نشریه علوم و مهندسی جداسازی
دوره هشتم، شماره اول، سال ۱۳۹۵، صفحه ۱-۶

Journal of Separation Science and Engineering
Vol. 8, No. 1, pp. 1-6

استخراج آنزیم پروتئاز توسط سیستم‌های دوفازی آبی حاوی پلی اتیلن گلایکول و نمک‌های سیترات سدیم و پتاسیم

غلام خیاطی[۱،*]، مطهره فیروزی[۲]، میترا احمدی[۲]

۱. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

مشخصات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۲۴ خرداد ۹۴
دریافت پس از اصلاح: ۲۲ آذر ۹۴
پذیرش نهایی: ۱۸ بهمن ۹۴

کلمات کلیدی:
استخراج
پروتئاز
سیستم دوفازی آبی
پلی اتیلن گلایکول
سیترات سدیم
سیترات پتاسیم

چکیده

یکی از چالش‌های عمده در صنعت بیوتکنولوژی، تخلیص پروتئین مطلوب از مجموعه بیومولکول‌های موجود در سوسپانسیون تخمیری است. هدف از تحقیق حاضر جداسازی آنزیم پروتئاز تولیدشده توسط سویه باسیلوس لیکنی فورمیس از سوسپانسیون تخمیری با استفاده از سیستم دوفازی آبی می‌باشد. سیستم دوفازی آبی روشی ارزشمند برای جداسازی و تخلیص مخلوط بیومولکول‌ها است. در این تحقیق سیستم‌های دوفازی آبی مختلف شامل پلی اتیلن گلایکول (وزن مولکولی ۲۰۰۰ و ۸۰۰۰) در غلظت‌های ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی و نمک‌های سیترات سدیم و سیترات پتاسیم در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد برای استخراج آنزیم پروتئاز از سوسپانسیون تخمیری باسیلوس لیکنی فورمیس مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سیستم متشکل از پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی ۲۰۰۰ و نمک سیترات سدیم برای استخراج پروتئاز از سوسپانسیون تخمیری مناسب و بهترین شرایط عملیاتی شامل ۴۰ درصد وزنی به وزنی پلی اتیلن گلایکول ۲۰۰۰ و ۴۰ درصد وزنی به وزنی سیترات سدیم بود که در شرایط فوق، فاکتور تخلیص و درصد بازیابی آنزیم به ترتیب ۱۲/۷ و ۴۸/۹ به دست آمد.

* عهده‌دار مکاتبات
khayati@guilan.ac.ir

حقوق ناشر محفوظ است.

۱-مقدمه

پروتئازها یکی از سه گروه بزرگ آنزیم‌های صنعتی بوده و با حدود ۶۰ درصد از فروش جهانی آنزیم‌ها، سهم عمده بازار آنزیم‌های صنعتی را به خود اختصاص داده‌اند[۱].

از میان انواع پروتئازها، پروتئازهای قلیایی تولیدشده توسط گونه‌های جنس باسیلوس به دلیل ثبات حرارتی و پایداری تحت pHهای متفاوت از اهمیت فزاینده‌ای در صنایع شوینده برخوردارند. به علاوه اعضای این جنس قابلیت بالایی در تولید و ترشح مقادیر بسیار زیاد آنزیم دارند که ناشی از فعالیت‌های فیزیولوژیک آن‌ها است [۲].

در خصوص جداسازی و تخلیص پروتئازها از منابع گوناگون از روش‌های مختلفی استفاده شده است که در این بین سامانه‌های دوفازی آبی به علت هزینه پایین، زمان کوتاه و بازده بالا مزیت بیشتری دارند [۳] و برای جداسازی پروتئین و سایر مولکول‌های زیستی مکرراً استفاده شده اند [۴و۵].

جداسازی پروتئین‌های مطلوب به وزن مولکولی پلی اتیلن گلایکول و اجزای تشکیل‌دهنده سیستم دوفازی آبی بستگی دارد، زیرا این پارامترها از طریق تغییر میزان برهمکنش‌های آب‌گریزی که به برهمکنش بین پلی اتیلن گلایکول و نواحی آب‌گریز پروتئین‌ها مربوط می‌شود، بر تفکیک پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارند[۶]. تفکیک مولکول‌های زیستی در سیستم‌های دو فازی آبی همچنین تا حدودی متأثر از عواملی چون pH، دما، خواص سطحی، اندازه و غلظت مولکول‌های زیستی و نوع پلیمر و نمک است[۷].

