



Identification and enzymatic evaluation of peptidase producing bacteria

Mojtaba Mortazavi¹, **Batool Khani Sakhvidi**², **Masoud Torkzadeh-Mahani**¹, **Safa Lotfi**³

Mahmood Maleki³, **Mehdi Rahimi**¹

¹ Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. ² M.Sc, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. ³ Assistant Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Proteases, hydrolases used extensively in industries like detergents and textiles, are particularly valuable when sourced from microbes due to their resilience. This study aims to identify bacteria capable of producing proteases and to investigate their enzymatic properties. Understanding the function and efficiency of these enzymes can lead to process improvements and novel applications in various industries.

Materials and methods: Bacterial protease-producing bacteria were isolated from water and soil samples collected in Kerman and screened on SMA based on halo diameter. The species exhibiting the highest protease activity was selected, its 16S rDNA sequenced, and identified using BLAST. Protease activity was then evaluated at different temperatures.

Results: Enzyme tests show that sample 11b has protease activity in the temperature range of 25-45°C. After bacterial DNA extraction, PCR processing, and epidermal sequencing, *Staphylococcus vitellinus*, *Bacillus toyonensis*, *Citrobacter jillini*, and *Staphylococcus sevieri* were identified.

Conclusion: This analysis introduces a new bacterial species that can be used in various industrial and clinical fields.

Keywords: Protease enzyme, 16srRNA gene, phylogenetic tree, protease activity, enzyme-producing bacteria.

Received: 15 September 2024

Revised: 5 November 2024

Accepted: 2 December 2024

Correspondence to: Mojtaba Mortazavi

Tel: +98 9191263262

E-mail: mortezavimm@gmail.com

Journal of Microbial World 2024, 17 (3): 222 - 233

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2024.1201628>



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



شناسایی و بررسی آنزیمی باکتری‌های تولید کننده آنزیم پتیداز

مجتبی مرتضوی^{*}، بتول خانی‌سخویدی^۲، مسعود ترک‌زاده‌ماهانی^۱، صفا لطفی^۳، محمود ملکی^۳، مهدی رحیمی^۱

^۱ دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

^۲ کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

^۳ استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم پروتئاز در گروه هیدرولازهای مورد استفاده در صنایع مختلف از جمله مواد شوینده، نساجی و غیره طبقه بندی می‌شود. پروتئازهای میکروبی بسیار مهم هستند زیرا می‌توانند در شرایط سخت مقاومت کنند. هدف از مطالعه شناسایی و بررسی آنزیمی باکتری‌های تولید کننده آنزیم پتیداز، شناسایی باکتری‌هایی است که قادر به تولید این آنزیم هستند. همچنین، مطالعه بر روی عملکرد و کارایی این آنزیم‌ها می‌تواند به بهبود فرایندهای صنعتی و توسعه کاربردهای جدید کمک کند.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های آب و خاک از مناطقی در کرمان جمع‌آوری شد و پنج باکتری مولد پروتئاز باکتریایی بر روی یک محیط جامد خاص (SMA) بر اساس قطر هاله غربال‌گری شدند. بهترین گونه باکتری انتخاب شده و توالی ۱۶ srDNA آن مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد از پایگاه داده BLAST برای شناسایی گونه‌ها استفاده شد. میزان فعالیت پروتئاز در دماهای مختلف ارزیابی شد.

یافته‌ها: آزمایشات آنزیمی نشان می‌دهد که نمونه D دارای فعالیت پروتئاز در محدوده دمایی ۲۵-۴۵ درجه سلسیوس است. پس از استخراج DNA باکتریایی، پردازش PCR و تعیین توالی اپیدرمی، /استافیلوکوکوس ویتولینوس، باسیلوس تریوننسیس، سیتروباکتر جیلینی و /استافیلوکوکوس سیوری شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: این تجزیه و تحلیل یک گونه باکتریایی جدید را معرفی می‌کند که می‌تواند در زمینه‌های مختلف صنعتی و بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آنزیم پروتئاز، ژن ۱۶ srRNA، درخت فیلوژنتیک، فعالیت پروتئاز، باکتری‌های تولید کننده آنزیم.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۹/۱۲

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۸/۱۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۶/۲۵

مقدمه

گسترده توسط شرکت‌های مختلف در سراسر جهان تجاری‌سازی شده‌اند (۱). پروتئازها نقش‌های حیاتی در فرایندهای بیولوژیکی گوناگون ایفا می‌کنند که از جمله آن‌ها می‌توان به هضم پروتئین‌های تاخورد، کاتابولیسم پروتئین‌ها (تجزیه پروتئین‌های قدیمی) و سیگنالینگ سلولی اشاره نمود (۲و۳). این عملکرد پروتئازها می‌تواند منجر به تغییرات

پروتئازهای باکتریایی به دلیل کاربردهای گسترده در صنایع مختلف از جمله شوینده‌ها، تصفیه بیولوژیکی، صنایع غذایی و فرآوری چرم، از اهمیت به‌سزایی برخوردار بوده و به طور

(*) آدرس برای مکاتبه: گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی فناوری پیشرفته کرمان، ایران.

