



مقاله پژوهشی

بیان نو ترکیب، خالص سازی نسبی و ارزیابی ویژگی های بیوشیمیایی سرین پروتئاز
قلیایی سویه *Salinivibrio proteolyticus* AF-2004^T جدا شده از دریاچه
فوق شور بختگان

پریچهر سیروس نیا^۱، علی دلجو^{۲*}، حسین غفوری^۳، سجاد صاری خان^۴

DOI: 10.22124/japb.2024.28131.1550

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۳

چکیده

پروتئازها به عنوان یکی از پرکاربردترین آنزیم های صنعتی در شکستن مولکول های پروتئین و تبدیل آن به پپتیدها و آمینواسیدها نقش دارند. سرین پروتئازها که جزو اندوپپتیدازها به حساب می آیند خود به چهار زیرگروه تقسیم می شوند که در میان آنها سرین پروتئازهای قلیایی از نظر صنعتی مهم ترین گروه محسوب می شوند. در این مطالعه، ژن سرین متالوپروتئاز قلیایی از سویه *Salinivibrio proteolyticus* AF-2004^T از دریاچه فوق شور بختگان کلون و بیان نو ترکیب شد. نتایج به دست آمده، تولید یک پروتئین منومر با وزن مولکولی حدود ۶۶ کیلودالتون را تایید کرد. نتایج این پژوهش نشانگر عدم تاثیر معنی دار پلاسמידهای چارپرونی بر روی بیان محلول پروتئاز مورد مطالعه است و حتی در صورت استفاده فرایند تخلیص پروتئین را به دلیل وجود مقادیر بالای پروتئین های چارپرونی در فاز محلول مختل می کند. سنجش فعالیت آنزیم به روش زایموگرافی و همچنین با محلول Folin-Ciocalteu نشان دهنده فعالیت پروتئازی آن بر روی سوبسترای کازئین بود. با مشاهده اثر مهارکنندگی EDTA با غلظت ۱ میلی مولار به عنوان مهار کننده متالوپروتئازها و اثر کاهندگی فعالیت آنزیم در حضور PMSF با غلظت ۱ میلی مولار به عنوان مهار کننده سرین پروتئازها چنین نتیجه گیری می شود که پروتئاز مورد بررسی به دسته سرین متالوپروتئازها تعلق دارد. همچنین، فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم بر روی سوبسترای کازئین با غلظت ۰/۶۵ درصد، بر اساس نتایج اسپکتروفتومتر و با استفاده از منحنی استاندارد ال-تیروزین به میزان $1/65 \pm 0/08$ واحد در میلی گرم محاسبه شد. در نهایت باید برای دستیابی به فعالیت ویژه بهینه آنزیم ارزیابی شرایط مختلف واکنش مانند دما و pH بهینه و یون های فلزی مطلوب آن مد نظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اندوپپتیداز، زایموگرافی، آنزیم صنعتی.

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۴- مربی بانک DNA و داده های ژنومی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: sarikhan@acecr.ac.ir، ali.deljou@basu.ac.ir

مقدمه

Smith, 1968; Adinarayana and Ellaiah, 2002).

فرایندهای صنعتی که در آنها از پروتئازها استفاده می‌شود به طور فزاینده‌ای در حال گسترش هستند. در کنار کاربردهای بسیار گسترده این آنزیم‌ها در صنایع مهمی مانند کاربردهای پزشکی، صنایع غذایی، شوینده‌ها و صنعت چرم، یکی از شناخته شده‌ترین کاربردهای پروتئازها در صنعت کشاورزی در فراوری خوراک دام و طیور است (Solanki et al., 2021). افزودن مکمل آنزیمی پروتئازی به خوراک دام می‌تواند فراهمی زیستی مواد مغذی را در غذای دام افزایش دهد یا به عنوان عنصری در ترکیب جیره غذایی جانور برای کمک به هضم پروتئین در دستگاه گوارش کمک کند (Hejdysz et al., 2020). تاثیر مخلوط جیره با مکمل پروتئازهای مختلف به شکل دانه‌ای سیستمین پروتئاز و سرین اندوپتیداز بر متغیرهای بهره‌وری در گاوهای شیری، با استفاده از گاوهای هلشتاین شیرده به عنوان مدل توسط Park و همکاران (۲۰۲۰) مورد مطالعه قرار گرفت. نتیجه این آزمایش و مطالعات مشابه نشان داد که مکمل پروتئازی کارایی تولید شیر و گوشت و همچنین

پروتئازها یکی از پرکاربردترین آنزیم‌های صنعتی هستند که کاتالیز واکنش‌های هیدرولیز را بر روی مولکول‌های پروتئین و تبدیل آن به پپتیدها و آمینواسیدها بر عهده دارند. این آنزیم‌ها یکی از سه گروه بزرگ آنزیم‌های صنعتی هستند که در این میان، آنزیم‌های با منشا میکروبی بالاترین سهم را در بازار دارند (Singh et al., 2016; Suberu et al., 2019a). بر اساس مطالعه Hartley (۱۹۶۰)، پروتئازهای اندوپتیداز با توجه به جایگاه فعال و حساسیت آنها به انواع بازدارنده‌های آنزیمی، به چهار گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند که سرین پروتئازها یکی از این انواع هستند. سرین پروتئازها به چهار زیر گروه شامل پروتئینازهای مشابه تریپسین، آلکالین پروتئینازها، پروتئینازهای α -Lytic میکسوباکتر (Myxobacteria) و پروتئینازهای استافیلوکوک طبقه‌بندی می‌شوند (Moriyama, 1974) که آلکالین پروتئازها از نظر صنعتی مهم‌ترین گروه هستند. سرین-آلکالین پروتئازهایی که تاکنون تجاری شده‌اند، در فرایندهایی مانند ترد کردن گوشت، بهبود عطر و طعم پنیر، بهبود بافت خمیر، بهبود قابلیت هضم خوراک دام و حذف لکه‌های پروتئینی در منسوجات استفاده می‌شوند

دستکاری ژن‌ها و سنتز ژن‌های پروتئازی با ویژگی‌های متمایز را نوید می‌دهد، با این حال پژوهش در مورد تنوع میکروبی عظیم به منظور دستیابی به سویه‌های تولید کننده پروتئازهای جدید با ویژگی‌های مطلوب صنعتی هنوز یک زمینه مطالعاتی بسیار جالب و امید بخش است (Singh and Bajaj, 2015).

در یک مطالعه بر روی پروتئازهای جدا شده از سویه‌های نمک‌دوست (هالوفیل) ایران، Ghafoori و همکاران (۲۰۱۶) یک سرین پروتئاز قلیایی را از سویه *Bacillus iranensis* جداسازی و مورد بررسی قرار دادند. نتیجه این مطالعه نشانگر تحمل بسیار بالای آنزیم به غلظت بالای نمک و pH بسیار قلیایی بود، به گونه‌ای که آنزیم ۵۰ درصد فعالیت خود را در غلظت ۲/۵ مولار نمک و ۷۰ درصد فعالیت خود را در pH قلیایی ۱۱ حفظ کرد (Ghafoori et al., 2016). در مطالعه‌ای دیگر، Sepehri و همکاران (۲۰۲۳) ژن متالوکربوکسی پپتیداز را از گونه *Mesobacillus persicus* جداسازی، کلون و به طور موفق در *E. coli* بیان کردند. سویه *M. persicus* از دریاچه فوق شور آران و بیدگل شناسایی و معرفی شده است و میزان قابل توجه بیان نوترکیب پپتیداز جدا شده از آن و تاشدگی صحیح و خالص‌سازی موفق پروتئین

پارامترهای وضعیت نیترژن را افزایش می‌دهد (Park et al., 2020; Yang et al., 2020). در مطالعه‌ای دیگر استفاده از یک سرین پروتئاز جدید از *Bacillus licheniformis* که به عنوان پروتئاز خوراک طیور بیان شده است، افزایش قابل توجهی در درجه هیدرولیز، حل شدن و قابلیت هضم پروتئین‌ها ایجاد کرد و عملکرد جوجه‌های گوشتی را با افزایش قابلیت هضم پروتئین و انرژی بهبود بخشید (Naveed et al., 2021).

