Archive of SID

تخلیص و بازیافت آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت در سامانه های دو فازی آبی

فریبا مشایخی مزار[۱]، اسکندر امیدی نیا[۱]*، حمید شهباز محمدی[۱]، مینا ابراهیمی راد[۱]، سامان حسینخانی[۲] و آندره گریگوریان[۱]

[۱] تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه بیوشیمی

[۲] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۲۵

چکیده

آلکالین پروتئازهای مقاوم به حرارت گروهی از مهمترین آنزیمهای صنعتی هستند که به علت حفظ عملکرد و پایداری در شرایط سخت نظیر محدوده های pH قلیایی، دمای بالا و حضور دناتوره کننده های شیمیایی کاربردهای فراوانی دارند. در این راستا، جداسازی و غربالگری آنزیمهای جدید با خصوصیات مؤثر و نیز بهینه سازی روشهای تخلیص به عنوان اولین مرحله در مسیر تحقیق و توسعه این محصولات بیوکاتالیزوری محسوب می شود. در این تحقیق، تخلیص و بازیافت آنزیم آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت از سویه *Bacillus subtilis* در سامانه دو فازی آبی تشکیل شده از پلی اتیلن گلیکول و سیترات سدیم مطالعه شد. بهترین شرایط تخلیص آنزیم درسامانه متشکل از ۲۲ درصد پلی اتیلن گلیکول ۱۰۰۰۰ دالتون، ۱۸ درصد سیترات سدیم و۱۲ درصد کلرید سدیم با pH=۸ به دست آمد. پارامترهای تخلیص شامل ضریب تفکیک آنزیم، بازده، بازیافت، فاکتور تخلیص و فعالیت ویژه به ترتیب ۳۷/۸۶، ۹۷/۷۷ درصد، ۱۷۷/۵ درصد، ۲۷ و ۳۳۲۵/۷۹U/mg protein محاسبه گردید. وزن مولکولی آنزیم با استفاده از SDS-PAGE در حدود ٤١ kDa تخمین زده شد و خصوصیات کینتیکی K_m و V_{max} به ترتیب، ۲/۲۱ میلی مولار و ۰/۲٦ U/ml محاسبه شد.

واژه های کلیدی: سامانه های دو فازی آبی، تخلیص، آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت، پلی اتیلن گلیکول، سیترات سدیم

* نویسنده مسئول، تلفن تماس:٦٦٤٠٢٧٧٠-٠٢١، پست الکترونیکی:skandar@pasteur.ac.ir

مقدمه

پروتئازها (EC ٣.٤.٢١,X) از خانواده هیدرولازها و یکی از مهمترین انواع آنزیمهای صنعتی هستند که در حدود ٦٥-٦٠ درصد از فروش بازار جهانی آنزیم را به خود اختصاص می دهند و کاربردهای متنوعی در صنایع شوینده، غذایی، داروسازی، چرم، نساجی و نیز پزشکی دارند (۲، ۸ و ١٦). دراین گروه، آلکالین پروتئازهای مقاوم به حرارت که در برابر شرایط سخت نظیر محدوده های pH قلیایی، دمای بالا و حضور یونهای فلزی، سورفاکتانت ها و دناتوره کننده های شیمیایی مقاوم هستند، از اهمیت قابل توجهی در فرآیندهای صنعتی برخوردار می باشند. از این رو، نیاز به مطالعات گسترده در زمینه غربالگری منابع جدید پروتئازی با خصوصیات آنزیمی مناسب یک ضرورت محسوب می شود (۸ و۹). پروتئازهای مقاوم به حرارت توسط طیف وسیعی از موجودات زنده نظیر گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم ها شامل باکتریها، کپکها و مخمرها تولید می شوند. ولیکن، جداسازی آنها از باکتریهای باسیلوس به دلیل بازده بالای تولید و شرایط تخلیص آسانتر، متداول تر می باشد. در خصوص جداسازی و تخلیص پروتئازها از منابع گوناگون از روشهای مختلفی نظیر کروماتوگرافی و سامانه های دو

