

Extracellular Peroxidase Enzyme Production in Native Bacteria *Bacillus tequilensis* and Determination of Some Biochemical Properties of Enzyme

Ahmadi F.¹ PhD, Abbasi A.^{*2} PhD, Yakhchali B.³ PhD, Alizade H.² PhD,
Pourbabaee A.A.⁴ PhD

¹ Biotechnology Department, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

² Agronomy & Plant Breeding Department, Agricultural Science & Engineering Faculty, University of Tehran, Karaj, Iran

³ National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

⁴ Soil Science Department, Agriculture Engineering & Technology Faculty, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract

Aims: Peroxidases are used in a wide range of biotechnological applications, most of which are carried out at high temperatures and pHs. Since most of the common peroxidases in alkaline conditions are unstable and inactive, it is necessary to find thermoalkalophilic peroxidases for practical purposes.

Materials & Methods: In the present study, the extracellular production of peroxidase enzyme in the native strain *Bacillus tequilensis* was studied. For this purpose, the bacteria were cultured in liquid LB medium. Enzyme activity was measured using two substrates 2,4-DCP and pyrogallol. The effect of culture time on enzyme production as well as the effect of pH and temperature parameters on enzyme activity were investigated. Partial purification of the enzyme was performed by ion exchange chromatography with Sephadex DEAE A50 and the enzyme obtained from the purification process was used to measure the kinetic parameters. Kinetic parameters such as K_m and V_{max} were also calculated in this study.

Findings: The highest production of peroxidase enzyme was obtained on the fourth day of bacterial culture. The effect of temperature on the enzyme activity showed the highest amount of enzyme activity at 70°C and the optimum pH of peroxidase activity was obtained 8 and 10 by using 2,4-DCP and pyrogallol respectively as substrates. The specific activity of the enzyme obtained 0.431 and 0.833U/ml respectively for the crude enzyme and sample purified with Sephadex A50, indicating an increase in purity up to approximately two fold after purification. The enzymes K_m and V_{max} for pyrogallol were 0.15mM and 2501.1U/ml, respectively, and for 2,4-DCP were 0.77mM and 0.97U/ml, respectively. The results of kinetic parameters showed that the specificity of this enzyme for pyrogallol is higher.

Conclusion: The peroxidase enzyme produced in the native *Bacillus* bacterium has the optimum activity at high temperature and pH and since most of the industrial processes are performed under the above conditions, therefore, this enzyme can potentially be used in these processes.

Keywords

Bacillus tequilensis [Not in MeSH];

Peroxidase [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68009195>];

Thermoalkalophilic [Not in MeSH];

Kinetic Parameters [Not in MeSH]

*Corresponding Author

Tel: +98 (26) 32227608

Fax: +98 (26) 32227608

Post Address: College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Daneshkadeh Avenue, Karaj, Iran.

Postal code: 3158777871

rezabbasi@ut.ac.ir

Received: March 16, 2019

Accepted: September 2, 2019

ePublished: March 14, 2020

تولید برون‌سلولی آنزیم پراکسیداز در باکتری بومی *Bacillus tequilensis* و تعیین برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم

فتح‌اله احمدی PhD

گروه بیوتکنولوژی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

علیرضا عباسی PhD

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

باقر یخچالی PhD

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

هوشنگ علیزاده PhD

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

احمدعلی پوربابائی PhD

گروه علوم خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

اهداف: پراکسیدازها در طیف وسیعی از کاربردهای بیوتکنولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند که بیشتر آنها در دما و pH های بالا انجام می‌شوند. از آنجایی که بیشتر پراکسیدازهای رایج در شرایط قلیایی ناپایدار و غیرفعال هستند، یافتن پراکسیدازهای ترموآلکالوفیلیک برای اهداف کاربردی امری ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، تولید برون‌سلولی آنزیم پراکسیداز در سویه بومی *Bacillus tequilensis* مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور، باکتری در محیط کشت LB مایع کشت داده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از دو سوبسترای ۲-و ۴-دی‌کلروفنل و پیروگالول مورد سنجش قرار گرفت و تأثیر مدت‌زمان کشت بر تولید آنزیم و همچنین تأثیر پارامترهای pH و دما بر میزان فعالیت آنزیم بررسی شد. خالص‌سازی نسبی آنزیم با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی با سفادکس DEAE A50 انجام و آنزیم حاصل از فرآیند خالص‌سازی برای اندازه‌گیری پارامترهای کینتیکی استفاده شد. در این مطالعه پارامترهای کینتیکی از قبیل V_{max} و K_m نیز محاسبه شدند.

یافته‌ها: بیشترین میزان تولید آنزیم پراکسیداز مربوط به روز چهارم کشت باکتری بود. بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم بیشترین میزان فعالیت آنزیم را در دمای 70°C نشان داد و pH بهینه فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از سوبسترای ۲-و ۴-دی‌کلروفنل و پیروگالول به ترتیب برابر با ۸ و ۱۰ بود. فعالیت ویژه آنزیم برای عصاره خام آنزیمی 0.43 U/ml و در نمونه حاصل از خالص‌سازی با سفادکس A50، 0.833 U/ml گزارش شد که افزایش خلوص تا نزدیک به دو برابر پس از خالص‌سازی را نشان داد. V_{max} و K_m آنزیم برای پیروگالول به ترتیب برابر با 0.15 میکرومولار و 250 U/ml و برای ۲-و ۴-دی‌کلروفنل برابر با 0.77 میکرومولار و 97 U/ml به دست آمد. نتایج بررسی پارامترهای کینتیکی نشان داد که اختصاصیت این آنزیم نسبت به پیروگالول بیشتر است.