از نقطه نظر صنعتی بیشتر پروتئازهای موجود فاقد خواص مطلوب هستند. بنابراین طبیعی است که به طور مداوم جستجو برای کشف پروتئازهای قلیایی کاراتر با تحمل حرارتی بالاتر ادامه یابد. از طرف دیگر، بیشتر آنزیم‌ها به عنوان مولکول‌های زیستی در برابر فرایندهای صنعتی سخت آسیب‌پذیر هستند. بنابراین تلاش برای پیدا کردن آنزیم‌هایی با کارایی بالا و مقاوم در برابر شرایط صنعتی توجیه‌پذیر است (Rekik et al., 2019). پروتئازهای در نظر گرفته شده برای کاربرد صنعتی باید محتمل به حضور سورفکتانت‌ها، حلال‌ها و اکسیدان‌ها بوده و در برابر شرایط دمایی و pH قلیایی و حضور بازدارنده‌های آنزیم مقاوم باشند (Rao et al., 2009). با این که علم مهندسی پروتئین امکان

پروتئاز با بررسی توالی ژنوم سویه در سرور (Rapid Annotation Using) RAST (Subsystem Technology) و با غربال کردن آنزیم‌های پروتئازی در خروجی نرم‌افزار به دست آمد (Brettin et al., 2015). آغازگرهای مناسب بر اساس وکتور بیانی pET28a+ طراحی و ساخته شد. برای تکثیر ژن سرین-آلکالین پروتئاز آغازگر رفت (Forward) با توالی 5'-TTATATCATATGATGAATAAG TCAGTTATGCTATCC-3' و آغازگر برگشت (Reverse) با توالی 5'-TTATATC TCGAGCTGGTTTACATCGAGGG TG-3' که به ترتیب حاوی جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های برشی *NdeI* و *XhoI* هستند، در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. به منظور طراحی آغازگرها از سرور IDT Oligo Analyzer استفاده شد. واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر در سه تکرار و با استفاده از 1X بافر PCR، ۲/۵ میلی‌مولار منیزیم کلرید (MgCl₂)، ۰/۶ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۴ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲ واحد DNA پلیمرز Taq و ۱۰ نانوگرم DNA ژنومی انجام شد. برنامه واکنش به ترتیب شامل یک چرخه واشرست‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵

نوید بخش نتایج بهتر و کاربردی‌تر در مطالعات آتی عنوان شده است (Sepehri et al., 2023). بنابراین، با توجه به پتانسیل بالای سویه‌های بومی ایران در تولید انواع آنزیم‌های کارا و با قابلیت صنعتی شدن، هدف این مطالعه، کلون کردن ژن، بیان نوترکیب در میزبان *Escherichia coli* خالص‌سازی نسبی و ارزیابی ویژگی‌های بیوشیمیایی سرین-آلکالین پروتئاز باکتریایی از *Salinivibrio proteolyticus* است که به عنوان یک سویه نمک‌دوست نسبی و گرم منفی قبلاً توسط Amoozegar و همکاران (۲۰۰۸) از دریاچه بختگان (استان فارس)، یک دریاچه بسیار شور با ۱۷ درصد نمک (جرمی-حجمی) جدا شد.

مواد و روش‌ها

کلون کردن ژن سرین-آلکالین پروتئاز

به منظور جداسازی ژن، ابتدا DNA ژنومی سویه *Salinivibrio proteolyticus* AF-2004T از بانک DNA مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با شماره دسترسی IBRC-M 10218 تهیه شد. با توجه به این که ژنوم این سویه به طور کامل توسط مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران توالی‌یابی و مورد تجزیه و تحلیل ژنومی قرار گرفته بود، توالی ژن

دقیقه، سپس ۳۵ چرخه تکثیر شامل مراحل واشرست‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط آغازگر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه Thermal Cycler (Bio-Rad, T100)، آمریکا) انجام شد. پس از هضم آنزیمی محصول واکنش و وکتور pET28a+ با آنزیم‌های *NdeI* و *XhoI* و خالص‌سازی قطعات برش یافته، ابتدا قطعه ژنی طی واکنش الحاق در داخل وکتور برش یافته درج شد. سپس پلاسمیدهای به دست آمده به درون سلول‌های شایسته *E. coli* BL21(DE3) انتقال یافتند و بر روی پلیت LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت شدند. به منظور شناسایی کلونی‌های نوترکیب مثبت با استفاده از Colony PCR از آغازگرهای Universal T7 استفاده شد.

بیان و خالص‌سازی نسبی پروتئین نوترکیب

یکی از کلونی‌های نوترکیب مثبت برای تهیه استوک گلیسروله استفاده شد. برای بیان پروتئین، ابتدا کشت شبانه از کلونی مثبت در محیط LB Broth حاوی ۵۰ میکروگرم در

میلی‌لیتر کانامایسین تهیه شد. سپس در ارلن ۱ لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط LB Broth با کانامایسین، مقدار ۱ به ۱۰۰ از کشت اولیه تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت حدود ۳ ساعت در انکوباتور شیکردار (Vision Scientific، کره جنوبی) کشت داده شد تا زمانی که جذب آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) حدود ۰/۶ برسد. برای القای بیان پروتئین نوترکیب از القاگر β -Isopropyl D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار استفاده شد. پس از القا، کشت به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. در نهایت سلول‌های باکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma، 2-16KHL، آلمان) شدند. رسوب به دست آمده در ۲۰ میلی‌لیتر بافر لیز حاوی Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار و ایمیدازول ۵ میلی‌مولار حل شد و به مقدار ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر لیزوزیم به آن اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه التراسونیک (Hielscher، UP50H، آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ مورد سونیکاسیون قرار گرفت. سپس مقدار ۵ واحد