www.SID.ir

Archive of SID

فازی آبی استفاده شده است. که در این بین، سامانه های دو فازی آبی به علت هزینه پایین، زمان کوتاه و بازده بالا در مقایسه کروماتوگرافی از مزیت بالاتری برخوردار است (۱۷و۲۰). در زمینه جداسازی و تخلیص آلکالین پروتئازهای مقاوم به حرارت از منابع میکروبی مختلف نظیر *Bacillus subtilis* PE-11 (۱)، *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 (٤)، *Aspergillus clavatus* ES1 (۸) و *Bacillus* sp. JB-99 (۹) گزارشهایی ارائه شده است. در این مطالعه، جداسازی و غربالگری آنزیم آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت جدا شده از خاکهای ایران انجام شد و به منظور دستیابی به یک روش تخلیص مؤثر، رفتار تفکیک آنزیم در سامانه دو فازی آبی تشکیل شده از پلی اتیلن گلیکول و سیترات سدیم مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بهینه نمودن شرایط تخلیص، تأثیر عوامل مختلف نظیرترکیبات تشکیل دهنده فاز، وزن مولکولی پلی اتیلن گلیکول، غلظت کلرید سدیم و pH سامانه نیز در نظر گرفته شد.

مواد و روشها

سویه باکتری و مواد شیمیایی استفاده شده: میکروارگانیسم مورد استفاده در این تحقیق، سویه ترموفیل *Bacillus subtilis* بود که در گروه بیوشیمی انستیتو پاستور ایران جداسازی و غربالگری شده بود. مواد شیمیایی و محیطهای کشت میکروبیولوژیکی استفاده شده از شرکتهایMerck آلمان و Sigma-Aldrich خریداری شدند.

تهیه عصاره سلولی: باکتری *B. subtilis* در محیط تشکیل شده از گلوکز (w/w) ۰/۷۵ درصد، پپتون (w/w) ۰/۵ درصد، سولفات منیزیم (w/w) ۰/۵ درصد، فسفات پتاسیم (w/w) ۰/۵ درصد و سولفات آهن (w/w) ۰/۰۱ درصد با pH=۷ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۱٤۰ rpm به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد (۱). محیطهای رشد کرده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد و دور ۳٦۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. سپس رسوب سلولی دور ریخته شد و محلول رویی حاوی آنزیم پروتئازی جهت مراحل بعدی تخلیص مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سامانه های دوفازی آبی: سامانه های دوفازی آبی مورد استفاده در این مطالعه از پلی اتیلن گلیکول ۱۰۰۰ دالتون و سیترات سدیم تهیه شدند. هر سامانه دو فازی با حل کردن مقادیر مناسب از پلی اتیلن گلیکول و سیترات سدیم در آب دوبار تقطیر در لوله های سانتریفوژ ۱۵ میلی لیتری ساخته شد. بعد از حل کردن دو ماده پلی اتیلن گلیکول و سیترات سدیم، محلول آنزیمی به آن اضافه شده و حجم نهایی سیستم به ۱۰ میلی لیتر رسانیده شد. سپس به منظور سرعت بخشیدن به تشکیل و تفکیک دو فاز، سامانه ها به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دور rpm ۳۵۰۰ سانتریفوژ شدند. حجمهای دو فاز بالا و پایین اندازه گیری شده و جهت سنجش فعالیت آنزیمی و محاسبه غلظت پروتئین از هم جدا گردیدند (۱۵).

محاسبه پارامترهای تخلیص در سامانه های دو فازی آبی: تفکیک و تخلیص آنزیم در سامانه های دو فازی آبی توسط پارامترهای متعددی نظیر نسبت حجم فازها، ضریب تفکیک آنزیم، بازیافت، بازده، فعالیت ویژه و فاکتور تخلیص مورد ارزیابی قرار گرفت. این پارامترها به صورت زیر تعریف شدند (۱۹).

