای مرحله کروماتوگرافی پیشنهاد شده [۳۴-۳۲] اما در بعضی دیگر استفاده از یک ستون تعویض یونی دیده می‌شود [۲]. آنشو گوپتا و همکاران در سال ۲۰۰۵ میلادی به انجام خالص‌سازی آنزیم پروتئاز قلیایی از منشا باسیلوس قلیادوست (Ve-1) و توسط یک مرحله کروماتوگرافی با فنیل سفاروز ۶ پرداختند آن‌ها توانستند با این روش آنزیم را ۱۰ بار و با راندمان ۸۲٪ خالص نموده و با روش SDS-PAGE وزن ملکولی را حدود ۲۹ کیلودالتون تخمین زدند [۱]. در این پژوهش استفاده از یک ستون تعویض کاتیونی فراکسیون‌های ۲ میلی‌لیتری ۲۱ تا ۱۴ جمع‌آوری گردید و جداسازی کافی و مناسب به نظر می‌رسد. در اکثر کارهای تحقیقاتی مشابه راندمان خالص‌سازی بین ۳۰-۲۰ درصد متغیر بوده است [۳۳-۳۲، ۲]. در این مطالعه راندمان ۲۴٪ بود که در حد سایر تحقیقات بود و وزن ملکولی این آنزیم ۲۴۷۰۰ دالتون تعیین گردید که کاملاً در محدوده آنزیم‌های سوبتیلیسین مانند (۲۷۴۰۰–۲۲۷۰۰ دالتون) قرار داشت [۲]. چون تحرک الکتروفورتیک این آنزیم در دو روش الکتروفورز PAGE و SDS-PAGE مشابه هم بود و در هر دو روش تشکیل یک باند منفرد کاملاً مشهود است بنابراین در نهایت نتیجه گرفته شد ملکول آنزیم فوق مونومر بوده و دارای یک زنجیره پلی‌پپتیدی می‌باشد. مشابه این نتیجه‌گیری در سال ۱۹۹۴ توسط کوبایاشی و همکاران هنگام خالص‌سازی ملکول‌های آلکالین پروتئازی از باسیلوس KSM- K16 گرفته شده بود [۲۹]. هم‌چنین سینگ و همکاران در سال ۲۰۰۰ میلادی به بررسی سرین آلکالین پروتئاز جدا شده از گونه باسیلوس SSR1 که از ملاس چغندر قند جدا شده بود

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:16 IRST on Tuesday December 12th 2017

پرداختند. آن‌ها برای تخلیص آنزیم پروتئاز قلیایی از کروماتوگرافی توسط سفادکس A-50 و سفاروز 6B استفاده کرده و با مقایسه نتایج ژل الکتروفورز (PAGE) و (SDS-PAGE) نتیجه گرفتند که آنزیم یاد شده مونومر و دارای وزن ملکولی ۲۹ کیلودالتون می‌باشد [۳۴].

نتیجه‌گیری

بنابراین نتیجه گرفته شد که آنزیم فوق را می‌توان جزو دسته آنزیم‌های قابل کاربرد در شوینده‌ها قرار داد و البته پس از به کارگیری تکنولوژی کلونینگ و ایجاد تغییراتی در ساختار ژنتیکی می‌توان با افزایش مقاومت حرارتی آن و پس از تولید انبوه به کارگیری آن را در شوینده‌ها عملی ساخت.

تشکر و قدردانی

از کلیه کارشناسان گروه بیوشیمی و تغذیه به خصوص خانم‌ها انصاری و سعدی و جناب آقای عارفانیان تشکر و قدردانی می‌گردد هم‌چنین از کارشناسان گروه میکروبیولوژی به خاطر در اختیار قرار دادن تجهیزات مورد نیاز برای انجام این کار تشکر می‌گردد.

References

[1] Gupta A, Roy I, Patel RK, Singh SP, Khare SK, Gupta MN. One step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkalophilic bacillus sp. *J Chromatography A.* 2005; 1075: 103-8.

[2] Do Young Y, Chung H, Bai D, Oh D, Yu J. Purification and characterization of alkaline protease from an alkalophilic streptomyces sp. *Biosci Biotech Biochem*, 1994; 58(3): 470-4.

[3] Adinarayana K, Ellaiah P, Prasad DS. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated Bacillus subtilis PE-11 AAPS. *pharm SciTech*. 2003; 4(4): 56.

[4] Fujiwara N, Yamamoto K. Purification of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic bacillus sp and properties of the enzyme. *J Ferment Technol*, 1987; 65: 345-8.

[5] Hitomi, et al. Alkaline protease isolation from bacillus sp. 1994; U.S. Patent No.5, 296, 367.

[6] Horikoshi K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms, Part 1. Alkaline protease produced by bacillus No. 221. *Agric Biologic Chem*, 1971; Vol. 35: 1407-14.

[7] Takami H, Akiba T, Horikoshi K. Production of exteremly stable alkaline protease from bacillus sp No. AH – 101. *Appl Microb and Biotech*, 1989; 30: 120-4.

