

جداسازی و تعیین خصوصیت بیوشیمیایی پروتئاز مقاوم به شوینده از باسیلوس پومیلوس سویه KHB3

ارسطو بدویی دلفارد^{1*}، پروین امیری²، زهرا کرمی³، بتول قنبری⁴، باقر سیدعلیپور⁵

1-3- استادیار بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

2- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تهران، تهران

4- مربی بخش زیست شناسی، دانشگاه پیام نور مرکز جیرفت، جیرفت

5- استادیار بخش زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

* کرمان، کد پستی 76169-133

badoei@uk.ac.ir

(دریافت مقاله: 93/12/14 پذیرش مقاله: 94/1/30)

چکیده- در این پژوهش از فلور میکروبی چشمه آب معدنی دوساری واقع در شهرستان جیرفت، یک سویه باسیلوس شناسایی شد که در محیط اختصاصی کازئین آگار واجد فعالیت پروتئازی بود. این باکتری بر اساس تست‌های میکروبی-بیوشیمیایی و توالی‌یابی ژن 16S rRNA به عنوان *B. Pumilus* (KHB3) شناخته شد. به منظور تولید آنزیم، سویه موردنظر به مدت 48 ساعت در محیط مایع اختصاصی رشد داده شد. محیط کشت پس از رسوب دهی با سولفات آمونیوم (85 درصد) و دیالیز با ستون کروماتوگرافی تبادل یونی Q-سفاروز به طور نسبی خالص‌سازی شد. ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئاز KHB3 در دماهای مختلف، pHهای مختلف، یون‌ها و شوینده‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان دادند که آنزیم حداکثر فعالیت و پایداری را در pH 8/0 نشان می‌دهد. این پروتئاز در حضور غلظت های 1/0 و 1/5 مولار NaCl حدود 100 درصد فعالیت خود را حفظ کرده است. در حضور یون‌های MnSO4 و FeSO4 به ترتیب 33 و 10 درصد افزایش فعالیت نسبت به عدم حضور یون را نشان می‌دهد. این پروتئاز حداقل 45 درصد فعالیت و پایداری خود را در حضور شوینده‌های تجاری حفظ کرده است. علاوه بر این، در حضور شوینده بانو حدود 12 درصد افزایش در فعالیت پروتئازی نشان می‌دهد. فعالیت و پایداری در pHهای قلیایی، حلال‌های آلی و شوینده‌ها پتانسیل قابل توجه این آنزیم را برای استفاده در صنایع مختلف از جمله صنعت شوینده نشان می‌دهد.

کلیدواژگان: پروتئاز، فعالیت، پایداری، حلال‌های آلی، شوینده‌ها.

1- مقدمه

پروتئازها از جمله پرمصرف ترین آنزیم‌های صنعتی هستند که کاربردهای گسترده‌ای را در بیوتکنولوژی دارند. پروتئازها به طور وسیع در آب، خاک و در شرایط دشوار زیست محیطی از جمله شرایط بسیار قلیایی یافت می‌شوند [1،2]. پروتئازها برای کاربرد مؤثر در صنعت نیاز به پایداری و فعالیت در شرایط سخت مانند دمای بالا، pH بالا و در حضور حلال‌های آلی، سورفاکتانت‌ها و عوامل اکسید کننده دارند [3،4]. پروتئازهای قلیایی یک گروه بزرگ از آنزیم‌های صنعتی تولید شده بوسیله طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها شامل حیوانات، قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌باشند. در حال حاضر تعداد زیادی از پروتئازهای قلیایی تجاری از گونه باسیلوس به دلیل توانایی آن در ترشح مقدار زیاد پروتئاز قلیایی، داشتن فعالیت پروتئولیتیک قابل توجه و پایداری در pH و درجه حرارت بالا به دست آمده است [5،6]. استفاده از آنزیم‌های خام در کاربردهای صنعتی بیش از آنزیم‌های تخلیص شده ترجیح داده می‌شود. این برای جلوگیری از هزینه تخلیص و ایجاد فرایندهای تجاری مقرون به صرفه می‌باشد. پروتئاز خام به طور گسترده در کاربردهای مختلف بیوتکنولوژی مانند پوشش‌های ضد رسوب، تهیه سس ماهی، صنایع غذایی، دباغی و مواد تشکیل‌دهنده شوینده به کار می‌رود [7،8]. در این مطالعه، یک باکتری مولد پروتئاز از چشمه آب معدنی دوساری واقع در شهرستان جیرفت، جداسازی و شناسایی شده است. خصوصیات بیوشیمیایی آن مانند فعالیت و پایداری در حضور pH، دما، حلال‌های آلی و شوینده‌های تجاری مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

2- مواد و روش‌ها

تریس، تریپتون، عصاره مخمر و کازئین از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردید. مواد مورد نیاز برای PCR dNTP

(10x PCR buffer), (10 mM), (20 mM) MgCl₂ و آنزیم Taq DNA Polymerase از شرکت سینازن و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. همین طور پرایمرهای مورد نیاز توسط شرکت بیونیر (کره جنوبی) سنتز گردید. حلال‌های آلی مورد نیاز از شرکت مرک خریداری شدند.

1-2- جداسازی و غربالگری باکتری مولد پروتئاز

نمونه برداری از چشمه آب معدنی دوساری (E 30/99 28° 28' 0" N 51° 57') واقع در شهرستان جیرفت صورت گرفت و میزان هاله پروتئازی در پلیت‌های حاوی کازئین شیر-آگار به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت کازئین شیر آگار شامل (gr): 0/16 کازئین، 0/33 میلک آگار و 0/25 آگار می‌باشد [9،10].

2-2- شناسایی سویه

برخی از تست‌های بیوشیمیایی از جمله رنگ آمیزی گرم، مورفولوژی، آزمون اکسیداز، کاتالاز و حرکت انجام شد. برای شناسایی گونه مورد نظر از روش مولکولی 16S rRNA استفاده شد. ابتدا باکتری روی محیط نوترینت آگار به صورت چمنی کشت داده شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. باکتری‌های رشد یافته به کمک لوپ از سطح محیط کشت جمع آوری و سوسپانسیونی از آن در آب مقطر استریل تهیه شد. با سانتریفیوژ سوسپانسیون حاصل در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه و در دور 10000g رسوبی از باکتری حاصل شد. جداسازی DNA ژنومی با استفاده از روش فنل/کلروفرم صورت گرفت [11]. به منظور تخمین کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده، جذب محلول رقیق شده DNA (با رقت 100) در طول موج 280 نانومتر اندازه‌گیری شد. پرایمرها مطابق با پرایمرهای عمومی جهت تکثیر ژن 16S rRNA به

شده و در حداقل بافر حل شده و با کمک تکنیک دیالیز نمک از محلول پروتئینی جدا گردید. تخلیص نسبی بوسیله ستون کروماتوگرافی تعویض یونی Q- سفاروز انجام شد. ابتدا ستون با بافر تریس 40 میلی مولار و 7/5 pH به تعادل رسید. محتوی کیسه دیالیز که شامل آنزیم پروتئاز بود، از روی ستون عبور داده شد. پس از شستشوی ستون با بافر تریس 7/5 pH، نمونه‌های متصل شده به ستون با ایجاد شیب نمکی NaCl (صفر تا 0/5 مولار) جداسازی شده و فعالیت آنزیمی آنها اندازه‌گیری شد [11,7].