پست الکترونیک: mortezavimm@gmail.com

تلفن: ۰۹۱۹۱۲۶۳۲۶۲



قارچ‌ها و ویروس‌ها به دلیل اهمیت و کاربردهای گسترده‌شان در صنایع مختلف و بیوتکنولوژی، به طور فزاینده‌ای مورد مطالعه و بررسی قرار می‌گیرند. از منظر تجاری، پروتئازهای میکروبی به دلیل سهولت نسبی تولید در مقیاس وسیع و دسترسی آسان‌تر به منابع تولیدکننده در مقایسه با پروتئازهای حیوانی و گیاهی، از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. این پروتئازها قابلیت تکثیر در مقادیر زیاد، در زمان نسبتاً کوتاه و با استفاده از روش‌های تخمیری شناخته‌شده را دارند و می‌توانند مقادیر قابل توجهی آنزیم و محصول مطلوب را تولید کنند. پروتئازهای میکروبی تقریباً ۴۰ درصد از سهم فروش آنزیم‌های بازارهای جهانی را به خود اختصاص داده‌اند و به دلیل دارا بودن خصوصیات مطلوب برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی، نسبت به پروتئازهای استخراج‌شده از منابع گیاهی و حیوانی ارجحیت دارند. علاوه بر این، پروتئازهای میکروبی را می‌توان به دلیل داشتن ژن‌های کوچک‌تر، به‌منظور تولید آنزیم‌هایی با خصوصیات بهبودیافته برای کاربردهای گوناگون، به صورت ژنتیکی دستکاری کرد (۴). قارچ‌ها نیز قادر به ترشح و تولید انواع مختلفی از آنزیم‌ها هستند؛ به‌عنوان مثال، *آسپرژیلوس اوریزه* انواع پروتئازهای اسیدی، خنثی و قلیایی را ترشح می‌کند (۱۴ و ۱۵). با این حال، تولید پروتئازها بیشتر از طریق منابع میکروبی انجام می‌گیرد، زیرا تولید پروتئازهای گیاهی مانند بروملین و فیسین زمان‌بر بوده و پروتئازهای حیوانی نیز نمی‌توانند پاسخگوی نیاز بازارهای صنعتی در سراسر جهان باشند (۱۶).

پروتئازهای میکروبی، به‌ویژه آن‌هایی که از باسیلوس تولید می‌شوند، به طور سنتی سهم غالب بازار فروش آنزیم‌های صنعتی را در سراسر جهان به خود اختصاص داده‌اند که بخش عمده‌ای از آن در فرمولاسیون شوینده‌ها به کار می‌رود. پروتئازهای قلیایی باکتریایی با فعالیت زیاد در محدوده pH قلیایی (به‌عنوان مثال pH برابر با ۱۰) و اختصاصیت سوبسترای وسیع توصیف می‌شوند (۱۷ و ۱۸). دمای بهینه آن‌ها حدود ۶۰ درجه سلسیوس است که این ویژگی آن‌ها را برای استفاده در صنعت شوینده‌سازی مناسب می‌سازد. مزیت پروتئازهای

مختلف، فعال‌سازی عملکردها یا انتقال سیگنال‌ها در مسیرهای چرخه زندگی باکتریوفاژها، مرگ برنامه‌ریزی شده و سیگنالینگ گردد (۴). پروتئازها همچنین در کنترل سیستم سلول‌های باکتریایی و تنظیم پاسخ‌های شوک حرارتی نقش دارند (۵). پروتئازها بر اساس مکانیسم پروتئولیتیک و گروه عاملی موجود در جایگاه فعال، به چهار گروه اصلی سرین پروتئازها، آسپارتیک پروتئازها، سیستئین پروتئازها و متالوپروتئازها تقسیم می‌شوند. مخمرها، قارچ‌ها و باکتری‌ها از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم پروتئاز قلیایی به شمار می‌روند (۶). پروتئینازها نخستین بار در سال ۱۹۹۳ بر اساس روابط تکاملی خود در ۸۴ خانواده طبقه‌بندی شدند (۷). در یک دسته‌بندی جدیدتر، آن‌ها به شش نوع شامل سرین، ترئونین، سیستئین، متالو، آسپارتات و گلوتامیک پروتئازها تقسیم می‌شوند که هر یک دارای فرآیندهای زیستی و عملکردی متمایزی هستند. با این حال، تمامی این شش نوع پروتئاز نقش تنظیمی اساسی در عملکردهای حیاتی نظیر تنفس، پیری، رشد، بلوغ و هضم ایفا می‌کنند (۸). پروتئازها همچنین بر اساس روابط تکاملی و pH بهینه فعالیت به انواع اسیدی، قلیایی و خنثی تقسیم می‌شوند (۱).

مکانیسم عمل پروتئازها شامل مجموعه‌ای از واکنش‌های اکسیداسیون و احیا است که با کمک مجموعه‌ای از سه اسید آمینه که در محل فعال برخی از آنزیم‌ها قرار دارند، انجام می‌شود (۹ و ۱۰). تریادهای کاتالیتیکی بیشتر در آنزیم‌های هیدرولاز و ترانسفراز یافت می‌شوند و آنزیم پروتئاز نمونه‌ای از ریشه‌های کاتالیتیکی تریاد در جایگاه فعال است (۱۱). فعالیت پروتئازها توسط مهارکننده‌های پروتئاز مهار می‌شود (۱۱). بسیاری از مهارکننده‌های طبیعی پروتئاز، پروتئینی هستند (۱۲). مهارکننده‌های پروتئازی داروهای مهارکننده قوی و اختصاصی آنزیم پروتئاز HIV-1 هستند و در محدوده نانومولار فعال می‌باشند (۱۳).