آنزیم DNase I به آن افزوده شده و دوباره به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت با سانتریفیوژ در ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها ته‌نشین شدند. محلول رویی به عنوان پروتئین فاز محلول جدا شده و برای بررسی‌های بعدی و خالص‌سازی استفاده شد. همچنین در ادامه به منظور مطالعه اثر چپرون‌ها در افزایش بیان محلول (Tarazi et al., 2021) و بهبود ساختار و فعالیت آنزیم (Fathinejad et al., 2023)، وکتور نوترکیب حاوی ژن پروتئاز به صورت همزمان با وکتور تجاری (Takara, pG-KJE8، ژاپن) دارای چپرون‌های مختلف هم‌بیان (Co-expression) شد و مراحل بیان و خالص‌سازی برای آن تکرار شد. به دلیل وجود دنباله هیستیدینی (-His6 tag) در هر دو انتهای آمینی (N-terminal) و کربوکسی (C-terminal)، انتظار می‌رود آنزیم تمایل زیادی برای اتصال به نیکل نشان دهد. بنابراین، برای دستیابی به آنزیم با خلوص تقریبی با روش کروماتوگرافی تمایلی (Affinity Chromatography)، بخش محلول پروتئین در یک ستون نیکل-آگارز (Nickel-Agarose) شامل ۱ میلی‌لیتر رزین از پیش متعادل شده، بارگذاری شد. مرحله

شستشو سه بار با ۵ میلی‌لیتر بافر شستشو (۵۰ میلی‌مولار سدیم فسفات با pH ۸/۰، ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول و ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید) انجام شد. پس از آن، ۱ میلی‌لیتر بافر جداکننده حاوی ۵۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۵۰ میلی‌مولار فسفات سدیم pH ۸/۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید به ستون اضافه شد. تمامی مراحل خالص‌سازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به منظور تایید بیان پروتئین نوترکیب در فاز محلول، و تایید خالص‌سازی آن، مقداری از هر کدام از مراحل فاز محلول و تخلیص پروتئین بر روی ژل ۱۱ درصد SDS-PAGE بارگذاری و جداسازی شد و با رنگ کوماسی بریلیانت بلو-250G (CBB) مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت.

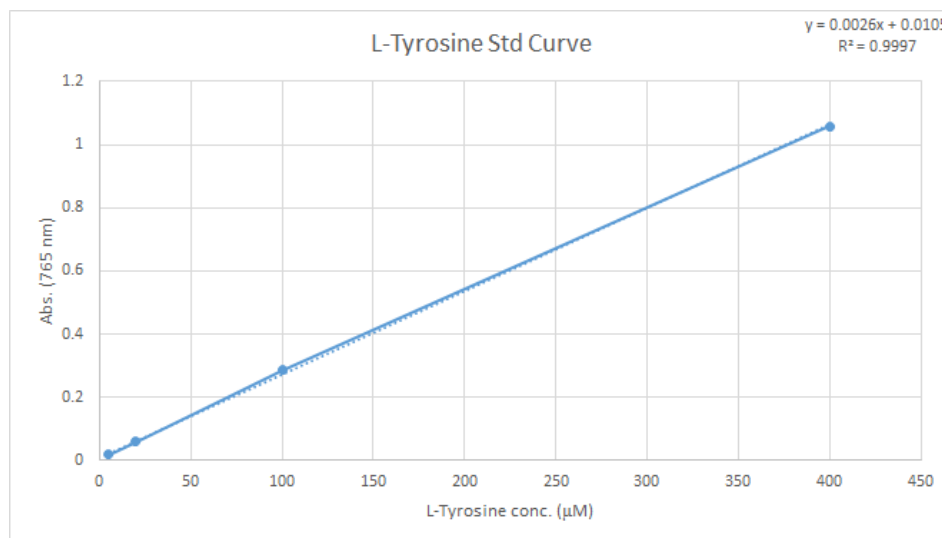
سنجش فعالیت آنزیم

به منظور تایید فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب تولید شده، از روش زایموگرافی کازئین و همچنین روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. برای دستیابی به نتایج بهینه در زایموگرافی پروتکل RAMA Casein Zymography به کار گرفته شد (Yasumitsu, 2017). به طور خلاصه، ابتدا نمونه آنزیم در شش تکرار مساوی و به همراه بافر نمونه و بدون گرم کردن بر روی

ژل پلی‌آکریل آمید حاوی SDS و سوبسترای کازئین (۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر) بارگذاری و الکتروفورز شد. چاهک حاوی لدر پروتئین به همراه تکرار کناری آنزیم برای رنگ آمیزی مستقیم با CBB برش داده شد و به محلول رنگ آمیزی منتقل شد. بقیه قسمت های ژل برای ادامه مرحله زایموگرافی به کار رفت. برای حذف SDS از ژل و بازیابی شکل فعال پروتئین، ژل در محلول حاوی ۵۰ میلی مولار Tris-HCl با pH ۷/۵ و ۲/۵ درصد Triton X-100 به مدت ۴۰ دقیقه غوطه ور شده، سپس با آب مقطر شسته شد. در ادامه، ردیف های حاوی ۵ تکرار باقیمانده آنزیم به صورت تکی برش یافته و قطعات به ظروف حاوی بافر انکوباسیون شامل ۵۰ میلی مولار Tris-HCl با pH ۷/۵ و ۱ میلی مولار کلسیم کلرید (CaCl_2) به طور جداگانه منتقل شدند، به گونه ای که یکی از ظروف فقط حاوی بافر انکوباسیون بود و در چهار ظرف دیگر، به ترتیب مقادیر ۰/۱ و ۱ میلی مولار از هرکدام از دو ماده EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) به عنوان بازدارنده متالوپروتئازها و PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) به عنوان بازدارنده سرین پروتئازها، به بافر انکوباسیون اضافه شد. ظروف حاوی ژل پس از ۱۰ دقیقه تکان خوردن بر روی شیکر، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. برای رنگ آمیزی، قطعات ژل از بافر انکوباسیون به بافر رنگ آمیزی RAMA حاوی ۰/۰۵ درصد CBB، ۱۰ درصد استیک اسید، ۱۵ درصد متانول و ۳ درصد آمونیوم سولفات که به صورت تازه تهیه شده بود انتقال یافت و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. در نهایت با حذف محلول رنگ آمیزی، ابتدا قطعات ژل ۲ بار با مقدار کمی آب مقطر شستشو داده شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در داخل ظرف حاوی آب مقطر بر روی شیکر بخوبی تکان داده شدند. غلظت آنزیم خالص شده نسبی با روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد به دست آمد. سنجش فعالیت آنزیم در واکنشی با حجم نهایی یک میلی لیتر در بافر پتاسیم فسفات با pH ۷/۵، سدیم کلرید ۰/۵ مولار، کلسیم کلرید ۱ میلی مولار، در حضور سوبسترای کازئین با غلظت ۰/۶۵ درصد و با افزودن مقدار ۵۰ میکرولیتر از آنزیم خالص شده (با غلظت ۰/۰۲ میلی گرم در میلی لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. در ادامه، واکنش با استفاده از ۴۷۰ میکرولیتر محلول TCA (Trichloroacetic Acid) ۱۱۰ میلی مولار متوقف شد. ویال ها پس

از نگهداری در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه، در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای سنجش میزان فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت واکنش با ۶۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات (Na_2CO_3) ۰/۵ مولار و ۱۵۰ میکرولیتر از محلول Folin-Ciocalteu ۰/۵ نرمال مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. رنگ آبی به دست آمده با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۰ نانومتر (UV/Vis T80+)،

PG Instrument، استرالیا) خوانش شد و مقدار جذب به دست آمده با استفاده از منحنی استاندارد ال-تیروزین به صورت مقدار فعالیت آنزیمی محاسبه شد (شکل ۱). واکنش در سه تکرار انجام شد. واحد فعالیت پروتئازی به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزادسازی ۱ میکرومول تیروزین در ۱ دقیقه، تحت شرایط مشخص انجام واکنش تعریف شد. فعالیت ویژه پروتئین به عنوان واحد فعالیت آنزیم در میلی گرم پروتئین در نظر گرفته شد.