نسبت حجم فازها: نشان دهنده نسبت حجم فاز بالا بر حجم فاز پایین می باشد.

$$V_R = \frac{V_t}{V_b}$$

ضریب تفکیک آنزیم: نشان دهنده فعالیت آنزیم (U/ml) در فاز بالا (A_t) بر فعالیت آنزیم در فاز پایین (A_b) است.

$$K_E = \frac{A_t}{A_b}$$

www.SID.ir

Archive of SID

بازیافت: با نسبت فعالیت آنزیم در فاز بالا به فعالیت اولیه آنزیم قبل ازتفکیک تعریف می شود.

$$R(\%) = \frac{A_t}{A_{total}}$$

بازده:

$$Y(\%) = \frac{100 V_t K_E}{V_t K_E + V_b}$$

فعالیت ویژه: عبارت است از نسبت فعالیت آنزیم (U/ml) به غلظت پروتئین کل (mg/ml) و واحد آن U/mg protein می باشد.

$$SA = \frac{A}{C}$$

فاکتور تخلیص: با کمک نسبت فعالیت ویژه آنزیم در فاز بالا بر فعالیت ویژه آنزیم در عصاره سلولی اولیه تعریف می شود.

$$PF = \frac{SA_t}{SA_i}$$

سنجش فعالیت پروتئازی: فعالیت پروتئازی با استفاده از روش Kunitz و همکارانش مورد سنجش قرار گرفت (۱۰). مخلوط واکنش با حجم ۳ میلی لیتر شامل محلول کازئین ۵ درصد، بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار (pH=۸/۰) و محلول آنزیمی بود که پس از افزودن ۷۰۰ ماکرولیتر محلول تری کلرو استیک اسید به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبگرم انکوبه گردید. جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر و در مقابل شاهد مناسب اندازه گیری شد و محاسبات بر اساس منحنی استاندارد تیروزین انجام گرفت. واحد فعالیت پروتئازی نیز به عنوان مقداری از آنزیم که یک میکروگرم تیروزین را در هر دقیقه تولید می نماید، تعریف گردید (٤).

تعیین غلظت پروتئین: مقدار پروتئین کل موجود در فازهای بالا و پایین با استفاده از روش Lowry و ترسیم منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی محاسبه شد (۱۱).

الکتروفورز SDS-PAGE : به منظور آنالیز روند تخلیص آنزیم در سامانه های دو فازی آبی، نمونه هایی از عصاره سلولی و فاز بالا جمع آوری شدند. برای انجام SDS-PAGE از ژلی به ابعاد ۸×۸ cm شامل قسمت متراکم کننده ۵ درصد و قسمت جدا کننده ۱۲ درصد استفاده گردید. پس از آماده سازی ژل، نمونه ها همراه با بافر نمونه به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفت و پس از آماده شدن با استفاده از سرنگ هامیلتون در داخل چاهکهای ژل وارد شدند. الکتروفورز در شرایط ولتاژ ثابت ٦۰ ولت و به مدت ٤ ساعت انجام گرفت و پس از پایان الکتروفورز، ژل مورد نظر با استفاده از رنگ آمیزی کماسی بلو R-250 رنگ آمیزی شد (١٤). وزن مولکولی آنزیم در مقایسه با پروتئینهای استاندارد β-گالاکتوزیداز (١١٦ کیلو دالتون)، آلبومین سرم گاوی (٦٦/٢ کیلو دالتون)، اوالبومین (٤٥ کیلودالتون)، لاکتات دهیدروژناز (۳۵ کیلو دالتون)، REase Bsp 981 (۲۵ کیلو دالتون)، β-لاکتوآلبومین (١٨/٤ کیلو دالتون) و لیزوزیم (١٤/٤ کیلو دالتون) تخمین زده شد.

خصوصیات کینتیکی آنزیم: مطالعات کینتیک حالت پایا به منظور محاسبه پارامترهای ثابت میکائیلیس- منتن (K_m) و سرعت ماگزیمم (V_{max}) انجام شد. جهت تعیین پارامترهای کینتیکی V_{max}و K_m از نمودار معکوس دو طرفه که معادله لینویور- برک (Lineweaver-Burk) نامیده می شود، استفاده شد. برای این منظور فعالیت آنزیمی درحضور غلظتهای مختلف سوبسترا مورد سنجش قرار گرفت و نمودار به صورت عکس تغییرات غلظت سوبسترا در مقابل عکس سرعت فعالیت آنزیمی K_m/V_{max} تهیه شد که در آن خط حاصل محور $\frac{1}{V}$را در $\frac{1}{V_{max}}$ و محور $\frac{1}{[s]}$را در $-\frac{1}{K_m}$قطع می نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