ناتوانی پروتئازهای حیوانی و گیاهی در پاسخگویی به تقاضای فزاینده جهانی، توجهات را به سمت پروتئازهای میکروبی معطوف ساخته است. پروتئازهای تولید شده توسط باکتری‌ها،

محیط کشت اختصاصی (SMA) Skim Milk Agar کشت داده شد و به مدت ۳۶ ساعت در دمای 37 °C گرمخانه‌گذاری شد. باکتری‌هایی که در طی ۳۶ ساعت هاله‌ی بزرگتری را ایجاد کردند برای مراحل بعدی انتخاب گردیدند (ایجاد هاله بیانگر تولید آنزیم پروتئاز) و از آن‌ها استوک تهیه شد (۲۲).

ج) تأثیر دما بر فعالیت آنزیم: باکتری‌های انتخاب شده را در محیط کشت اختصاصی SMA با استفاده از سرلوپ و در شرایط استریل در ۳ پلیت مجزا کشت و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دماهای ۲۵ و ۲۸ و ۳۷ و ۴۵ گرمخانه‌گذاری شدند. سپس با اندازه‌گیری قطر هاله ایجاد شده در ۳ پلیت و محاسبه میانگین آن‌ها سویه‌ای با بیشترین فعالیت شناسایی شد.

د) بهینه‌سازی تولید و بررسی فعالیت: ابتدا از استوک باکتری در محیط کشت LB تلقیح داده شد تا باکتری رشد کند. سپس ۲۰۰ ماکرو از باکتری در محیط کشت SKIM MILK تلقیح شد تا باکتری آنزیم پروتئاز ترشح کند پس از انجام سانتریفیوژ سوپرناتانت حاصله حاوی آنزیم پروتئاز خواهد بود.

ه) سنجش فعالیت: برای اندازه‌گیری فعالیت پروتئازی، ابتدا محلول سوستر تهیه و در حمام آب گرم (بن‌ماری) قرار داده شد تا به دمای مطلوب برسد و سپس به‌عنوان سوستر مورد استفاده قرار گرفت. محلول سوستر با آنزیم مخلوط شده و به منظور هیدرولیز سوسترهای کازئین توسط آنزیم و تولید تیروزین، در شرایط دمایی و زمانی مشخص گرمخانه‌گذاری شد. پس از اتمام دوره انکوباسیون، با افزودن محلول تری‌کلرواستیک اسید (TCA)، واکنش آنزیمی متوقف می‌گردد. لوله‌های حاوی مخلوط واکنش در دمای یخچال نگهداری شده و سپس سانتریفیوژ شد تا پروتئین‌های هضم‌نشده رسوب کنند. در نهایت، میزان جذب نوری (Absorbance) محلول شفاف حاصل از سانتریفیوژ خوانده شد. به‌عنوان شاهد (Blank)، مخلوطی از محلول سوستر سرد شده و آب مقطر تهیه و گرمخانه‌گذاری شد. سپس، محلول TCA به این مخلوط اضافه شده و به‌منظور رسوب پروتئین‌ها در یخچال قرار گرفت. مخلوط حاصل سانتریفیوژ شده و جذب نوری سوپرناتانت شفاف قرائت شد. سوسترهای آماده شده با آنزیم مخلوط شده و

قارچی سهولت تولید آن‌ها در فرآیند تخمیر حالت جامد است (۱۹). در میان باکتری‌ها، باسیلوس یک ابزار صنعتی جذاب برای تولید پروتئازها به شمار می‌رود (۱۷ و ۲۰). از بین تمام میکروارگانیزم‌ها، اعضای جنس باسیلوس منبع مناسبی برای تولید پروتئاز هستند. سویه‌های باسیلوس در ترشح آنزیم‌هایی مانند پروتئاز و آمیلاز شناخته شده‌اند و در نتیجه، گزینه‌ای مطلوب برای تولید انبوه محسوب می‌شوند. در سالیان اخیر، استخراج آنزیم‌های پروتئولیتیک از منابع میکروبی به دلیل فعالیت بالا، ثبات در طیف گسترده‌ای از pH و دما، پایداری در برابر یون‌های فلزی مختلف، مهارکننده‌ها و حلال‌های آلی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به همین دلیل، پروتئاز میکروبی گزینه‌ای بسیار مناسب برای صنایع غذایی، پزشکی، بیوتکنولوژی و داروسازی به شمار می‌رود (۲۱). با توجه به نیاز روزافزون به این آنزیم در کشور و کاربردهای وسیع آنزیم پروتئاز قلیایی در صنایع مختلف و مزایایی که مخمرها نسبت به سایر میکروارگانیزم‌های تولیدکننده آنزیم پروتئاز قلیایی دارند، به نظر می‌رسد که برای تکمیل این پژوهش‌ها و شناسایی مخمرهای بومی مولد آنزیم، ادامه این پژوهش‌ها امری ضروری است. با توجه به کاربردهای فراوان این آنزیم در صنعت و عدم تولید آن در کشور، به نظر می‌رسد استفاده از سویه‌های محلی می‌تواند در دستیابی به تولید بالای آنزیم پروتئاز قلیایی مفید واقع شود. در این راستا، هدف این مطالعه بررسی سویه‌های باکتریایی بومی تولید کننده آنزیم‌های پروتئازی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

