Archive of SID

مطالعات مقایسه‌ای مقاومت پروتئازحاصل ازسودوموناس آئروجینوزا در مقایسه با ترمولیزین حاصل از باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس در حلالهای آلی

افسانه صدرممتاز و سید محسن اصغری*

رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۸

چکیده

تحقیقات گسترده‌ای برروی پایداری پروتئازها درحلالهای آلی انجام شده است، زیرا این آنزیمها کاربردهای فراوانی درحلالهای آلی دارند. الاستاز حاصل از سودوموناس آئروجینوزا ازجمله Zn–متالوپروتئازهای مقاوم به حلالهای آلی است. اما، آنزیم همولوگ آن، ترمولیزین باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس، دارای پایداری دمایی بالاست درحالیکه پایداری بسیار کمی در حلالهای آلی دارد. این آنزیم از نظر صنعتی مهم بوده و به ویژه در سنتز پپتید کاربرد دارد. در این تحقیق الاستاز نوترکیب خالص گردید و با ترمولیزین در حضور حلالهای آلی مختلف مورد مطالعات مقایسه ای قرار گرفت. بدین منظور، فعالیت آنزیمها در غلظتهای (V/V) ۵۰-۰ درصد از حلالهای آلی اتانول، متانول، ایزوپروپانول، دی متیل فرمامید، گلیسرول و اتیلن گلیکول اندازه‌گیری شد. فعالیت الاستاز در حضور همه حلالهای آلی، به کار رفته به جز اتانول، در تمامی غلظتها نه تنها کاهش نیافته بلکه روند افزایشی را نشان داده، در حالی که فعالیت ترمولیزین در شرایط مشابه کاملاً از دست رفت. از سوی دیگر، فعالیت الاستاز در حضور DTT ۱ میلی مولاردر تمام حلالها به شدت کاهش یافت. با توجه به اینکه الاستاز دارای یک پیوند دی سولفیدی در دمین آمینوترمینال و یک پیوند دی سولفیدی در دمین کربوکسی ترمینال می‌باشد می‌توان پیشنهاد نمود که دلیل پایداری الاستاز در حلالهای آلی وجود این پیوندهای دی‌سولفیدی می‌باشد.

واژه های کلیدی: متالو پروتئاز، ترمولیزین، الاستاز، حلال آلی، فعالیت آنزیمی

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۹۱۲۲۴۳۲۰۷۰ ، پست الکترونیکی: sm_asghari@guilan.ac.ir