نتیجه‌گیری: باکتری بومی *B. tequilensis* قابلیت تولید آنزیم پراکسیداز ترموآلکالوفیل را به‌صورت برون‌سلولی دارد. از آنجایی که بیشتر فرآیندهای صنعتی در شرایط دما و pH بالا انجام می‌شوند، آنزیم فوق می‌تواند پتانسیل کاربرد در این فرآیندها را داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: *Bacillus tequilensis*، پراکسیداز، ترموآلکالوفیل، پارامترهای کینتیکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۱

*نویسنده مسئول: rezabbasi@ut.ac.ir

مقدمه

پراکسیدازها (1.11.1.X) آنزیم‌هایی از خانواده اکسیدوردوکتاز هستند که به هیدروژن‌پراکسید (H_2O_2) یا دیگر پراکسیدها برای اکسیدکردن سوبستراهای احیایی نیاز دارند. این آنزیم‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران تولید می‌شوند و قادر به اکسیدکردن طیف وسیعی از سوبستراهای آلی با استفاده از هیدروژن‌پراکسید به‌عنوان دهنده الکترون هستند. این قابلیت پراکسیدازها منجر به استفاده از آنها در کاربردهای گسترده بیوتکنولوژیکی می‌شود [12]. برای مثال، پراکسیدازها می‌توانند در صنایع نساجی و کاغذسازی برای رنگ‌زدایی و سفیدکنندگی استفاده شوند [3]. آنها قادر هستند رنگ‌های آزو را بشکنند. این آنزیم‌ها با حذف مواد فنلی و رنگ‌های سمی در تصفیه فاضلاب‌ها، زیست‌پالایی فنل‌ها، کریزول و فنل‌های کلردار از خاک و آب کاربرد دارند [4-6]. همچنین انواع مختلفی از زیست‌حسگرها بر پایه پراکسیدازها ساخته شده‌اند که برای تشخیص پراکسید هیدروژن و دیگر پراکسیدهای آلی در زمانی که با آنزیم‌های تولیدکننده پراکسید هیدروژن جفت می‌شوند، مورد استفاده قرار می‌گیرند [7]. پراکسیدازها در کاربردهای آنالیتیکی برای ساخت کیت‌های تشخیصی مثل اندازه‌گیری کمی اوریک‌اسید، گلوکز، کلسترول، لاکتوز و غیره استفاده می‌شوند. تست الایزا که در آن پراکسیداز به‌عنوان رایج‌ترین آنزیم برای نشان‌دارکردن آنتی‌بادی استفاده می‌شود، یک روش ساده و مطمئن برای تشخیص توکسین‌ها، پاتوژن‌ها، سرطان‌های مثانه و پروستات و نمونه‌های متعدد دیگر است [2]. در برخی از زمینه‌های فوق، فرآیندها عمدتاً در شرایط قلیایی و دمای بالا انجام می‌شوند. متأسفانه بیشتر پراکسیدازهای رایج در شرایط قلیایی، ناپایدار و غیرفعال هستند و در pH های زیر و نزدیک ۶ بهینه فعالیت دارند. بنابراین یافتن پراکسیدازهای ترموآلکالوفیلیک برای اهداف کاربردی امری ضروری به نظر می‌رسد [8].

پراکسیدازها از منابع مختلف از جمله گیاه، باکتری و قارچ استخراج می‌شوند و برای اهداف کاربردی مختلف استفاده می‌شوند. تا به حال پراکسیداز تریچه کوهی به‌طور گسترده در بیشتر کاربردهای بالینی مورد استفاده قرار گرفته است، اما تولید پراکسیداز در باکتری‌ها به دلایل مختلفی سودمند است [9]. باکتری‌ها می‌توانند پراکسیدازها را به‌صورت برون‌سلولی ترشح کنند که خالص‌سازی پایین‌دستی آنزیم را آسان می‌کند. در مقابل استخراج آنزیم از ریشه‌های تریچه، نیاز به روش‌های پیچیده و طولانی دارد که شامل چندین مرحله رسوب‌دهی، بخش‌بخش کردن، کروماتوگرافی و فیلتراسیون می‌شود که کل فرآیند بسته به درجه خلوص آنزیم از چند روز تا چند هفته طول می‌کشد. علاوه بر این تولید پراکسیداز از تریچه یک فرآیند ناکارآمد است و تنها چند گرم آنزیم با کیفیت از یک تن ریشه گیاه به دست می‌آید [10].

تاکنون آنزیم پراکسیداز از باکتری‌های مختلفی جداسازی و تعیین ویژگی شده است. در سال ۱۹۸۸، لوپرسرت و همکاران آنزیم

دیانیزیدین، ۲-و دی-کلروفنل و پیروگالول (دی-هیدروکسی فنل) را داشت، ولی به وسیله پتاسیم سیانید و سدیم آزید مهار شد که نشان‌دهنده وجود هم در ساختار آنزیم بود. در مطالعه فوق اثر رنگ‌زدایی، پایداری در برابر عوامل دنا توره‌کننده، اکسیدکننده، سفیدکننده و سازگاری آنزیم با بعضی از شوینده‌های صنعتی مورد مطالعه قرار گرفت که کارایی آنزیم پراکسیداز در شرایط فوق به اثبات رسید [16].

اگرچه تولید آنزیم‌های صنعتی در میکروب‌ها به‌عنوان یکی از مناسب‌ترین روش‌ها است، اما در انتخاب سویه میکروبی برای تولید آنزیم صنعتی چندین جنبه باید مورد توجه قرار گیرد. اول اینکه ترشحی‌بودن آنزیم، فرآیند خالص‌سازی و بازیافت را نسبت به خالص‌سازی از بین هزاران پروتئین مختلف سلولی و اجزای دیگر آسان‌تر می‌کند. همچنین میزان تولیدکننده باید ایمن (GRAS) باشد. سوم اینکه سویه مورد نظر باید مقدار زیادی آنزیم را در مدت‌زمان منطقی تولید کند. همچنین چند مورد از مهم‌ترین معیارهایی که در انتخاب آنزیم صنعتی در نظر گرفته می‌شود، شامل میزان فعالیت، pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم، اختصاصیت آن نسبت به سوبسترا و غیره هستند [17].

با در نظر گرفتن موارد فوق، در مطالعه حاضر تولید برون سلولی پراکسیداز ترموآلکالوفیلک در سویه بومی *Bacillus tequilensis* و همچنین اثر برخی پارامترهای فیزیوشیمیایی بر تولید و فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

در این مطالعه از مواد شیمیایی ساخت شرکت‌های Merck، Sigma، Ducheфа و شرکت‌های معتبر داخلی استفاده شد.