اثرات ترکیبات فازهای تشکیل دهنده بر تفکیک و تخلیص آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت: تفکیک مولکولهای زیستی در سامانه های دو فازی آبی حاصل توزیع انتخابی آنها در بین فازهای تشکیل دهنده سامانه است و عوامل متعددی نظیر خصوصیات مولکول هدف، وزن مولکولی پلیمر، دما، قدرت یونی، pH، نوع نمک، هیدروفوبیسیته و غلظت اجزای فاز بر رفتار تفکیک تأثیرگذار است (۷). در این مطالعه به منظور بهینه کردن شرایط تخلیص، ابتدا ۱۲ سامانه با استفاده از غلظتهای متفاوت پلی اتیلن گلیکول ۱۰۰۰۰ دالتون و نمک سیترات سدیم طراحی شده و پارامترهایی نظیر ضریب تفکیک آنزیم، فعالیت ویژه، بازیافت، بازده و فاکتور تخلیص در آنها مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۱). درانتها، با توجه به نتایج به دست آمده که در جدول ۱ خلاصه شده اند، سامانه متشکل از ۲۲ درصد پلی اتیلن گلیکول ۱۰۰۰۰دالتون و ۱۸ درصد سیترات سدیم که دارای بالاترین مقادیر به دست آمده از پارامترهای اندازه گیری شده بود، انتخاب و در مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- مقایسه سامانه های دو فازی پلی اتیلن گلیکول و سیترات سدیم بررسی شده در تخلیص آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت.

سامانه	پلی اتیلن گلیکول (درصد)	سیترات (درصد)	ضریب تفکیک	فعالیت ویژه	بازیافت (درصد)	بازده (درصد)	فاکتور تخلیص
۱	۲۶	۱۸	۹۰/۹	۱۸۱۸	۱۱۲/۶	۹۹/۰۷	۱٤/۷۷
۲	۲۲	۱۸	۳۲/۵	۲۶۰۰	۱۶۲/۵	۹۷/۰۱	۲۱/۱۲
۳	۲۶	۱۲	۲۲/۰۹	۲۰۰۰	۱۲۵	۹۷/۰۲	۱۶/۲۵
٤	۲۲	۱۲	۲۷/۶۲	۲۰۸۷	۱۱۷/٤	۹۷/٦٤	۱۶/۹۵
۵	۲۶	۸	۲۰/۲۶	۲۰۸۷/۹	۱۰٤/۲	۹۸/۲۸	۱۶/۹۶
٦	۲۲	۸	۸/۵۷	۲۵۲۱	۱۱٤/٦	۹٦/۸۱	۲۱/۰۰
۷	۲۶	٦	۱۵/٤٤	۲۲۵۲/٦	۱۱۹/۷	۹۷/۸۸	۱۸/۲۱
۸	۲۲	٦	٦/۰٤	۲۱۲۵/۵	۱۰۸/۱	۹۷/۱۷	۱۷/۲۵
۹	۲۶	۱٤	۹۲/٦٦	۱۹۵۰/٦	۱۱۵/۷	۹۹/۲۸	۱۵/۸٤
۱۰	۲۲	۱٤	۵۰/۷۸	۱۵۲٦/۸	۸۸/۸	۹۸/۷۰	۱۲/٤۰
۱۱	۲۶	۱۰	۲۱/٤۱	۱۹٤۷/۰٦	۱۰۷	۹۷/۸٤	۱۵/۸۲
۱۲	۲۲	۱۰	۸۹/۷۲	۲۱۵۱/۵	۱٤/۲۵	۹۷/۸٤	۱۷/٤۸