شکل ۱: منحنی استاندارد L-Tyrosine در محدوده غلظت ۴۰۰-۵ میکرومولار به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۷۶۵ نانومتر و در حضور Folin-Ciocalteu رسم شد.

دو آغازگر روی پلاسمید بود (حدود ۲۰۰۰ جفت باز).

بیان و خالص سازی آنزیم پروتئاز

نتایج به دست آمده از بیان آنزیم نو ترکیب در شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی گراد در شکل ۳، ردیف های ۱ و ۲ به ترتیب برای فاز محلول و فاز رسوب آنزیم نشان داده شده است که حاکی از تاخوردگی ناصحیح بخش عمده آنزیم و انباشتگی آن به صورت اجسام تجمعی در سلول (فاز رسوب) است. با این حال نتایج خالص سازی نسبی فاز محلول آنزیم با کروماتوگرافی تمایلی نیکل- آگارز نشان داد که مقدار قابل قبولی از آنزیم در فاز محلول وجود داشت که در اثر خالص سازی و تغلیظ آن در حجم کم بافر به صورت باند مشخص خالص شده در اندازه حدود ۶۶ کیلودالتون بر روی ژل SDS-PAGE قابل مشاهده است (شکل ۳، ردیف ۳). به منظور بررسی اثر چاپرون ها بر میزان محلول سازی آنزیم مورد نظر، فاز سوپرناتانت حاصل از لیز سلول های کوترانسفرم شده، بعد از تخلیص پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به دست آمده نشان دهنده عدم تاثیر معنی دار چاپرون ها در افزایش نسبت بیان محلول آنزیم بود. همچنین به دلیل میزان

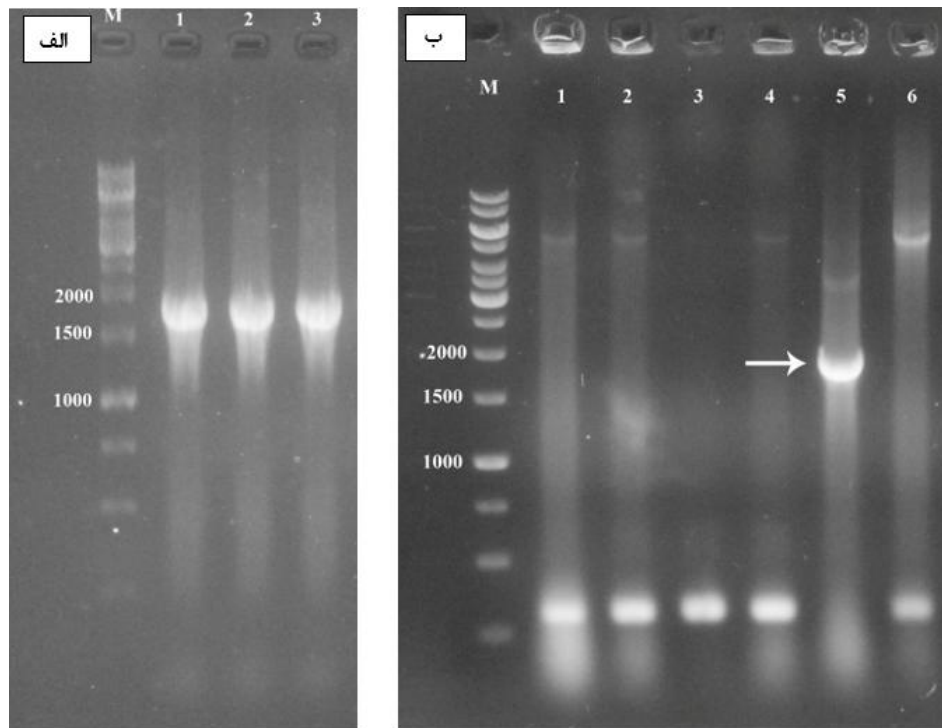
به منظور بررسی روابط تکاملی در توالی ژن سرین پروتئاز مورد مطالعه با گونه های دیگر، توالی آمینواسید پروتئازهای مشابه با استفاده از BLAST در پایگاه داده Uniprot استخراج شد. پس از هم ردیفی توالی ها با نرم افزار Clustal Omega درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA11 و مدل آماری NJ (Neighbor Joining) با تکرار بوت استرپ ۱۰۰۰۰ رسم شد.

نتایج

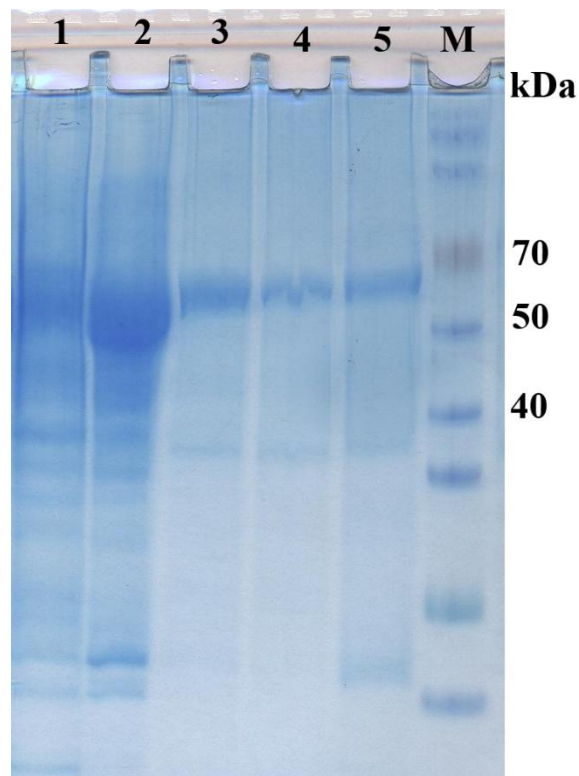
کلونینگ ژن پروتئاز

تفکیک قطعه ژن تکثیر شده در واکنش PCR بر روی ژل آگارز، تایید کننده اندازه ژن پروتئازی (۱۷۷۰ جفت باز) بود (شکل ۲-الف). پس از انجام مراحل کلونینگ ژن و دستیابی به کلونی های رشد یافته بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک، به منظور تایید کلونی های نو ترکیب مثبت که پلاسمید دارای ژن پروتئاز را دریافت کرده بودند، واکنش Colony PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی T7 صورت پذیرفت که نتیجه آن نشانگر یک کلونی مثبت در بین ۶ کلونی بررسی شده بود (شکل ۲-ب)، به گونه ای که اندازه باند مثبت به دست آمده بر روی ژل برابر با مجموع اندازه ژن و فاصله بین

بالای بیان مولکول‌های چاپرون در فاز محلول، هنگام خالص‌سازی پروتئین مقدار قابل توجهی از پروتئین‌های چاپرونی در کنار پروتئین پروتئازی بر روی ژل مشاهده شد که با وجود بهینه‌سازی روش تخلیص پروتئین، هیچ‌گونه بهبودی در خلوص آنزیم به دست نیامد (نتایج الکتروفورز در اینجا نشان داده نشده است). در نتیجه، ادامه آزمایش‌های سنجش فعالیت آنزیمی با پروتئاز تخلیص شده از روش بدون چاپرون انجام شد.