[8] Thangam EB, Rajkumar GS. Purification and characterization of alkaline protease from Alkaligenes faecalis. *Biotechnol Appl Biochem*, 2002; 35: 149-54.

[9] Tsuchiya K, Nakamura Y, Sakashita H, Kimura T. Purification and characterization of a thermosrable alkaline protease from alkalophilic thermo actinomyces sp . Hs 682. *Bioscie Biotech Biochem*, 1992; 156: 246-50.

[10] Keay L, Moseley MH, Andersen RG, O'connor RG, Wildi BS. Production and Isolation of Microbial Proteinases. Biotech and Bioengineering Symp. No.3. Enzyme Bioengineering. (L.B.Wingard,Ed); Wiley , New York. 1972; pp: 63-92.

[11] Aunstrup K. Production, Isolation and Economics of Extracellular Enzymesand Bioconservations. (A.H. Rose ed) Academic Press, New York. 1979; Vol 2: pp: 27-69.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:16 IRST on Tuesday December 12th 2017

[12] Aunstrup K, Anderson O. Preparation of proteolytic enzymes having maximum activity at high alkalinity. 1972; US patent No. 3, 678-43.

[13] Kalisz HM. Microbial Proteinases. Advances in biochemical engineering and biotechnology. 1988; Vol. 36: p: 1-57.

[14] Kennedy JF. Enzyme Technology in Bacteriology . Vol.7a. Publish by V.C.H ; 1987; pp: 156-63.

[15] Aunstrup K, Anderson O, Outtrup H. Proteolytic enzymes, Their production and uses. 1971; UK patent 1243784.

[16] Aunstrup K. New developments in the production and use of bacillus proteases. Abh. Akad.wiss. ddr, Abt.Math.naturwiss. tech. (3N, Mikrob. Enzym prod). 1981; 447-57.

[17] Bergmeyer HU. Proteinases in methods of enzymatic analysis. 3th ed by V.C.H. 1988; vol 5: 258.

[18] Balassa G, Dob B, Zucca J. Over production of sporulation – associated extracellular protease in bacillus subtilis mutants. *Spores*. 1975; 6: 279.

[19] Bollag DM, Edelstein SJ. Protein methods. By Wiley – Liss. 1991; 71-160.

[20] Clause GW. Underestanding Microbes. A laboratory text book for microbiology. By W.H Freeman and company. 1989; pp: 233-303.

[21] Cowan D, Daniel R, Morgan H. Thermophilic proteases. Properties and potential applications. *Trends Biotec*. 1985; 3: 68.

[22] Fogarty WM, Leelly CT: Microbial enzymes and biotechnology . *Elsevier.* 1990; 229-34.

[23] Fron Kena J, Van Versafeld HW, Stouth cmer AH. Production of extracellular enzymes by bacillus licheniformis. European cogress of biotec. 1987; 3: 481.

[24] Vesterberg O. Methods in Enzymology. Ed by W.B.Jokoby, Academic Press. 1971; Vol.22. p: 384

[25] Sneath PHA, Mair NS, Sharp ME, Holt JG. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. 1986; Vol 2: 1104-38.

[26] Higahara B, Matsubara H, Nakai M, Okunuki K. Crystaline bacterial proteinase. 1. Preparation of crystalline proteinase from Bacillus Subtilis. *J Biochemistry*. (Tokyo) 1958; 45: 185-94.

[27] Matsuzawa H, Tokugawa K, Hamaoki M, Mizoguchi M, Taguchi H, Kwon S, et al. Purification and characterization of of aqua lysine I (athermophilic alkaline serine protease) produced by thermus aquaticus Yt-1. *J Biochem*, 1988; 171: 441-7.

[28] Boyer EW, Ingle MB, Mercer GD. Bacillus Alkalophilus subsp. halodurans subsp. nov. analkalin amylase producing, Alkalophilic microorganism. *Int J syst Bacteriology*,1973; 23(3): 238-42.

[29] Fujiwara N. Production of a thermophilic alkaline protease from bacillus sp B 18".*J Biotech*, 1993; 30(2): 245-56.

[30] Shimogaki H, Takeuchi K, Nishino T, Ohdera M, Kudo T, Ohba K. Purification and properties of a novel surface active agent and alkaline resistant protease from bacillus sp Y. *Agric Biologic Chem*, 1991; 55:. 2251-8.

[31] Glazer AG, Nikaido H. Microbial Biotechnology, Fundamentals of applied

of an alkalophilic proteinase of a streptomyces species. *Agric Biologic Chem*, 1974; 38(1): 37-44.

[34] Singh J, Batra and Sobti RC. Serin alkaline protease from a newly isolated bacillus sp.SSR1. *Process Biochemistry*. 2001; 36: 781-5.

microbiology. By W.H Freeman comp. 1995; pp: 256-9.

[32] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. Protein measurement with folin phenol reagent . *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-73.

[33] Nakanishi T, Matsumura Y, Minamiura N, Yamamoto T. Purification and some properties

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 6:16 IRST on Tuesday December 12th 2017