اثرات وزن مولکولی پلی اتیلن گلیکول بر تفکیک و تخلیص آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت: به منظور بررسی اثر وزن مولکولی پلی اتیلن گلیکول، هشت سامانه تشکیل شده از ۲۲ درصد پلی اتیلن گلیکول و ۱۸ درصد سیترات سدیم با وزنهای مولکولی مختلف ساخته شد. در حالت کلی، افزایش وزن مولکولی پلیمر سبب افزایش انتقال پروتئین به فاز پلیمری شده و این رفتار تفکیک توسط فاکتورهای مختلفی نظیر اثر دافعه پلیمر بر پروتئین و نیروهای درگیر در واکنش پلیمر– پروتئین هدایت می شود (۱۲ و ۱۹). همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است رفتار تفکیک پروتئاز به میزان زیادی به وزن مولکولی پلی اتیلن گلیکول وابسته است. در تمام سامانه های بررسی شده، پروتئاز به فاز بالای غنی از پلیمر و مواد مزاحم به فاز پایین غنی از نمک وارد شدند. تفکیک آنزیم در محدوده وزن مولکولی ٦۰۰ تا ۱۰۰۰۰ دالتون به تدریج افزایش یافت. این افزایش می تواند با این دلیل توجیه شود

www.SID.ir

Archive of SID

که، با افزایش طول زنجیره پلی اتیلن گلیکول، گروههای اتیلن اکسید آن افزایش یافته و هیدروفوبیسیتی پلیمر زیاد می شود. در نتیجه تعداد بیشتری از آنزیمهای پروتئاز جذب فاز بالا شده و ضریب تفکیک افزایش خواهد یافت (۳ و ۱۳). بنابراین براساس نتایج به دست آمده، پلی اتیلن گلیکول ۱۰۰۰۰ دالتون به عنوان فاز پلیمری در سامانه بهینه شده انتخاب گردید.

جدول ۲- اثر وزن مولکولی پلی اتیلن گلیکول بر تفکیک و تخلیص آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت.

سامانه	وزن مولکولی پلی اتیلن گلیکول	ضریب تفکیک	فعالیت ویژه	بازیافت (درصد)	بازده (درصد)
۱	۶۰۰	۲/۹	۶۱۹/۱	۱۶/۳۱	۷۷/۹۹
۲	۱۰۰۰	۳/۲۳	۶۷۷/۵	۱۸/۵۶	۷۹/۱۱
۳	۲۰۰۰	۳/۹	۸۶۵/۸	۲۱/۴۳	۷۹/۶۳
۴	۴۰۰۰	۵/۰۴	۱۰۹۵/۸	۲۴/۵۶	۸۲/۷۴
۵	۶۰۰۰	۵/۲	۱۳۲۳	۲۵	۸۲/۸۸
۶	۸۰۰۰	۵/۶۵	۱۳۵۲/۳	۲۸/۲۵	۸۳/۹۱
۷	۱۰۰۰۰	۳۲/۵	۲۶۰۰	۱۶۲/۵	۹۷/۰۱

اثرات غلظت کلرید سدیم بر تفکیک و تخلیص آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت: جهت بهبود تفکیک آلکالین پروتئاز، تاثیر غلظتهای متفاوت کلرید سدیم نیز مورد مطالعه قرار گرفت. در حالت کلی، افزودن نمک به سامانه های دو فازی آبی، اختلاف پتانسیل الکتریکی بین فازها را افزایش داده و مولکولها را براساس بارشان به فازهای بالا یا پایین هدایت می نماید (۶و۱۹). پروتئینهای با بار منفی به فاز بالا و پروتئینهای با بار مثبت به فاز پایین رانده می شوند. همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، با افزایش غلظت کلرید سدیم تا مقدار ۱۲ درصد، پارامترهای ضریب تفکیک، فعالیت ویژه ، بازیافت و بازده افزایش یافت. رفتار مشاهده شده آنزیم در حضور غلظتهای متفاوت کلرید سدیم با نتایج گزارش شده از مطالعه Wongmongkol و Prichanont برروی تفکیک آلکالین پروتئاز در سامانه‌های دوفازی پلی اتیلن گلیکول، پتاسیم فسفات و کلرید سدیم مطابقت دارد (۱۹). در نهایت بر اساس داده‌های به دست آمده در این مرحله، غلظت ۱۲ درصد کلرید سدیم به عنوان غلظت بهینه نمک انتخاب شد.

جدول ۳- اثر کلرید سدیم بر تفکیک و تخلیص آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت.