تهیه سویه باکتری و نگهداری آن

در مطالعه حاضر، از باکتری بومی *Bacillus tequilensis* که از خاک‌های اطراف مرغداری‌ها و کشتارگاه‌های شهر مشهد جداسازی شده بود، استفاده شد [1]. این باکتری در محیط کشت جامد LB (*Luria bertani Agar*) که شامل ۱۰ گرم بر لیتر تریپتون، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۱۰ گرم بر لیتر سدیم کلرید و ۱۵ گرم بر لیتر آگار با pH نهایی ۷ بود، کشت و نگهداری شد.

کشت مایع و تهیه عصاره خام آنزیمی

برای تهیه عصاره خام آنزیمی، سویه *B. tequilensis* در محیط کشت LB مایع کشت شد و در انکوباتور با دمای ۳۷°C و سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. پس از اتمام دوره رشد، محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g و دمای ۴°C سانتریفیوژ و از عصاره رویی به‌عنوان عصاره خام آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز برون سلولی استفاده شد.

خالص‌سازی نسبی آنزیم با استفاده از ستون سفادکس DEAE A50

به این منظور ابتدا مقدار یک گرم رزین دی‌اتیل‌آمینواتیل A50

پراکسیدازی را از *باسیلوس/استاروترمو فیلوس (Bacillus stearothermophilus)* جداسازی کردند که بهینه pH آن ۶ و بهینه دمای فعالیت آن ۷۰°C بود. از بین سوبستراهای مختلف بیشترین فعالیت پراکسیدازی آنزیم (۱۰۰٪) برای ۲-و دی-کلروفنل و ۴-آمینوآنتی‌پیرین (4-aminoantipyrine) با Km برابر ۱/۳ میلی‌مولار برای H₂O₂ بود [11]. راب و همکاران تولید آنزیم پراکسیداز خارج سلولی را در *استرپتومایسس/اورمیتیلیس UAH30 (Streptomyces avermitilis UAH30)* بررسی کردند. این سویه از مواد لیگنوسلولزی جداسازی و به‌دلیل قابلیت آن در حذف رنگ از فاضلاب کارخانه کاغذسازی انتخاب شده بود. بیشترین فعالیت پراکسیدازی حاصل از این سویه ۱۲U/mg protein (واحد در هر میلی‌گرم پروتئین) بود. همچنین pH بهینه برای فعالیت آن ۶/۵ تا ۸/۵ و Km و Vmax به ترتیب ۱/۴۵ میلی‌مولار و ۳۱U/mg protein، با استفاده از ۲-و دی-کلروفنل به‌عنوان سوبسترا بود [12]. در مطالعه‌ای باکتری ترموآلکالوفیل را از پساب‌های کارخانجات نساجی جداسازی و به‌عنوان *Bacillus sp.* (SF) شناسایی کردند. آنزیم کاتالاز-پراکسیداز این باکتری به‌علت پایداری در دما و pH بالا پتانسیل استفاده در سفیدکننده‌های پارچه را داشت. این آنزیم فعالیت پراکسیدازی قابل توجهی را با سوبستراهای گایاکول و او-دیانیزیدین (o-dianisidine) نشان داد. بهینه فعالیت آنزیم در pH برابر ۷ و دمای ۵۵°C بود [13].

آنتونوپولوس و همکاران قابلیت آنزیم پراکسیداز برون سلولی تولیدشده در *استرپتومایسس/آلبوس ATCC 3005 (Streptomyces albus ATCC 3005)* را برای کاربرد در سفیدسازی خمیر کاغذ نشان دادند. بیشترین مقدار تولید پراکسیداز برون سلولی ۵۸U/mg و بیشترین فعالیت پراکسیدازی در pH برابر ۹/۹، دمای ۵۳°C و غلظت بهینه ۲۰ میلی‌مولار H₂O₂ بود، در حالی که آنزیم قادر به فعالیت در محدوده pH برابر ۶ تا ۱۱/۵ و همچنین غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار H₂O₂ نیز بود. در این مطالعه ۲-و دی-کلروفنل به‌عنوان سوبسترا برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شده بود [14]. در مطالعه‌ای دیگر آنزیم پراکسیداز دارای هم خارج سلولی از *Thermobifida fusca* را در باکتری *اشریشیاکلی (E.coli)* بیان و ویژگی‌های مختلف بیوشیمیایی آن را مطالعه کردند که مشخص شد این آنزیم نه تنها قادر به بیرنگ کردن انواع رنگ‌ها است، بلکه می‌تواند سولفوکسیداسیون enantioselective (سولفوکسیداسیون ایزومری) را نیز کاتالیز کند [15]. رکیک و همکاران نمونه‌های مختلف خاک را برای اکتینومیسیت‌های تولیدکننده پراکسیداز غربالگری کردند. آنها از تغییرات رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز در محیط کشت برای غربالگری پراکسیداز استفاده کردند. بعد از چند مرحله، یک سویه به نام *griseosporeus* SN9 *Streptomyces* بیشترین میزان فعالیت پراکسیدازی (۸U/ml) را نشان داد. مطالعه تاثیر pH و دما بر فعالیت آنزیم نشان داد که بهینه فعالیت آنزیم در pH= ۸/۵ و دمای ۶۵°C است. این آنزیم قابلیت استفاده از سوبستراهای مختلف مثل گایاکول، او-

یک واحد از فعالیت آنزیم به‌صورت مقدار لازم برای تولید ۱ میلی‌گرم از محصول واکنش در مدت‌زمان یک دقیقه تعریف می‌شود. میزان جذب به‌دست‌آمده در پایان ۴ دقیقه آنکو باسیون به وسیله تفریق میزان جذب کنترل (بلانک) تصحیح می‌شود.

مطالعه تاثیر برخی از پارامترهای فیزیوشیمیایی بر تولید و فعالیت آنزیم

بررسی تاثیر مدت‌زمان کشت بر تولید آنزیم پراکسیداز
به این منظور ابتدا سویه *B. tequilensis* در فالكون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت LB مایع به مدت یک شبانه‌روز پیش‌کشت شد. برای بررسی تاثیر مدت‌زمان کشت در تولید آنزیم پراکسیداز، مایه تلقیح حاصل از پیش‌کشت که OD₆₀₀ آن حدوداً ۰/۶ بود، در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۶۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB کشت شد و به مدت ۷ روز در آنکوباتور ۳۷°C با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. نمونه‌برداری از کشت‌های فوق طی روزهای یک تا ۷ و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از سوپسترای ۴۰۲ دی‌کلروفنل انجام شد.