4-2- تعیین خصوصیات بیوشیمیایی پروتئاز

4-2-1- بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در دماهای مختلف
فعالیت پروتئازی در دماهای مختلف (90-30 درجه سانتی‌گراد) بررسی شد. مخلوط واکنش استاندارد شامل 250 میکرولیتر بافر، 130 میکرولیتر سوبسترا (محلول کازئین 1/5 درصد) و 20 میکرولیتر آنزیم می‌باشد. میکروتیوپ‌ها به مدت 20 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس 400 میکرولیتر محلول 10 درصد TCA (تری‌کلرو کربوکسیلیک اسید) افزوده شد تا آنزیم متوقف شود. سپس رسوب حاصله با سانتریفیوژ با دور 12000 g جدا شد و جذب محلول رویی در طول موج 280 نانومتر توسط دستگاه اسپکترومتر اندازه‌گیری شد. در تمامی واکنش‌ها از محلول شاهی استفاده شد که آنزیم در پایان واکنش و پس از افزودن TCA به مخلوط واکنش افزوده شده بود. یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که در مدت زمان یک دقیقه یک میکرومول تیروزین را تحت شرایط واکنش تولید کند. منحنی فعالیت آنزیم بر حسب دماهای مختلف رسم شد. پایداری دمایی آنزیم پروتئاز با انکوباسیون آنزیم در طیف دمایی مختلف 90-30 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام شد و فعالیت باقی مانده آنزیم طبق روش استاندارد اندازه‌گیری شد [13,12]. تمامی آزمایش‌ها مربوط به فعالیت و

صورت زیر طراحی شدند [11]. پرایمر Forward: 5-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3 با $T_m=53/7^\circ\text{C}$ پرایمر Reverse: 5-GGC TAC CTT GTT ACG ACT با $T_m=53/4^\circ\text{C}$ واکنش PCR مطابق برنامه ذیل انجام گرفت: (1) دمای اولیه 94 درجه سلسیوس به مدت 5 دقیقه. (2) 30 سیکل که هر کدام شامل: 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه و 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 90 ثانیه. (3) برای تکثیر نهایی 72 درجه سلسیوس به مدت 8 دقیقه. محصول PCR پس از الکتروفورز ژل آگارز 1% با استفاده از کیت استخراج DNA خالص سازی شد. سپس توالی DNA با استفاده از توالی یاب DNA توسط بیونیر (کره جنوبی) تعیین گردید.

3-2- تولید و خالص‌سازی نسبی پروتئاز

برای تولید آنزیم، ابتدا کلونی موردنظر به محیط پیش-کشت انتقال داده شد که شامل 0/65 گرم پودر نوترینت براث در 25 میلی‌لیتر آب مقطر در ارلن 100 میلی‌لیتری می‌باشد و pH آن روی 7/5 تنظیم شده بود. انکوباسیون به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و دور 160 صورت گرفت. پس از رشد باکتری‌ها، محیط پیش کشت به محیط تولید تلقیح شد که شامل (g/l): 0/625 گلوکز، 0/625 سیتریک اسید، 1/25 عصاره مخمر، 1/25 K_2HPO_4 ، 0/0125 MgSO_4 ، 0/0125 CaCl_2 و 0/125 NaCl بود و به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و با دور 160 انکوبه گردید. محیط کشت حاوی باکتری‌های تکثیر یافته به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در دور 10000g سانتریفیوژ شده و محلول رویی حاوی آنزیم از رسوب که حاوی باکتری‌ها بود، جدا گردید (6). با استفاده از پدیده رسوب دهی با نمک، پروتئین‌های موجود در محیط کشت با استفاده از نمک سولفات آمونیوم (85 درصد) رسوب داده شدند و با استفاده از سانتریفیوژ پروتئین‌های حاصل جمع آوری

پایداری آنزیمی با سه بار تکرار انجام شده است.

مدت 20 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد. پارامترهای سینتیکی با رسم منحنی لینیویر-برک تعیین شد [18,11].

2-4-2- بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در pHهای مختلف

فعالیت پروتئازی در pHهای مختلف با استفاده از یک بافر مخلوط انجام شد که شامل ترکیبات زیر با غلظت 100 میلی‌مولار از Glycine (2, 3, 11, 12), Acetate-Na (4, 5), Phosphate (6, 7), Tris-base (8, 10) می‌باشد. فعالیت آنزیمی نمونه‌ها با استفاده از سوبسترای کازئین 1/5 درصد و در شرایط استاندارد انجام شد و منحنی فعالیت آنزیمی بر حسب pH رسم گردید. پایداری pH پروتئاز با انکوباسیون آنزیم در بافر مخلوط با pHهای مختلف در محدوده‌ی 3-12 به مدت یک ساعت در دمای اتاق انجام شد و سپس میزان فعالیت باقی‌مانده پروتئازی بر اساس شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد [15,14].

2-4-3- اثر یون‌های فلزی و ترکیبات بر فعالیت و پایداری پروتئاز

تأثیر یون‌های ZnSO₄, CuSO₄, FeSO₄, MnSO₄, MgSO₄, CaCl₂, CoCl₂, HgCl₂, KCl, NaCl و ترکیبات EDTA, H₂O₂, T.X100, SDS و مرکاپتو اتانول روی پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت. این ترکیبات در غلظت 5 میلی‌مولار در بافر تریس با pH 7/5 تهیه شدند. فعالیت آنزیم در محلول واکنش فاقد این یون‌ها 100 درصد در نظر گرفته شد. برای بررسی اثر یون‌های فلزی روی پایداری پروتئاز، آنزیم به مدت یک ساعت در حضور یون‌ها و ترکیبات مختلف در غلظت 5 میلی‌مولار در دمای اتاق انکوبه و در نهایت فعالیت باقی‌مانده آنزیم مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت پروتئازی در محلول فاقد یون‌های فلزی و ترکیبات به عنوان 100 درصد در نظر گرفته شد [17,16].

2-4-4- تعیین پارامترهای سینتیکی

تأثیر غلظت‌های مختلف کازئین (صفر تا 2 میلی‌مولار) به

5-4-2- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت پروتئازی
تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید (0، 1/0.0/5، 1/5، 2، 2/5، 3/0، 3/5، 4/0، 4/5، 5/0 مولار) روی فعالیت پروتئازی در شرایط استاندارد بررسی شد [20,19].