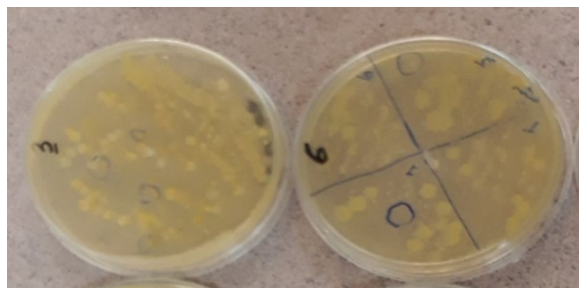
الف) جمع‌آوری نمونه و کشت و جداسازی سویه‌ها: از خاک و آب فاضلاب مناطق مختلف دانشگاه تحصیلات تکمیلی کرمان نمونه‌هایی جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌های خاک و فاضلاب به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق‌سازی شدند. نمونه‌ها در محیط کشت پایه LB کشت و در دمای 37 °C به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

ب) بررسی تولید آنزیم پروتئاز: از باکتری‌هایی که در محیط کشت پایه LB کشت داده شده بود یک تک کلنی انتخاب و در

برای انجام واکنش آنزیمی گرمخانه‌گذاری گردید. در پایان دوره گرمخانه‌گذاری، مخلوط سانتریفیوژ شده و جذب نوری سوپرناتانت شفاف خوانده شد. برای تهیه محلول استاندارد، محلول تیروزین با بافر سیترات مخلوط و در حمام آب گرم قرار گرفت. پس از سرد شدن، محلول در رقت‌های مختلف تهیه شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس، محلول TCA به آن اضافه و در دمای یخچال نگهداری شد. سپس، مخلوط سانتریفیوژ شده و جذب نوری سوپرناتانت شفاف قرائت شد. پس از تهیه محلول تیروزین و قرائت جذب نوری استاندارد آن، غلظت تیروزین آزاد شده بر اساس منحنی استاندارد تیروزین تعیین گردید (۲۳).

و) انجام تست‌های بیوشیمیایی: شناسایی /ستافیلوکوکوس با آزمون کواگولاز، برای سیتروباکتر از آزمون کاتالاز و برای باسیلوس از آزمون تخمیر قند استفاده شد. به منظور انجام آزمون کواگولاز، یک کلنی از باکتری در لوله‌ای حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم گاوی تلقیح شد. پس از هم زدن آرام، مخلوط در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. تشکیل لخته در لوله، نشان‌دهنده نتیجه مثبت آزمون کواگولاز و شناسایی /ستافیلوکوکوس است. برای انجام آزمون کاتالاز، یک کلنی از باکتری به یک لوله آزمایش حاوی ۲ تا ۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل شد. سپس، چند قطره از محلول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) با غلظت ۳ درصد به این سوسپانسیون باکتریایی اضافه گردید. تولید حباب‌های گاز اکسیژن، نشان‌دهنده فعالیت آنزیم کاتالاز و در نتیجه، شناسایی سیتروباکتر است. برای انجام آزمون تخمیر قند، ابتدا یک محیط کشت مایع حاوی گلوکز تهیه شد. سپس، مقدار مشخصی از کلنی باکتری به این محیط کشت اضافه و لوله آزمایش به آرامی هم زده شد. لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. عدم مشاهده تولید گاز یا تغییر رنگ محیط کشت (در صورت استفاده از شناساگر pH)، نشان‌دهنده عدم تخمیر گلوکز توسط باکتری نشانه منفی بودن آزمون تخمیر قند است. این نتیجه، در شناسایی باسیلوس مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ز) بررسی اثر دما بر فعالیت باکتری: باکتری‌های انتخاب شده در پلیت‌های مجزا کشت داده شدند و در زمان‌های متفاوت در دماهای مختلفی گرمخانه‌گذاری شدند. سپس با اندازه‌گیری قطر هاله ایجاد شده در این پلیت‌ها و محاسبه میانگین آن‌ها می‌توان تشخیص داد که در کدام دما سویه مورد نظر ما بیشترین فعالیت را دارد (۲۴ و ۲۵). با استفاده از دستگاه طیف سنج VIS Spectrometer (PerkinElmer) UV فرابنفش (280nm) میزان جذب نوری هر یک از نمونه‌های آماده شده خوانده شد و پس از آن واحد فعالیت آنزیمی برای هر نمونه محاسبه شد. باکتری انتخاب شده را در محیط کشت اختصاصی SMA با استفاده از سرلوپ و در شرایط استریل در ۳ پلیت مجزا کشت داده شد و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دماهای ۲۵ و ۲۸ و ۳۷ انکوبه شد. سپس با اندازه‌گیری قطر هاله ایجاد شده در ۳ پلیت و میانگین آن‌ها محاسبه شد. همچنین، منحنی رشد این باکتری‌ها در مدت زمان هفتاد ساعت رسم شد. ح) شناسایی مولکولی باکتری‌ها: از ژن srDNA ۱۶ در شناسایی مولکولی باکتری‌های جداسازی شده استفاده شد. ابتدا DNA جدایه باکتری به روش جوشاندن استخراج شد. استوک باکتری در محیط LB Broth در انکوباتور کشت و سپس باکتری‌های رشد کرده سانتریفیوژ شدند. به سوسپانسیون حاصل NaOH افزوده و پس از ورتکس کردن محلول حاصله در فالتکون‌ها در بن ماری قرار داده شدند. محلول از بن ماری خارج و در فریزر قرار داده شود. این عمل چهار بار تکرار شد و در ادامه تریس ۲۵ میلی‌مولار اضافه و ورتکس شد. در مرحله آخر در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت که حاوی DNA استخراجی است جمع‌آوری گردید. به منظور اطمینان از حضور DNA استخراج شده از روش الکتروفورز با ژل آگاروز استفاده شد، سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای یونیورسال بر روی آن انجام گرفت زیرا توانایی شناسایی توالی srRNA ۱۶ را دارند. برای انجام واکنش PCR از پرایمرها به مقدار نیم ماکرولیتر از ماسترمیکس به مقدار شش ماکرولیتر و DNA به مقدار یک ماکرولیتر و از آب دوبر تقطیر به مقدار هفت ماکرولیتر در شرایط استریل استفاده و

