

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: ۱۳۸۴/۶/۲

اصلاح نهایی: ۱۳۸۴/۹/۱۴

پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۹/۳۰

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 ۲-۵ 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- تغییظ توسط اولترافیلتراسیون ۳- کروماتوگرافی تعویض کاتیونی توسط رزین کربوکسی‌متیل سلولز صورت گرفت. در تمام مراحل فعالیت پروتئاز قلیایی از طریق هیدرولیز سوبسترای کازئین در pH ۱۰ 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 ۲-۵ با باسیلوس آکالوفیلیک تطابق داشت. همچنین این سویه در H_pهای قلیایی دارای فعالیت پروتئولیتیک و آمیلولیتیک بود ولی فعالیت ژلاتینولیتیک نداشت. پیشرفت خالص‌سازی 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 منوم 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: ۰۲۱-۲۲۳۷۶۴۲۶، فاکس: ۰۲۱-۲۲۳۶۰۶۰، 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

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 آنکالوفیلیک باسیلوس‌ها کشت داده و در ۳۰°C درجه برای ۲-۳ روز و یا ۳۷°C درجه برای یک روز انکوبه نمودیم [۷]. بعد از این مدت کلینی‌هایی که اطراف آن‌ها یک لایه شفاف تشکیل شده بود به نشانه وجود خاصیت پروتئازی جدا شد. سپس از هر یک از ۴ کلینی 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 ۰/۰۲ MgSO₄. ۷H₂O. ۰/۰۵ گرم، K₂HPO₄ ۰/۱ گرم، pH ۱۰/۰) با بیکربنات سدیم ۹۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه و pH ۱۰/۵ با (۰/۱۰٪) داخل ارلن‌های (۲۵۰cc) ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع تلقیح در شرایط کاملاً استریل اضافه شد پس از آن برای ۳۶ ساعت عملیات همزی در ۳۷-۴۰°C و با ۱۲۵ rpm در شیکر انکوباتور انجام شد سپس توسط سانتریفوژ یخچال‌دار MSE ۲۵ HIGH SPEED در ۴°C و ۱۰۰۰۰×g محتویات مخلوط شده سلول‌ها و سایر اجزای سلولی از بخش آنزیمی و پروتئینی جدا گردید و فعالیت آنکالین پروتئازی و میزان پروتئین کل در آن اندازه‌گیری شد. فعالیت آنکالین پروتئازی بر اساس روش هیگاها را 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 pH ۱۰ (بافر بورات- NaOH) و با به کار بردن کازائین به عنوان سوبسترا را تولید نماید. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کل موجود در هر محیط کشت از روش لووری

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 لزوماً می‌بایستی دارای فعالیت آنزیمی بالا در محدوده وسیعی از pH و درجه حرارت باشد بنابراین جستجو برای یافتن و تخلیص آنزیم‌های پروتئولیتیک که هر دو خاصیت را توان 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 [۲-۹] بیشتر باسیلوس‌های تولید کننده پروتئازها هتروتروفیک هستند بنابراین به خوبی روی محیط‌های کشت گوناگون رشد می‌کنند. تولید آنزیم توسط رده‌های گوناگون قویاً 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 [۱۱-۱۴]. از مهم‌ترین آنکالین پروتئازها که تابحال تولید شده‌اند می‌توان به سوبتیلیسین BPN از باسیلوس لیکنیفورمیس [۱۵-۱۶] سوبتیلیسین کارلسبرگ از باسیلوس لیکنیفورمیس [۱۷] سوبتیلیسین آمیلوساکاریتیکوس از باسیلوس آمیلوساکاریتیکوس [۱۸-۱۹] و سوبتیلیسین E از باسیلوس سوبتیلیس [۲۰-۲۱] اشاره نمود. سوبتیلیسین‌ها در pH ۱۰-۸/۵ دارای بیشترین فعالیت هستند [۲]. انواع پروتئازهای قلیایی دارای محدوده pH فعالیت بالاتری نسبت به سوبتیلیسین‌ها می‌باشند [۲۲-۲۳]. هدف از انجام این مطالعه جدا کردن یک گونه باسیلوس قلیادوست از خاک با قدرت تولید آنزیم پروتئاز قلیایی و شناسایی آن در حد امکان می‌باشد هم‌چنین از آنجایی که بر اساس نظریه و در و هوریکوشی بیشتر میکروارگانیسم‌های قلیا دوست می‌توانند پروتئاز قلیایی نیز

(PAGE) استفاده گردید [۲۸]. تعیین جرم ملکولی به وسیله پلی‌اکریل‌آمید ژل الکتروفورز و در حضور سدیوم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) انجام شد. استانداردهای پروتئینی استفاده شده برای رسم دیاگرام کالیبراسیون عبارت بودند از: لیزوژیم سفیده تخم مرغ ۴،۱۴KDa کربنیک انھیدراز ۶.۸ KDa، اوالبومین ۴۳ KDa و سرم آلبومین گاوی ۲۹ 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 ۲-۵ 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 گلوكز تولید گاز از گلوكزاستفاده 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 pH ۷ پاسخ مثبت و به هیدرولیز ژلاتین پاسخ منفی داد. پس از آن خصوصیت تولید آنزیم آلکالین پروتئاز آن بررسی گردید. فعالیت ویژه آنزیمی سوش ۲-۵ در این مرحله معادل ۲۸۲۹ APU/mg تعیین گردید (جدول ۱).

پس از اشباع‌سازی محلول آنزیمی با آمونیوم سولفات ۵.۵٪ حدود ۷۰٪ از کل آنزیم و ۴٪ از کل پروتئین موجود در فاز رسوب قرار گرفت با درصد اشباعیت ۵۵٪ راندمان خالص‌سازی برای این مرحله حدود ۶۲٪ بود (جدول ۱).

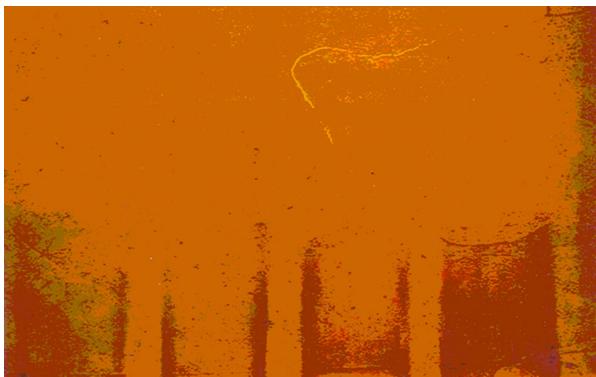
(Lowry) استفاده گردید. منحنی استاندارد توسط آلبومین سرم گاوی (BSA) رسم و غلظت محلول پروتئینی مجہول از طریق آن معین گردید [۲۷]. فعالیت ویژه آنزیمی میزان فعالیت آنزیم به کل پروتئین موجود در محیط است که در هر لحظه می‌توان با تقسیم کردن فعالیت پروتئاز قلیایی (APU) بر میزان پروتئین (mg) به دست آورد [۲۸].

خالص‌سازی آنزیم آلکالین پروتئاز: تمام مراحل خالص‌سازی در ۴°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 ۰/۰۱ مولار و با pH ۷/۵ بارامی حل گردید و توسط روش اولترافیلتراسیون یا دیالیز تحت خلا (cut off <10000) ضمن کاهش حجم تا ۱۰ میلی‌لیتر و تغليظ 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) م Hollow 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 pH ۷/۵ و جهت عملیات جداسازی آنزیم متصل شده به رزین، با افزودن نمک KCl (۵/۰ 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 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 پلی‌اکریل‌آمید ژل الکتروفورز در شرایط دناتوره نشده

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

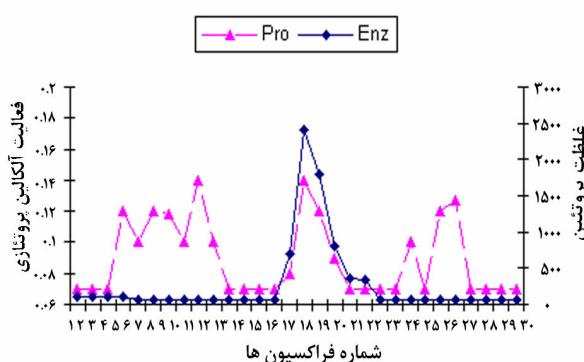
مراحل خالص سازی	CM-Cellulos	حجم (ml)	APU	پروتئین (mg)	فعالیت ویژه APU/mg	مرتبه خالص سازی	درصد بازیافت
محلول رویی اولیه		۱۲۲	۲۳۷۹۱۱	۸۴/۱	۲۸۲۹	۱	۱۰۰
رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۵۵٪		۱۰	۱۴۷۸۵۷	۱/۸	۸۲۱۴۸	۲۹	۶۲
کروماتوگرافی تعویض کاتیونی با Cellulos		۱	۵۷۴۲۰	۰/۴	۱۴۳۵۵۰	۵۰	۲۴



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

بحث

با مقایسه با سیلوس ۲-۵ با باسیلوس‌های سوبتیلیس و آکالوفیلیک از نظر تاکسونومیک و فیزیولوژیک می‌توان دید باسیلوس ۲-۵ دارای تشابه بیشتری با باسیلوس آکالوفیلیک است. در مقایسه مشابهی که توسط آقای هیتموی و همکاران در ۱۹۹۴ انجام شد علی‌رغم 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 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 آکالوفیلیک باسیلوس در نظر گرفته شد [۱۷]. چون باسیلوس ۲-۵ در pH خنثی قادر به رشد و تولید آنزیم نبود بنابراین می‌توان آن را به عنوان آکالوفیلیک باسیلوس در نظر گرفت. برخی از گونه‌های باسیلوس آکالوفیلیوس در pHهای قلیایی دارای خاصیت ژلاتینولیتیک هستند [۳۰] اما باسیلوس ۲-۵



نمودار ۱: جداسازی بخش حاوی آنزیم آکالالین 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 ۱۴ تا ۲۱ جم آوری 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 خالص سازی در نهایت راندمان خالص سازی با ۲۴٪ را داشت. با روش SDS-PAGE وزن ملکولی این آنزیم ۲۴۷۰۰ دالتون تعیین گردید (شکل ۱)



شکل ۱: تعیین وزن مولکولی آنزیم آکالالین پروتئاز با روش SDS-PAGE برای اثبات خالص سازی از روش پلی‌اکریل‌آمید ژل الکتروفورز (PAGE) استفاده گردید و تشکیل یک باند منفرد خلوص آن را اثبات کرد (شکل ۲).

همکاران از اشباع‌سازی ۹۵٪ بهره برداشتند 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 می‌یافتد 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 ۲۰-۳۰ درصد متغیر بوده است [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 سوبیتیلیسین مانند (۲۲۷۰۰-۲۷۴۰۰ 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

این خاصیت را از خود نشان نداد. بیشتر گونه‌های آلالوفیلیک باسیلوس در pHهای قلیایی دارای فعالیت کاربئنولیتیک هستند به طور مثال آلالوفیلیک باسیلوس ۷ که توسط شیموگاکی و همکارانش در ۱۹۹۱ جداسده است [۳۱] هم‌چنین برخی از گونه‌های استریوتومیسنس دارای این فعالیت در pH قلیایی هستند [۲]. بیشترین فعالیت کاربئنولیتیک باسیلوس ۲-۵ 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 آلالوفیلیک باسیلوس‌ها دیده شده است [۳۲]. باسیلوس ۲-۵ دارای فعالیت آمیلولتیک 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 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 کتابولیکی شود [۳۲] بنابراین استفاده از منابع کربنی پیچیده مثل نشاسته، Ground Barely شده است که در مورد باسیلوس ۲-۵ هم صادق است. راجاش پاتل و همکاران در سال ۲۰۰۵ میلادی به بررسی پروتئاز قلیایی تولید شده توسط یک گونه باسیلوس هالوآلکالوفیل 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 آامونیوم 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

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.

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

نتیجه‌گیری

بنابراین نتیجه گرفته شد که آنزیم فوق را می‌توان جزو دسته آنزیم‌های قابل کاربرد در شوینده‌ها 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. *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.

- [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 Biotecl*. 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. 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 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 Sobe RC. Serin alkaline protease from a newly isolated bacillus sp.SSR1. *Process Biochemistry*. 2001; 36: 781-5.