شکل ۲: نتیجه تکثیر ژن و نتیجه واکنش Colony PCR. الف) نتیجه واکنش PCR برای تکثیر ژن پروتئاز. چاهک M: اندازه مارکر 1kb DNA ladder؛ چاهک‌های ۱ تا ۳: تکثیر ژن در سه تکرار. ب) نتیجه واکنش Colony PCR برای انتخاب کلونی‌های نو ترکیب مثبت. چاهک M: اندازه مارکر 1kb DNA ladder. چاهک‌های ۱ تا ۶: نتیجه واکنش تکثیر کلونی‌های نو ترکیب با آغازگرهای عمومی T7. فقط چاهک شماره ۵ کلونی مثبت را نشان می‌دهد.



شکل ۳: نتیجه بیان و خالص سازی نسبی پروتئین نو ترکیب. چاهک M: لدر پروتئین؛ چاهک ۱: فاز محلول؛ چاهک ۲: فاز رسوب؛ چاهک ۳: پروتئین نسبتاً خالص شده؛ چاهک های ۴ و ۵ به ترتیب بافر شستشو بار اول و بار دوم

ارزیابی فعالیت آنزیم

زمینه آبی ژل، در راستای باند آنزیم تخلیص شده در محدوده اندازه مورد انتظار مشاهده می شود. همچنین، عملکرد آنزیم در حضور دو غلظت مختلف از بازدارنده های PMSF و EDTA، نشانگر کاهش نسبی فعالیت در غلظت بالای PMSF و توقف کامل فعالیت آنزیم در حضور غلظت ۱ میلی مولار EDTA است.

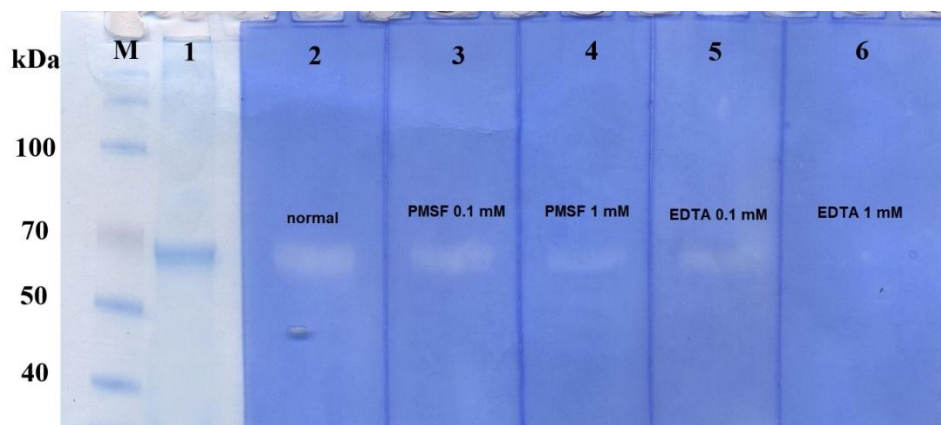
نتایج به دست آمده از ارزیابی فعالیت آنزیم به روش زایموگرافی نشان دهنده عملکرد مناسب آنزیم بر روی سوبسترای کازئین است (شکل ۴). همان طور که در ژل زایموگرام مشخص است، علایم فعالیت آنزیم و هضم سوبسترای کازئین به صورت لکه سفید رنگ در

مقایسه هم‌ردیفی با توالی آمینواسیدی ژن‌هایی که به عنوان آنزیم‌های سرین پروتئاز در پایگاه داده Uniprot شناسایی شده بودند، رسم شد. نتایج نشان داد موقعیت فیلوژنتیکی توالی پروتئینی ژن سرین پروتئاز مورد مطالعه در یک گروه شامل شش جنس مختلف قرار گرفته است و بیشترین نزدیکی را در داخل این گروه با سویه‌های *Pseudoalteromonas ulvae* و *Vibrio navarrensis* دارد (شکل ۵).

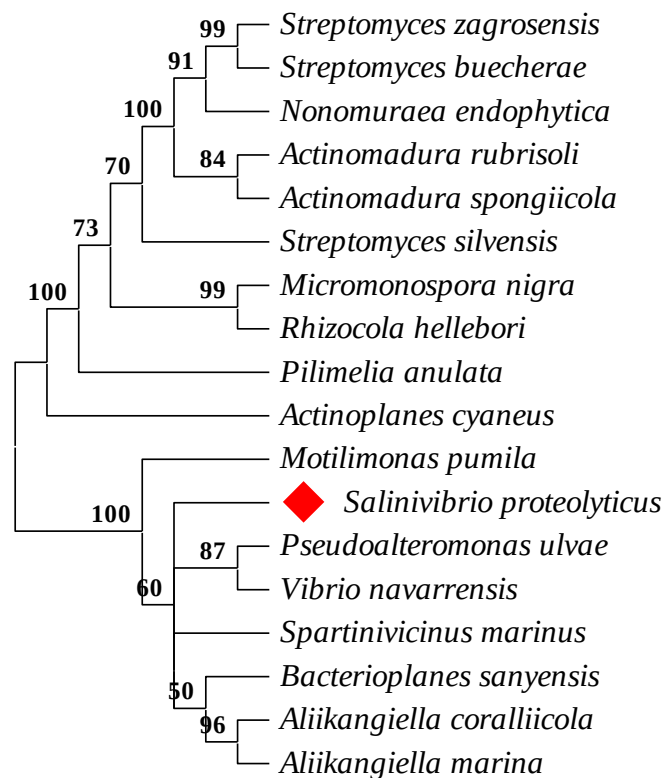
به علاوه، میزان فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم به روش Folin-Ciocalteu با استفاده از سوبسترای کازئین با غلظت ۰/۶۵ درصد و بر اساس منحنی استاندارد به میزان $1/65 \pm 0/08$ واحد در میلی گرم محاسبه شد.

بررسی روابط تکاملی ژن آنزیم پروتئاز

درخت فیلوژنی با مدل NJ و با استفاده از توالی آمینواسیدی ژن سویه مورد مطالعه در



شکل ۴: نتیجه زایموگرافی بر روی سوبسترای کازئین. چاهک M: لدر پروتئین؛ چاهک ۱: آنزیم خالص رنگ آمیزی شده با CBB به همراه لدر؛ چاهک ۲: نتیجه زایموگرافی آنزیم بدون بازدارنده؛ چاهک‌های ۳ و ۴ به ترتیب زایموگرافی در حضور ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار PMSF؛ چاهک‌های ۵ و ۶ به ترتیب: زایموگرافی در حضور EDTA ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار.



شکل ۵: درخت فیلوژنی برای توالی سرین پروتئاز سویه *Salinivibrio proteolyticus* در مقایسه با توالی سرین پروتئازهای به دست آمده از پایگاه داده Uniprot. رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA 11 و بر اساس مدل Neighbor Joining (NJ) با عدد بوت استرپ ۱۰۰۰۰ انجام شد.

