زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 6، شماره 1، بهار و تابستان 1394

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

ارسطو بدویی دلفارد[1*]، پروین امیری[2]، زهرا کرمی[3]، بتول قنبری[4]، باقر سیدعلیپور[5]

1و3- 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 133-76169**
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 می-شوند [2،1]. 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 [4،3]. 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 [۵،۶]. 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 [8،7]. 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 (10 mM), (10x PCR buffer)، MgCl2 (20 mM) و آنزیم Taq DNA Polymerase از شرکت سیناژن 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.

2-1- جداسازی و غربالگری باکتری مولد پروتئاز

نمونه‌برداری از چشمه آب معدنی دوساری (E 30/99 °28 °28، N 0 °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 [10،9].

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

صورت زیر طراحی شدند [11]. پرایمر Forward: 5-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3 با Tm=53/7 ℃ پرایمرReverse: 5-GGC TAC CTT GTT ACG ACT-3 با Tm=53/4 ℃. 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.

2-3- 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، 0/625سیتریک اسید، 1/25 عصاره مخمر، 1/25 K_2HPO_4، $MgSO_4$0/0125، $CaCl_2$ 0/0125 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 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 تریس40 میلی‌مولار 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 pH 7/5، 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].

2-4- تعیین خصوصیات بیوشیمیایی پروتئاز

2-4-1- 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 سانتی گراد 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 g 12000 جدا شد و جذب محلول رویی در طول-موج 280 نانومتر توسط دستگاه اسپکترومتر اندازه‌گیری شد. در تمامی واکنش‌ها از محلول شاهدی 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 آنزیمی 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

پایداری آنزیمی با سه بار تکرار انجام شده است.

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 Glysine (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 12-3 به مدت یک ساعت در دمای اتاق انجام شد و سپس میزان فعالیت باقی‌مانده پروتئازی بر اساس شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد [15،14].

3-4-2- 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].

4-4-2- 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. پارامترهای سینتیکی با رسم منحنی لینویور- برک تعیین شد [18،11].

5-4-2- اثر غلظت های 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].

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

غلظت 40 درصد از حلال‌های آلی مختلف (متانول، 1-بوتانول، ایزوپروپانول، تولوئن، کلروفرم، دی‌اتیل اتر، DMSO و سیکلوهگزان) در بافر فسفات 100 میلی-مولار 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، دی اتیل 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].

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

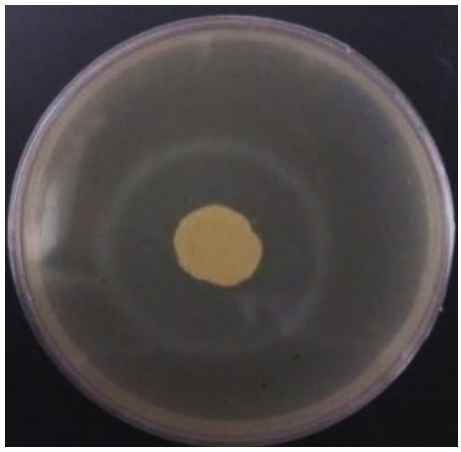
غلظت 1 درصد شوینده‌های (دریا، شوما، برف، بانو، دی اکسیژنه، کف و تاژ) در بافر فسفات 50 میلی مولار با pH7/5 تهیه شد. فعالیت پروتئازی در حضور این شوینده‌های تجاری بدون آنزیم در شرایط استاندارد

سنجش شد. غلظت شوینده‌ها در زمان سنجش فعالیت پروتئازی 0/5 درصد (v/v) می‌باشد. به منظور اندازه‌گیری پایداری، میکروتیوپ‌های حاوی آنزیم و بافر حاوی شوینده با مقدار مساوی در دمای اتاق به مدت یک ساعت قرار داده شدند، سپس میزان فعالیت باقی‌مانده پروتئازی بر اساس شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد [24-26].

3- نتایج و بحث

3-1- غربالگری باکتری‌های 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- شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی

نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان داد که سویه باکتری مورد نظر یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای، دارای آنزیم کاتالاز، بی‌حرکت و فاقد تاژک، فاقد آنزیم اکسیداز و سولفات آهن بود. بر اساس اطلاعات مربوط به توالی‌یابی 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 تأئید کننده این مطلب می باشد. درخت فیلوژنی سویه مورد نظر در شکل 2 آمده است.