بررسی تاثیر دما و pH بر فعالیت آنزیم پراکسیداز
برای بررسی تاثیر pH بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، از بافرهای مختلفی در محدوده pH های ۶ تا ۱۱ و سوپسترای ۴۰۲ دی‌کلروفنل و پیروگالول در دمای اتاق استفاده شد. در این آزمایش از بافر فسفات برای pH های ۶ و ۷، بافر تریس-هیدروکلریک‌اسید برای pH های ۸ و ۹ و بافر کربنات/بی‌کربنات برای pH های ۱۰ و ۱۱ استفاده شد. همچنین برای بررسی تاثیر دما بر فعالیت آنزیم، سنجش فعالیت آنزیمی با استفاده از سوپسترای ۴۰۲ دی‌کلروفنل در pH = ۸ و محدوده دمایی ۲۵ تا ۸۰°C با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت.

بررسی پارامترهای کینتیکی آنزیم پراکسیداز
پارامترهای کینتیکی از قبیل Km و Vmax برای آنزیم پراکسیداز با دو سوپسترای پیروگالول و ۴۰۲ دی‌کلروفنل اندازه‌گیری شد. این پارامترها با استفاده از فعالیت آنزیم پراکسیداز که به‌صورت نسبی خالص‌سازی شده بود، محاسبه شدند. در این آزمایش فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف سوپسترا (۲۵ تا ۴ میلی‌مولار برای پیروگالول و ۱ تا ۲۰ میلی‌مولار برای ۴۰۲ دی‌کلروفنل) و مقدار ثابت آنزیم در شرایط pH برابر ۸ و دمای ۲۵°C مورد سنجش قرار گرفت و پارامترهای Km و Vmax به‌صورت آنالین با استفاده از نرم‌افزار Km Vmax Tool Kit محاسبه شدند.

آنالیز داده‌ها

کلیه آزمایش‌های مطالعه حاضر با ۳ تکرار انجام و از میانگین داده‌ها برای گزارش نتایج استفاده شد.

یافته‌ها

خالص‌سازی نسبی آنزیم

آنزیم پراکسیداز از عصاره برون‌سلولی کشت باکتری *B. tequilensis* براساس روش ذکرشده به‌طور نسبی خالص‌سازی شد. مقدار پروتئین

(DEAE A50، سیگما آلد ریچ؛ ایالات متحده) در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۰°C قرار گرفت. در این مدت ژل به‌طور کامل متورم و ستون خالص‌سازی با استفاده از این ژل متورم‌شده پر شد. بعد از آماده‌سازی ستون، متعادل‌سازی آن با بافر شست‌وشوی تریس-هیدروکلریک‌اسید ۲۰ میلی‌مولار دارای ۸ pH انجام شد. این کار چندین مرتبه تکرار شد تا pH بافر ورودی با pH بافر خروجی از ستون یکسان شود. بعد از متعادل‌شدن ستون، عصاره خام آنزیمی به ستون تزریق شد. شست‌وشوی اولیه با بافر شست‌وشو انجام گرفت و در مراحل بعد برای خروج آنزیم پراکسیداز از ستون، از محلول سدیم کلرید با غلظت‌های ۱/۰ تا ۱۰۰ میلی‌مولار برای شست‌وشوی ستون استفاده شد. فراکشن‌های به‌دست‌آمده از ستون برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین با استفاده از روش برادفورد [18] و سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم

در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از دو سوپسترای ۴۰۲ دی‌کلروفنل (2,4-DCP، سیگما آلد ریچ؛ ایالات متحده) براساس روش آنتونو/ویوس و همکاران [14] و پیروگالول (سیگما آلد ریچ؛ ایالات متحده) براساس روش فلاو و همکاران [19] همراه با تغییراتی مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱) ترکیبات محلول سنجش آنزیمی با سوپسترای ۴۰۲ دی‌کلروفنل و پیروگالول

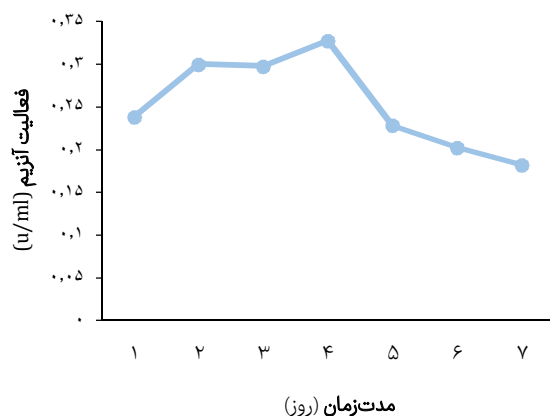
ترکیبات محلول سنجش آنزیمی	۴۰۲ دی‌کلروفنل (میکرولیتر)	پیروگالول (میکرولیتر)
Tris-HCl (۱۰۰ میلی‌مولار)	۲۰۵	۲۳۰
۴۰۲ دی‌کلروفنل (۱۰۰ میلی‌مولار)	۱۵	-
۴-آمینوآنتی‌پیرین (۱۰۰ میلی‌مولار)	۱۵	-
پیروگالول (۲۰ میلی‌مولار)	-	۳۰
آب اکسیژنه (۱۰۰ میلی‌مولار)	۱۵	۳۰
محلول آنزیمی	۵۰	۱۰
حجم کلی	۳۰۰	۳۰۰

واکنش با افزودن H₂O₂ شروع و افزایش جذب در طول موج‌های ۵۱۰ و ۴۲۰ نانومتر به‌ترتیب برای ۴۰۲ دی‌کلروفنل و پیروگالول با استفاده از دستگاه‌های خوانشگر میکروپلیت و اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. از محلول واکنش بدون عصاره آنزیمی به‌عنوان بلانک استفاده شد.