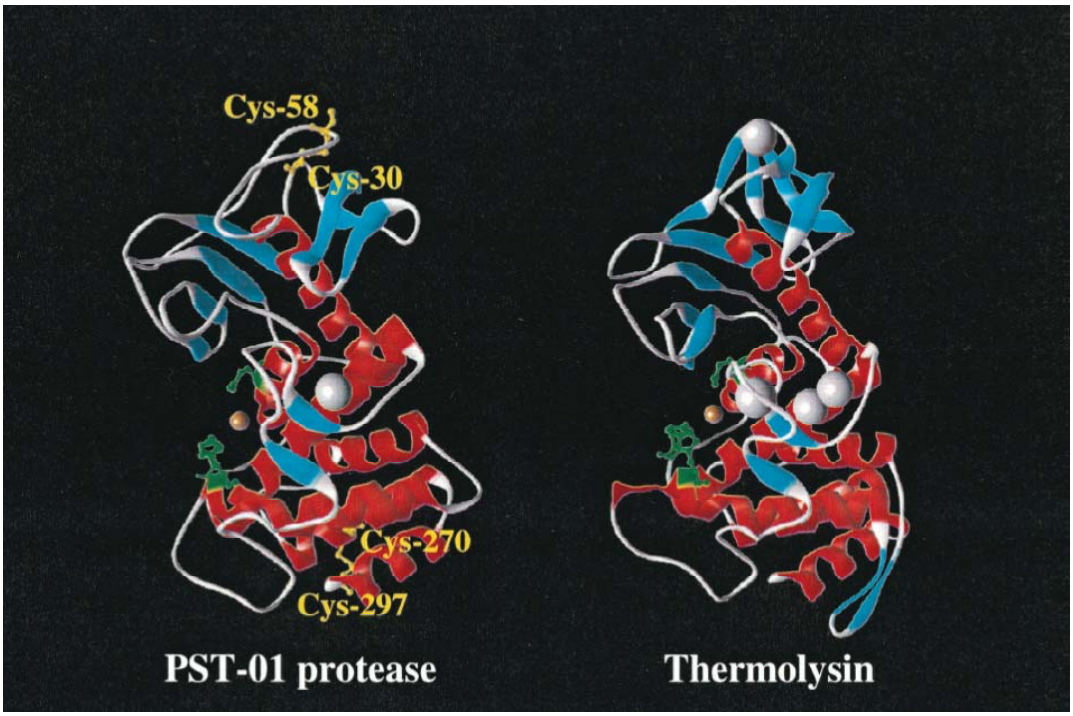
مقدمه

پروتئازها یکی از مهمترین رده از آنزیمهای هیدرولیتیک هستند که براساس فعالیت کاتالیتیک به انواعی همچون متالوپروتئازها، سرین پروتئازها و سیستئین پروتئازها و آسپارتیک پروتئازها تقسیم می‌شوند (۶). این دسته از آنزیمها پیوندهای پپتیدی را در محیط آبی هیدرولیز کرده و در محیطهای غیر آبی سنتز می‌کنند (۵، ۹، ۲۰ و ۲۱). این آنزیمها گستره‌ای از کاربردها را در فرآیندهای صنعتی مانند صنایع شوینده، غذایی کاغذ، چرم و دارویی دارند (۱۱). همچنین از آنها در سنتز پپتید، تشخیص معرفها، تعیین توالی پروتئیین و بازیافت silver از فیلمهای فتوگرافیک و x-rayاستفاده می‌شود (۲۲). پایداری حرارتی دربسیاری از پروتئازها مانند ترمولیزین به اتصال آنها به یون(های) کلسیم وابسته است. فعالیت کاتالیتیک پروتئازهای خانواده ترمولیزین (TLPs) وابسته به یون روی در جایگاه فعال می‌باشد. ترمولیزین در عدم حضور آب فعالیت کمی داشته یا غیر فعال است (۸ و ۲۶). به سبب کاربرد صنعتی، به ویژه برای سنتز پپتید در حضور برخی حلالهای آلی، فعالیت پروتئازهای خانواده ترمولیزین در حلال آلی بسیار مورد توجه محققین بوده است (۱۲ و ۱۸). از جمله پروتئازهای پایدار در محیطهای آلی، سودوموناس

www.SID.ir

Archive of SID

آئروجینوزا می‌باشد (۴ و ۱۰). در تحقیق حاضر فعالیت آنزیم الاستاز حاصل از سودوموناس آئروجینوزا (۲۴) در مقایسه با ترمولیزین[Ec 3.4.24.27] (۳) در حضور حلالهای آلی بررسی و نقش پیوند دی سولفیدی در پایداری الاستاز مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۷). از جمله دلایل انتخاب و مقایسه این دو آنزیم در کنار هم در تحقیق حاضر و همچنین مطابق مطالعات انجام شده (۱۷) نشان داده است، توالی آمینواسیدی پروتئاز الاستاز بسیار مشابه ترمولیزین است. همولوژی ساختار اول ۳۳ درصد و ساختار سه بعدی کلی پروتئاز الاستاز بسیار شبیه به ترمولیزین است (شکل۱).



شکل۱- مقایسه ساختار ۳ بعدی الاستاز حاصل از سودوموناس آئروجینوزا با ترمولیزین

مواد و روشها

مواد: آنزیم ترمولیزین از شرکت سیگما و کازئین، $CaCl_2$، تریس و سایر مواد استفاده شده از شرکت مرک آلمان خریده شد.