3-3- خالص‌سازی نسبی پروتئاز

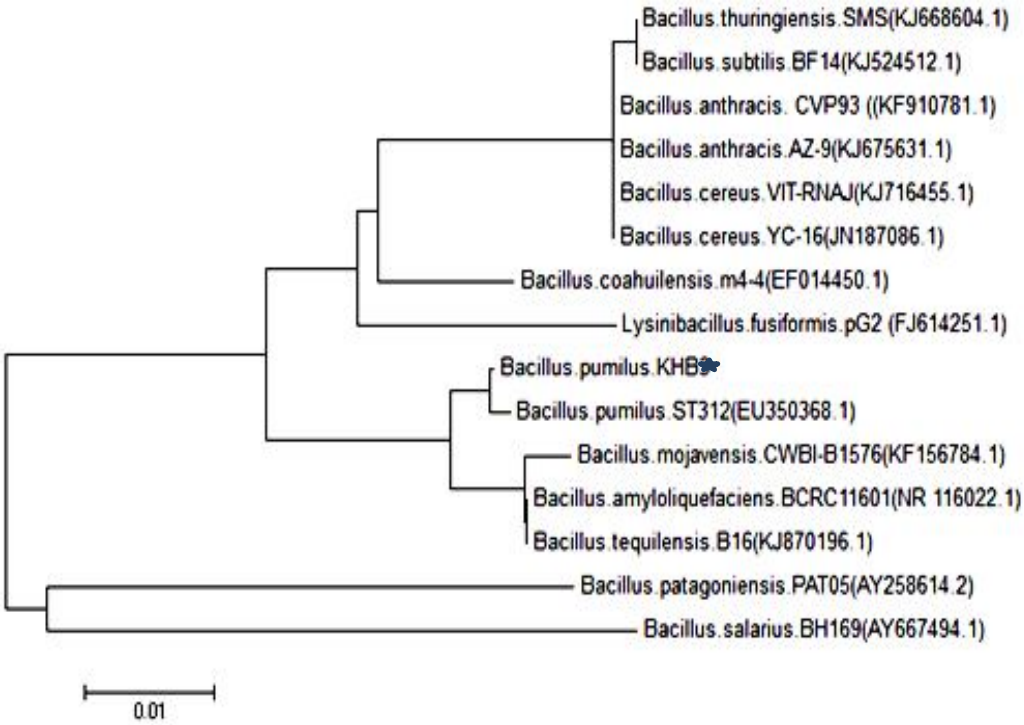
محلول پروتئینی دیالیز شده روی ستون Q-سفاروز به تعادل رسیده با بافر تریس40 میلی‌مولار و pH 7/5 بارگذاری شد. سپس ستون با این بافر شستشو داده شد و با افزایش غلظت نمک (NaCl) از 0 تا 0/5 مولار پروتئین‌ها جداسازی شدند. کروماتوگرام حاصل از خوانش جذب نمونه‌ها در طول‌موج 280 نانومتر و طیف فعالیت آنزیمی در شکل 3 نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که پروتئاز مورد مطالعه در غلظت نمکی 10 درصد از ستون خارج می‌شود.

3-4- تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم پروتئاز

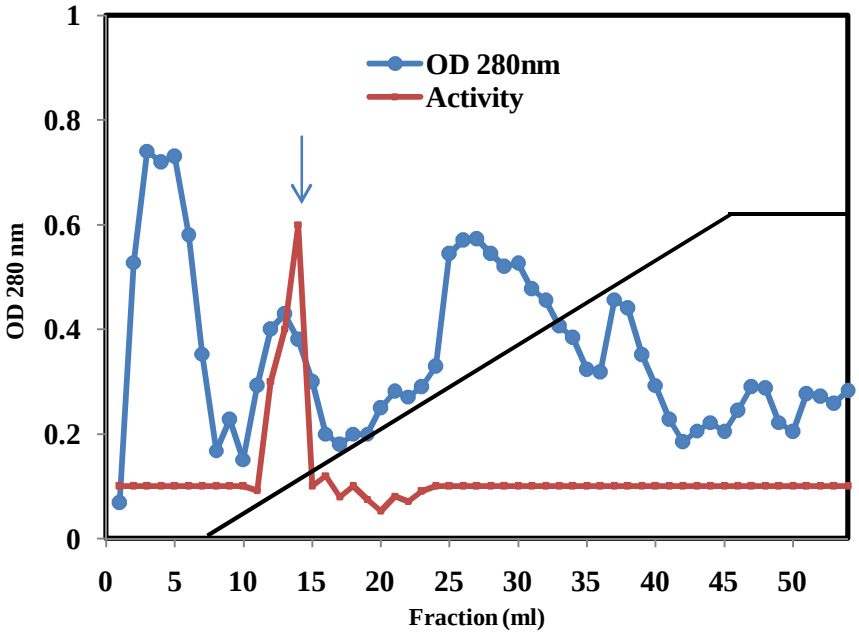
3-4-1- بررسی فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف

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 کم فعالیت پروتئازی کاهش یافت. این آنزیم در دماهای 30 و60 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 [۱۰،۱۹]. جو و همکارانش در سال 2005 یک پروتئاز قلیایی از *Bacillus clausii l-52* با دمای بهینه حدود 50-45 درجه سانتی‌گراد را گزارش نموده‌اند [16]. پروتئاز جدا شده از *B. Pumilus D-6* فعالیت بهینه خود را در 50 درجه سانتی‌گراد نشان داده است [14].



شکل 2 درخت فیلوژنی سویه باکتریایی *باسیلوس پومیلوس* KHB3 با استفاده از نرم‌افزار Mega 4



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

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

بالایی در دمای 50 درجه سلسیوس نشان داد ولی از دمای 50 تا 90 درجه سلسیوس پایداری کاهش یافت. این آنزیم در دمای 30 و60 درجه سلسیوس به ترتیب 45 درصد فعالیت خود را حفظ کرد (شکل 4).

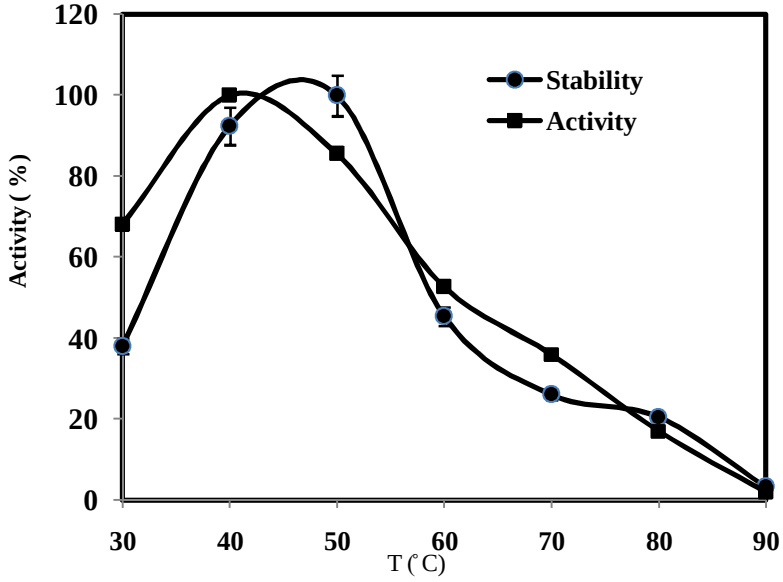
نتیجه مشابهی توسط پروتئاز جدا شده از *B. Pumilus D-6* با پایداری بهینه در دمای 40 درجه سانتی‌گراد نیز گزارش شده است [14]. یک پروتئاز تخلیص شده از *Bacillus brevis* با پایداری بهینه در دمای 55 درجه سانتی‌گراد نیز گزارش شده است [3]. پایداری بهینه پروتئاز *Bacilluse Sp. APR-4* در 50 درجه سانتی‌گراد نیز گزارش شده است [9].

3-4-2- اثر pH روی فعالیت پروتئاز

بررسی اثر pH روی فعالیت آنزیم پروتئاز در pHهای مختلف (12-3) با استفاده از یک بافر مخلوط در دمای 37 درجه به مدت 20 دقیقه انجام شد. فعالیت آنزیم 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 در10 pH حفظ کرده است (شکل 5).