2-4-6- بررسی فعالیت و پایداری آنزیمی در حضور حلال‌های آلی

غلظت 40 درصد از حلال‌های آلی مختلف (متانول، 1- بوتانول، ایزوپروپانول، تولوئن، کلروفرم، دی‌اتیل اتر، DMSO و سیکلوهگزان) در بافر فسفات 100 میلی‌مولار با pH 7/5 تهیه شد. فعالیت پروتئازی با استفاده از سوبسترای کازئین 1/5 درصد و در حضور حلال‌های آلی مختلف اندازه‌گیری شد. غلظت حلال آلی در زمان سنجش فعالیت پروتئازی 40 درصد (v/v) می‌باشد. به منظور اندازه‌گیری پایداری در حضور حلال‌های آلی 40 درصد، میکروتیوپ‌های حاوی آنزیم با بافر حاوی حلال‌های آلی مختلف (متانول، 1-بوتانول، ایزوپروپانول، تولوئن، کلروفرم، دی‌اتیل اتر، DMSO و سیکلوهگزان) به مقدار مساوی در دمای اتاق به مدت یک ساعت انکوبه شدند. سپس میزان فعالیت باقی‌مانده پروتئازی در شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد. در این شرایط غلظت حلال آلی در زمان سنجش فعالیت پروتئازی کمتر از 5 درصد (v/v) است [23-21].

2-4-7- اثر شوینده‌ها روی فعالیت و پایداری آنزیم

غلظت 1 درصد شوینده‌های (دریا، شوما، برف، بانو، دی اکسیژنه، کف و تاژ) در بافر فسفات 50 میلی‌مولار با pH 7/5 تهیه شد. فعالیت پروتئازی در حضور این شوینده‌های تجاری بدون آنزیم در شرایط استاندارد

ژن 16S rRNA این سویه متعلق به گونه *Bacillus pumilus* در بانک ژنی به ثبت رسیده است. نتایج حاصل از تطبیق توالی و رسم درخت فیلوژنی نیز تأیید کننده این مطلب می باشد. درخت فیلوژنی سویه مورد نظر در شکل 2 آمده است.

3-3- خالص سازی نسبی پروتئاز

محلول پروتئینی دیالیز شده روی ستون Q-سفاروز به تعادل رسیده با بافر تریس 40 میلی مولار و pH 7/5 بارگذاری شد. سپس ستون با این بافر شستشو داده شد و با افزایش غلظت نمک (NaCl) از 0 تا 0/5 مولار پروتئین ها جداسازی شدند. کروماتوگرام حاصل از خوانش جذب نمونه ها در طول موج 280 نانومتر و طیف فعالیت آنزیمی در شکل 3 نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که پروتئاز مورد مطالعه در غلظت نمکی 10 درصد از ستون خارج می شود.

4-3- تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم پروتئاز

3-4-1- بررسی فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف

فعالیت آنزیمی در گستره دمایی 30-90 درجه سلسیوس طبق روش استاندارد تعیین شد. آنزیم KHB3 بیشترین فعالیت را در دمای 40 درجه سلسیوس نشان داد و از دمای 40 تا 90 درجه سلسیوس کم فعالیت پروتئازی کاهش یافت. این آنزیم در دماهای 30 و 60 درجه سلسیوس به ترتیب 67 و 53 درصد فعالیت خود را حفظ کرده است (شکل 4).

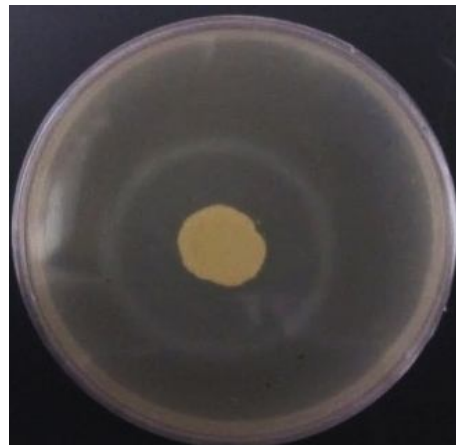
پروتئاز جدا شده از *Bacillus Pumilus* با فعالیت بهینه در دمای 45 درجه سلسیوس گزارش شده است [19، 10]. جو و همکارانش در سال 2005 یک پروتئاز قلبیایی از *Bacillus clausii* l-52 با دمای بهینه حدود 45-50 درجه سانتی گراد را گزارش نموده اند [16]. پروتئاز جدا شده از *B. Pumilus* D-6 فعالیت بهینه خود را در 50 درجه سانتی گراد نشان داده است [14].

سنجش شد. غلظت شوینده ها در زمان سنجش فعالیت پروتئازی 0/5 درصد (v/v) می باشد. به منظور اندازه گیری پایداری، میکروتیوپ های حاوی آنزیم و بافر حاوی شوینده با مقدار مساوی در دمای اتاق به مدت یک ساعت قرار داده شدند، سپس میزان فعالیت باقی مانده پروتئازی بر اساس شرایط استاندارد اندازه گیری شد [24-26].

3- نتایج و بحث

3-1-3- غربالگری باکتری های مولد پروتئاز

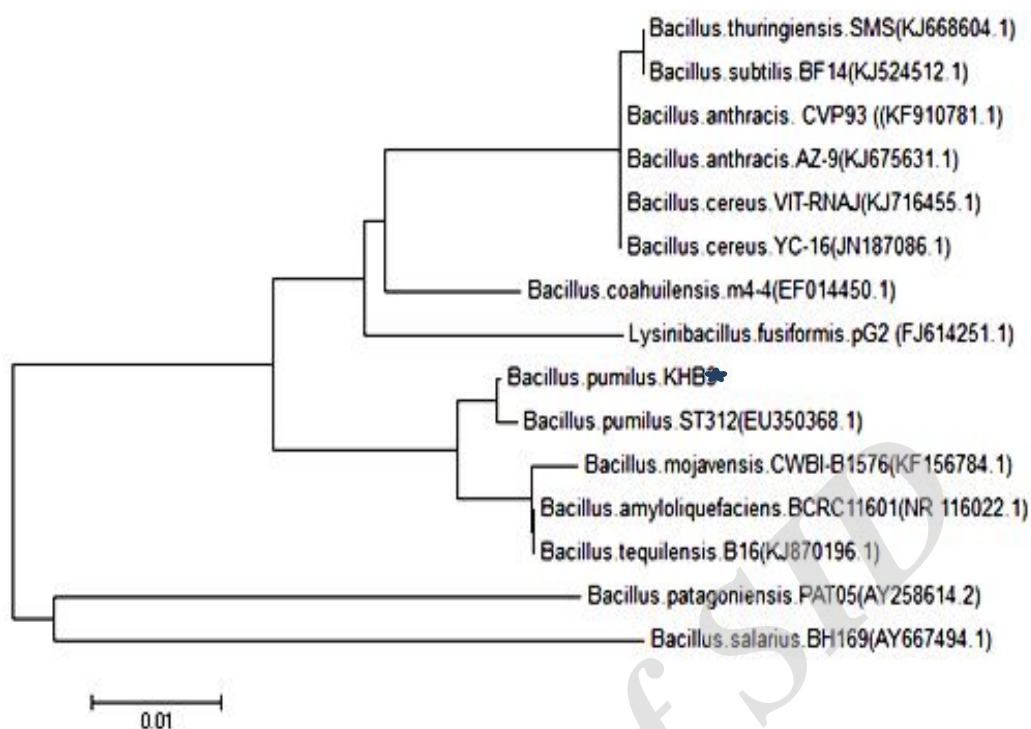
100 میکرولیتر از نمونه در محیط کشت جامد اختصاصی کازئین آگار کشت داده شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس انکوبه شد. کلونی که بیشترین هاله شفاف را ایجاد کرده بود جداسازی و به عنوان سویه برتر انتخاب شد (شکل 1).