بیان و خالص سازی: در مطالعات قبلی ژن الاستاز حاصل از *Pseudomonas aeruginosa* سویه PTCC1430 در $pET21a^+$ کلون شد و سپس در *E.coli* بیان گردید. در این تحقیق بهینه سازی تولید انجام گردید. بنابر نتایج بهینه سازی بهترین زمان برای بیان ۱۰ ساعت، دمای بهینه جهت تولید آنزیم ۳۷ درجه سانتی گراد، غلظت بهینه IPTG برابر ۱ میلی مولار تعیین گردید. سپس با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی با ستون نیکل-سفارز تخلیص انجام شد (۱۵). در این مرحله با استفاده از بافر شستشو سایر پروتئینها از ستون عبور کرده و تنها پروتئین الاستاز به علت وجود دنباله هیستیدینی به ستون متصل می‌شود. در مرحله بعد به کمک بافر جداکننده در حضور غلظت بالای ایمیدازول جداسازی انجام شد. نمونه‌های خالص شده روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی شد. پروتئینهای خالص شده سپس دیالیز شدند.

سنجش فعالت آنزیمی: فعالیت الاستاز و ترمولیزین با روش Endpoint تعیین شد. پیش ماده استفاده شده برای واکنش، کازئین ۱ درصد (W/V) بود. از تریس ۲۰ میلی

www.SID.ir

Archive of SID

مولار با pH=۷/۵ به عنوان بافر و از تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد به عنوان متوقف کننده واکنش استفاده شد. واکنش پروتئولیز، ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از پایان واکنش، به اندازه حجم محیط سنجش (۲۵۰ میکرولیتر)، TCA اضافه شد. پس از متوقف کردن واکنش، مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر به عنوان فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد (۲۱). برای به دست آوردن واحد فعالیت آنزیمی، منحنی استاندارد غلظتهای تیروزین رسم شد. همچنین در مورد DTT، بعد ازطی زمان ۱۰ دقیقه انکوباسیون پروتئین در مجاورت DTT ۱ میلی مولار در دمای اتاق در حضور و عدم حضور حلالهای آلی قرار گرفت و سنجش فعالیت آنزیمی انجام شد.

بررسی مقاومت آنزیم در حلالهای آلی: پروتئینهای خالص الاستاز و ترمولیزین در غلظتهای (v/v ٪)۵۰-۰ از حلالهای اتانول، متانول، ایزوپروپانول، گلیسرول، اتیلن گلیکول و دی متیل فرمامید تحت شرایط ثابت غلظت آنزیم تعیین فعالیت شدند. با بررسی Log P این حلالها (۲۳) رنج متنوعی از حلالهای غیرقطبی تا قطبی را شامل می‌شوند، که رفتار آنزیم را با توجه به ساختارهای سطحی پروتئین و ویژگیهای پیوند دی سولفیدی به طور قابل ملاحظه‌ای متأثر می سازد. همچنین آنزیم ترمولیزین در محیط برخی از حلالهای آلی منتخب (اتانول،متانول، ایزوپروپانول و ...) در این تحقیق سنتز پپتید را نیز انجام می‌دهد که از جمله کاربردهای صنعتی مهم این آنزیم می باشد (۱۴). برای سنجش مقاومت آنزیم در حلال آلی، سوبسترای مورد استفاده کازئین (1% w/v) و بافر مورد استفاده تریس ۲۰ میلی مولار با pH برابر با ۸ و زمان سنجش آنزیمی ۱۰ دقیقه می‌باشد. فعالیت آنزیم به صورت درصد فعالیت باقی مانده در مقایسه با کنترل (بدون حلال آلی) گزارش گردید (۲۳).