بحث

امروز، منشا عمده آنزیم‌های پراهمیت از نظر

علمی و صنعتی از میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها بوده است (Alvarez et al., 2006). تقاضای جهانی برای پروتئازها به دلیل کاربرد آنها در صنایع مختلف از جمله شوینده‌ها، کشاورزی، چرم‌سازی، صنایع غذایی و لبنی، دارویی و تولید پپتیدها رو به

آنزیم‌هایی با ویژگی هیدرولیتیک حدود ۷۵ درصد از انواع آنزیم‌های شناخته شده صنعتی را شامل می‌شوند که در این میان، آنزیم‌های پروتئاز با تنوع بالای خود حدود ۶۰ درصد از نسبت آنزیم‌های هیدرولیتیک را به خود اختصاص داده‌اند (Raval et al., 2014). تا به

افزایش است (Sinha and Khare, 2013; Raval et al., 2014). بیشتر فرایندهای صنعتی تحت شرایط شدید دما، pH و غلظت بالای حلال‌های آلی انجام می‌شوند که در آن شرایط بیشتر آنزیم‌ها پایدار نبوده و قادر به فعالیت نیستند. بنابراین، استفاده از آنزیم‌هایی با منشا میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست و قلیادوست که پایداری و فعالیت بالاتری در شرایط شدید صنعتی دارند، برتری می‌یابد (Raval et al., 2018). پروتئازهای موجود در میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست به دلیل توانایی آنها در عملکرد در pH قلیایی، دماهای بالا و غلظت نمک بالا برای کاربردهای مختلف مورد تقاضا هستند (Sinha and Khare, 2013; Raval et al., 2014). ژن سرین-آلکالین پروتئاز مورد مطالعه در پژوهش حاضر از سویه *S. proteolyticus* جدا سازی و کلون شده است که منشا این سویه دریاچه فوق شور بختگان است. Karbalaeei-Heidari و همکاران در مطالعات خود بر روی سویه‌های نمک‌دوست دریاچه‌های نمک مهارلو (Karbalaeei-Heidari et al., 2013) و بختگان (Karbalaeei-Heidari et al., 2007a) به ویژگی‌های پروتئازهای خالص شده از این سویه‌ها و از جمله تحمل آنها در برابر حلال‌های آلی پرداختند. آنها در مطالعه خود بر روی آنزیم‌های پروتئازی سویه *S. proteolyticus* (سویه مورد استفاده در مطالعه حاضر)، پس از خالص‌سازی یک متالوپروتئاز ترشح شده از سویه، ویژگی‌های آن را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که آنزیم خالص شده یک سرین متالوپروتئاز با وزن حدود ۳۱ کیلودالتون است که در دامنه وسیعی از pH و در حضور حلال‌های آلی فعالیت خوبی را از خود نشان می‌دهد (Karbalaeei-Heidari et al., 2007a). با این حال، در مطالعه حاضر پس از تجزیه و تحلیل توالی ژنومی سویه یاد شده و شناسایی تمامی ژن‌های عملکردی آن و از جمله ژن‌های پروتئازی، یک ژن که پروتئین حاصل از آن وزن مولکولی حدود ۶۶ کیلودالتون داشت و بر اساس داده‌های سرور RAST در بررسی بار اول به عنوان یک سرین-آلکالین پروتئاز فعال در سرما شناسایی شده بود، جداسازی و کلون شد. هدف از این جداسازی تولید پروتئاز مد نظر به صورت نوترکیب در سیستم بیانی *E. coli* بود تا مقادیر قابل توجهی از پروتئین نوترکیب خالص برای ارزیابی‌های آزمایشگاهی به دست آید. نتیجه بیان نوترکیب پروتئاز مورد مطالعه نشان داد که با وجود میزان بسیار بالای رونویسی و ترجمه ژن منتقل شده، بخش عمده

محصول تولید شده به صورت اجسام تجمعی در سلول *E. coli* رسوب کرد و فقط درصد کمی از آن به فرم فعال و به صورت محلول در سلول یافت شد. این وضعیت برای اغلب پروتئین‌های نوترکیب که منشا ژن آنها از گونه‌های دور باکتریایی و یا منابع یوکاریوتی با فاصله ژنتیکی بیشتر نسبت به میزبان بیانی *E. coli* است و الگوی آگزیزی بالاتری نیز نشان می‌دهند دور از انتظار نیست. به گونه‌ای که Sadeghi و همکاران (۲۰۱۰) در بیان یک ژن پروتئازی با منشا جنس *Bacillus* در سیستم بیانی *E. coli* موفق به دستیابی به فرم فعال پروتئین نشدند. بنابراین، با لحاظ عدم موفقیت انواع تیمارهای مختلف فیزیکی، شیمیایی و چاپرون‌های مولکولی در افزایش سهم بیان محلول آنزیم‌ها، به نظر می‌رسد تغییر سیستم بیانی از *E. coli* به *Bacillus* و استفاده از مکانیسم ترشحی آنها (Tekin et al., 2021) بتواند با کاهش تجمع پروتئین‌های تولید شده در داخل سیتوپلاسم و هدایت آنها به محیط کشت مقدار قابل توجهی پروتئین محلول فراهم کند. از طرف دیگر به دلیل پیش‌بینی کاربرد پروتئاز مورد مطالعه و آنزیم‌های مشابه دیگر در صنایع کشاورزی و غذایی، تولید و مطالعه این گونه آنزیم‌های نوترکیب در میزبان *Bacillus* و حتی میزبان‌های مخمری مزیت به شمار می‌آید. پروتئاز نوترکیب تولید شده در این مطالعه، بر اساس نتایج SDS-PAGE یک منومر به وزن مولکولی حدود ۶۶ کیلودالتون است. این در حالی است که وزن مولکولی بیشتر سرین پروتئازها و سرین پروتئازهای قلیایی (با منشا باکتریایی) بررسی شده در مطالعات دیگران در بازه ۳۱ تا ۴۳ کیلودالتون تعیین شده است (Karbalaei-Heidari et al., 2007a,b; Ariyaei et al., 2019; Suberu et al., 2020; Bhatt and Singh, 2020). نتیجه آزمایش زایموگرافی نشانگر فعالیت پروتئازی آنزیم بر روی سوبسترای کازئین در بستر ژل آکریل امید است که اثر فعالیت آنزیم به صورت لکه روشن در زمینه آبی رنگ ژل قابل مشاهده است (شکل ۴). بررسی فعالیت آنزیم در حضور بازدارنده‌ها حاکی از تاثیر نامحسوس هر دو بازدارنده EDTA و PMSF در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در کاهش فعالیت آنزیم نسبت به چاهک شاهد است. با این حال با افزایش غلظت بازدارنده‌های آنزیمی به ۱ میلی‌مولار، توقف فعالیت آنزیم در حضور EDTA و کاهش شدید فعالیت آن در حضور PMSF مشاهده شد (شکل ۴). با در نظر گرفتن این که در تجزیه و