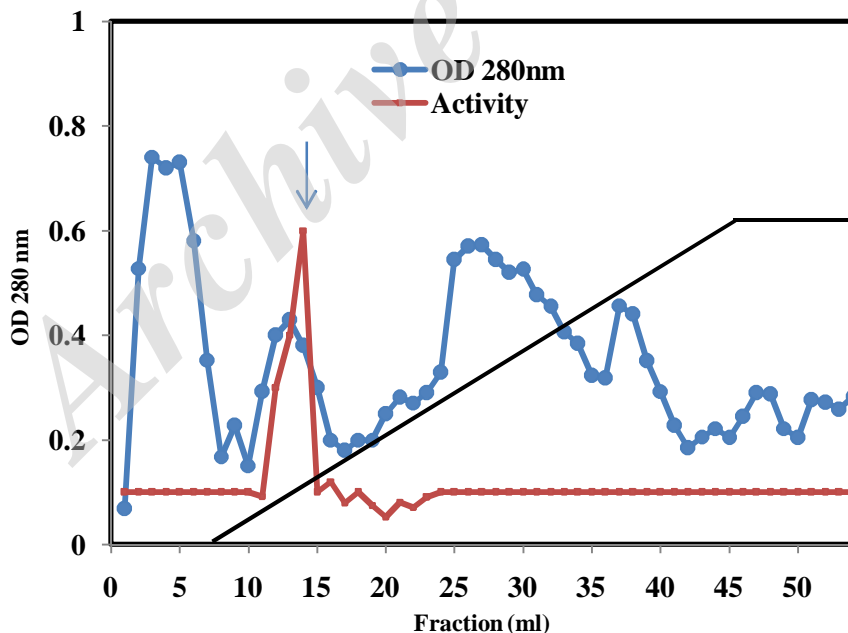
شکل 1 ایجاد هاله شفاف توسط باکتری KHB3 در محیط کازئین آگار

3-2-3- شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی

نتایج تست های بیوشیمیایی نشان داد که سویه باکتری مورد نظر یک باکتری گرم مثبت، میله ای، دارای آنزیم کاتالاز، بی حرکت و فاقد تاژک، فاقد آنزیم اکسیداز و سولفات آهن بود. بر اساس اطلاعات مربوط به توالی یابی



شکل 2 درخت فیلوژنی سویه باکتریایی باسیلوئیس پومیلوس KHB3 با استفاده از نرم افزار Mega 4



شکل 3 کروماتوگرام پروتئاز KHB3. جایگاه فرکشن فعال در شکل نشان داده شده است.

سویسترا اضافه شد و بعد از اینکه به مدت 20 دقیقه در دمای 37 درجه سلسیوس انکوبه شدند، فعالیت باقی مانده آنها مورد مقایسه قرار گرفت. آنزیم KHB3 پایداری

به منظور بررسی پایداری دمایی آنزیمی، عصاره‌های آنزیمی به طور مجزا یک ساعت در دمای‌های مختلف انکوبه شدند. سپس طبق روش استاندارد به آنها بافر و

نتایج فوق مؤید این است که بالاترین میزان فعالیت آنزیمی در pH 8 حاصل می‌شود. فعال بودن آنزیم در این محدوده، نشان از خاصیت قلیایی آن دارد که این موضوع از لحاظ بیوتکنولوژی قابل توجه می‌باشد. این ویژگی مهم برای استفاده از پروتئاز قلیایی به عنوان افزودنی مواد شوینده مهم می‌باشد زیرا مواد شوینده رختشویی به طور کلی در محدوده‌ی pH 9-12 فعالیت دارند [5]. در این رابطه گزارش‌های متعددی برای پروتئازها ذکر شده است. گوربل و همکاران در سال 2003 پروتئاز مقاوم به حلالی را از *Bacillus cereus* BG1 گزارش نمودند که pH بهینه آن بین 8-9 گزارش شد، در حالی که در pHهای بالاتر از 10 فعالیت خود را به طور کامل از دست داده است [13]. بسیاری از پروتئازهای جدا شده از باسیلوس‌ها در pHهای قلیایی فعالیت می‌کنند و برای اهداف صنعتی مناسب می‌باشند. به طور مشابه، پروتئازی از *B. Licheniformis* BBRC 100053 با فعالیت بهینه در pH 8-10 گزارش نمودند [23].

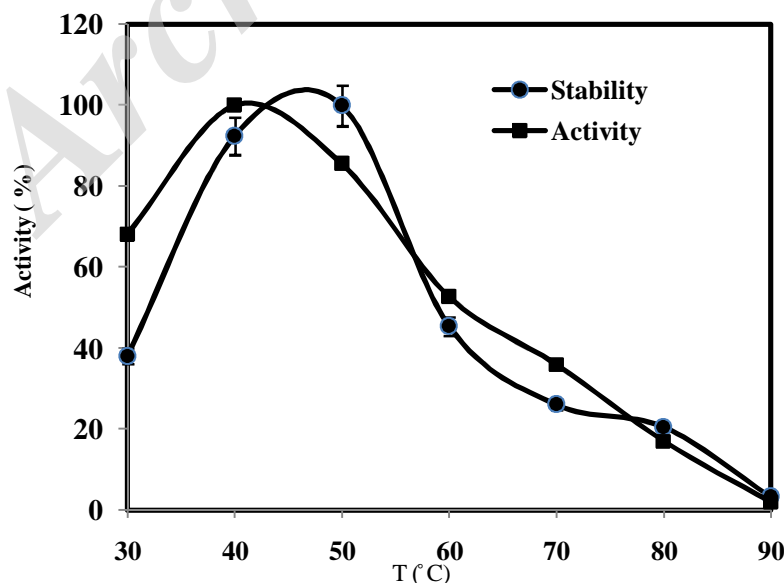
پایداری این آنزیم نیز پس از انکوبه کردن به مدت یک ساعت در pHهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

بالایی در دمای 50 درجه سلسیوس نشان داد ولی از دمای 50 تا 90 درجه سلسیوس پایداری کاهش یافت. این آنزیم در دمای 30 و 60 درجه سلسیوس به ترتیب 45 درصد فعالیت خود را حفظ کرد (شکل 4).