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 قابل‌توجه می باشد. این ویژگی مهم برای استفاده از پروتئاز قلیایی به عنوان افزودنی مواد شوینده مهم می‌باشد زیرا مواد شوینده رختشویی به طور کلی در محدوده‌یpH 12-9 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 9-8 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 10-8 گزارش نمودند [23].

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



شکل 4 میزان فعالیت و پایداری پروتئاز KHB3 در دماهای مختلف

نتایج نشان می‌دهد که پایداری آنزیم KHB3 در pH9 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 *B. Licheniformis* BBRC 100053، مشخص شد که pH بهینه برای پایداری pHهای 8-7 می‌باشند [23].

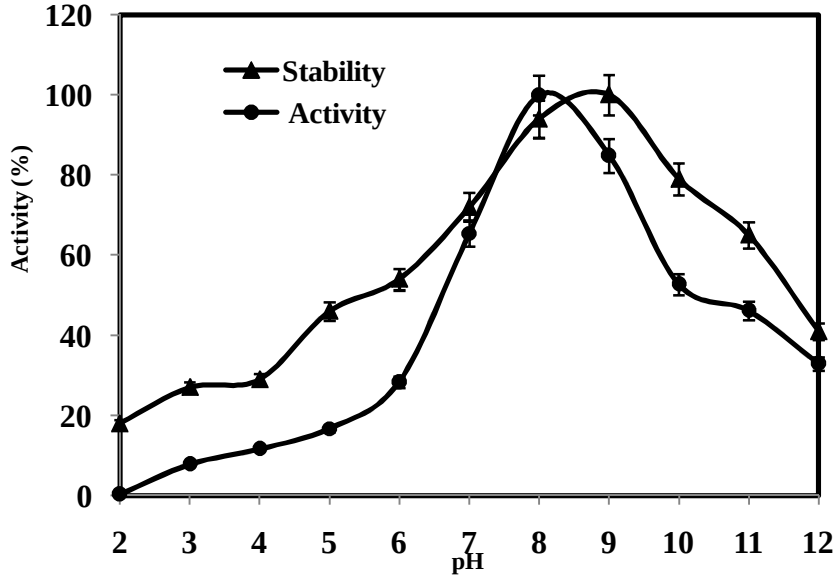
3-4-3- تعیین پارامترهای سینتیکی

تأثیر غلظت‌های مختلف کازئین (صفر تا 2 میلی‌مولار) به مدت20 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد. مقدار K_m و V_{max} آنزیم KHB3 طبق معادله لینویور- برک به ترتیب 2/67 mg/ml و 353 U/ml/min به دست آمد. مقدار K_m و V_{max} پروتئاز حاصل از *B. pseudofirmus SVB1* در غلظت های مختلف کازئین به ترتیب 1/83 mg/ml و 533/83U/ml/min برآورد شد. در گزارشی دیگر مقادیر K_m و V_{max} 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 تمایل مطلوب این آنزیم به سوبسترا و سرعت بالای کاتالیز آن دارد.

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

تأثیر یون‌های ZnSO4, CuSO4, FeSO4, MnSO4, MgSO4, CaCl2, CoCl2, HgCl2, KCl, NaCl و ترکیباتEDTA, H2O2, 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 FeSO4، H2O2 و MnSO4 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 ZnSO4و KCl مشابه فعالیت نمونه کنترل به دست آمد و در حضور ترکیبات EDTA، 2.M.E و T.X100 آنزیم به ترتیب حدود 87، 67 و 54 فعالیت خود را حفظ کرده است (جدول 1).



شکل 5 فعالیت و پایداری پروتئاز KHB3 در حضور pHهای مختلف

گزارش شده است که پروتئاز *Basillus 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, H2O2, 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, BaCl2, CuSO4, ZnCl2, HgCl2 باعث مهار پروتئاز *B. Laterospors* شده و همچنین در حضور یون‌های CoCl2, CaCl2 و MnSO4 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 MnSO4 ZnSO4, CuSO4, H2O2, EDTA, NaCl, HgCl2 FeSO4, KCl, T.X100, MgSO4, 2.M.E, CaCl2 بیشترین پایداری را نسبت به نمونه کنترل فاقد یون نشان داد و در حضور یون CoCl2 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].