سامانه	کلرید سدیم (درصد)	ضریب تفکیک	فعالیت ویژه	بازیافت (درصد)	بازده (درصد)
۱	۰	۳۲/۵	۲۶۰۰	۱۶۲/۵	۹۷/۰۱
۲	۳	۳۲/۷	۲۶۱۰	۱۶۵/۶۲	۹۷/۲
۳	۶	۳۳/۰۱	۲۶۱۵/۸۳	۱۶۶/۵۶	۹۷/۴۳
۴	۹	۳۴/۱۶	۳۰۶۱/۰۲	۱۶۸/۷۵	۹۷/۶
۵	۱۲	۳۷/۸۶	۳۳۲۵/۷۹	۱۷۷/۵	۹۷/۷۷

www.SID.ir

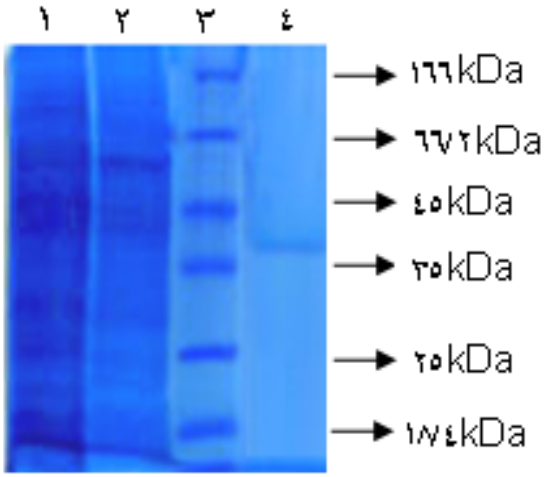
Archive of SID

اثرات pH بر تفکیک و تخلیص آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت: تاثیر pH بر تفکیک آلکالین پروتئاز در سامانه تشکیل شده از ۲۲ درصد پلی اتیلن گلیکول و ۱۸ درصد سیترات سدیم در محدوده pH ۵/۵ تا ۸ بررسی گردید. pH سامانه های دوفازی با تاثیر بر بار پروتئین هدف و ترکیبات آلوده کننده مزاحم و نیز تناسب بین یونهای مختلف بر رفتار تفکیک آنزیم مؤثر می باشد (۱۹). بر اساس نتایج به دست آمده که در جدول ٤ نشان داده شده است، با افزایش pH، پارامترهای تخلیص آنزیم افزایش یافت و بهترین رفتار تفکیک در pH= ۸ به دست آمد. مطابق با اصول کلی نحوه تغییرات pH در سامانه های دوفازی آبی، با افزایش pH، بار منفی پروتئینها افزایش یافته، تفکیک آن به فاز غنی از پلیمر افزایش خواهد یافت (۱۵).

جدول٤- اثر pH بر تفکیک و تخلیص آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت.

سامانه	pH	ضریب تفکیک	فعالیت ویژه	بازیافت (درصد)	بازده (درصد)
۱	۵/۵	۱۱	۲۰۹۸	۱٥٤	۹۰
۲	٦	۱۸	۲۱۷٦	۱٥٥	۹۲
۳	٦/٥	۲٦	۲۳٦۰	۱٥۷	۹۳
٤	۷	۲۹/۷	۲٤٥۰	۱٥۹/۸	۹٤
٥	۷/٥	۳۰/۲	۲٥۹۰	۱٦۰	۹٥
٦	۸	۳۲/٥	۲٦۰۰	۱٦۲/٥	۹۷/۰۱

این تغییر تحت تأثیر بار پروتئین بوده و در پروتئینهای دارای بار منفی نظیر پروتئاز مقاوم به حرارت که pH ایزوالکتریک آن درحدود ٦/۲ می باشد و با افزایش pH بار منفی آنها زیاد خواهد شد، افزایش بیشتری بر پارامترهای تخلیص خواهد داشت. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه اثرات pH بر تخلیص آنزیم، pH= ۸ به منظور تفکیک آلکالین پروتئاز در سامانه بررسی شده انتخاب گردید.