نتایج

میزان فعالیت باقی مانده آنزیم الاستاز و ترمولیزین در حضور غلظتهای مختلف حلال آلی اتانول، متانول، ایزوپروپانول،گلیسرول، دی متیل فرمامید و اتیلن گلیکول در مورد هر دو آنزیم در مقایسه با حالت کنترل تعیین گردید (شکل ۲و۳). همانطور که در یافته‌ها مشاهده می-شود در مورد آنزیم الاستاز (شکل ۲) هیچ یک از حلالهای آلی فعالیت آنزیم را از بین نبردند و فقط اتانول و ایزوپروپانول در برخی غلظتها موجب کاهش فعالیت آنزیم شدند و در سایر موارد فعالیت افزایش یافته است. در مقابل، فعالیت آنزیم ترمولیزین در تمامی غلظتهای حلالهای آلی کاهش یافته است (شکل ۳) (۵).

همان گونه که در مقدمه ذکر شد، الاستاز دارای دو پیوند دی سولفیدی در دمین آمینو- و کربوکسی ترمینال است (۱۶) درحالیکه این پیوندها در ترمولیزین وجود ندارد. جهت بررسی نقش این پیوند در پایداری الاستاز در برابر حلالهای آلی، فعالیت الاستاز در غلظت (V/V) ۵۰ درصد و در حضور mM DTT ۱ بررسی گردید. DTT موجب احیای دی سولفید و شکسته شدن این پیوند می‌شود. بنابراین، انتظار می‌رود الاستاز در حضور آن فاقد پیوند دی‌سولفیدی باشد. نتایج این بررسی آشکار ساخت که پایداری الاستاز در حضور حلالهای آلی به شدت وابسته به پیوند دی سولفیدی می‌باشد (۱۳) (جدول ۱). در تمامی موارد، فعالیت آنزیم در حضور حلال آلی به شدت کاهش یافت و حتی در مورد ایزوپروپانول و اتانول این میزان به صفر رسید.

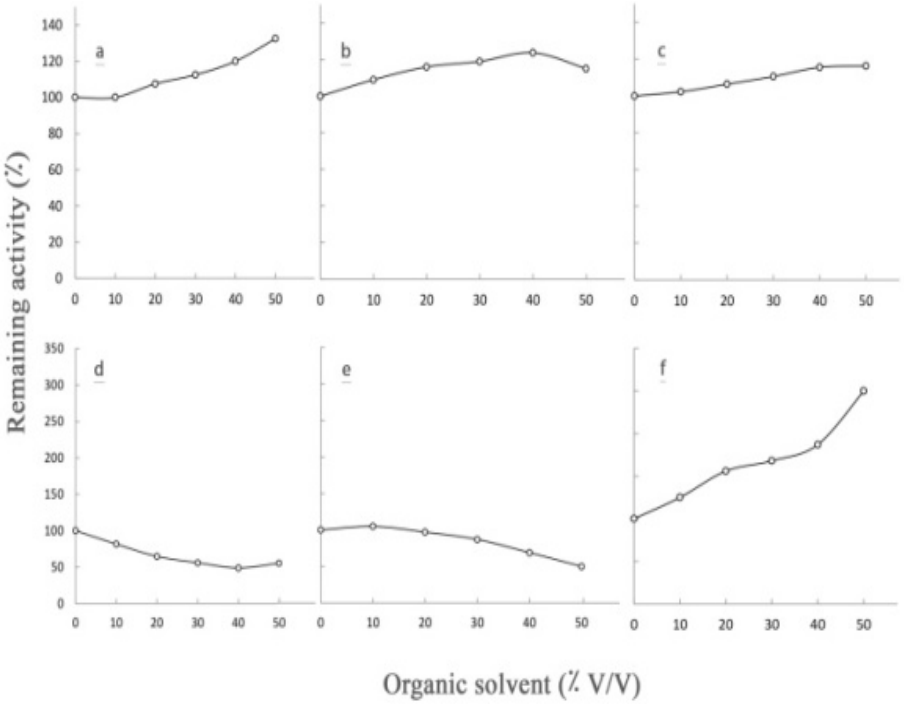
بحث

میکروارگانیسم ها مهمترین و ایده آل ترین منبع تولید کننده آنزیمهای مختلف با دامنه کاربردهای گسترده به شمار می آیند. از مزایای آنزیمهای میکروارگانیسم ها می توان به امکان کنترل فیزیولوژیکی و فیزیکو شیمیایی، تنوع آنزیمی و مقادیر بالای تولید اشاره نمود(۱). در این راستا، جداسازی و غربالگری آنزیمهای جدید با خصوصیات موثر و بهینه از میکروارگانیسمهای ساکن طبیعت به عنوان اولین