نتیجه مشابهی توسط پروتئاز جدا شده از *B. Pumilus* D- کبا پایداری بهینه در دمای 40 درجه سانتی‌گراد نیز گزارش شده است [14]. یک پروتئاز تخلیص شده از *Bacillus brevis* با پایداری بهینه در دمای 55 درجه سانتی‌گراد نیز گزارش شده است [3]. پایداری بهینه پروتئاز *Bacilluse* Sp. APR-4 در 50 درجه سانتی‌گراد نیز گزارش شده است [9].

3-4-2- اثر pH روی فعالیت پروتئاز

بررسی اثر pH روی فعالیت آنزیم پروتئاز در pHهای مختلف (3-12) با استفاده از یک بافر مخلوط در دمای 37 درجه به مدت 20 دقیقه انجام شد. فعالیت آنزیم با KHB3 با افزایش pH از 2 تا 8 روند افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته و سپس فعالیت آن کاهش یافته و pH بهینه‌ی آن 8 می‌باشد. این آنزیم حدود 50 درصد از فعالیت اولیه خود را در 10 pH حفظ کرده است (شکل 5).



شکل 4 میزان فعالیت و پایداری پروتئاز KHB3 در دماهای مختلف

تأمیل مطلوب این آنزیم به سوبسترا و سرعت بالای کاتالیز آن دارد.

4-4-3- اثر یون‌های فلزی و ترکیبات مختلف بر

فعالیت و پایداری پروتئاز

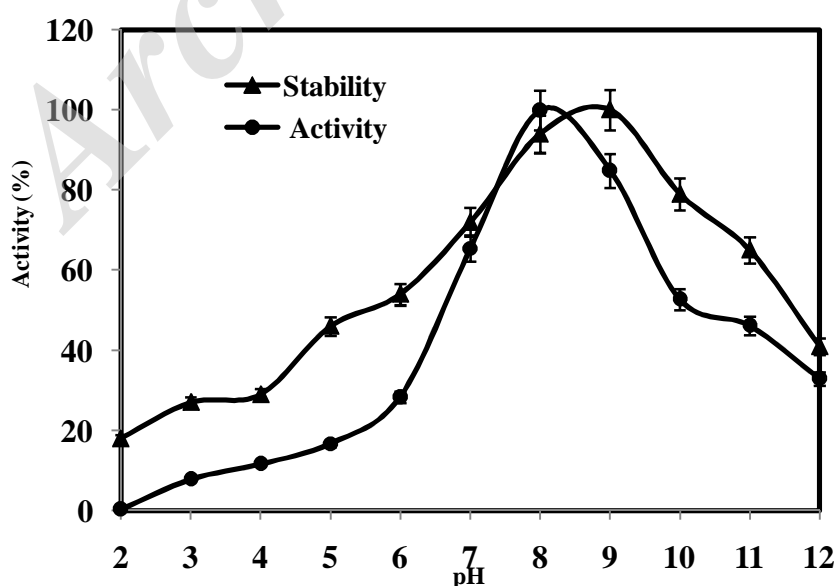
تأثیر یون‌های $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $HgCl_2$, KCl , $NaCl$ و ترکیبات EDTA, H_2O_2 , T.X100, SDS و مرکاپتو اتانول روی پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت. این یون‌ها در غلظت 5 میلی‌مولار در بافر تریس با pH 7/5 تهیه شدند. فعالیت آنزیم در محلول واکنش فاقد این یون‌ها 100 درصد در نظر گرفته شد.

فعالیت آنزیم KHB3 در حضور یون‌های H_2O_2 , $FeSO_4$ و $MnSO_4$ بیش از فعالیت نمونه کنترل مشاهده شد. در صورتی که کمترین فعالیت (36%) نسبت به نمونه کنترل در حضور SDS مشاهده گردیده است. فعالیت یون‌های $ZnSO_4$ و KCl مشابه فعالیت نمونه کنترل به دست آمد و در حضور ترکیبات EDTA, 2.M.E, T.X100 آنزیم به ترتیب حدود 87، 67 و 54 فعالیت خود را حفظ کرده است (جدول 1).

نتایج نشان می‌دهد که پایداری آنزیم KHB3 در pH 9 بیشترین مقدار می‌باشد. این آنزیم در pH 10 و 11 به ترتیب حدود 80 و 60 درصد فعالیت خود را حفظ کرده است (شکل 5). به طور مشابه، در نتایج حاصل از بررسی‌های pH پروتئاز BBRC 100053 *Licheniformis* مشخص شد که pH بهینه برای پایداری pH 7-8 می‌باشد [23].

3-4-3- تعیین پارامترهای سینتیکی

تأثیر غلظت‌های مختلف کازئین (صفر تا 2 میلی‌مولار) به مدت 20 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد. مقدار V_{max} و K_m آنزیم KHB3 طبق معادله لینیور-برک به ترتیب 2/67 mg/ml و 353 U/ml/min به دست آمد. مقدار V_{max} و K_m پروتئاز حاصل از *B. pseudofirmus* SVB1 در غلظت‌های مختلف کازئین به ترتیب 1/83 mg/ml و 533/83 U/ml/min برآورد شد. در گزارشی دیگر مقادیر V_{max} و K_m یک پروتئاز از *Lactobacillus brevis* در غلظت‌های مختلف سوبسترا به ترتیب 3/33 mg/ml و 66/66 U/ml/min برآورد شد [26]. این نتایج نشان از



شکل 5 فعالیت و پایداری پروتئاز KHB3 در حضور pH‌های مختلف

محمد ندیم و همکارانش در سال 2013 پروتئازی از *B. Licheniformi UV-9* را گزارش نمودند که در حضور 1% یون H_2O_2 و سدیم پرورات به ترتیب فعالیت باقی مانده-ای حدود 108 و 115 درصد نشان داد [21]. پروتئازهایی از *B. Clausii I-52*، *B. Mojavensis A21* گزارش شده است که در حضور 1% یون H_2O_2 به ترتیب فعالیت باقی مانده‌ی حدود 114 و 79 درصد را نشان دادند [۱۶،۱۷].