فعالیت آنزیم با استفاده از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$\text{فعالیت آنزیم (U/ml)} = \frac{Vt \times \Delta A/t \times df}{\epsilon \times D \times V}$$

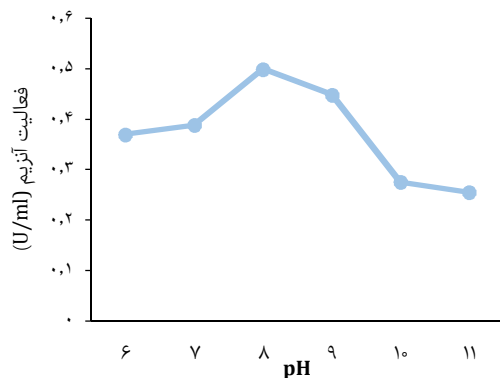
Vt نشان‌دهنده حجم کل واکنش بر حسب میلی‌لیتر، $\Delta A/t$ اختلاف جذب در یک دقیقه، df ضریب رقت آنزیم، ϵ ضریب مولی خاموشی، D طول عبوری نور و V حجم آنزیم بر حسب میلی‌لیتر است.



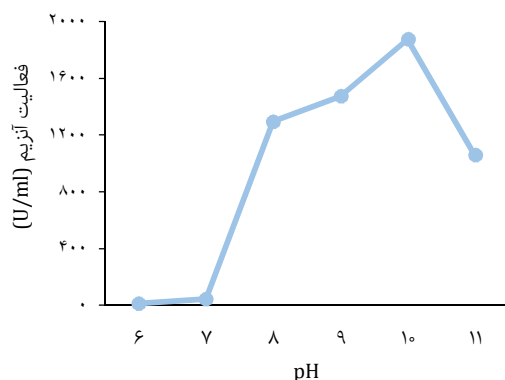
نمودار ۲) تاثیر مدت زمان کشت بر تولید آنزیم پراکسیداز در سویه *B. tequilensis*

بررسی تاثیر pH بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

آنزیم پراکسیداز در طیف وسیعی از pH ها و از pH ۶ تا ۱۱ فعالیت داشت و در محدوده pH های قلیایی فعالیت بیشتری را نشان داد و فعالیت بهینه این آنزیم با استفاده از سوسترای ۲-دی کلروفنل در pH= ۸ بود (نمودار ۳). همچنین آزمایش تاثیر pH بر فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از سوسترای پیروگالول نیز انجام و مشخص شد که این آنزیم در pH های قلیایی فعالیت بهتری روی سوسترا دارد و در pH= ۱۰ دارای بیشترین فعالیت روی این سوسترا است. با توجه به این دو آزمایش می توان نتیجه گرفت که این آنزیم یک پراکسیداز آلکالوفیل است.



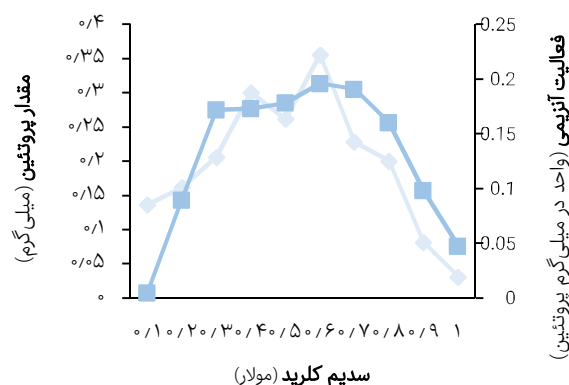
(الف)



(ب)

نمودار ۳) تاثیر pH بر فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از سوسترهای الف) ۲-دی کلروفنل و ب) پیروگالول

در فراکشن های مختلف با استفاده از روش برادفورد و همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از سوسترای ۲-دی کلروفنل مورد سنجش قرار گرفت. مقدار پروتئین خارج شده از ستون در غلظت های مختلف سدیم کلرید و همچنین میزان فعالیت آنزیم در فراکشن های خروجی تعیین شد (نمودار ۱). مقدار پروتئین و میزان فعالیت آنزیم در غلظت های شست و شوی ۰/۳ تا ۰/۷ مولار سدیم کلرید بیشتر از بقیه قسمت ها بود. فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در غلظت شست و شوی ۰/۳ مولار سدیم کلرید، ۸۳۳ U/mg گزارش شد که بیشتر از بقیه غلظت ها و نزدیک به دو برابر فعالیت ویژه عصاره خام آنزیمی (۴۳۱ U/mg) بود. همچنین مقدار پروتئین، فعالیت کل آنزیم و فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در عصاره خام آنزیمی و نمونه خالص شده با ستون تعویض یونی مقایسه شد (جدول ۲).



سدیم کلرید (مولار)

نمودار ۱) مقدار پروتئین (U) و فعالیت پراکسیدازی () در غلظت های مختلف شست و شو

جدول ۲) مقایسه مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم در عصاره خام آنزیمی و نمونه خالص شده با ستون تعویض یونی (DEAE A50)

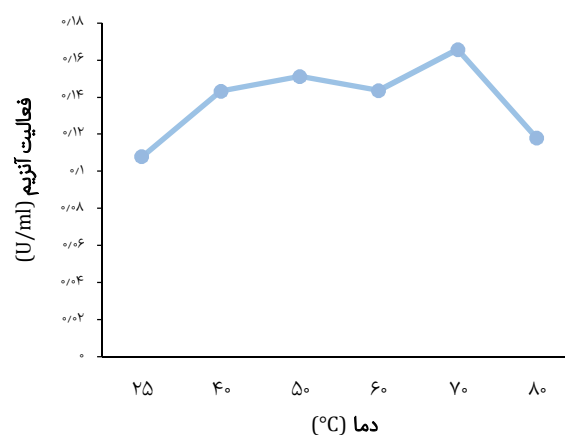
DEAE A50	عصاره خام	
۰/۲۰۶	۰/۸۹۱	پروتئین کل (میلی گرم)
۰/۱۷۱۹	۰/۳۸۴۷	فعالیت کل آنزیم (U/ml)
۰/۸۳۳	۰/۴۳۱	فعالیت ویژه آنزیم (U/mg)

بررسی تاثیر مدت زمان کشت بر تولید آنزیم پراکسیداز

برای این منظور در فواصل زمانی ۲۴ ساعت از کشت باکتری نمونه برداری شد و نمونه ها پس از سانتریفیوژ و تهیه عصاره خام آنزیمی برای سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند. میزان تولید آنزیم پراکسیداز برون سلولی در کشت باکتری *B. tequilensis* طی روزهای اول تا چهارم افزایش یافت، ولی بعد از آن کاهش پیدا کرد (نمودار ۲). همچنین بیشترین مقدار فعالیت آنزیم (۳۳ U/ml) مربوط به روز چهارم کشت بود، ولی این میزان در روزهای بعدی کاهش یافت و در روز هفتم تا حدود ۵۰٪ مقدار بهینه (۱۸ U/ml) رسید. بنابراین می توان نتیجه گرفت که مدت زمان بهینه کشت برای تولید بیشتر آنزیم پراکسیداز در این سویه ۴ روز است.