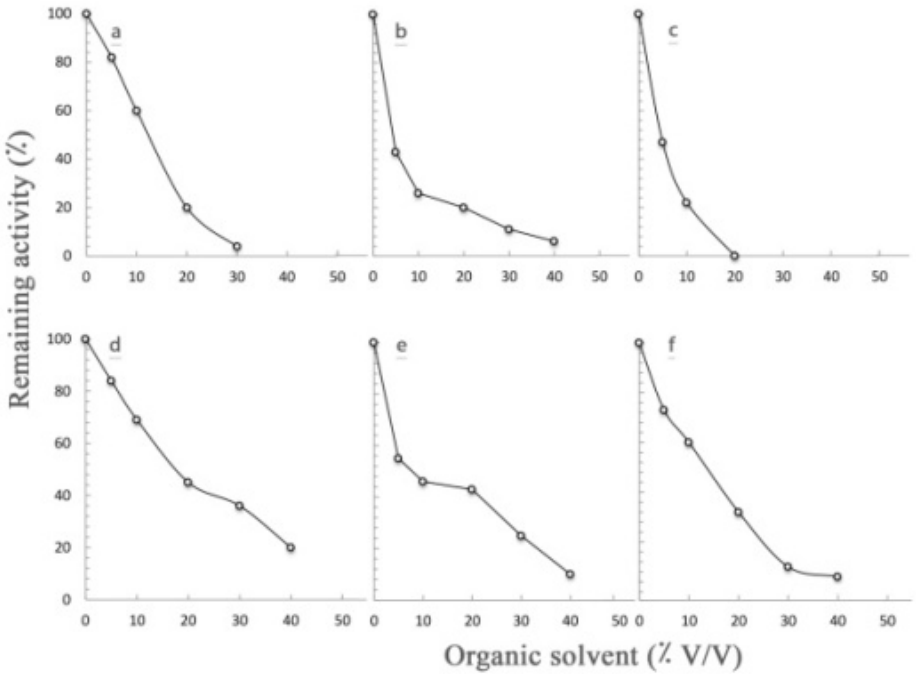
www.SID.ir

Archive of SID

مرحله در مسیر تحقیق و توسعه محصولات آنزیمی محسوب می شود (۲).



شکل۲- فعالیت باقیمانده الاستاز در حضور غلظتهای مختلف حلالهای آلی (a) دی متیل فرمامید، (b) گلیسرول، (c) اتیلن گلیکول، (d) ایزوپروپانول، (e) اتانول، (f) متانول.



شکل۳- فعالیت باقیمانده ترمولیزین در حضور غلظتهای مختلف حلالهای آلی (a) متانول، (b) اتانول، (c) ایزوپروپانول، (d) اتیلن گلیکول، (e) گلیسرول، (f) دی متیل فرمامید

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- مقایسه فعالیت باقیمانده آنزیم الاستاز در حضور1 mM DTT در حضور و عدم حضور حلالهای آلی در دمای اتاق.

نوع / درصد حلال	DMF	گلیسرول	اتیلن گلیکول	متانول	ایزوپروپانول	اتانول
٪۰ *	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
٪۵۰	۱۳۳ (۱۸)	۱۱۶ (۲۳)	۱۱۵ (۳۴)	۲۵۰ (۱۱)	۵۶ (صفر)	۵۰ (صفر)

* در عدم حضور حلاهای آلی، 1 mM DTT تاثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم نداشته است.

همان طور که اشاره شد دو پروتئین ترمولیزین حاصل از باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس و الاستاز حاصل از سودوموناس آئروجینوزا، علی رغم، همولوژی در ساختار و ترادف آمینواسیدی تفاوتهای فراوانی در پایداری نسبت به حلالهای آلی نشان می‌دهند (۱۹). بیشتر تفاوت این دو پروتئین مربوط به دمین آمینوترمینال آنها می‌باشد.