جدول 1 اثر یون‌های فلزی و ترکیبات مختلف روی فعالیت پروتئاز KHB3

یون‌های فلزی	فعالیت	پایداری
No Ion	100	100
NaCl	90±0.1	122±0.4
KCl	102±0.2	132±0.2
MnSO4	133±0.2	157±0.2
MgSO4	94±0.1	108±0.4
ZnSO4	102±0.1	115±0.3
CaCl2	73±0.2	108±0.2
CuSO4	81±0.3	116±0.1
CoCl2	97±0.3	81±0.1
FeSO4	110±0.2	126±0.3
HgCl2	69±0.1	126±0.2
H2O2	116±0.3	120±0.1
EDTA	87±0.2	118±0.3
SDS	36±0.1	62±0.1
Triton X-100	54±0.1	157±0.2
2 M. E.	67±0.2	105±0.3

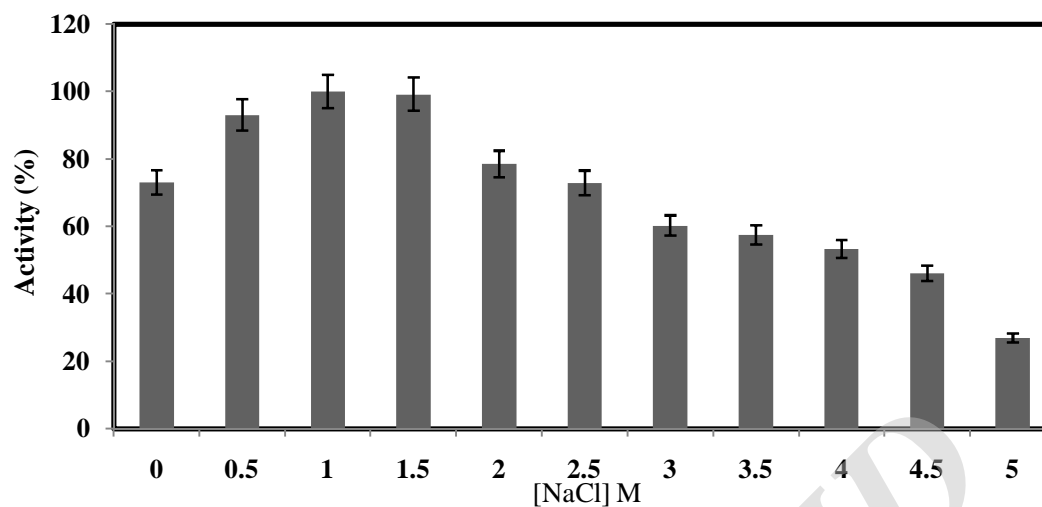
3-4-5- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت پروتئازی
تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید (0، 1/0/5، 1/5، 2، 2/5، 3/0، 3/5، 4/0، 4/5 و 5/0 مولار) روی فعالیت پروتئازی در شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد. آنزیم KHB3 فعالیت حداکثری را در غلظت 1 و 1/5 مولار سدیم کلرید نشان داد و به تدریج فعالیت آن در غلظت‌های بالاتر کاهش یافت (شکل 6).

گزارش شده است که پروتئاز *Bacillus sp. PCSIR EA-3* و *B. Pumilus* بوسیله یون کلسیم فعال می‌شوند [28]. فعالیت پروتئاز *Bacillus sp. CY7* در حضور EDTA، SDS، Triton x-100، H_2O_2 بیش از 95 درصد نسبت به نمونه کنترل گزارش شده است [22].

یون‌های فلزی نقش حیاتی در حفظ ساختار جایگاه فعال آنزیم ایفا می‌کنند. ترکیبی از یون‌های فلزی دو ظرفیتی ممکن است برای افزایش فعالیت آنزیم نیاز باشد. در این رابطه گوربل و همکارانش در سال 2003 گزارش دادند که یون کلسیم نقش عمده‌ی در فعالیت دمایی بالا یک متالوپروتئاز از سویه *B. Cereus BG1* دارد [13]. یون‌های KCl ، $BaCl_2$ ، $CuSO_4$ ، $ZnCl_2$ ، $HgCl_2$ باعث مهار پروتئاز *B. Laterosporis* شده و همچنین در حضور یون‌های $MnSO_4$ ، $CoCl_2$ ، $CaCl_2$ فعالیت پروتئازی افزایش یافته است [7].

برای بررسی اثر یون‌های فلزی روی پایداری آنزیم، آنزیم به مدت یک ساعت در حضور یون‌ها و ترکیبات مختلف در غلظت 5 میلی‌مولار در دمای اتاق انکوبه شده و در نهایت فعالیت باقی‌مانده آنزیم مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت محلول فاقد یون به عنوان 100 درصد در نظر گرفته شده است. آنزیم KHB3 در حضور ترکیبات $MnSO_4$ ، $ZnSO_4$ ، $CuSO_4$ ، H_2O_2 ، EDTA، $NaCl$ ، $HgCl_2$ ، $FeSO_4$ ، KCl ، T.X100، $MgSO_4$ ، $CaCl_2$ ، 2.M.E. بیشترین پایداری را نسبت به نمونه کنترل فاقد یون نشان داد و در حضور یون $CoCl_2$ فعالیت 81 درصدی را نشان داد. کمترین فعالیت مشاهده شده نسبت به نمونه کنترل در حضور یون SDS با فعالیت 62 درصد گزارش می‌شود (جدول 1).

پایداری در حضور SDS در تعداد معدودی از پروتئازهای قلیایی جدا شده از میکروارگانیسم‌ها از جمله گونه *Bacillus Sp. RGR-14* و *B. Clausii I-52* گزارش شده است. پروتئاز جدا شده از گونه *Bacillus sp.* در حضور 0/5 درصد یون SDS، 100 درصد پایداری نشان داد [27].



شکل 6 اثر غلظت‌های مختلف NaCl روی فعالیت پروتئاز KHB3

پایداری آنزیم KHB3، محلول کنترل بدون شوینده بالاترین پایداری را نسبت به حضور شوینده‌ها نشان داد و کمترین فعالیت مربوط به شوینده تاژ با مقدار 43 درصد می‌باشد. اما آنزیم در حضور شوینده بانو حدود 90 درصد فعالیت خود را حفظ کرده است (شکل 7). پایداری یک پروتئاز قلیایی در حضور شوینده‌ها یک ویژگی مهم برای کاربردهای صنعتی می‌باشد. یک پروتئاز قلیایی پایدار در برابر شوینده و نمک از باسیلوس سرئوس SIUI گزارش شده که در غلظت 10% مواد شوینده، فعالیت باقی مانده برای شوینده‌های Rin, Surf, Ariel, Wheel بین 8 تا 10 درصد می‌باشد. پروتئاز *B. Licheniformi PRI* در حضور شوینده‌های Ariel و Dixan حدود 95 درصد از فعالیت اولیه خود را بعد از انکوباسیون در دمای 40 درجه سانتی-گراد حفظ کرده است.

این آنزیم حدود 92 و 80 درصد از فعالیت اولیه خود را در حضور شوینده‌های Axio, Dixan حفظ کرده است [25]. سینگ و همکارانش در سال 2001 گزارش کردند که پروتئاز قلیایی از *Bacillus Sp. SSR1* فقط 37 درصد از فعالیت اولیه خود را پس از یک ساعت انکوباسیون در حضور شوینده آریل حفظ کرده است [25].

فعالیت و پایداری در حضور غلظت بالای نمک NaCl به عنوان یک ویژگی مهم در دانه دانه سازی پروتئاز قبل از اضافه شدن به شوینده‌ها می‌باشد. یک پروتئاز قلیایی مقاوم به نمک از *B. clausii I-52* جدا شده است که در طیف گسترده‌ای از غلظت NaCl فعال بوده، اما حداکثر فعالیت آن در 1% غلظت NaCl می‌باشد [16]. یک پروتئاز قلیایی مقاوم به نمک از سویه *B. aquimaris VITP4* جداسازی شده که در غلظت 20 مولار NaCl فعالیت اندکی داشت. در حالی که در حضور 4 مولار NaCl فعالیت خود را در حدود 40 درصد حفظ کرده است [28].

3-4-6- اثر شوینده‌ها بر فعالیت و پایداری آنزیمی

آنزیم KHB3 در حضور شوینده بانو بالاترین فعالیت را به میزان 112 درصد نسبت به محلول کنترل نشان داد و کمترین فعالیت مربوط به شوینده‌های دریا و کف با مقدار 56 درصد می‌باشد (شکل 7). گزارش شده است که پروتئاز قلیایی از *B. pseudofirmus SVB1* در حضور شوینده‌های Nirma, Surf, Rin, Ariel به ترتیب حدود 91، 95، 98، 87 درصد افزایش فعالیت را نشان می‌دهد [2]. در مورد

3-4-7- بررسی فعالیت آنزیمی در حضور حلال‌های

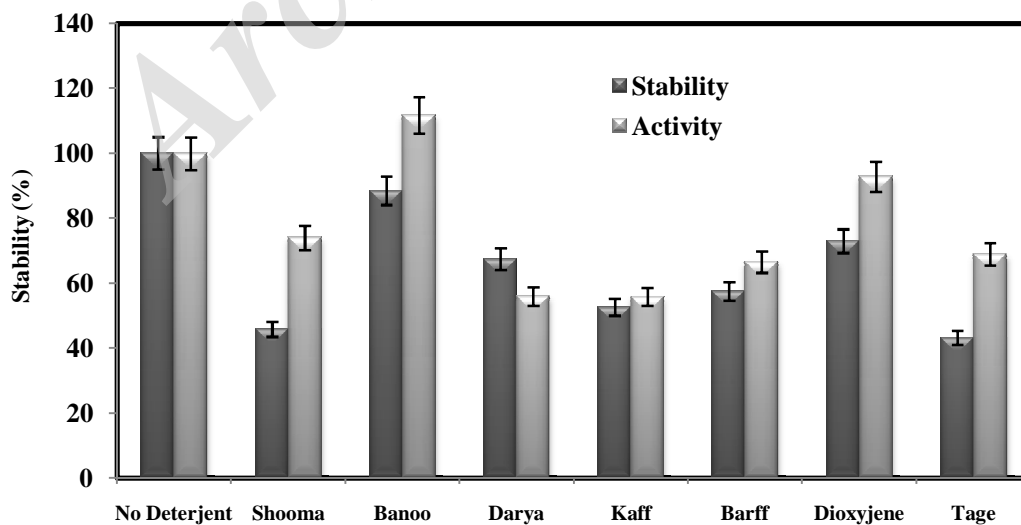
آلی

آنزیم KHB3، در حضور حلال‌های سیکلوهاگزان فعالیت مشابه فعالیت نمونه کنترل دارد و در حضور حلال‌های 1-بوتانول، حدود 30 درصد فعالیت را نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهد. آنزیم در حضور حلال‌های آلی تولوئن، DMSO، متانول، دی اتیل اتر و کلروفرم حدود 60 تا 80 درصد فعالیت خود را نسبت به نمونه بدون حلال حفظ کرده است (شکل 8). پروتئاز قلیایی مقاوم به حلال از سویه *B. Circulans* MTCC 7942 از زیستگاه آلوده با هیدروکربن جدا شده که در حضور حلال‌های آلی تولوئن، استون، بوتانول، گزین، بنزن، سیکلوهاگزان و دی متیل سولفوکسید به خوبی رشد کرده است. پروتئاز قلیایی مقاوم به حلال‌های آلی و حرارت نیز از *B. Coagulans* PSB-07 گزارش شده است که در حضور متانول 70 درصد فعالیت خود را حفظ کرده است [12].

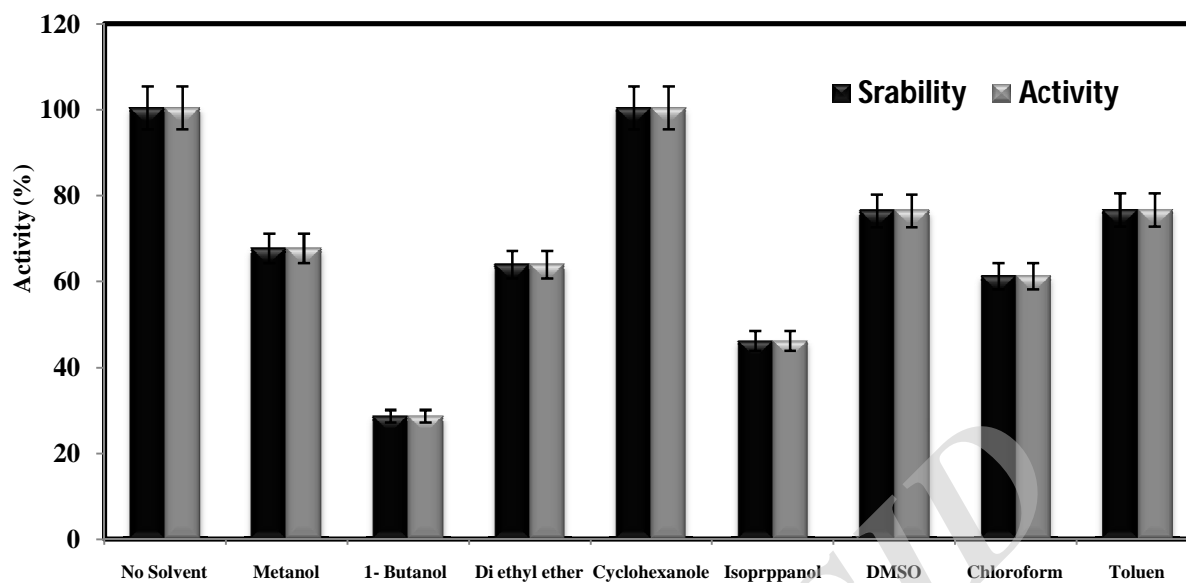
به منظور بررسی پایداری پروتئاز در حضور حلال‌های آلی، آنزیم به مدت یک ساعت در دمای اتاق در غلظت 100 میلی‌مولار حلال‌های آلی (متانول، 1-بوتانول، ایزوپروپانول، دی اتیل اتر، سیکلوهاگزانول، DMSO.