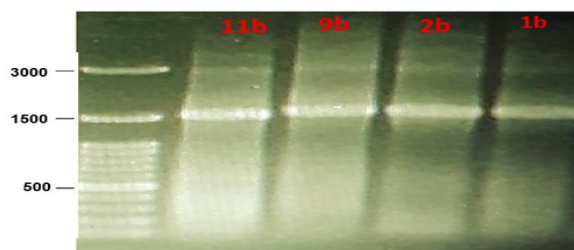


شکل ۱: ایجاد کلنی بر روی محیط کشت SMA در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.

جدول ۲: سنجش فعالیت آنزیمی.

شماره نمونه	میزان OD در ۲۸۰ nm	غلظت سویسترا mg/ml (OD/Slop)	واحد فعالیت آنزیمی (U/ml)
۲b	۰/۸۳۹۶۷۵	۹۳۲/۹۷۲۲	۳۱۰/۹۹۰
۹b	۰/۸۸۶۵۵	۹۸۵/۰۵۵۵	۳۲۸/۳۵۱۸۵
۱۱b	۰/۸۹۰۹۵	۹۸۹/۹۴۴۴	۳۲۹/۹۸۱۴
۱b	۰/۸۸۱۲۷۵	۹۷۹/۱۹۴	۳۲۶/۳۹۸۱

ج) واکنش PCR و انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی: برای شناسایی سویه باکتریایی از تعیین توالی ژن 16srRNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. از DNA استخراج شده به عنوان الگو استفاده شد. در مرحله بعد صحت واکنش انجام شده توسط الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. با توجه به شکل، اندازه باند 16srRNA سویه‌های جداسازی شده ۱۸۰۰ می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲: تصویر ژل حاصل از واکنش PCR.

توالی 16 srRNA سویه ورد نظر جداسازی و توسط شرکت بایونیر کره جنوبی توالی‌یابی شد. پس از انجام تعیین توالی سویه‌های 1b، 2b، 9b و 11b شناسایی شدند که بعد از انجام blast در پایگاه اطلاعاتی NCBI و مشخص شدن گونه باکتری‌ها در سایت NCBI ثبت شدند که اطلاعات آن در جدول ۳ نشان داده شده است.

میکس حاصله در دستگاه قرار گرفت. در جدول ۱ برنامه دمایی بهینه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان داده شده است.

جدول ۱: برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

مراحل	تعداد تکرار	دما	زمان دقیقه
واسرشت اولیه	۱	۹۵	۵
واسرشت	۳۰	۹۵	۱
اتصال	۳۰	۶۰	۱
گسترش	۳۰	۷۲	۱
گسترش نهایی	۱	۷۲	۱

سپس محصولات واکنش بر روی ژل آگارز بررسی و مراحل الکتروفورز انجام شد. سپس با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و در نهایت با استفاده از دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا برای شناسایی گونه باکتری از پایگاه اطلاعاتی BLASTn استفاده شد. توالی‌های ناحیه این شش نمونه مورد آنالیز بیوانفورماتیکی قرار گرفتند. در ادامه، به کمک نرم‌افزار مگا میزان شباهت و هم ترادفی آن‌ها آنالیز گردید. همچنین، روابط فیلوژنتیکی این گونه‌ها تعیین گردید. در ادامه، میزان شباهت توالی ناحیه 16srDNA این نمونه‌ها به همراه توالی ناحیه 16srDNA سویه بومی تولید کننده آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت و درخت فیلوژنتیکی آن‌ها رسم گردید.

یافته‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه و کشت و جداسازی سویه‌ها و تاثیر دما بر فعالیت آنزیم: در مرحله‌ی غربالگری سویه‌های جدا شده از خاک باغچه دانشگاه تحصیلات تکمیلی، خاک گاوداری و مرغداری و آب‌های فاضلاب مورد ارزیابی قرار گرفت سویه‌ای که توانایی رشد در محیط اسکیم میلک آگار و توانایی ایجاد هاله اطراف کلنی خود را داشت جداسازی شد (شکل ۱).

ب) سنجش فعالیت آنزیمی: با اضافه کردن آنزیم و سویسترا جذب آن در 280nm خوانده و سپس واحد فعالیت آنزیمی (u/ml) و غلظت سویسترا (OD/slop tyrosin) محاسبه شد. طبق نتایج به دست آمده نمونه ۱۱b بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان داد (جدول ۲).



الگوهای رشد باکتریایی متمایز در بین گونه‌های *باسیلوس*، *استافیلوکوکوس* و *سیتروباکتر* قابل توجه است. *باسیلوس* با یک دوره رشد اولیه سریع مشخص می‌شود و تقریباً در ساعت ۱۲ تا ۱۵ به فاز ثابت می‌رسد، پس از آن یک کاهش تدریجی دنبال می‌شود. در مقابل، *استافیلوکوکوس* یک نرخ رشد کندتر از خود نشان می‌دهد و فاز ثابت را در حدود ساعت ۲۱ تا ۲۴ تجربه می‌کند و پس از آن یک روند نزولی مشابه را طی می‌کند. *سیتروباکتر* کندترین میزان رشد را در بین سه باکتری نشان می‌دهد و فاز ثابت آن از حدود ساعت ۲۴ تا ۲۷ شروع می‌شود، قبل از اینکه یک مرحله کاهش آهسته شروع شود. این تفاوت‌ها در منحنی‌های رشد باکتریایی بر ویژگی‌های متابولیک و سازگاری‌های محیطی منحصربه‌فرد مرتبط با هر گونه تاکید دارد.