تحقیقات گسترده‌ای در استفاده از سیستم‌های دوفازی آبی برای استخراج آنزیم‌های پروتئاز از منابع مختلف انجام شده است. به‌طوری‌که چایووت[1] و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که بالاترین درصد استخراج آنزیم پروتئاز از عصاره گیاه استبرق[2] در فاز غنی از پلیمر سیستم دو فازی آبی متشکل از (%w/w) ۱۲ پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی ۴۰۰۰ و (%w/w) ۱۷ نمک منیزیم سولفات به دست آمد و با افزایش وزن مولکولی و غلظت پلیمر، ضریب تفکیک فعالیت آنزیمی، فعالیت ویژه، فاکتور تخلیص و درصد استخراج آنزیم کاهش یافت. افزایش غلظت نمک نیز موجب کاهش فعالیت ویژه، فاکتور تخلیص و درصد استخراج آنزیم شد[۸].

تحقیقات سارانگی[3] و همکاران (۲۰۱۱) در جداسازی و تخلیص آنزیم پروتئاز از روده مرغ نشان داد که افزایش غلظت نمک سیترات سدیم در سیستم دو فازی آبی منجر به کاهش عملکرد درصد استخراج و فاکتور تخلیص آنزیم شد و با افزایش غلظت پلیمر، درصد استخراج و فاکتور تخلیص آنزیم کاهش یافت [۹].

عمید[4] و همکاران (۲۰۱۲) اثر پارامترهای مختلف، از جمله نوع نمک (سدیم سیترات، پتاسیم فسفات و سولفات آمونیوم)، pH و تأثیر افزودن نمک طعام را بر تخلیص آنزیم پروتئاز از عصاره میوه انبه را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که غلظت نمک پتاسیم فسفات و میزان آنزیم اولیه در خوراک بر تفکیک آنزیم پروتئاز به‌شدت تأثیرگذار بوده و افزودن نمک طعام و تعدیل pH، تفکیک پروتئاز را در فاز بالا تسهیل می‌کند [۱۰].

هدف این تحقیق تفکیک و تخلیص آنزیم پروتئاز تولید شده توسط باسیلوس لیکنی فورمیس[5] از آب گوشت تخمیری با استفاده از سیستم دوفازی آبی متشکل از پلیمر پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۲۰۰۰ و ۸۰۰۰ با انواع نمک‌های آلی سیترات سدیم و پتاسیم است. همچنین تأثیر غلظت اجزاء تشکیل‌دهنده پلیمر و نمک بر جداسازی آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که داده‌های چنین سیستم دوفازی آبی در خصوص جداسازی آنزیم پروتئاز تولیدشده از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس پیش‌تر گزارش نشده است.

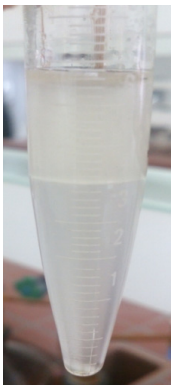
۲- مواد و روش‌ها

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده با بالاترین درجه خلوص تهیه شدند. همچنین باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

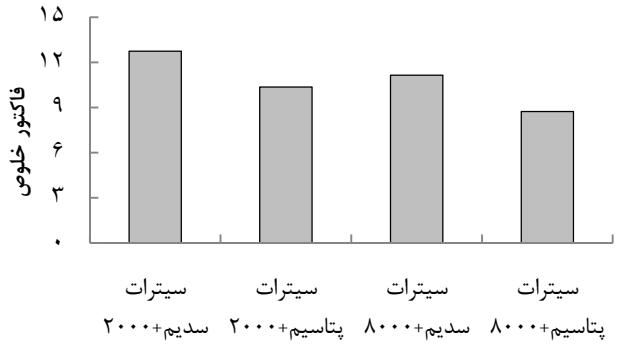
۲-۱- روش انجام آزمایش‌ها

فرایند تخمیر غوطه‌ور جهت تولید آنزیم پروتئاز در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری با محیط کشت متشکل از گلوکز g/L ۲۰، دی پتاسیم هیدروژن فسفات g/L ۷، پتاسیم دی هیدروژن فسفات g/L ۲، سولفات منیزیم g/L ۰/۲، کلرید سدیم g/L ۰/۵، سولفات آمونیوم g/L ۱، عصاره مخمر ۱۰g/L و کازئین ۱۰g/L(به عنوان القاء کننده) انجام شد. پس از استریل سازی محیط، مایه تلقیح باکتری به آن اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، جداسازی آنزیم توسط سانتریفوژ (در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه طی ۱۰ دقیقه) انجام شد.