کلروفرم و تولوئن) مورد بررسی قرار گرفت. پایداری آنزیم KHB3 در حضور حلال‌های آلی سیکلوهاگزان مشابه نمونه کنترل فاقد حلال می‌باشد و آنزیم در حضور حلال‌های آلی 1-بوتانول کمترین پایداری (30%) را نسبت به نمونه کنترل نشان داد. آنزیم در حضور حلال‌های آلی دی اتیل اتر، سیکلوهاگزانول، متانول، تولوئن و کلروفرم پایداری خود را بین 60 تا 90 درصد حفظ کرده است (شکل 8). اثر حلال‌های آلی در پروتئازها، از پروتئازی تا پروتئاز دیگر متفاوت است. آنزیم‌ها معمولاً در حضور حلال‌های آلی غیرفعال یا دناتوره می‌شوند. پروتئاز قلیایی مقاوم به حلال‌های آلی و حرارت از *B. Coagulans* PSB-07 گزارش شده است که در حضور حلال‌های آلی متانول و DMSO فعالیت خود را تا 50 درصد حفظ کرده است [12].

پروتئاز جدا شده از *B. Licheniformis* 3C5 در حضور حلال‌های آلی بوتانول فعالیت خود را تا 20 درصد حفظ کرده است [1]. این نتایج پتانسیل قابل توجه این آنزیم را برای استفاده در صنعت شوینده و بیوتکنولوژی سنتزی نشان می‌دهد.



شکل 7 اثر شوینده‌های تجاری فاقد آنزیم روی فعالیت پروتئاز KHB3



شکل 8 فعالیت و پایداری پروتئاز KHB3 در حضور حلال‌های آلی مختلف

R. (1999) Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process. Biochem.* 35, 213-219.

- [5] Kalisz, H. M. (1988) Microbial proteinases. In: Fietcher A (ed) *Advances in biochemical engineering/biotechnology, (Enzyme studies)*. Springer, Berlin Heidelberg New York. 36, 3-61.
- [6] Sareen, R. and Mishra, P. (2008) Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 399-405.
- [7] Usharani, B., Muthuraj, M., Kaur, M., Dhillon, S. and Chaudhary, K. (2009) Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. *Global. J. Molecul. Sci.* 4, 180-186.
- [8] Ogino, H., Yasui, K., Shiotani, T., Ishihara, T. and Ishikawa, H. (1995) Organic solvent tolerant bacterium which secretes an organic solvent-stable proteolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4258-62.
- [9] Kumar, D., Chang, D., Sankhian, U. D. and Bhalla, T. C. (2003) Utilization of a *Bacillus* sp. APP-4 protease synthesis. *Indian J. microbial.* 43, 131-133.
- [10] Huang, Q., Y. Peng, X. Li, Wang, H. and Zhang, Y. (2003) Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Curr. Microbiol.* 46, 169-173.
- [11] Badoei-Dalfard, A. and Karami, Z. (2013)

4- تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است. به این وسیله نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

5- منابع

- [1] Rachadech, W., Navacharoen, A., Ruangsit, W., Pongtharangkul, T. and Vangnai, A. (2010) An organic solvent-, detergent-, and thermostable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5. *Mikrobiologiia.* 79, 620-629.
- [2] Sen, S. V., Dasu, V., Dutta, K. and Mandal, B. (2011) Characterization of a novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus pseudofirmus* SVB1. *Res. J. Microbiol.* 6, 769-783.
- [3] Ammar, M. S., Bayoumi, R. A., El-Kasaby, A. M. H. and Soliman, A. M. (2003) Purification and properties of thermostable protease by *Bacillus brevis* geltinoamylolyticus using fish wastes (Fi.W.) and poultry wastes (Po.W) under solid state fermentation (S.S.F.) conditions. *Sic Conf Al-Azhar Univ Fac Sci.* 5, 25-27.
- [4] Banerjee, U. C., Sani, R. K., Azmi, W. and i,

- [20] Kaur, S., Vohra, R. M., Kapoor, M., Beg, Q. K. and Hoondal, G. S. (2001) Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 125-129.
- [21] Nadeem, M., Qazi, J. I., Syed, Q. and Gulsher, M. (2013) Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations. *J. Sci. Technol.* 35, 187-195.
- [22] Nihan, A. R., Yasemin, C. A. F., Yelis, M. A. and Burhan, A. (2013) Partial purification and characterization of thermostable, alkaline and chelator resistant protease from a newly isolated *Bacillus* sp. CY7 and its potential applications in various industries. *J. Appl. Biological Sci.* 7, 14-19.
- [23] Rahman R. N., Mahamad, S., Salleh, A. B. and Basri, M. (2007) A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. *J. Industrial Microb. Biotechnol.* 34, 509-517.
- [24] Singh, S. K., Tripathi, V. R. and Garg, S. K. (2011) An oxidant, detergent and salt stable alkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1. *Afri. J. Biotechnol.* 10, 12257-12264.
- [25] Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., El-Hadj, N., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S. and Nasri, M. (2008) Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiol. Res.* 163, 299-306.
- [26] Femi-Ola, T. O. and Oladokun, D. O. (2012) Partial purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Lactobacillus brevis*. *Malaysian J. Microbiol.* 8, 1-5.
- [27] Doddapaneni, K. K., Tatineni, R., Rachcha, R. N., Anabrolu, N. and Mangamoori, V. N. (2009) Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol. Res.* 164, 383-390.
- [28] Shivanand P. and Jayrman, G. (2011) Isolation and characterization of a metal ion-dependent alkaline protease from halotolerant *Bacillus aquimaris* VITP4. *Indian J. Biochem. Biophysics.* 48, 95-100.
- Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: Activity optimization by response surface methodology. *J. Molecul. Catal. B: Enz.* 89, 15-23.
- [12] Olajuyigbe F. M. and Ehiosun, K. I. (2013) Production of thermostable and organic solvent tolerant alkaline protease from *Bacillus coagulans* PSB-07 under different submerged fermentation conditions. *Afri. J. Biotechnol.* 12, 3341-3350.
- [13] Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A. and Nasri, M. (2003) Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enz. Microb. Technol.* 32, 513-518.
- [14] Bajaj, B. K. and Gaytri, J. (2013) Thermostable alkaline protease production from *Bacillus pumilus* D-6 by using agro-residues as substrates. *Adv. Enzyme Res.* 1, 30-36.
- [15] Adinarayana, K. P., Ellaiah, D. and Prasad S. (2003) Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* 4, 569-571.
- [16] Joo, H.S. and Chang, C. S. (2005) Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *J. Appl. Microbiol.* 98, 491-497.
- [17] Hadder, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A. and Nasri, M. (2009). Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technol.* 100, 3366-3373.
- [18] Wan, M. Y., Wang, H. Y. and Feng, H. (2009) Substrate specificity and thermostability of the dehairing alkaline protease from *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 394-403.
- [19] Feng, Y. Y., Yang, W. B., Ong, S. L., Hu, J. Y. and W. J. Nig (2001) Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 153-160.