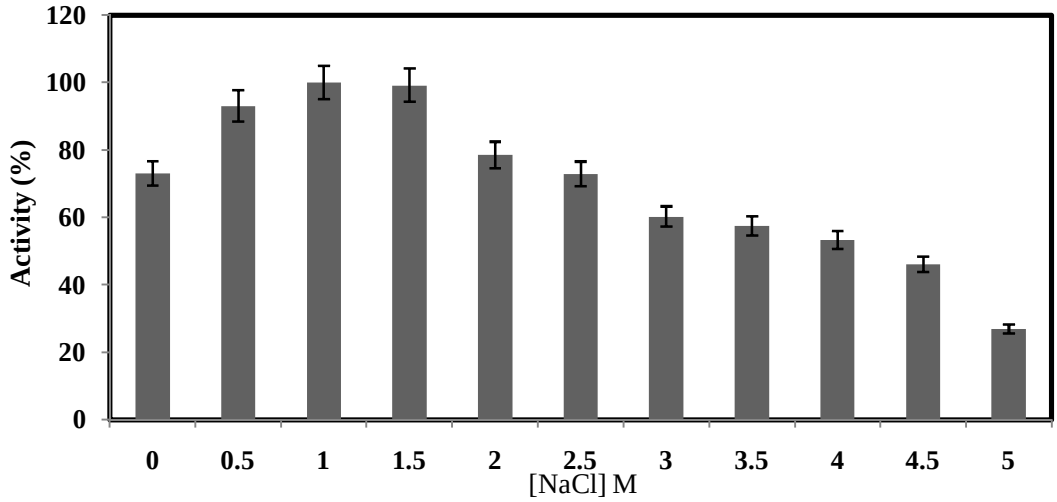
محمد ندیم و همکارانش در سال 2013 پروتئازی از *B. Licheniformi UV-9* را گزارش نمودند که در حضور 1% یون H_2O_2 و سدیم پربورات به ترتیب فعالیت باقی مانده-ای حدود 108 و 115 درصد نشان داد [21]. پروتئازهایی از *B. Clausii I-52, B. Mojavensis A21* گزارش شده است که در حضور 1% یون H_2O_2 به ترتیب فعالیت باقی 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، 0/5، 1/0، 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 KHB3فعالیت 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).



شکل 6 اثر غلظت‌های مختلف NaCl روی فعالیت پروتئاز KHB3

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 l-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 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 *SIU1* گزارش شده که در غلظت 10% مواد شوینده، فعالیت باقی مانده برای شوینده های Rin, Surf, Ariel, Wheel بین 8 تا 10 درصد می‌باشد. پروتئاز *B. Licheniformi PR1* 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.

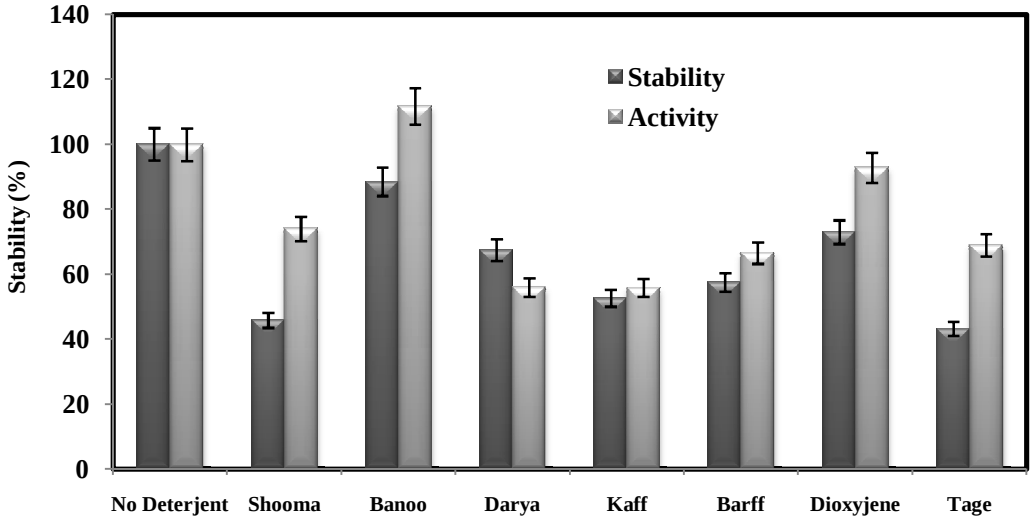
این آنزیم حدود 92 و 80 درصد از فعالیت اولیه خود را در حضور شوینده‌های Axio, Dixan حفظ کرده است [25]. سینگ و همکارانش در سال 2001 گزارش کردند که پروتئاز قلیایی از *Bacllus Sp. SSR1* فقط 37 درصد از فعالیت اولیه خود را پس از یک ساعت انکوباسیون در حضور شوینده آریل حفظ کرده است [25].