شکل۱- تصویرژل SDS-PAGE آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت تخلیص شده در سامانه متشکل از ۲۲ درصد پلی اتیلن گلیکول ۱۰۰۰۰ دالتون، ۱۸ درصد سیترات سدیم و۱۲ درصد کلرید سدیم. ۱و۲- عصاره سلولی ۳- پروتئینهای استاندارد ٤- فاز بالای حاوی آنزیم تخلیص شده.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری نهایی

در این مطالعه تفکیک و تخلیص آنزیم پروتئاز قلیایی مقاوم به حرارت در سامانه دوفازی پلی اتیلن گلیکول ۱۰۰۰۰ دالتون و سیترات سدیم با موفقیت انجام شد. سامانه بهینه شده شامل ۲۲ درصد پلی اتیلن گلیکول ۱۰۰۰۰، ۱۸ درصد سیترات سدیم و ۱۲ درصد کلرید سدیم در pH= ۸ بود. بهترین سامانه با ضریب تفکیک ۳۷/۸۶، فاکتور تخلیص ۲۷، بازده ۱۷۷/۵ در صد، فعالیت ویژه ۳۳۲۵/۷۹ U/mg protein و بازیافت ۹۷/۷۷ درصد در فاز غنی از پلیمر به دست آمد.

فعالیت ویژه پروتئاز تخلیص شده (U/mg protein ۳۳۲۵/۷۹) با فعالیت پروتئازهای مقاوم به حرارت به دست آمده از باکتریهای دیگر نظیر *B. subtilis* [(۱) U/ mg protein ۲۱۳/٦] و [(۲۱) U/ mg protein ۳۹]، *B. licheniformis* [(۵) U/ mg protein ۱۰۲] و *B. proteolyticus* [(٤) U/ mg protein ۲۲/۵] قابل مقایسه می باشد. تصویر SDS-PAGE آنزیم تخلیص شده (شکل ۱)، یک باند با جرم مولکولی ٤۱ کیلو دالتون را نشان داد. در باکتریهای باسیلوس مختلف، وزن مولکولی پروتئاز قلیایی معمولاً در محدوده ۱۵ تا ۳۵ کیلو دالتون متغیراست (٤). هر چند که در بعضی مطالعات وزنهای مولکولی بالاتر از ۳۰ کیلو دالتون نظیر ۳۵(۸) ، ٤۱(۱۸) و ٤٤(۲۱) کیلو دالتون نیز گزارش شده است. ویژگیهای کینتیکی آنزیم تخلیص شده نظیر K_m و V_{max} در مقابل سوبسترای کازئین به ترتیب ۲/۲۱ mM و ۰/۲٦ U/ml به دست آمد. در مجموع، با توجه به نتایج حاصل شده و همینطور سادگی فرآیند سامانه دو فازی آبی به علت هزینه پایین، کاهش تعداد مراحل استخراج، کاهش زمان و بازده بالای تخلیص، این تکنیک می تواند به عنوان یکی از روشهای مؤثر تخلیص پروتئازهای قلیایی معرفی شود.

تقدیر و تشکر: از گروه بیوشیمی و میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران به منظور کمکهایشان در انجام آزمایشات و استفاده ازتجهیزات مورد نیاز در اجرای این تحقیق تشکر و قدر دانی می شود.

منابع

1. Adinaryana K., Ellaiah P., Prasad D.S. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAP*. Pharm. Sci. Tech. 4, 56 62.
2. Banik R., Prakash M. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. Microbiol. Res. 159, 135–140.
3. Bhachandra K.V., Hitesh K.S., Sangta K., Sanjay N. 2006. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. Biochem. Eng. J. 28,161-166.
4. Bhaskar N., Sudeepa E.S., Rashmi H.N., Tamil selvi A. 2007. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. Biores. Technol. 98, 2758-2764.
5. Chouyyok W., Wongmongkol N., Siwarungson N., Prichanont S. 2005. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. Process Biochem. 40, 3514–3518.
6. Deng G., Yao S.J., Lin D.Q. 2005. Partitioning of protease using a hydrophobically modified ethylene oxide/SDS aqueous two-phase system. World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 1209-1214.
7. Dimitris P., Nikolaos E.L. 2006. Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract. J. Chromatogr. A. 1128, 114-124.
8. Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Gharsallah N. 2007. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. Process Biochem. 42, 791-797.
9. Johnvesly B., Naik G.R. 2001. Studies on production of thermostable alkalin protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. Process Biochem. 37,139–144.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Kunitz M. 1945. Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol. 30, 291-310.