بحث

آنزیم‌ها، به‌ویژه پروتئازهای میکروبی، کاتالیزورهای زیستی ضروری برای تسهیل واکنش‌های متابولیکی در سلول‌ها هستند و اطمینان می‌دهند که این فرآیندها با سرعت و دقت لازم برای حیات انجام می‌شوند. بیش از ۵۰۰۰ نوع واکنش بیوشیمیایی وجود دارد که آنزیم‌ها واسطه آن‌ها هستند (۲۸). پروتئازها که جزء مهم‌ترین آنزیم‌های هیدرولیزکننده هستند، نقش حیاتی در فرآیندهای صنعتی مختلف دارند، از جمله در تولید شوینده‌ها، جایی که پروتئازهای قلیایی ۲۵ درصد از فروش جهانی آنزیم‌های صنعتی را تشکیل می‌دهند و درآمدی در حدود ۷ میلیارد دلار ایجاد می‌کنند (۲۹). با توجه به اهمیت تجاری پروتئازها و فقدان امکانات تولید داخلی، تحقیقات با هدف استفاده از ضایعات کشاورزی به‌عنوان سوبسترا برای تولید آنزیم پروتئاز، یک رویکرد امیدوارکننده برای کاهش هزینه‌های تولید و مقابله با چالش‌های زیست‌محیطی مرتبط با دفع زباله است (۳۰). هدف این استراتژی دوگانه بهینه‌سازی تولید آنزیم و در عین حال تبدیل محصولات جانبی کشاورزی به منابع با ارزش است (۳۱).

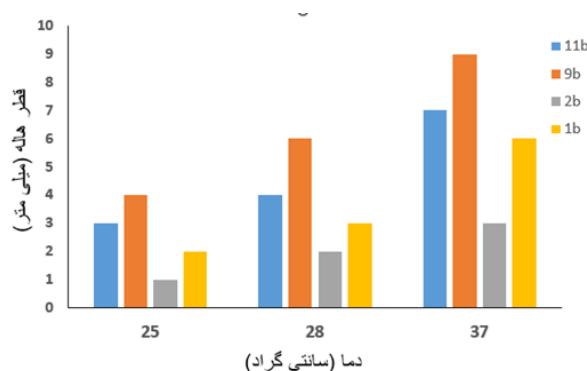
در این مطالعه، مجموعاً ۳۶ نمونه خاک و ۴ نمونه فاضلاب

در خصوص ویژگی‌های متابولیکی و شناسایی دقیق‌تر گونه‌های باکتریایی فراهم می‌آورند. این اطلاعات به تشخیص دقیق‌تری از گونه‌های مختلف *باسیلوس* و ویژگی‌های متابولیکی آن کمک می‌کند. نتایج این تست‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است.

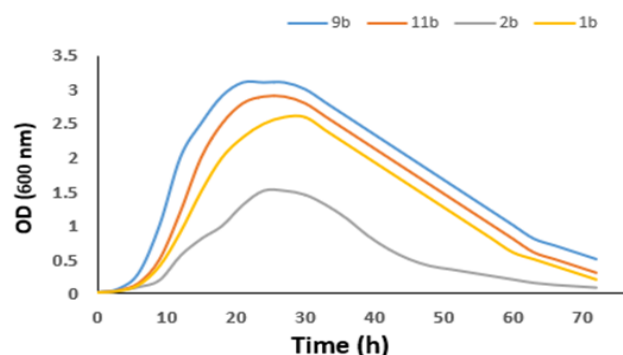
جدول ۳: تست‌های بیوشیمیایی سویه‌ها.

نام نمونه	تست گرم (+ و -)	تست کاتالاز	تست کوآگولاز	تست تخمیر قند
2b	-	-	-	+
9b	+	+	+	-
11b	-	+	+	-
1b	-	+	+	-

باکتری انتخاب شده را در محیط کشت اختصاصی SMA در شرایط استریل در ۳ پلیت مجزا کشت داده شد و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس با اندازه‌گیری قطر هاله ایجاد شده و منحنی رشد این باکتری‌ها در ۳ پلیت و میانگین آن‌ها محاسبه شد که در شکل زیر نمایش داده شده است (نمودار ۱ منحنی ۱).



نمودار ۱: اندازه‌گیری قطر هاله ایجاد شده در پلیت.



منحنی ۱: منحنی رشد باکتری‌ها.