در تحقیق حاضر، در تمامی حلالهای آلی فعالیت الاستاز به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از ترمولیزین بوده است. در حلالهای دی متیل فرمامید، متانول و اتیلن گلیکول فعالیت آنزیم مقادیری بالاتر از کنترل (عدم حلال آلی) را نشان داده است این نشان می‌دهد که تغییرات ساختاری ناشی از حلال آلی حتی اثرات مطلوبی بر فعالیت این آنزیم داشته است. در مقابل، فعالیت آنزیم ترمولیزین در حضور این حلالها کاهش یافته است. این نتیجه پیشنهاد می‌کند که حلالهای آلی موجب اثرات ساختاری نامطلوب و در نتیجه کاهش فعالیت در ترمولیزین شده است.از سوی دیگر، در حلالهای آلی ایزوپروپانول و اتانول هر دو آنزیم دچار کاهش فعالیت شدند. با این حال، در این حلالها نیز آنزیم الاستاز به طور قابل ملاحظه‌ای پایدارتر از ترمولیزین بوده است. جهت بررسی دقیق اثر حلالهای آلی بر فعالیت و پایداری آنزیمها لازم است به میزان قطبیت حلالها توجه گردد. پارامتری که میزان قطبیت حلالهای آلی را به طور کمی بیان می‌دارد Log P نام دارد که عبارت است از لگاریتم بر پایه ۱۰ ثابت تفکیک (P) که به عنوان نسبت غلظت حلال آلی به غلظت فاز آبی تعریف می‌شود:

Partition coefficient (P) = [organic] / [aqueous]

هر چه میزان Log P بزرگتر باشد، میزان قطبیت حلال آلی کمتر است. براساس این تعریف Log P حلالهای مورد استفاده در تحقیق حاضر به صورت اتانول< ایزوپروپانول< اتیلن گلیکول< گلیسرول< DMF< متانول می‌باشد. به عبارت دیگر ایزوپروپانول غیرقطبی ترین و گلیسرول قطبی ترین حلال مورد استفاده نسبت به آب است. بنابراین ارتباط مستقیم و مشخصی مابین قطبیت حلال آلی و مقاومت آنزیم به حلال آلی مشاهده نمی‌گردد. این در حالی است که پاژنگ و همکاران (۲۳) بیان داشتند که در مورد آنزیم ترمولیزین هر چه Log P افزایش یابد مهار نیز بیشتر خواهد شد که در این تحقیق به این مهم نیز دست یافته شد. مطالعات انجام شده پس از شکسته شدن پیوند دی‌سولفیدی توسط DTT آشکار ساخت که پایداری قابل ملاحظه الاستاز تا حد زیادی وابسته به پیوند دی‌سولفیدی است. با در نظر گرفتن این نکته که الاستاز دارای ۲ پیوند دی سولفیدی در دمین‌های آمینو- و کربوکسی ترمینال می-باشد و این یافته که شکسته شدن این پیوندها موجب کاهش شدید پایداری الاستاز برابر حلالهای آلی شده است. مهندسی آنزیم ترمولیزین دارای پیوندهای دی سولفیدی در نواحی متناظر با الاستاز می‌تواند منجر به دستیابی به آنزیمهایی با پایداری بیشتر در جهت کاربردهای صنعتی از

www.SID.ir

Archive of SID

جمله سنتز پپتید در حلالهای آلی گردد (۱۷). با بررسی Log P حلالهای مورد استفاده در این تحقیق و از طرفی وابسته بودن مکانیسم عملکرد حلالهای آلی، به ساختار سطحی پروتئین و همچنین تغییرات ناشی از تشکیل پیوند دی سولفیدی در آرایش ساختاری آنزیم، پی به ویژگی و تأثیر هر حلال با وجود قطبیت و هیدروفوبیسیته اش بر فعالیت و پایداری آنزیم در محیط آن حلال برده شد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله کمال تشکر و قدردانی را از آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده علوم پایه و معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان ابراز می‌دارند.