[1] Chaiwut
[2] Calotropis procera
[3] Sarangi
[4]. Amid
[5]. *B. licheniformis*



شکل (۱) سیستم دوفازی آبی حاوی سوسپانسیون آنزیمی پس از جدایش فازها



شکل (۲) تأثیر نوع سیستم دوفازی حاوی نمک‌های سیترات سدیم و پتاسیم به همراه پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ و ۸۰۰۰ بر جداسازی آنزیم

به منظور بررسی اثر نوع و وزن مولکولی پلیمر و نمک بر جداسازی پروتئاز در آبگوشت تخمیری از سیستم دوفازی آبی، محلول نمک‌های سیترات سدیم و سیترات پتاسیم با محلول پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی ۲۰۰۰ و ۸۰۰۰ استفاده شد. سیستم دو فازی پلیمر (پلی اتیلن گلایکول)- نمک به دلیل مزایایی مانند ویسکوزیته کم (در مقایسه با سیستم‌های پلیمر-پلیمر) و هزینه ناچیز (در مقایسه با پلیمرهایی مانند پلی پروپیلن گلایکول و دکستران) استفاده شد. استفاده از پلیمرهایی که دارای گرانروی بالا می‌باشند موجب کاهش شدید فعالیت آنزیم پروتئاز در فاز غنی از پلیمر می‌شود[۶]. از آنجا که نمک‌های سیترات سدیم و سیترات پتاسیم جزء نمک‌های آلی بوده، به دلیل حفظ ماهیت پروتئینی آنزیم و جایگاه‌های فعال آنزیمی و در نتیجه حفظ میزان فعالیت آنزیمی در جداسازی آنزیم‌ها انتخاب گردیدند [۱۱].

همه سیستم‌های دو فاز آبی با وزن برابر از محلول‌های نمکی (در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ درصد وزنی) و محلول پلی اتیلن گلایکول (در غلظت‌های ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی) تهیه گردیدند. پس از افزودن مقدار مناسب از محلول آنزیم تولیدی و تکانش شدید، فازها توسط سانتریفوژ در ۷۰۰۰ دور بر دقیقه طی ۱۰ دقیقه جداسازی شدند. پس از جدایی فازها، به منظور تعیین نسبت حجمی، حجم هر فاز اندازه‌گیری شد (شکل (۱)). جهت تعیین فعالیت آنزیمی و غلظت پروتئین در نمونه‌ها، با استفاده از یک سرنگ نمونه‌برداری انجام شد.

۲-۲- روش‌های آنالیز

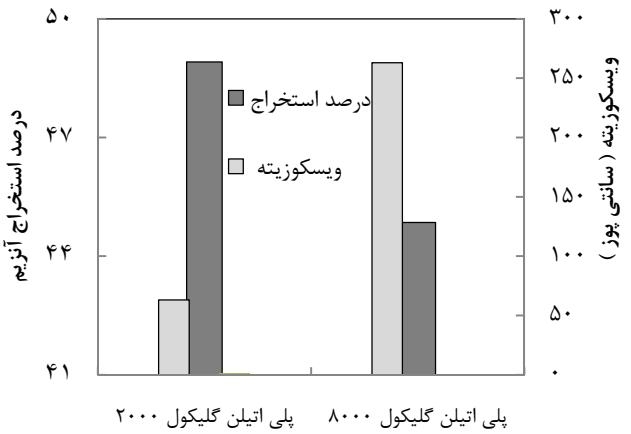
فعالیت آنزیم پروتئاز به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از سوبسترای آزوکازئین اندازه‌گیری شد [۱۲]. غلظت پروتئین‌ها به روش برادفورد[1] [۱۳] با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. همچنین ویسکوزیته محلول آبی پلیمری با ویسکومتر استوالد اندازه‌گیری شد. نتایج توسط پارامترهایی از جمله ضریب تفکیک پروتئین (K_p)، ضریب تفکیک فعالیت آنزیمی (K_e)، درصد استخراج آنزیم (Y)، فاکتور خلوص (PF) و فعالیت ویژه (SA) تعریف و تحلیل گردید [۶].