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

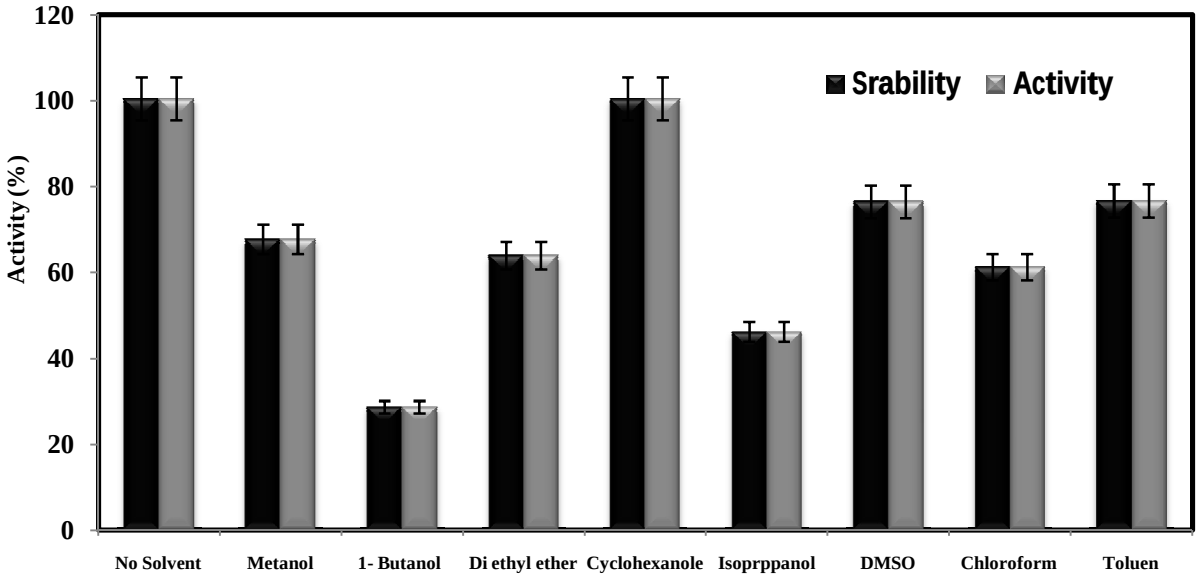
آنزیم KHB3، در حضور حلال‌آلی سیکلوهگزان فعالیتی مشابه فعالیت نمونه کنترل دارد و در حضور حلال آلی 1-بوتانول، حدود 30 درصد فعالیت را نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهد. آنزیم در حضور حلال‌های آلی تولوئن، DMSO، متانول، دی اتیل اتر و کلروفرم حدود 60 تا 80 درصد فعالیت خود را نسبت به نمونه بدون حلال حفظ کرده است (شکل 8). پروتئاز قلیایی مقاوم به حلال از سویه *B. Circulans MTCC 7942* از زیستگاه آلوده با هیدروکربن جدا شده که در حضور حلال های آلی تولوئن، استون، بوتانول، گزیلن، بنزن، سیکلوهگزان 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، سیکلوهگزانول، DMSO، کلروفرم و تولوئن) مورد بررسی قرار گرفت. پایداری آنزیم KHB3 در حضور حلال‌های آلی سیکلوهگزان مشابه نمونه کنترل فاقد حلال می‌باشد و آنزیم در حضور حلال آلی 1-بوتانل کمترین پایداری (30%) را نسبت به نمونه کنترل نشان داد. آنزیم در حضور حلال‌های آلی دی اتیل اتر، سیکلوهگزانول، 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 حلال 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

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, 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 gineering/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)

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 cereu*s 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.

[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.