

تولید و خالص سازی آنزیم پروتئاز قلیایی از باسیلوس قلیادوست جدا شده از خاک

حمیدرضا فلاح پیشه^۱، دکتر محمود جلالی^۲، دکتر ناصر بادامی^۳، نادیا مردانی^۴

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۶/۲ اصلاح نهایی: ۱۳۸۴/۹/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۹/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: پروتئازها جزو مهم ترین آنزیم های صنعتی هستند پروتئازهای قلیایی در ترکیب شوینده ها استفاده می شوند. از آن جایی که مقاومت در برابر حرارت و محیط قلیایی دو خصوصیت مهم آنزیم ها به هنگام افزودن به ترکیب پاک کننده ها است لذا جستجو برای یافتن منابع آنزیمی و آنزیم های قلیایی دارای اهمیت بسیاری می باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی جداسازی باسیلوس قلیادوست از خاک و امکان تولید آنزیم پروتئاز قلیایی از سوش جدا شده و خالص سازی آنزیم تولید شده بود.

مواد و روش ها: عملیات جداسازی و تخلیص باسیلوس قلیا دوست از نمونه های خاک با استفاده از کشت در محیط اختصاصی با هدف شناسایی فعالیت پروتئازی اولیه و سپس تخلیص سویه های دارای فعالیت پروتئازی انجام گردید. پس از آن گونه باسیلوس ۲-۵ در محیط مناسب با شرایط معین کشت داده شد. و خالص سازی آن از طریق: ۱- رسوب دهی فاز آنزیمی از طریق اشباع سازی با آمونیوم سولفات ۵۵٪. ۲- تغلیظ توسط اولترافیلتراسیون ۳- کروماتوگرافی تعویض کاتیونی توسط رزین کربوکسی متیل سلولز صورت گرفت. در تمام مراحل فعالیت پروتئاز قلیایی از طریق هیدرولیز سوبسترای کازئین در pH ۱۰ برای مدت زمان مشخص و سپس اندازه گیری محصول پروتئولیز (میزان معادل تیروزین) در طول موج ۲۷۵ نانومتر انجام می گرفت.

یافته ها: با مقایسه خصوصیات بیوشیمیایی و تاکسونومیک، باسیلوس ۲-۵ با باسیلوس آلفا فلیک تطابق داشت. همچنین این سویه در pH های قلیایی دارای فعالیت پروتئولیتیک و آمیلولیتیک بود ولی فعالیت ژلاتینولیتیک نداشت. پیشرفت خالص سازی با روش الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید (PAGE) بررسی و جرم ملکولی آنزیم با روش SDS-PAGE و با کمک استانداردهای پروتئینی معادل ۲۴۷۰۰ دالتون معین گردید.

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

واژه های کلیدی: پروتئاز قلیایی، باسیلوس قلیادوست، خالص سازی، فعالیت ویژه آنزیمی

۱- (نویسنده مسئول) کارشناس ارشد گروه آموزشی بیوشیمی و عضو هیأت علمی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۰۲۱-۲۲۳۷۶۴۲۶، فاکس: ۰۲۱-۲۲۳۶۰۶۶۰، پست الکترونیک: hfalahatpish@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