بررسی تاثیر دما بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

در این آزمایش از ۲ و ۴ دی‌کلروفنل به عنوان سوبسترا برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده و واکنش سنجش آنزیمی در $\text{pH} = 8$ به عنوان pH بهینه انجام شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط pH بهینه با افزایش دما از ۲۵ تا 70°C افزایش یافت و در دمای 70°C به بیشترین میزان خود رسید و بعد از آن کاهش پیدا کرد (نمودار ۴).



نمودار ۴) تاثیر دما بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

تعیین پارامترهای کینتیکی آنزیم پراکسیداز

مقدار پارامترهای کینتیکی برای یک آنزیم بستگی به سوبسترای مورد استفاده برای سنجش فعالیت آنزیم و همچنین شرایط محیطی از قبیل pH ، دما، قدرت یونی و غیره دارد. در این مطالعه نیز مقادیر $V_{\max}$ و K_m برای آنزیم پراکسیداز تولیدشده در سویه *B. tequilensis* نسبت به دو سوبسترای مختلف متفاوت بود (جدول ۳). آنزیم پراکسیداز برای پیروگالول K_m پایین‌تری داشت و این تمایل بیشتر این آنزیم به این سوبسترا نسبت به ۲ و ۴ دی‌کلروفنل را نشان داد.

جدول ۳) پارامترهای کینتیکی آنزیم پراکسیداز

سوبسترا	K_m (میلی‌مولار)	$V_{\max}$ (میلی‌مولار)
۲ و ۴ دی‌کلروفنل	۰/۷۷	۰/۹۷
پیروگالول	۰/۱۵	۲۵۰/۱

بحث

باسیلوس‌ها به دلیل داشتن ویژگی‌هایی همچون نرخ رشد بالا، چرخه کوتاه تخمیر، تولید پروتئین‌های برون‌سلولی و ایمن‌بودن میزبان‌های مناسبی برای تولید آنزیم‌های صنعتی به شمار می‌آیند [20]. باکتری *B. tequilensis* یک سویه گرم مثبت و غیربیماری‌زا است که در مطالعه حاضر برای تولید آنزیم پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت. این سویه تمامی ویژگی‌های یک میزبان تولیدکننده آنزیم‌های صنعتی را دارد. تاکنون تولید آنزیم‌های صنعتی مختلف از قبیل انواع پروتئازها [20]، آمیلاز [21]، سلولاز [22]،

زایلاناز [23] و آنزیم‌های پکتینولایتیک [24] در این گونه بررسی شده، اما مطالعه‌ای روی تولید آنزیم پراکسیداز در این سویه انجام نشده است. بنابراین یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند اطلاعاتی در مورد تولید آنزیم پراکسیداز و همچنین ویژگی‌های این آنزیم در اختیار محققان قرار دهد.

اگرچه اطلاعات زیادی در مورد پراکسیدازهای گیاهی از جمله پراکسیداز تربچه (*Horse Radish Peroxidase*) و پراکسیدازهای تولیدشده در برخی گونه‌های قارچی مثل *Phanerochaete chrysosporium* و *Pleurotus ostreatus* وجود دارد، اما پراکسیدازهای باکتریایی به دلیل ویژگی‌های خاص خود می‌توانند پتانسیل بالقوه‌ای را در صنایع مختلف داشته باشند.

در مطالعه حاضر باکتری *B. tequilensis* توانایی تولید برون‌سلولی آنزیم پراکسیداز را داشت که این امر خالص‌سازی آنزیم را راحت‌تر می‌کند. همچنین مشخص شد که عصاره برون‌سلولی این سویه قادر به فعالیت روی سوبستراهای پیروگالول و ۲ و ۴ دی‌کلروفنل است. بیشترین هزینه‌های تولید آنزیم مربوط به خالص‌سازی آن است. بنابراین تولید برون‌سلولی یکی از مهم‌ترین مزیت‌های یک میزبان برای تولید آنزیم صنعتی محسوب می‌شود. در مطالعه حاضر تولید آنزیم در این سویه در مدت‌زمان کوتاهی و در چند روز اول کشت به بیشترین میزان خود رسید. این نتیجه در مورد تولید آنزیم پراکسیداز در گونه‌های باکتریایی دیگر مثل گونه‌هایی از جنس استرپتومیس‌ها که برای تولید این آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، بسیار بیشتر است. به عنوان مثال بیشترین میزان تولید آنزیم پراکسیداز در سویه *Streptomyces albus* ATCC 3005 حدود ۳-۴ روز [14] و در سویه *Nonomuraea gerenzanensis* ۲۰ روز [25] بعد از کشت به دست می‌آید. تولید پراکسیدازهای گیاهی نیاز به فرایندهای پیچیده‌تر دارد و مدت‌زمان رشد گیاه و تولید آنزیم به مراتب بیشتر است. میزان تولید آنزیم پراکسیداز در سویه *B. tequilensis* نیز قابل توجه است، به طوری که این آنزیم در این سویه نسبت به کارهای مشابه انجام‌شده به میزان بیشتری تولید شد. به عنوان مثال بیشترین میزان پراکسیداز برون‌سلولی تولیدشده در باکتری *Streptomyces griseosporus* SN9 و به میزان ۱/۸ U/ml [16] و در *Streptomyces albus* ATCC 3005، ۵۸/۵ U/ml [14] گزارش شده است که میزان آنزیم تولیدشده در سویه *B. tequilensis* بیشتر از مقادیر فوق بود. بنابراین می‌توان گفت سویه *B. tequilensis* ویژگی‌های یک میزبان مناسب برای تولید آنزیم پراکسیداز را دارد.