منابع

۱- شهباز محمدی، ح. و امیدی نیا، ا. ۱۳۸۷. جداسازی، غربالگری و تعیین خصوصیات آنزیمی میکروارگانیسمهای تولید کننده آمینواسید دهیدروژنازها از نمونههای خاک ایران. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۱، شماره ۱، ص ۹۴-۱۰۴.

۲- مشایخی، ف.، امیدی نیا، ا.، شهباز محمدی، ح.، ابراهیمی راد، م.، حسین خانی، س. و گره گوریان، آ. ۱۳۸۹. تخلیص و بازیافت آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت در سامانه های دوفازی آبی . مجله زیست شناسی ایران.جلد۲۳،شماره۳،ص۳۶۷-۳۷۶.

3. Adekoya OA, and Sylte I. The Thermolysin family (M4) of Enzyme :Therapeutic and biothechnological potential. Chem. Biol. Drug Des. 2009;73;7-16.
4. Aono . R, Ito. M, Inoue .A, Horikoshi .K. Isolation of Novel Toluene-Tolerant Strain of Pseudomonas aeruginosa. J. Biosci. Biotech. Biochem 1992;56 (1);145-146
5. Asghari SM, Pazhang M, Ehtesham S, Karbalaei-Heidari HR, Taghdir M, Sadeghizadeh M, Naderi-Manesh H, Khajeh K. Remarkable improvements of a neutral protease activity and stability share the same structural origins. Protein Eng. Des. Sel. 2010; 23; 599-606.
6. Asoodeh.A, Mohammadian Musaabadi.H. Purification and characterization of a thermostable neutrophilic metalloprotease from Pseudomonas sp. DR89. J. Biotechnol.2012 ;2;120-128.
7. Badoei-Dalfard A, Khajeh K, Asghari SM, Ranjbar B. and Karbalaei-Heidari HR. Enhanced activity and stability in the presence of organic solvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. J Biochem. 2010;148; 231–238.
8. Cowan. D.A. and Daniel. R.M. (1982) Purification and some properties of an extracellular protease (Caldolysin) from an extreme thermophile. Biochim. Biophys. Acta. 1982;705, 293-305.
9. Doukyu N, Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. Biochem. Eng. J. 2010; 48; 270-282.
10. Geok LP, Razak CNA, Abd Rahman RNZ, Basri M, Salleh AB. Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer Biochem Eng Jl. 2003;13(1):73-7.
11. Gupta MN, Roy I. Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. Eur. J. Biochem. 2004;271; 2575–2583.
12. Holland DR, Tronrud DE, Pley HW, K. M. Flahertykm, W. Starkw, J. N.Jansoniusjn, D. B. McKay DB and B. W. Matthews. Structural comparison suggests that thermolysin and related neutral proteases undergo hinge bending motion during catalysis. Biochemistry. 1992;31;11310-11316.
13. Ko, J. H., W. H. Jang, E. K. Kim, H. B. Lee, K. D. Park, J. H. Chung, and O. J. Yoo. Enhancement of thermostability and catalytic efficiency of AprP, an alkaline protease from *Pseudomonas* sp., by the introduction of a disulfide bond. J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996; 221,631–635.
14. Kuhn, D., P. Durrschmidt, J. Mansfeld, and R. Ulbrich-Hofmann**.** Boilysin and thermolysin in dipeptide synthesis: a comparative study.Biotechnol. Appl. Biochem. 2002,36**:**71-76.
15. Leatherbarrow RJ and Fersht AR. Protein Engineering. Protein Engin. 1986;1;7-16.
16. Ogino. H, Uchiho. T, Doukyu. N, Yasuda. M, Ishimi. K and Ishikawa. H. Effect of exchange of amino acid residues of the surface region of the PST-01 protease on its organic solvent-

www.SID.ir

Archive of SID

stability. Biochem. Biophys. Res Commun. 2007;358;1028-1033.