پروتئازی می‌تواند در سطح جامعه میکروبی خاک نیز مشهود باشد، زیرا پروتین‌ها در پاسخ به محدودیت کربن، نیتروژن یا گوگرد تجزیه می‌شوند (۳۸). بیشتر پروتئازهای تجاری، به‌ویژه انواع خشی و قلیایی، توسط میکروارگانیسم‌هایی از جنس باسیلوس تولید می‌شوند (۳۹). این آنزیم‌ها به دلیل توانایی در ایجاد تغییرات مطلوب در طعم، بافت، ظاهر محصولات و بازیافت زباله، کاربردهای گسترده‌ای در صنایع مختلف دارند. با توجه به اهمیت آنزیم پروتئاز در صنایع مختلف، تولید آن از اهمیت بالایی برخوردار است. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که گونه‌های جنس باسیلوس، به دلیل مقاومت بالا، قادر به بقا در شرایط سخت و تولید پروتئاز در دماهای بالا و پایین هستند. این میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان تولیدکنندگان اسپور، فعالیت پروتئازی قابل توجهی از خود نشان می‌دهند. بنابراین، پروتئازهای تولیدشده توسط سویه‌های مختلف جنس باسیلوس در دامنه وسیعی از pH و دما فعال هستند. برای افزایش تولید آنزیم، شرایط بهینه رشد برای این میکروارگانیسم‌ها ضروری است (۳۵). این ویژگی‌ها، استفاده صنعتی از این جدایه‌ها را برای تولید انبوه پروتئاز مطلوب می‌سازد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان، تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شماره ۷/ص/۰۰/۲۵۸۸ با استفاده از اعتبارات پژوهشی-پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران انجام شده است.

تعارض منافع

وجود ندارد.

جمع‌آوری و برای بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی جنس‌های باکتریایی /استافیلوکوکوس، سیتروباکتر و باسیلوس مورد استفاده قرار گرفتند. تست کواگولاز بر روی /استافیلوکوکوس، نتایج مثبت را نشان داد که دال بر وجود آنزیم کواگولاز و احتمالاً شناسایی /استافیلوکوکوس /اورئوس، یک پاتوژن مهم، می‌باشد. این یافته بر اهمیت تشخیص دقیق این باکتری تاکید می‌کند. در مورد سیتروباکتر، تست کاتالاز مثبت، فعالیت آنزیم کاتالاز را نشان داد که در تجزیه هیدروژن پراکسید نقش دارد.

از ۴۰ نمونه بررسی‌شده، ۷ نمونه بر روی محیط کشت اسکیم میلک آگار (skim milk agar) هاله شفاف ایجاد کردند، که نشان‌دهنده فعالیت پروتئازی این باکتری‌ها است. این یافته با نتایج تحقیقات دیگر هم‌خوانی دارد. به‌عنوان مثال، زرپرور و آموزگار ۲۲ سویه نمک‌دوست نسبی و ۳۳ سویه تحمل‌کننده نمک مولد پروتئاز را از تالاب پرشور اینچه‌برون جدا و شناسایی کردند (۳۲). همچنین، بابالیان و همکاران سویه تولیدکننده پروتئاز نمک‌دوست را از دریاچه نمک آران و بیدگل جدا و شناسایی نمودند (۳۳).

مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ نشان داد که نمونه‌های SP3، SP10 و sp21 در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، طی ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش قطر هاله را نشان می‌دهند، که با نتایج این مطالعه همسو بوده و نشان‌دهنده افزایش فعالیت پروتئازی با گذشت زمان است (۳۴). در مطالعه P. Saravana Kumari و R. Reshma (28)، فعالیت پروتئولیتیک پروتئاز خام و عصاره خالص با استفاده از بافر گلیسین سنجیده شد و حداکثر (۳۵) فعالیت آنزیم پروتئاز خالص‌شده از باسیلوس در دمای ۳۵ درجه سلسیوس مشاهده شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنیک سویه‌های باکتریایی شناسایی‌شده نشان داد که ۱۱ باکتری متعلق به گروه باسیلوس، ۴ به گرو و سایر باکتری‌ها به گروه‌های مختلف تعلق دارند (۳۶).

پروتئازهای باکتریایی و قارچی نقش حیاتی در چرخه جهانی کربن و نیتروژن ایفا می‌کنند، به‌ویژه در بازیافت پروتین‌ها، فرآیندی که تحت تاثیر سیگنال‌های غذایی در این میکروارگانیسم‌ها تنظیم می‌شود (۳۷). تنظیم تغذیه‌ای فعالیت

References

1. Kumar D, Savitri TN, Verma R, Bhalla TJRM. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. 2008;3(12):661-72.
2. King JV, Liang WG, Scherpelz KP, Schilling AB, Meredith SC, Tang W-J. Molecular basis of substrate recognition and degradation by human presequence protease. Structure. 2014;22(7):996-1007.
3. Shen Y, Joachimiak A, Rosner MR, Tang W-J. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. Nature. 2006;443(7113):870-4.
4. Ibrahim ASS, Al-Salamah AA, El-Toni AM, Almaary KS, El-Tayeb MA, Elbadawi YB, et al. Enhancement of alkaline protease activity and stability via covalent immobilization onto hollow core-mesoporous shell silica nanospheres. International journal of molecular sciences. 2016;17(2):184.
5. Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, et al. Microbial proteases applications. 2019;7:110.
6. Shah D, Mital KJAit. The role of trypsin: chymotrypsin in tissue repair. 2018;35:31-42.
7. Garrido C, Wollman F-A, Lafontaine IJGB, Evolution. The evolutionary history of peptidases involved in the processing of organelle-targeting peptides. 2022;14(7):evac101.
8. Ahvenainen T. Ubiquitin-specific protease 14 in Huntington's disease. 2015.
9. Buller AR, Townsend CA. Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(8):E653-E61.
10. Babic M, Jankovic P, Marchesan S, Mause G, Kalafatovic DJJoci, modeling. Esterase sequence composition patterns for the identification of catalytic triad microenvironment motifs. 2022;62(24):6398-410.
11. Shafee T. Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity: University of Cambridge; 2014.
12. Pietzner M, Wheeler E, Carrasco-Zanini J, Cortes A, Koprulu M, Wörheide MA, et al. Mapping the proteo-genomic convergence of human diseases. 2021;374(6569):eabj1541.
13. Shamsi TN, Parveen R, Fatima SJIjobm. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. 2016;91:1120-33.
14. Domsalla A, Melzig MF. Occurrence and properties of proteases in plant latices. Planta medica. 2008;74(07):699-711.
15. Rao CS, Sathish T, Ravichandra P, Prakasham RSJPB. Characterization of thermo-and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. 2009;44(3):262-8.

16. Rani K, Rana R, Datt SJIJCLS. Review on latest overview of proteases. 2012;2(1):12-8.
17. Mohammad Mashhadi-Karim MA, Seyyed Latif Mousavi Gargari,, Sarshar M. Comparison of function of immobilized and free *Bacillus licheniformis* cells in production of alkaline protease. Journal of Microbial World. 2011;4(1):22-15.-- (In Persian)
18. Arastoo Badoei-dalfard PA, Narjes Ramezanipour, Zahra Karami1, Batool Ghanbari. The production of alkaline protease by *Bacillus tequilensis* FJSH2 isolated from Jiroft's slaughterhouse wastes. Journal of Microbial World. 2015;8(1):54-61.-- (In Persian)
19. Matkawala F, Nighojkar S, Kumar A, Nighojkar AJWJoM, Biotechnology. Microbial alkaline serine proteases: production, properties and applications. 2021;37:1-12.
20. Hamza TA. Bacterial protease enzyme: Safe and good alternative for industrial and commercial use. Int J Chem Biomol Sci. 2017;3(1):1-10.
21. Mohammad Mashhadi-Karim MA, Seyyed Latif Mousavi Gargari, Meysam Sarshar. Comparison of function of immobilized and free *Bacillus licheniformis* cells in production of alkaline protease. Journal of Microbial World. 2011;4(1):15-22.
22. Mrudula SJAB, Microbiology. A Review on Microbial Alkaline Proteases: Optimization of Submerged Fermentative Production, Properties, and Industrial Applications. 2024;60(3): 383-401.
23. Shanmugaiah V, Mathivanan N, Balasubramanian N, Manoharan PJAJoB. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. 2008;7(15).
24. Bamdad F, Shin SH, Suh J-W, Nimalaratne C, Sunwoo HJM. Anti-inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. 2017;22(4):609.
25. Soltanmoradi R, Razmara AS, HOSEINI DSR. Molecular screening and of extracellular protease producing *Serratia marcescens* from the different environments of west Mazandaran. 2013.-- (In Persian)
26. Karray F, Ben Abdallah M, Kallel N, Hamza M, Fakhfakh M, Sayadi SJMBR. Extracellular hydrolytic enzymes produced by halophilic bacteria and archaea isolated from hypersaline lake. 2018;45(5):1297-309.
27. Flandrois J-P, Perrière G, Gouy M. leBIBI QBPP: a set of databases and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. BMC bioinformatics. 2015;16 (1):251.
28. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura KJMb, evolution. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. 2018;35(6):1547-9.
29. Solanki P, Putatunda C, Kumar A, Bhatia R, Walia AJB. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. 2021;11(10):428.

30. Song P, Zhang X, Wang S, Xu W, Wang F, Fu R, et al. Microbial proteases and their applications. 2023;14:1236368.
31. Sharma V, Tsai M-L, Nargotra P, Chen C-W, Kuo C-H, Sun P-P, et al. Agro-industrial food waste as a low-cost substrate for sustainable production of industrial enzymes: a critical review. 2022;12(11):1373.
32. Majithiya VR, Gohel SDJAB, Biotechnology. Agro-industrial Waste Utilization, Medium Optimization, and Immobilization of Economically Feasible Halo-Alkaline Protease Produced by *Nocardiosis dassonvillei* Strain VCS-4. 2024:1-25.
33. Zarparvar P, Amoozegar MA, Fallahian MRJC, Research M. Diversity of culturable moderate halophilic and halotolerant bacteria in Incheh Boroun hyper saline wetland in Iran. 2014;27(1):44-56.- (In Persian)
34. Babavalian H, AMOUZGAR M, Pourbabaei A. Isolation, Identification and Characterization of moderately halophilic bacteria producing Hydrolytic enzymes from Aran-Bidgol salt Lake. 2009.- (In Persian)
35. Patil R, Jadhav B. Isolation and characterization of protease producing *Bacillus* species from soil of dairy industry. Int J Curr Microbiol App Sci. 2017;6(6):853-60.
36. Reshma R. Effect of alkaline protease produced from fish waste as substrate by *Bacillus clausii* on destaining of blood stained fabric. Journal of Tropical Life Science. 2021;11(1).
37. Saxena S, Verma J, Modi DR. RAPD-PCR and 16S rDNA phylogenetic analysis of alkaline protease producing bacteria isolated from soil of India: Identification and detection of genetic variability. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2014;12(1):27-35.
38. Sims G. Nitrogen starvation promotes biodegradation of N-heterocyclic compounds in soil. Soil Biology and Biochemistry. 2006;38(8):2478-80.
39. He W, Zhang M, Jin G, Sui X, Zhang T, Song FJME. Effects of nitrogen deposition on nitrogen-mineralizing enzyme activity and soil microbial community structure in a Korean pine plantation. 2021;81:410-24.
40. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(3):597-635.