یکی دیگر از مهم‌ترین معیارهای مورد نیاز یک آنزیم برای کاربردهای صنعتی، فعالیت در pH و دمای مورد نظر است. فعالیت آنزیم پراکسیداز تولیدشده در سویه *B. tequilensis* در pH و دماهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که این آنزیم در محدوده pH ‌های ۶ تا ۱۱ فعالیت دارد، ولی در محدوده قلیایی فعالیت بیشتری روی دو سوبسترای مورد مطالعه، به خصوص پیروگالول نشان می‌دهد. این آنزیم در دماهای بالای 40°C نیز

آنجا که Km معیاری از تمایل آنزیم به سوبسترا است، می توان گفت این آنزیم تمایل بیشتری نسبت به پیروگالول دارد و فعالیت آن نیز روی این سوبسترا بیشتر است.

نتیجه گیری

باکتری بومی *B. tequilensis* قابلیت تولید آنزیم پراکسیداز را به صورت برون سلولی دارد و آنزیم پراکسیداز تولید شده در این سویه، یک آنزیم ترموآلکالوفیل است. این ویژگی ها باعث شده است که این سویه به عنوان میزبان مناسبی برای تولید صنعتی آنزیم پراکسیداز محسوب شود. همچنین این آنزیم فعالیت خوبی در اکسیداسیون ترکیبات فنلی دارد. از آنجایی که بیشتر فرآیندهای صنعتی در شرایط قلیایی و دمای بالا انجام می شوند، آنزیم فوق می تواند پتانسیل کاربرد در این فرآیندها را داشته باشد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از کارشناسان آزمایشگاه صنعت و محیط زیست پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

تأییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان تأیید شده است. همچنین این مطالعه در نشریه دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا سایر زبان ها چاپ نشده یا به طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است. **تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می دارند هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فتح اله احمدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ علیرضا عباسی (نویسنده دوم)، روش شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ باقر یخچالی (نویسنده سوم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ هوشنگ علیزاده (نویسنده چهارم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ احمدعلی پوریابائی (نویسنده پنجم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر با حمایت های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شد.

منابع

- 1- Korouzhdehi B, Abbasi A, Bahreini M, Poorbabaee AA, Sharifmoghdam MR. Isolation and recognition of keratinolytic bacteria strains based on their biochemical and molecular properties. J Genet. 2018;12(4):535-46. [Persian]
- 2- Hamid M, Rehman K. Potential applications of peroxidases. Food Chem. 2009;115(4):1177-86.
- 3- Yu W, Liu W, Huang H, Zheng F, Wang X, Wu Y, et al. Application of a novel alkali-tolerant thermostable DyP-type peroxidase from *Saccharomonospora viridis* DSM 43017 in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. PLoS One. 2014;9(10):e110319.
- 4- Zhai R, Zhang B, Wan Y, Li C, Wang J, Liu J. Chitosan-halloysite hybrid-nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal. Chem Eng J. 2013;214:304-9.
- 5- Kim HJ, Suma Y, Lee SH, Kim JA, Kim HS. Immobilization of horseradish peroxidase onto clay minerals using soil

به صورت بهتری فعالیت می کند. با توجه به نتایج حاصل از بررسی تاثیر دما و pH بر فعالیت آنزیم می توان گفت که این آنزیم ترموآلکالوفیل و قادر به فعالیت در دماها و pH های بالا است. بیشتر فرآیندهای صنعتی از قبیل صنایع شوینده، صنعت خمیر کاغذ و غیره معمولاً در شرایط محیطی سخت و شدید از نظر دما و pH (pH ۷ تا ۱۰ و دمای ۲۰ تا ۶۰°C) انجام می شوند [26]. همچنین برخی از رنگ های صنعتی مثل رنگ های آزو، تری آریل متان و آنتراکوئینون نیز در شرایط pH خنثی تا قلیایی توسط آنزیم های پراکسیداز رنگبری می شوند [2]. آنزیم های تولید شده به منظور استفاده در این صنایع، باید قادر به فعالیت در این pH و دما باشند. پس از بررسی آنزیم پراکسیداز در برخی از گونه های باکتریایی مشخص شده است که اکثر این آنزیم ها در pH خنثی و نزدیک خنثی فعالیت بهینه دارند. به عنوان مثال فعالیت بهینه پراکسیداز تولید شده در باکتری *Bacillus megaterium* در pH=۷ و دمای ۳۷°C گزارش شده است [27]. فعالیت بهینه آنزیم های پراکسیداز PpDyP و BsDyP که به ترتیب از سویه های *B. subtilis* و *putida* گزارش شده بود، در pH های اسیدی ۴ تا ۵ و دمای بین ۲۰ تا ۳۰°C برای BsDyP و دمای بین ۱۰ تا ۳۰°C برای PpDyP به دست آمد [28]. فعالیت بهینه آنزیم SviDyP که از سویه *Saccharomonospora viridis* جدا سازی، خالص سازی و تعیین ویژگی شده بود، در pH=۷ و دمای ۷۰°C فعالیت قابل توجهی روی خمیر چوب اکالیپتوس در طول فرآیند سفید سازی داشت، به طوری که عدد کاپا ۲۱٪ کاهش و شفافیت تقریباً ۳٪ افزایش پیدا کرد [3]. فعالیت بهینه پراکسیدازهای قارچی نیز عمدتاً در pH های اسیدی است، به طوری که در pH های زیر ۵ فعالیت بهینه دارند و یکی از مهم ترین محدودیت های پراکسیدازهای قارچی برای استفاده در فرآیندهای صنعتی، عدم کارایی آنها در pH های بالا است. بنابراین می توان نتیجه گرفت که آنزیم پراکسیداز تولید شده در سویه *B. tequilensis* پتانسیل خوبی برای کاربرد در این فرآیندها داشته باشد.

یکی دیگر از کاربردهای آنزیم پراکسیداز زیست پالایی مواد سمی مثل مواد فنلی است. در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که این آنزیم قادر است ترکیبات فنلی مثل ۲-۴ دی کلرو فنل و پیروگالول را اکسید کند. بنابراین می توان انتظار داشت که این آنزیم بتواند در پروژه های زیست پالایی ترکیبات فنلی به کار برده شود و تا به حال مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است [29-31]. آنزیم پراکسیداز قادر به شکست ترکیبات فنلی نیست و فقط از طریق پلیمریزاسیون آنها منجر به رسوب این ترکیبات سمی می شود.