17. Ogino. H, Uchiho. T, Yokoo. J, Kobayashi. R, Ichise. R and Ishikawa. H. Role of Intermolecular Disulfide Bonds of the Organic Solvent-Stable PST-01 Protease in Its Organic Solvent Stability. J Appl.Environ.Microbiol. 2001;67,942-947

18. Ogino H, Watanabe F, Yamada M, Nakagawa S, Hirose T, Noguchi A, Yasuda M, Haruo I. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. J.Biosci. Bioeng. 1999;87; 61-68.

19. Ogino, H., Yasui. K, Shiotani. T, Ishihara. T, and Ishikawa. T. Organic solvent-tolerant bacterium which secretes an organic solvent-stableproteolytic enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 1995;61,4258–4262.

20. Ogino, H., Yamada. M,.Watanabe. F, Ichinose. H, Yasuda. M, and Ishikawa. H. Peptide synthesis catalyzed by organic solvent-stable proteasefrom *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 in monophasic aqueous-organic solvent systems. J. Biosci. Bioeng. 1999;88,513–518. 18.

21. Ogino, H., Gemba. Y, Yamada. M, Shizuka. M, Yasuda. M, and Ishikawa. H. The rates of peptide synthesis catalyzed by organic solvent-stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 in the presence of watersoluble organic solvents. J. Biochem. Eng2000;5,219–223.

22. Patill. U, Chaudhari.A. Purification and characterization of solvent-tolerant, thermostable,alkalin methaloprotease from alkalophilic *Pseudomonas aeroginosa* MTCC 7926. J. Chemical thecnology and Biothec 2009;84;1255-1262

23. Pazhang. M, Khajeh. KH, Ranjbar. B and Hosseinkhani. S. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. J. Biotechnol. 2006;127;45-53.

24. Sheridan PP, Panasik N, Coombs JM, and Brenchley JE. Approaches for deciphering the structural basis of low temperature enzyme activity, Bioch. Biophys. Acta, 2000;1543: 417-433.

25. Yamamoto S, Fukushima J, Atsumi Y, Takeuchi H, Kawamoto S, Okuda K, Morihara K, BH Iglewski. Cloning and characteization of elastase genes from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988;152;1117-1122.

26. Zamost. BL, Brantley. QL, Elm. DD, Beck. CM. Production and characterization of a thermostable proteases produced by an asporogenous mutant of *Bacillus Stearothermophilus*. J. Ind Microbial, 1990;5;303

www.SID.ir

Archive of SID

Comparative studies on the organic solvent stability of elastase from *Pseudomonas aeruginosa* and thermolysin from *Bacillus thermoproteolyticus*

Sadremomtaz A. and Asghari S.M.

Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Guilan University, Rasht, I.R.of Iran

Abstract

Extensive research has been conducted on the stability of proteases in organic solvents, because they have numerous applications in organic media. Thermolysin from *Bacillus thermoproteolyticus* is a highly thermostable Zn-metalloprotease and is applied in industry for peptide synthesis, a reaction essentially performs in organic media. However, thermolysin has low stability at organic solvents.In contrast, its homologous enzyme, *Pseudomonas aeruginosa* elastase (PAE) is an organic solvent stable protease. In the present study, recombinant PAE was purified and compared with thermolysin in different organic solvents. For this purpose, activity of enzymes was measured in ethanol, methanol, isopropanol, dimethylformamide, glycerol and ethylenglycol (0-50 % (V/V)). Except isopropanol and ethanol, not only the elastase activity was not decreased, but also strongly increased in organic solvents. However, activity of thermolysin was abolished in all organic solvents. In the presence of DTT 1mM, the PAE activity was notably decreased in organic solvents. Considering that PAE contains two disulfide bonds at N- and C-terminal domains, it may suggest that disulfide bonds play a role in organic solvent stability of PAE.

Key words: metaloprotease, thermolysin, elastase, organic solvent, activity of enzymes

www.SID.ir