مقدمه

پروتئازها از مهم ترین آنزیم های صنعتی هستند که تقریباً ۶۰٪ فروش آنزیم دنیا به آنها اختصاص دارد [۱] از این میان پروتئازهای قلیایی به صورت اختصاصی به فرمول پاک کننده ها افزوده می شوند. در مقایسه با پروتئازهای با منشأ قارچ و یا جانوری انواع تهیه شده از باکتری ها دارای اهمیت بیشتری هستند [۲]. پروتئازهای به کار گرفته شده در ترکیب پاک کننده ها لزوماً می بایستی دارای فعالیت آنزیمی بالا در محدوده وسیعی از pH و درجه حرارت باشند بنابراین جستجو برای یافتن و تخلیص آنزیم های پروتئولیتیک که هر دو خاصیت را توأم با هم داشته باشند از اهمیت خاصی برخوردار است. از ۱۹۷۵ تا به امروز رده های گوناگونی از باسیلوس های قلیا دوست شناسایی و قدرت تولید پروتئازهای قلیایی در آنها بررسی شده است [۹-۲] بیشتر باسیلوس های تولید کننده پروتئازها هتروتروفیک هستند بنابراین به خوبی روی محیط های کشت گوناگون رشد می کنند. تولید آنزیم توسط رده های گوناگون قویا به ترکیب محیط کشت وابسته است [۱۰] اما تنوع محیط کشت برای تولید پروتئازها زیاد می باشد و گزارش ها در مورد کارهای مناسب سازی محیط کشت تا به حال ناچیز و محدود بوده است [۱۴-۱۱]. از مهم ترین آلكالین پروتئازها که تا بحال تولید شده اند می توان 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. سوبتیلیسین ها در pH های ۱۰ - ۸/۵ دارای بیشترین فعالیت هستند [۲]. انواع پروتئازهای قلیایی دارای محدوده pH فعالیت بالاتری نسبت به سوبتیلیسین ها می باشند [۲۲-۲۳]. هدف از انجام این مطالعه جدا کردن یک گونه باسیلوس قلیا دوست از خاک با قدرت تولید آنزیم پروتئاز قلیایی و شناسایی آن در حد امکان می باشد هم چنین از آنجایی که بر اساس نظریه و در و هوریکوشی بیشتر میکروارگانیسم های قلیا دوست می توانند پروتئاز قلیایی نیز

تولید نمایند [۲۴] اقدام به تولید و خالص سازی پروتئاز قلیایی نیز خواهیم نمود.

مواد و روش ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، در ابتدا ۱ گرم از نمونه خاک با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل پس از مخلوط شدن به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس سوسپانسیون حاصله را تا دمای آزمایشگاه خنک می کنیم و در شرایط استریل در پلیت حاوی محیط کشت اختصاصی جداسازی آلكالوفیلیک باسیلوس ها 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 کلنی هایی که اطراف آنها یک لایه شفاف تشکیل شده بود به نشانه وجود خاصیت پروتئازی جدا شد. سپس از هر یک از ۴ کلنی به دست آمده کشت ذخیره (stock culture) تهیه و شناسایی باکتری های جدا شده انجام گردید [۲۵]. به منظور خالص سازی آنزیم تولیدی ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع اصلی (نشاسته ۵ گرم، کاز آمینواسید ۰/۳ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، K_2HPO_4 ۰/۱ گرم، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۲ گرم، ۹۰ میلی لیتر آب دیونیزه و pH ۱۰/۵ با بیکربنات سدیم ۱۰٪) داخل ارلن های (۲۵۰cc) ۰/۵ میلی لیتر از مایع تلقیح در شرایط کاملاً استریل اضافه شد پس از آن برای ۳۶ ساعت عملیات همزنی در ۳۷-۴۰°C و با ۱۲۵ rpm در شیکر انکوباتور انجام شد سپس توسط سانتریفوژ یخچال دار MSE HIGH SPEED 25 در ۴°C و $10000 \times g$ محتویات مخلوط شده سلول ها و سایر اجزای سلولی از بخش آنزیمی و پروتئینی جدا گردید و فعالیت آلكالین پروتئازی و میزان پروتئین کل در آن اندازه گیری شد. فعالیت آلكالین پروتئازی بر اساس روش هیگهارا و همکاران [۲۶] اندازه گیری گردید. بر این اساس فعالیت پروتئاز قلیایی عبارتست از میزان آنزیمی که می تواند در مدت ۱ دقیقه محصول هیدرولیزی معادل ۱ میکروگرم تیروزین (با اندازه گیری در ۲۷۵ نانومتر) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در pH ۱۰ (بافر بورات - NaOH) و با به کار بردن کازئین به عنوان سوبسترا تولید نماید. برای اندازه گیری میزان پروتئین کل موجود در هر محیط کشت از روش لووری

(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 4°C 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 $0/01$ مولار و با $\text{pH} 7/5$ بارامی حل گردید و توسط روش اولترافیلتراسیون یا دیالیز تحت خلا ($\text{cut off} < 10000$) ضمن کاهش حجم تا ۱۰ میلی‌لیتر و تغلیظ نمونه قدرت یونی آن نیز کاهش داده شد [۲۸]. در مرحله آخر ۲ میلی‌لیتر از این محلول به ستون کروماتوگرافی به ابعاد $(30\text{Cm} \times 2/5\text{Cm})$ حاوی رزین از قبل آماده شده کربوکسی‌متیل سلولز تزریق گردید پس از شستشوی ستون با بافر فسفات $0/01$ مولار و با $\text{pH} 7/5$ و جهت عملیات جداسازی آنزیم متصل شده به رزین، با افزودن نمک KCl ($0/5$ مولار) 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 آلکالین پروتئاز 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 سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) انجام شد. استانداردهای پروتئینی استفاده شده برای رسم دیاگرام کالبراسیون عبارت بودند از: لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ $40/14\text{KDa}$ کربنیک انهدراز 29KDa ، اوالبومین 43KDa و سرم آلبومین گاوی 68KDa . پس از الکتروفورز ژل حاصله توسط کوماسی بلو بریلیانت و نیز توسط تیترا ت نقره بروش پلی کروماتیک رنگ‌آمیزی می‌گشت [۲۸].

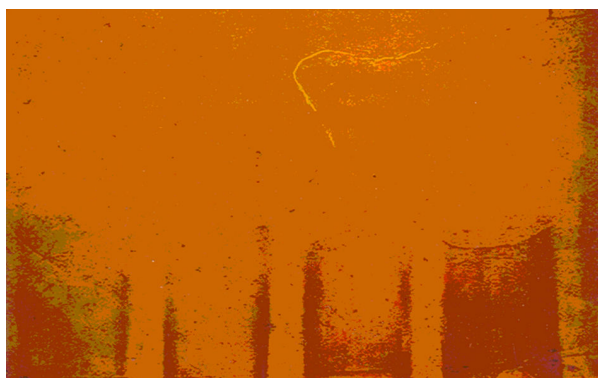
نتایج

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 گلوکز استفاده از سیترا ت احیای نیترا ت و رشد در دمای بالاتر از 50°C پاسخ منفی داد. همچنین به هر سه آزمایش هیدرولیز کازئین ژلاتین و نشاسته در $\text{pH} 7$ پاسخ منفی و در $\text{pH} 10$ 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 2829 APU/mg تعیین گردید (جدول ۱).

پس از اشباع‌سازی محلول آنزیمی با آمونیوم سولفات ۵۵٪ حدود ۷۰٪ از کل آنزیم و ۴۷٪ از کل پروتئین موجود در فاز رسوب قرار گرفت با درصد اشباعیت ۵۵٪ راندمان خالص‌سازی برای این مرحله حدود ۶۲٪ بود (جدول ۱).

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

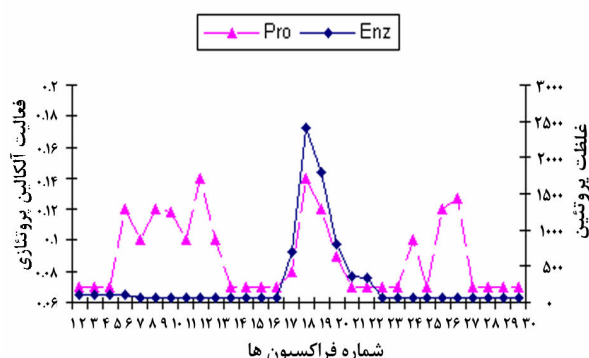
مرحله خالص سازی	حجم (ml)	APU	پروتئین (mg)	فعالیت ویژه APU/mg	مرتبه خالص سازی	درصد بازیافت
محلول رویی اولیه	۱۲۲	۲۳۷۹۱۱	۸۴/۱	۲۸۲۹	۱	۱۰۰
رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۵۵٪	۱۰	۱۴۷۸۵۷	۱/۸	۸۲۱۴۸	۲۹	۶۲
کروماتوگرافی تعویض کاتیونی با CM-Cellulos	۱	۵۷۴۲۰	۰/۴	۱۴۳۵۵۰	۵۰	۲۴



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

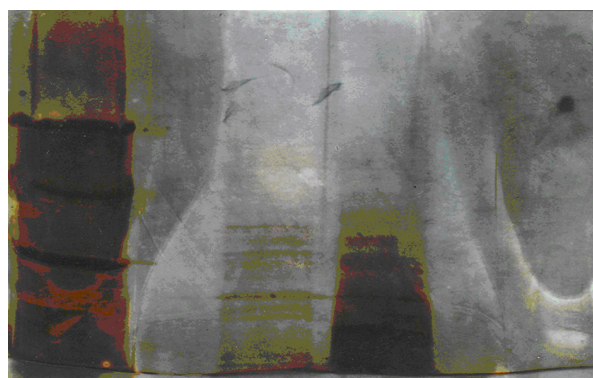
بحث

با مقایسه باسیلوس ۵-۲ با باسیلوس های سوبتیلیس و آلکالوفیلیک از نظر تاکسونومیک و فیزیولوژیک می توان دید باسیلوس ۵-۲ دارای تشابه بیشتری با باسیلوس آلکالوفیلیک است. در مقایسه مشابهی که توسط آقای هیتومی و همکاران در ۱۹۹۴ انجام شد علی رغم این که باسیلوس جدا شده در pH ۱۰ و درجه حرارت ۵۵ °C قادر به رشد و تولید آنزیم بود اما به خاطر برخی تشابهات هم چون 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 می توان آن را به عنوان آلکالوفیلیک باسیلوس در نظر گرفت. برخی از گونه های باسیلوس آلکالوفیلوس در pH های قلیایی دارای خاصیت ژلاتینولیتیک هستند [۳۰] اما باسیلوس ۵-۲



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 فراکسیون های ۲ میلی لیتری ۲۱ تا ۱۴ جمع آوری گردید و همان گونه که در شکل ۱ دیده می شود جداسازی کافی و مناسب به نظر می رسد آنزیم تولیدی در این پژوهش نیز با ۵۰ مرتبه خالص سازی 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 خالص سازی از روش پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (PAGE) استفاده گردید و تشکیل یک باند منفرد خلوص آن را اثبات کرد (شکل ۲).

این خاصیت را از خود نشان نداد. بیشتر گونه‌های آلکالوفیلیک باسیلوس در pH های قلیایی دارای فعالیت کازئینولیتیک هستند به طور مثال آلکالوفیلیک باسیلوس Y که توسط شیموگاکي و همکارانش در ۱۹۹۱ جداسازی شده 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 pH ۱۱ 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 pH های 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 می‌شکند 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 باسیلوس‌ها آلکالوفیل 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 کاز آمینو 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 آمونیوم ۵۵٪ معادل ۷۰٪ بود. شیموگاکي 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 [۳۲-۳۴] 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 [۲، ۳۲-۳۳]. 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 الکتروفوریتیک 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

از به کارگیری تکنولوژی کلونینگ و ایجاد تغییراتی در ساختار ژنتیکی می توان با افزایش مقاومت حرارتی آن و پس از تولید انبوه به کارگیری آن را در شوینده ها عملی ساخت.

تشکر و قدردانی

از کلیه کارشناسان گروه بیوشیمی و تغذیه به خصوص خانمها انصاری و سعدی و جناب آقای عارفانیا تشکر و قدردانی می گردد هم چنین از کارشناسان گروه میکروبیولوژی به خاطر در اختیار قرار دادن تجهیزات مورد نیاز برای انجام این کار تشکر می گردد.

پرداختند. آن ها 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 می باشد [۳۴].

نتیجه گیری

بنابراین نتیجه گرفته شد که آنزیم فوق را می توان جزو دسته آنزیم های قابل کاربرد در شوینده ها قرار داد و البته پس

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 extremely 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 thermostable alkaline protease from alkalophilic thermo actinomyces sp . Hs 682. *Biosci 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 Enzymes and Bioconservations. (A.H. Rose ed) Academic Press, New York. 1979; Vol 2: pp: 27-69.

- [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. Understanding 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 Biotech*. 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 coggess 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. Crystalline 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

-
- 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 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.