تحلیل ژنوم سویه در سرور RAST برای بار اول، ژن مورد مطالعه تحت عنوان سرین پروتئاز قلیایی فعال شونده با سرما شناسایی شده بود، بنابراین بازدارندگی غلظت ۱ میلی مولار EDTA برای فعالیت آنزیم در مقابل کاهش محسوس فعالیت (و نه توقف آن) در حضور غلظت ۱ میلی مولار PMSF شاید در نگاه اول ناقض تعریف سرین پروتئازی آنزیم باشد. با این حال، پس از تجزیه و تحلیل ژنوم سویه در سرور RAST برای بار دوم و بر اساس پایگاه داده روزرسانی شده، مشاهده شد که ژن آنزیم مد نظر این بار تحت عنوان یک متالوپروتئاز شناسایی شد. البته مطابق بررسی های انجام شده در پایگاه Uniprot توالی این آنزیم هم به توالی ژن های سرین پروتئاز و هم متالوپروتئاز شباهت نشان داد. بر اساس بررسی های بیوانفورماتیکی، تعدادی از پروتئازهای مختلف با وزن مولکولی متفاوت و عملکرد ویژه پیش بینی شده برای هر کدام (شامل متالوپروتئاز- متالوپروتئاز وابسته به روی و سرین پروتئاز) در ژنوم سویه حاضر شناسایی شده است. در مطالعات پیشین، Amoozegar و همکاران (۲۰۰۷) یک پروتئاز کوچک ترشح شده در شرایط تنش دمایی و شوری بالا را از این سویه خالص سازی کردند که فعالیت آن به وسیله

EDTA متوقف می شد. بنابراین آن را به عنوان یک متالوپروتئاز مشخص کردند (Amoozegar et al., 2007). از طرف دیگر Karbalaie-Heidari و همکاران (۲۰۰۷a,b) در دو مطالعه جداگانه بر روی پروتئازهای ترشح شده از همین سویه یک متالوپروتئاز ۳۸ کیلودالتونی وابسته به روی و یک پروتئاز ۳۱ کیلودالتونی با نتیجه مشابه با مطالعه حاضر در باره بازدارندگی همزمان با PMSF و EDTA را مشاهده کردند و اعلام کردند آنزیم به دست آمده به دسته سرین متالوپروتئازها تعلق دارد. مقدار فعالیت ویژه به دست آمده برای آنزیم بر روی سوبسترای کازئین و در شرایط استاندارد تعریف شده در بخش مواد و روش ها، $1/65 \pm 0/08$ واحد در میلی گرم بود که در مقایسه با مقادیر گزارش شده توسط Karbalaie-Heidari و همکاران (۲۰۰۷a, ۲۰۱۳) بر روی ژن های پروتئازی مشابه در همین سویه و سویه های نمک دوست دیگر فعالیت کمتری را نشان داد. علت فعالیت ویژه پایین می تواند به بهینه نبودن شرایط واکنش و تاثیر فرایند تولید نوترکیب آنزیم بر روی فعالیت آن مربوط باشد و احتمال دارد با بررسی تمامی شرایط دمایی و pH و غلظت یون های فلزی در واکنش و انتخاب شرایط بهینه بتوان به فعالیت

ویژه بالاتری دست یافت. از طرف دیگر، برخی مطالعات انجام شده بر روی سرین پروتئازها (Suberu et al., 2019b) و متالوپروتئازها (Amoozegar et al., 2008) مقادیر فعالیت ویژه پایینی را مشابه آنچه در مطالعه حاضر به دست آمد برای آنزیم‌ها گزارش کردند. با این وجود، ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های مورد مطالعه مانند دما و pH بهینه و مقاومت در برابر حلال‌های آلی در شرایط مطلوبی قرار داشت. بنابراین انتظار می‌رود با ادامه بررسی‌های آزمایشگاهی بر روی ویژگی‌های پروتئاز مورد مطالعه، بتوان برخی ویژگی‌های قابل توجه و امیدبخش آن را مورد شناسایی قرار داد.

در مجموع، در مطالعه حاضر یک ژن سرین پروتئاز با وزن مولکولی تقریبی ۶۶ کیلوالتون جداسازی، کلون و بیان نوترکیب شد. نتایج به دست آمده حاکی از فعالیت پروتئازی قابل تایید آنزیم بر روی سوبسترای کارئین بود. تاثیر EDTA و PMSF در بازدارندگی فعالیت آنزیم نشان داد که پروتئاز مورد مطالعه رفتاری مشابه سرین متالوپروتئازها داشت. همچنین به منظور دستیابی به فعالیت ویژه مناسب آنزیم باید بررسی‌های بیشتری در مورد دما و pH بهینه و همچنین یون‌های فلزی مطلوب آنزیم صورت گیرد.

منابع

- Adinarayana K. and Ellaiah P. 2002.** Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5: 272–278.
- Alvarez V.M., Von Der Weid I., Seldin L. and Santos A.L.S. 2006.** Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 625–630. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02015.x
- Amoozegar M.A., Schumann P., Hajighasemi M., Fatemi A.Z. and Karbalaee-Heidari H.R. 2008.** *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov., a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1159–1163. doi: 10.1099/ijs.0.65423-0
- Amoozegar M.A., Zahra Fatemi A., Karbalaee-Heidari H.R. and Razavi M.R. 2007.** Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiological Research*, 162: 369–377. doi: 10.1016/j.micres.2006.02.007
- Ariyaei A., Farhadi A., Moradian F. and Rahimi Mianji G. 2019.** Cloning, expression and characterization of a novel alkaline serine protease gene from native Iranian *Bacillus* sp.; a producer of protease for use in livestock. *Gene*, 693: 10–15. doi: 10.1016/j.gene.2019.01.020
- Bhatt H.B. and Singh S.P. 2020.** Cloning, expression and structural elucidation of a biotechnologically potential alkaline serine protease from a newly isolated halo-alkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2020.00941
- Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason III J.A., Stevens R., Vonstein V., Wattam A.R. and Xia F. 2015.** RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5: 1–6 (8365). doi: 10.1038/srep08365
- Fathinejad F., Ghafouri H., Barzegari E., Sarikhan S., Alizadeh A. and Howard N. 2023.** Gene cloning and characterization of a novel recombinant 40-kDa

- heat shock protein from *Mesobacillus persicus* B48. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(9): 248. doi: 10.1007/s11274-023-03693-2
- Ghafoori H., Askari M. and Sarikhan S. 2016.** Purification and characterization of an extracellular haloalkaline serine protease from the moderately halophilic bacterium, *Bacillus iranensis* (X5B). *Extremophiles*, 20(2): 115–123. doi: 10.1007/s00792-015-0804-8
- Hartley B.S. 1960.** Proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 29: 45–72. doi: 10.1146/annurev.bi.29.070160.000401
- Hejdysz M., Kaczmarek S.A., Kubis M., Wisniewska Z., Peris S., Budnik S. and Rutkowski A. 2020.** The effect of protease and *Bacillus licheniformis* on nutritional value of pea, faba bean, yellow lupin and narrow-leaved lupin in broiler chicken diets. *British Poultry Science*, 61: 287–293. doi: 10.1080/00071668.2020.1716303
- Karbalaei-Heidari H.R., Shahbazi M. and Absalan G. 2013.** Characterization of a novel organic solvent tolerant protease from a moderately halophilic bacterium and its behavior in ionic liquids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170: 573–586. doi: 10.1007/s12010-013-0215-1
- Karbalaei-Heidari H.R., Ziaee A.A. and Amoozegar M.A. 2007a.** Purification and biochemical characterization of a protease secreted by the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its behavior in organic solvents. *Extremophiles*, 11: 237–243. doi: 10.1007/s00792-006-0031-4
- Karbalaei-Heidari H.R., Ziaee A.A., Schaller J. and Amoozegar M.A. 2007b.** Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 266–272. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.04.006
- Morihara K. 1974.** Comparative specificity of microbial proteinases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 41: 179–243. doi: 10.1002/9780470122860.ch5
- Naveed M., Nadeem F., Mehmood T., Bilal M., Anwar Z. and Amjad F. 2021.** Protease- a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: An updated review. *Catalysis Letters*, 151: 307–323. doi: 10.1007/s10562-020-03316-7
- Park S., Lee J.J., Yang B.M., Cho J.H., Kim S., Kang J., Oh S., Park D.J., Perez-Maldonado R., Cho J.Y., Park I.H., Kim H.B. and Song M. 2020.** Dietary protease improves growth performance, nutrient digestibility, and intestinal morphology of weaned