۳- نتایج و بحث

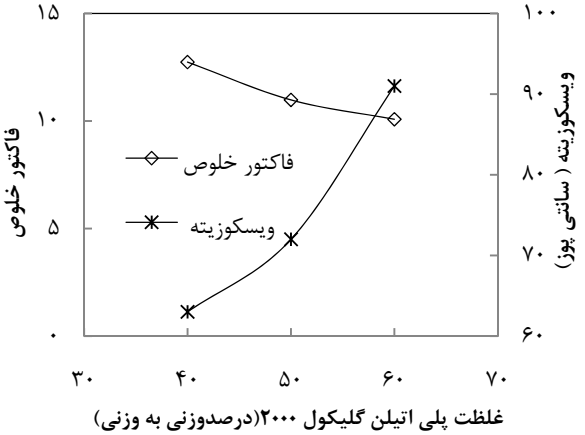
از چالش‌های مهم در جداسازی آنزیم‌ها توسط سیستم‌های دوفازی آبی، تعیین سیستم مناسب برای استخراج آنزیم است لذا چهار سیستم پلی اتیلن گلایکول ۲۰۰۰ + سیترات سدیم، پلی اتیلن گلایکول ۸۰۰۰ + سیترات سدیم، پلی اتیلن گلایکول ۲۰۰۰ + سیترات پتاسیم، پلی اتیلن گلایکول ۸۰۰۰ + سیترات پتاسیم، برای تعیین سیستم دوفازی آبی مناسب انتخاب گردید. بیشترین میزان استخراج آنزیم در سیستم دوفازی آبی حاوی پلی اتیلن گلایکول ۲۰۰۰ به همراه نمک سیترات سدیم به دست آمد (شکل ۲). همچنین نتایج نشان داد که فاکتور خلوص برای نمک سیترات سدیم در مقایسه با نمک سیترات پتاسیم، مقادیر بالاتر بود.

شکل ۳ تأثیر وزن مولکولی پلیمر بر درصد استخراج آنزیم پروتئاز در محیط حاوی نمک سیترات سدیم و تغییرات ویسکوزیته محیط غنی از پلیمر را نشان می‌دهد. این نتایج نشان داد که با افزایش وزن مولکولی پلیمر که با افزایش ویسکوزیته محیط فاز غنی از پلیمر همراه بود درصد استخراج آنزیم پروتئاز به علت ایجاد محیط ناهمگن و کاهش انتقال جرم، کاهش یافت. همچنین با توجه به افزایش رفتار آب‌گریزی پلیمر با افزایش طول زنجیره پلیمری پلی اتیلن گلایکول میزان تفکیک آنزیم در فاز پلیمری کاهش می‌یابد.

[1] Bardford



شکل (۳) تأثیر وزن مولکولی پلیمر پلی اتیلن گلایکول بر درصد استخراج آنزیم و ویسکوزیته محیط



شکل (۴) تأثیر غلظت پلیمر پلی اتیلن گلایکول ۲۰۰۰ بر فاکتور خلوص آنزیم و ویسکوزیته محیط

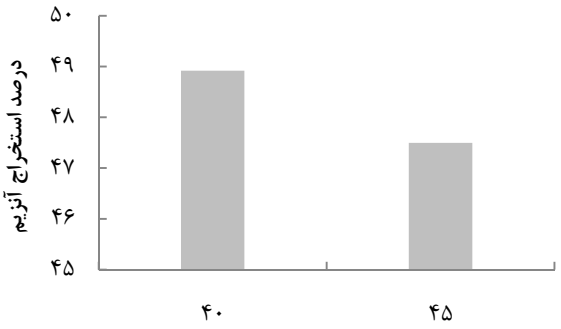
تیانوی[1] و همکاران نیز گزارش کردند که فعالیت آنزیمی با افزایش ویسکوزیته در محیط غنی از پلیمر کاهش می‌یابد [۱۱]. همچنین افزایش وزن مولکولی پلی اتیلن گلایکول موجب افزایش میزان ممانعت مولکول‌های پلیمر می‌شود، لذا حجم آزاد کاهش یافته و فضای کافی برای حضور پروتئین‌ها وجود نخواهد داشت[۱۴].

باید توجه نمود که استفاده از پلیمرهایی با وزن‌های مولکولی خیلی کم نیز توصیه نمی‌گردد، زیرا با کاهش بیش از حد وزن مولکولی پلیمر، سایر پروتئین‌ها (غیر از آنزیم) در فاز پلیمری تجمع می‌یابند، در نتیجه جداسازی و تخلیص آنزیم از سایر پروتئین‌ها دشوار خواهد شد. لازم به ذکر است که تحقیقات پیشین ما در مورد استخراج آنزیم لیپاز نیز نشان داد که با افزایش وزن مولکولی پلیمرها، فاکتور خلوص کاهش یافت [۶].

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده جهت ادامه بررسی‌های لازم، سیستم نمک سیترات سدیم و پلیمر پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی ۲۰۰۰ انتخاب گردید.

نتایج تأثیر غلظت پلیمر بر فاکتور خلوص در شکل ۴ ارائه شده است. بر اساس تئوری جداسازی، افزایش غلظت پلی‌اتیلن گلیکول منجر به افزایش ویسکوزیته و کشش سطحی بین فازهای سیستم دوفازی آبی می‌شود؛ بنابراین مقاومت برای انتقال مولکول‌های پروتئاز به فاز بالای پلیمری افزایش می‌یابد. همان‌طور که انتظار می‌رفت با افزایش غلظت پلیمر فاکتور خلوص در فاز بالا کاهش یافت.

برای بررسی اثر غلظت نمک بر میزان استخراج آنزیم پروتئـــاز



شکل (۵) تأثیر غلظت نمک سیترات سدیم بر درصد استخراج آنزیم پروتئاز

در سیستم دوفازی آبی حاوی ۴۰ درصد وزنی پلی اتیلن گلایکول ۲۰۰۰ با نمک سیترات سدیم، محلول نمکی در غلظت‌های ۴۰ و ۴۵ درصد وزنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک درصد استخراج آنزیم کاهش یافت (شکل ۵).

افزایش غلظت نمک در فاز پایین روی برهمکنش‌های آب‌گریز پروتئین‌ها و فاز پلیمری تأثیر می‌گذارد. افزایش غلظت نمک تا حدی می‌تواند موجب کاهش حجم آزاد موجود در فاز نمکی شده و باعث حرکت پروتئین‌ها به سمت فاز پلیمری شود. در غلظت‌های بالای نمک خاصیت salting out آن می‌تواند موجب ترسیب پروتئین‌ها در فصل مشترک دو فاز گردد لذا میزان جداسازی و درصد استخراج بیومولکول‌های هدف کاهش می‌یابد. از آنجا که یون‌های نمک با گروه‌های باردار با بار مخالف پروتئین‌ها برهمکنش دارند، با تشکیل

[1] Tianwei

لایه‌های دوتایی از گروه‌های یونی موجب دهیدراته شدن (حذف مولکول آب) پروتئین‌ها می‌شوند. این خاصیت آب پوشی یون‌های نمک و دهیدراته کردن پروتئین‌ها باعث گسترش نواحی آب‌گریز پروتئین‌ها می‌شود [۱۵].

۴- نتیجه‌گیری

هدف از بررسی توزیع بیومولکول در سیستم‌های دوفازی آبی دستیابی به شرایط مناسب برای افزایش بازدهی جداسازی بیومولکول‌ها خصوصاً آنزیم‌ها از محیط تخمیر است. سیستم دو فازی آبی به سیستم‌های متداول و سنتی آب- حلال آلی دارای مزیت‌های بیشتری می‌باشد. از آنجا که هر دو فاز تا حد بسیار زیادی شامل آب بوده، سیستم بسیار ملایمی برای مواد بیولوژیکی فراهم می‌نمایند. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که ترکیب فازی سیستم‌های دوفازی آبی اثر معنی‌داری بر تفکیک آنزیم پروتئاز دارند. در این تحقیق سیستم دو فازی حاوی غلظت ۴۰ درصد وزنی پلی اتیلن گلایکول با وزن مولکولی ۲۰۰۰ به همراه محلول ۴۰ درصدی نمک سیترات سدیم برای استخراج آنزیم پروتئاز حاصل از براث تخمیری باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس مناسب تشخیص داده شد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که آنزیم پروتئاز به‌شدت تمایل به تفکیک در فاز غنی از پلی اتیلن گلایکول دارد.

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر محمدعلی صالحی، خانم دکتر معصومه انوری و خانم مهندس صاحبه علیزاده، جهت استفاده از نظرات و مساعدت در ایجاد شرایط آزمایشگاهی تشکر به عمل می‌آید.

مراجع

[1] S. Asokan, and C. Jayanthi (2010) "Alkaline protease production by Bacillus licheniformis and Bacillus coagulans", *Journal of Cell and Tissue Research*, 10, 2119-2123.

[2] A. Anwar, and M. Saleemuddin (1998) "Alkaline proteases: a review", *Bioresource Technology,* 64, 175-183.

[3] H. G. Xie, Y. J. Wang, and M. Sun (2006) "Modeling of the partitioning of membrane protein and phase equilibria for Triton X-100–salt aqueous two-phase systems using a modified generalized multicomponent osmotic virial equation", *Process Biochem*, 41, 689-696.

[4] G. Khayati, M. Anvari, and N. Shahidi (2015) "Partitioning of b-galactosidase in aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and phosphate salts", *Fluid Phase Equilibria*, 385 147-152.

[5] K. L. Berna, and T. Leman, (2013) "Initial purification of catalase from Phanerochaete chrysosporium by partitioning in poly (ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems", *Separation and Purification Technology*, 105, 8-14.

[۶] غلام خیاطی، صاحبه علیزاده (۱۳۹۴) «استخراج آنزیم لیپاز تولیدی توسط قارچ Aspergillus niger از براث تخمیری با استفاده از سیستم دو فازی آبی»، نشریه علوم و مهندسی جداسازی، ۷، ۴۵-۵۳.

[7] G. Khayati (2013) "Optimization of Propionic Acid Extraction by Aqueous Two-Phase System Using Response Surface Methodology", *Chemical Engineering Communications,* 200, 667–677.

[8] P. Chaiwut, S. Rawdkuen, S. Benjakul (2010) "Extraction of protease from Calotropis procera latex by polyethylene glycol–salts biphasic system", *Process Biochemistry*, **45**, 1148–1155.

[9] B. K. Sarangi, D. P. Pattanaik, K. Rathinaraj, N. M. Sachindra, M.C. Madhusudan, and N.S. Mahendrakar (2011) "Purification of alkaline protease from chicken intestine by aqueous two phase system of polyethylene glycol and sodium citrate", *Journal of Food Science Technology*, 48, 36-44.

[10] M. Amid, M. Shuhaimi, M. Z. Islam Sarker, M. A. Manap (2012) "Purification of serine protease from mango (Mangifera Indica Cv. Chokanan) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system", *Food Chemistry* 132, 1382–1386.

[11] T. Tianwei, and H. Qing (2002) "Purification of glycyrrhizin from Glycyrrhiza uralensis Fisch with ethanol/phosphate aqueous two phase system", *Biotechnology Letters,* 24, 1417–1420.

[12] T. J. Leighton, R. H. Doi, R. A. J. Warren, and R. A. K. Kelln (1973) "The Relationship of Serine Protease Activity to RNA Polymerase Modification and Sporulation in Bacillus subtilis", *Journal* of *Molecular Biology*, 76, 103-122.

[13] M. M. Bradford (1972) "A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Analytical Biochemistry,* 72, 248.

[14] J.C. Lee, and L.L. Lee (1981) "Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols"*Journal of Biological Chemistry,* 256, 625-631.

[15] B. Ozturk (2001) "Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports" thesis of Department: Biotechnology and Bioengineering.

Partitioning of protease in PEG/sodium citrate and potassium citrate aqueous two-phase system

Gholam Khayati [1,*], Motahareh Firoozi [2], Mitra Ahmadi [2]

1. Department of Chemical Engineering, Faculty of Eng., University of Guilan, Rasht, Iran
2. Department of Chemical Engineering, Faculty of Eng., University of Payame Noor, Tehran, Iran

ABSTRACT

Purification of the desired protein from the fermentation broth containing a wide variety of biomolecules is one of the major challenges in the biotechnology industry. The aim of this work was partitioning of protease from the fermentation broth using aqueous two-phase systems (ATPS). ATPS has proved to be a valuable tool for separating and purifying mixtures of biomolecules. In this study, the various aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol (PEG 2000 and 8000) at a concentration of 40, 50, and 60% (w/w) with salts sodium citrate, potassium citrate at a concentration of 40 and 50% (w/w) were investigated for extraction of protease from fermentation broth. The results showed that the polyethylene glycol 2000/ sodium citrate system was suitable for the extraction of protease from fermentation broth of *Bacillus licheniformis* and the best operating system was contained the 40% (w/w) polyethylene glycol 2000, 40%(w/w) sodium citrate resulted in enzyme activity recovery of 48.9% and purification factor of 12.7.

All right reserved.

ARTICLE INFO

Article history:
Received in: June 14, 2015
Revised form: Dec. 13, 2015
Accepted: Feb. 7, 2016

Key words:
Partitioning,
Protease,
aqueous two-phase system,
poly ethylene glycol,
sodium citrate,
potassium citrate

* Corresponding author
khayati@guilan.ac.ir