11. Lowry O.H., Rosebrough N., Farr A.L., Rondall R.L. 1951. Protein measurement with the foline phenol reagent. J. Boil. Chem. 193, 265-73.

12. Pico G., Romanini D., Nerli B., Farruggia B. 2006. Polyethylene glycol molecular mass and polydispersivity effect on protein partitioning in aqueous two-phase systems. J. Chromatogr. B. 830, 286-292.

13. Qing C., Shehong L., Chiyang H., Kean L., Feng L. 2007. Extraction and determination of papaverin in pericarpium papaveris using aqueous two-phase system of polyethylene glycol-$(NH_4)_2SO_4$ coupled with high-performance liquid chromatography. Analytica. Chimica. Acta. 590, 187-194.

14. Sambrook J., Fritsch E.F., Manitis T. 1994. Molecular cloning: A laboratory Manual second ed., cold spring Harbor Laboratory press cold spring Harbor, New York, p.1847.

15. Shahbaz Mohamadi H., Omidinia E. 2007. Evaluation of recombinant phenylalanine dehydrogenase behavior in aqueous two-phase partitioning. Process Biochem. 42, 1296- 1301.

16. Singh J., Vohra R.M., Sahoo D.K. 2003. Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. Process Biochem. 39, 1093–1101.

17. Su C.K., Chiang B.H. 2006. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. Process Biochem. 41, 257-263.

18. Wang S.L., Chio Y.H., Yen H.Y., Wang C.L. 2007. Two novel surfactant-stable alkaline protease from *vibrio fluvialis* TKU005 and their applications. Enzyme Microb. Technol. 40, 1213-1220.

19. Wongmongkol N., Prichanont S. 2006. Partition of alkaline protease in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol 1000 and potassium phosphate. Korean J. Chem. Eng. 23, 71 76.

20. Xie H.G., Wang Y.J., Sun M. 2006. Modeling of the partitioning of membrane protein and phase equilibri for Triton X-100-salt aqueous two-phase systems using a modified generalized multi component osmotic viral equation. Process Biochem. 41, 689-696.

21. Yang J.K., Shih I.L., Tzeng Y.M., Wang S.L. 2000. Production and purification of protease from a *Bacilllus subtilis* that can deproteinize cruatacean wastes. Enzyme Microb. Technol. 26, 406-413.

www.SID.ir

Archive of SID

Purification and Recovery of Thermostable Alkaline Protease in Aqueous two-Phase Systems

Mashayekhi Mazar F.[1], Omidinia E.[1], Shahbaz Mohamadi H.[1], Ebrahemi-rad M.[1], Hosseinkhani S.[2], and Gregorian A.[1]

[1] **Biochemistry Dep., Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. of IRAN**

[2] **Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN**

Abstract

Thermostable alkaline proteases are a group of the most important industrial enzymes that have many applications due to function and withstand under harsh conditions such as alkaline pH ranges, high temperature and presence of chemical denaturants. In this case, isolation and screening of new enzymes with effective properties and also optimization of purification methods is the first step in researching and expanding of these biocatalyst products. In this research, purification and recovery of thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* strain in aqueous two-phase system (ATPS) containing polyethylene glycol and sodium citrate was studied. The best conditions for enzyme purification was obtained in system composed of 22% (w/w) PEG-10000, 18% (w/w) sodium citrate and 12% (w/w) NaCl at pH 8.0. The purification parameters such as partition coefficient of enzyme, yield, recovery, purification factor and specific activity values were achieved 37.86, 97.77%, 177.5%, 27 and 3325.79 U/mg protein, respectively. The molecular weight of enzyme was estimated to be 41kDa by SDS-PAGE. The kinetic properties of K_m and V_{max} were also calculated as 2.21 mM and 0.26 U/ml, respectively.

Keywords: Aqueous two-phase systems (ATPS), Purification, Thermostable Alkaline Protease, Polyethylene glycol, Sodium citrate

www.SID.ir