- pigs. *Journal of Animal Science and Technology*, 62(1): 21–30. doi: 10.5187/jast.2020.62.1.21
- Rao C.S., Sathish T., Ravichandra P. and Prakasham R.S. 2009.** Characterization of thermo-and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44: 262–268. doi: 10.1016/j.procbio.2008.10.022
- Raval V.H., Bhatt H.B. and Singh S.P. 2018.** Adaptation strategies in halophilic bacteria. P: 137–164. In: Durvasula R.V. and Subba Rao D.V. (Eds.). *Extremophiles: From Biology to Biotechnology*. CRC Press, USA.
- Raval V.H., Pillai S., Rawal C.M. and Singh S.P. 2014.** Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater halo-alkaliphilic bacteria. *Process Biochemistry*, 49: 955–962. doi: 10.1016/j.procbio.2014.03.014
- Rekik H., Frikha F., Zarai Jaouadi N., Gargouri F., Jmal N., Bejar S. and Jaouadi B. 2019.** Gene cloning, expression, molecular modeling and docking study of the protease SAPRH from *Bacillus safensis* strain RH12. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125: 876–891. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.103
- Sadeghi H.M.M., Rabbani M. and Naghitorabi M. 2010.** Cloning of alkaline protease gene from *Bacillus subtilis* 168. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 4: 43–46.
- Sepehri S., Ghafoori H. and Sarikhan S. 2023.** Cloning, expression and purification of a novel carboxypeptidase from a hypersaline lake halophilic *Bacillus persicus*. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology*, 11(1): 59–75. doi: 10.22124/japb.2022.22750.1479
- Singh R., Kumar M., Mittal A. and Mehta P.K. 2016.** Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6: 1–15. doi: 10.1007/s13205-016-0485-8
- Singh S. and Bajaj B.K. 2015.** Medium optimization for enhanced production of protease with industrially desirable attributes from *Bacillus subtilis* K-1. *Chemical Engineering Communications*, 202: 1051–1060. doi: 10.1080/00986445.2014.900052
- Sinha R. and Khare S.K. 2013.** Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. *Bioresource Technology*, 145: 357–361. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.024
- Smith E.L., DeLange R.J., Evans W.H., Landon M. and Markland F.S. 1968.** Subtilisin Carlsberg: V. The complete sequence: Comparison with subtilisin BPN[®]; Evolutionary relationship. *Journal*

- of Biological Chemistry, 243(9): 2184–2191. doi: 10.1016/S0021-9258(18)93461-7
- Solanki P., Putatunda C., Kumar A., Bhatia R. and Walia A. 2021.** Microbial proteases: Ubiquitous enzymes with innumerable uses. 3 Biotech, 11: 1–25. doi: 10.1007/s13205-021-02928-z
- Suberu Y., Akande I., Samuel T., Lawal A. and Olaniran A. 2019a.** Optimization of protease production in indigenous *Bacillus* species isolated from soil samples in Lagos, Nigeria using response surface methodology. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 18: 1–13 (101011). doi: 10.1016/j.bcab.2019.01.049
- Suberu Y., Akande I., Samuel T., Lawal A. and Olaniran A. 2019b.** Cloning, expression, purification and characterisation of serine alkaline protease from *Bacillus subtilis* RD7. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 20: 1–10 (101264). doi: 10.1016/j.bcab.2019.101264
- Tarazi S., Ghafoori H., Sarikhan S. and Sariri R. 2021.** Increasing the solubility of recombinant glutathione S-transferase from *Rutilus kutum* using chaperone-based method in *Escherichia coli*. Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology, 9: 89–108. doi: 10.22124/japb.2021.18601.1409
- Tekin A., Uzuner U. and Sezen K. 2021.** Homology modeling and heterologous expression of highly alkaline subtilisin-like serine protease from *Bacillus halodurans* C-125. Biotechnology Letters, 43: 479–494. doi: 10.1007/s10529-020-03025-6
- Yang H., Liu Y., Ning Y., Wang C., Zhang X., Weng P. and Wu Z. 2020.** Characterization of an intracellular alkaline serine protease from *Bacillus velezensis* SW5 with fibrinolytic activity. Current Microbiology, 77: 1610–1621. doi: 10.1007/s00284-020-01977-6
- Yasumitsu H. 2017.** Serine protease zymography: Low-cost, rapid, and highly sensitive RAMA casein zymography. Methods in Molecular Biology, 1626: 13–24. doi: 10.1007/978-1-4939-7111-4_2



Research Paper

Recombinant expression, partial purification and evaluation of biochemical properties of alkaline serine protease from *Salinivibrio proteolyticus* strain AF-2004^T isolated from Bakhtegan hyper saline lake

Parichehr Sirousnia¹, Ali Deljou^{2*}, Hossein Ghafouri³, Sajjad Sarikhan^{4*}

DOI: 10.22124/japb.2024.28131.1550

Received: August 2024

Accepted: October 2024

Abstract

Proteases, as one of the most widely used industrial enzymes, play a role in breaking protein molecules and converting them into peptides and amino acids. Serine proteases, which are considered as endopeptidases, are divided into four subgroups, among which alkaline serine proteases are considered the most important group from an industrial point of view. In this study, serine alkaline metalloprotease gene from *Salinivibrio proteolyticus* from Bakhtegan hyper saline lake was cloned and recombinantly expressed. The obtained results confirmed the production of a monomeric protein with a molecular weight of about 66kDa. The results of this research indicate that chaperone plasmids do not have a significant effect on the soluble expression of the studied protease, and even if used, it disrupts the protein purification process due to the presence of high amounts of chaperone proteins in the soluble phase. Enzyme activity measurement by zymography method and also with Folin-Ciocalteu reagent showed its protease activity on casein substrate. By observing the inhibitory effect of EDTA with a concentration of 1mM as an inhibitor of metalloproteases and the effect of reducing the enzyme activity in the presence of PMSF with a concentration of 1mM as an inhibitor of serine proteases, it is concluded that the investigated protease belongs to the category of serine metalloproteases. Also, the proteolytic activity of the enzyme on the casein substrate with a concentration of 0.65% was calculated as $1.65 \pm 0.08 \text{ U/mg}$ based on the spectrophotometer results and using the L-tyrosine standard curve. Finally, in order to achieve the optimal specific activity of the enzyme, the evaluation of different reaction conditions such as optimal temperature and pH and its desired metal ions should be considered.

Key words: *Endopeptidase, Zymography, Industrial Enzyme.*

1- Ph.D. Student in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

2- Associate Professor in Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

3- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

4- Scientific Member in DNA and Genomic Data Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: ali.deljou@basu.ac.ir, sarikhan@acecr.ac.ir