یکی از ویژگی هایی که در مطالعه آنزیم مد نظر قرار می گیرد، اختصاصیت آنزیم نسبت به سوبسترا است. در مطالعه حاضر مشخص شد که اختصاصیت آنزیم پراکسیداز تولید شده در سویه *B. tequilensis* نسبت به پیروگالول بیشتر است. با مطالعه پارامترهای کینتیکی آنزیم پراکسیداز مشخص شد که این آنزیم Km پایین تری برای پیروگالول نسبت به ۲-۴ دی کلرو فنل دارد. از

the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.

19- Falade AO, Eyisi OA, Mabinya LV, Nwodo UU, Okoh AI. Peroxidase production and ligninolytic potentials of fresh water bacteria *Raoultella ornithinolytica* and *Ensifer adhaerens*. *Biotechnol Rep.* 2017;16:12-7.

20- Khan I, Gupta P, Vakhlu J. Thermo-alkaliphilic halotolerant detergent compatible protease (s) of *Bacillus tequilensis* MTCC 9585. *Afr J Microbiol Res.* 2011;5(23):3968-75.

21- Manohar P, Shanthini T, Gothandam KM, Kannan VR, Ramesh N. Enhanced amylolytic activity of intracellular α -amylase produced by *Bacillus tequilensis*. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2017;6(6):1314-8.

22- Sharma A, Tewari R, Soni SK. Application of statistical approach for optimizing CMCase production by *Bacillus tequilensis* S28 strain via submerged fermentation using wheat bran as carbon source. *Int J Biol Biomol Agric Food Biotechnol Engin.* 2015;9(1):76-86.

23- Khandeparker R, Parab P, Amberkar U. Recombinant xylanase from *Bacillus tequilensis* BT21: Biochemical characterisation and its application in the production of xylobiose from agricultural residues. *Food Technol Biotechnol.* 2017;55(2):164-72.

24- Chiliveri SR, Koti S, Linga VR. Retting and degumming of natural fibers by pectinolytic enzymes produced from *Bacillus tequilensis* SV11-UV37 using solid state fermentation. *SpringerPlus.* 2016;5(1):559.

25- Casciello C, Tonin F, Berini F, Fasoli E, Marinelli F, Pollegioni L, et al. A valuable peroxidase activity from the novel species *Nonomuraea gerenzanensis* growing on alkali lignin. *Biotechnol Rep.* 2017;13:49-57.

26- Tuncer M, Kuru A, Sahin N, Isikli M, Isik K. Production and partial characterization of extracellular peroxidase produced by *Streptomyces* sp. F6616 isolated in Turkey. *Ann Microbiol.* 2009;59(2):323.

27- Patil SR. Production and purification of lignin peroxidase from *Bacillus megaterium* and its application in bioremediation. *CIBTech J Microbiol.* 2014;3(1):22-8.

28- Santos A, Mendes S, Brissos V, Martins LO. New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: Towards biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(5):2053-65.

29- Bevilacqua JV, Cammarota MC, Freire DM, Sant'Anna Jr GL. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Braz J Chem Eng.* 2002;19(2):151-8.

30- Chiong T, Lau SY, Khor EH, Danquah MK. Enzymatic approach to phenol removal from wastewater using peroxidases. *OA Biotechnol.* 2014;3(1):9.

31- Villegas LG, Mashhadi N, Chen M, Mukherjee D, Taylor KE, Biswas N. A short review of techniques for phenol removal from wastewater. *Curr Pollut Rep.* 2016;2(3):157-67.

organic matter for phenol removal. *J Mol Catal B Enzym.* 2012;83:8-15.

6- Kurnik K, Treder K, Skorupa-Kłaput M, Tretyn A, Tyburski J. Removal of phenol from synthetic and industrial wastewater by potato pulp peroxidases. *Water Air Soil Pollut.* 2015;226(8):254.

7- Saleh Ahammad AJ. Hydrogen peroxide biosensors based on horseradish peroxidase and hemoglobin. *J Biosens Bioelectron.* 2013;S(9):001.

8- Apitz A, Van Pée KH. Isolation and characterization of a thermostable intracellular enzyme with peroxidase activity from *Bacillus sphaericus*. *Arch microbiol* 2001;175(6):405-12.

9- Ogawa J, Sulistyaningdyah WT, Li QS, Tanaka H, Xie SX, Kano K, et al. Two extracellular proteins with alkaline peroxidase activity, a novel cytochrome c and a catalase-peroxidase, from *Bacillus* sp. No. 13. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins Proteom.* 2004;1699(1-2):65-75.

10- Barnard A. The optimization of the extraction and purification of horseradish peroxidase from horseradish roots [Dissertation]. Stellenbosch: Stellenbosch University; 2012.

11- Loprasert S, Negoro S, Okada H. Thermostable peroxidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Microbiology.* 1988;134(7):1971-6.

12- Rob A, Hernandez M, Ball AS, Tuncer M, Arias ME, Wilson MT. Production and partial characterization of extracellular peroxidases produced by *Streptomyces avermitilis* UAH30. *Appl Biochem Biotechnol.* 1997;62(2-3):159-74.

13- Gudelj M, Fruhwirth G, Paar A, Lottspeich F, Robra KH, Cavaco-Paulo A, et al. A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. with potential for the treatment of textile bleaching effluents. *Extremophiles.* 2001;5(6):423-9.

14- Antonopoulos VT, Rob A, Ball AS, Wilson MT. Dechlorination of chlorophenols using extracellular peroxidases produced by *Streptomyces albus* ATCC 3005. *Enzym Microb Technol.* 2001;29(1):62-9.

15- Van Bloois E, Pazmiño DE, Winter RT, Fraaije MW. A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;86(5):1419-30.

16- Rekik H, Nadia ZJ, Bejar W, Kourdali S, Belhoul M, Hmidi M, et al. Characterization of a purified decolorizing detergent-stable peroxidase from *Streptomyces griseosporus* SN9. *Int J Biol Macromol.* 2015;73:253-63.

17- Sarrouh B, Santos TM, Miyoshi A, Dias R, Azevedo V. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *J Bioprocess Biotech.* 2012; S(4):002.

18- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing