مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره نهم، زمستان ۱۳۹۱

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی مقاومت پروتئاز حاصل از *سودوموناس آئروجینوزا* سویه PTCC1430 در حلال های آلی

افسانه صدر ممتاز[۱]، ساناز ابراهیمی[۱]، حسین رحمانی[۱] ، سید محسن اصغری*[۲]، محمود رضا آقامعالی[۲]، رضا حسن ساجدی[۳]

[۱] کارشناسی ارشد بیوشیمی،

[۲] استادیار بیوشیمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان

[۳] استادیار بیوشیمی گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

سابقه و هدف: پروتئازها کاربردهای مختلفی در حلال های آلی دارند و بنابراین پایداری آن ها در حلال های آلی از اهمیت زیادی برخوردار است. الاستاز حاصل از *سودوموناس آئروجینوزا* از جمله آنزیم های مقاوم به حلال های آلی است. در این تحقیق الاستاز بعد از خالص سازی به منظور تعیین فعالیت در حضور حلال های آلی مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی آنزیم الاستاز بیان و تخلیص شد. با رسم منحنی فعالیت آنزیم در غلظت های (V/V) ٪ ۷۰-۰ از حلال های آلی اتانول، متانول، ایزوپروپانول، دی متیل فرمامید، گلیسرول و اتیلن گلیکول بررسی گردید.

یافته ها: فعالیت الاستاز در حضور همه حلال های آلی مورد بررسی در مطالعه حاضر و در همه غلظت های بکار رفته، بجز اتانول، بسیار بالا و حتی بیش از کنترل بوده است. به عنوان نمونه در غلظت ۷۰ درصد متانول، DMF و گلیسرول میزان فعالیت آنزیم به ترتیب باندازه ۳/۵ ، ۱/۴ و ۱/۲ برابرحالت عدم حضور حلال آلی می باشد.

نتیجه گیری: بر خلاف اکثر آنزیم ها که در حضور حلال های آلی دچار کاهش فعالیت می شوند، تحقیق حاضر نیز به وضوح نشان می دهد میزان فعالیت الاستاز حتی در حضور حلال های آلی افزایش می یابد. این بدان معنی است که آنزیم الاستاز حاصل از سودوموناس آئروژینوزا نه تنها یک آنزیم مقاوم به حلال های آلی است بلکه برای عملکرد آن حتی محیط آلی-آبی می تواند ایده آل تر از محیط آبی باشد.

کلمات کلیدی: حلال آلی، متالوپروتئازها، الاستاز، فعالیت آنزیمی، پایداری

مقدمه

توانایی بالقوه پروتئازها به عنوان بیوکالیست ها به خوبی شناخته شده است (۴) . این آنزیم ها کاربردهای مختلفی در سنتز پپتید، پردازش پروتئین، صنایع غذائی، داروئی و دترژنت ها دارند (۱۲). این دسته از آنزیم ها پیوندهای پپتیدی را در محیط های آبی هیدرولیز کرده و همچنین در محیط های غیر آبی سنتز می کنند (۱،۳). پروتئازها به عنوان بیوکاتالیست برای سنتز پپتید نیاز به پایدار شدن در حضور برخی از حلال های آلی دارند (شکل۱) (۵،۶). واکنش های آنزیمی در حلال های آلی فواید صنعتی بسیاری (۷،۱۱) همچون افزایش حلالیت سوبستراهای غیر قطبی، برگشت معادله ترمودینامیکی واکنش های هیدرولیز، جلوگیری از واکنش های جانبی وابسته به آب، تناوب ویژگی سوبسترا و ویژگی فضایی آن و حذف و زدودن آلودگی های میکروبی را فراهم می آورد (شکل۲) (۳). روش های متنوعی جهت بهبود فعالیت و پایداری آنزیم ها برای کاربرد در حضور حلال های آلی به کار گرفته می شوند (۴). این روش ها شامل تثبیت آنزیم روی بسترهای محافظ غیر قابل حل، مودیفیکاسیون شیمیایی، تغییرات فیزیکی آنزیم ها با لیپیدها و سورفاکتانت ها، بدام اندازی آنزیم ها در میسل های

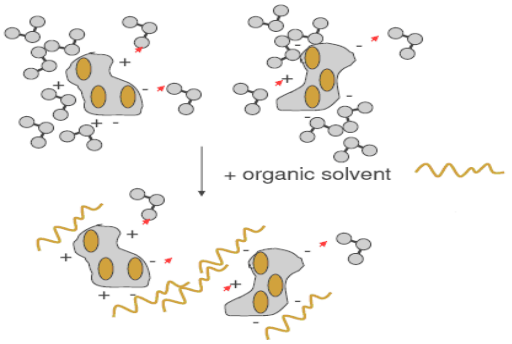
آدرس نویسنده مسئول: رشت، خیابان نامجو، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی. Email: sm_asghari@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۳/۱۱
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۴/۱۲

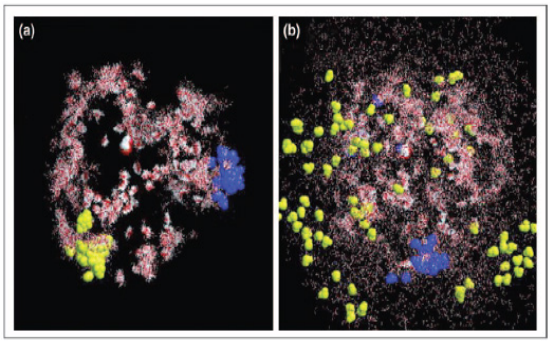
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.8.2]

برگشت پذیر و مهندسی پروتئین است (۸). یکی از رایج ترین روش ها جداسازی آنزیم های مقاوم به حلال های آلی از میزبان های طبیعی است (۴). در تحقیق حاضر نیز یک پروتئاز مقاوم (الاستاز حاصل از سودوموناس آئزوجینوزا) (۱۴) به حلال های آلی مورد خالص سازی و سپس تعیین خصوصیات بیوشیمیایی در حضور حلال های آلی قرار گرفت.



شکل ۱- حلال های آلی مولکول های آب متصل به پروتئین را جدا کرده و خود به جای آن ها قرار می گیرند. در نتیجه عملکرد پروتئین را تغییر می دهند.

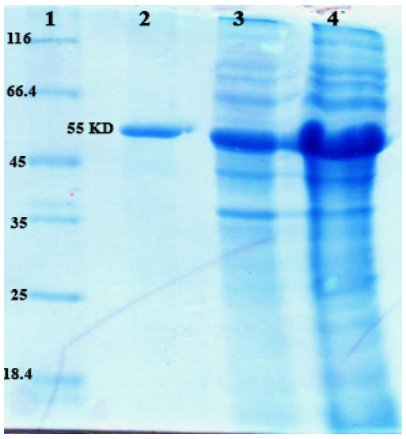


شکل۲- اثر حلال آلی روی آب دور پروتئین

مواد و روش ها

بیان و خالص سازی

در مطالعات قبلی ژن الاستاز حاصل از *Pseudomonas aeruginosa* سویه PTCC1430 در pET21a+ کلون شد و سپس در *E.coli* بیان گردید. در این تحقیق بهینه سازی تولید انجام گردید. بنابر نتایج بهینه سازی بهترین زمان برای بیان آنزیم ۱۰ ساعت، دمای بهینه جهت تولید آنزیم ۳۷ درجه سانتیگراد، غلظت بهینه IPTG برابر با ۱ میلی مولار تعیین گردید. سپس با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی با ستون نیکل- سفارز تخلیص انجام شد (۸). در این مرحله با استفاده از بافر شستشو سایر پروتئین ها از ستون عبور کرده و تنها پروتئین الاستاز به علت وجود دنباله هیستیدینی به ستون متصل می شود. در مرحله بعد به کمک بافر جدا کننده در حضور غلظت بالای ایمیدازول جداسازی انجام شد. نمونه های خالص شده روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بررسی شد (شکل۳). پروتئین های خالص شده سپس دیالیز شدند.



شکل۳- تخلیص آنزیم الاستاز. ۱) مارکر ۲) نمونه خالص سازی شده با ستون نیکل سفارز ۳) عصاره سلولی ۴) رسوب سلولی

بررسی مقاومت آنزیم در حلال های آلی

در پروتئین خالص در غلظت های (V/V) ٪۷۰-۰ از حلال های اتانول، متانول، ایزوپروپانول، گلیسرول، اتیلن گلیکول و دی متیل فرمامید تحت شرایط ثابت غلظت آنزیم تعیین فعالیت شدند. سوبسترای مورد استفاده کازئین (W/V ۱٪) و بافر مورد استفاده تریس ۲۰ میلی مولار با pH برابر با ۸ و زمان سنجش آنزیمی ۱۰ دقیقه بوده است. فعالیت آنزیم به صورت درصد فعالیت باقی مانده در مقایسه با کنترل (بدون حلال آلی) گزارش گردید (۱۳).

یافته ها

میزان فعالیت باقی مانده آنزیم الاستاز در حضور غلظت های مختلف حلال آلی اتانول، متانول، ایزوپروپانول، دی متیل فرمامید، گلیسرول و اتیلن گلیکول در مقایسه با حالت کنترل تعیین گردید (شکل۴) که نتایج آن در جدول ۱ آمده است و همچنین غلظتی از حلال آلی که ٪۵۰ فعالیت آنزیم در آن باقی

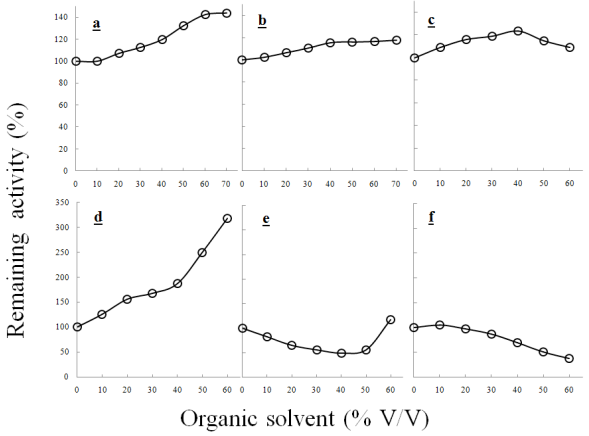
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.8.2]

می ماند (C_{50}) در مورد حلال اتانول بررسی گردید (شکل ۳-f) (۲). C_{50} اندازه گیری شده برای اتانول ۴۸ درصد تعیین گردید.

جدول ۱ – مقایسه فعالیت باقیمانده در حضور در صدهای مختلف حلال های آلی

نوع / درصد حلال	DMF	گلیسرول	اتیلن گلیکول	متانول	ایزوپروپانول	اتانول
٪۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
٪۱۰	۱۰۰	۱۰۲	۱۰۹	۱۲۵	۸۲	۱۰۵
٪۲۰	۱۰۸	۱۰۶	۱۱۶	۱۵۶	۶۵	۹۷
٪۳۰	۱۱۳	۱۱۱	۱۱۹	۱۶۸	۵۶	۸۷
٪۴۰	۱۲۰	۱۱۶	۱۲۴	۱۸۷	۴۹	۶۹
٪۵۰	۱۳۳	۱۱۶	۱۱۵	۲۵۰	۵۶	۵۰
٪۶۰	۱۴۳	۱۱۷	۱۰۹	۳۱۸	۱۱۷	۳۸
٪۷۰	۱۴۴	۱۱۸	۹۵	۳۲۰	۸۲	۳۰



شکل ۴- فعالیت باقیمانده الاستاز در حضور غلظت های مختلف حلال های آلی (a) دی متیل فرمامید، (b) گلیسرول، (c) اتیلن گلیکول ، (d) متانول، (e) ایزوپروپانول، (f) اتانول.

هیچ یک از حلال های آلی فعالیت آنزیم را از بین نبردند و فقط اتانول و ایزوپروپانول (در برخی غلظت ها) موجب کاهش فعالیت آنزیم شدند و در سایر موارد فعالیت افزایش یافته است.

بحث

همان گونه که در مطالعات قبلی نشان داده شده، تحقیق حاضر نیز به وضوح نشان می دهد که آنزیم الاستاز حاصل از سودوموناس آئروژینوزا یک آنزیم مقاوم به حلال آلی است آنچه در این تحقیق دیده می شود این است که در حضور حلال های آلی DMF (دی متیل فرمامید)، گلیسرول، اتیلن گلیکول و متانول در تمامی غلظت ها میزان فعالیت نسبت به حالت عدم حضور حلال آلی افزایش یافته است (۱۳). در مورد حلال های آلی دی متیل فرمامید، گلیسرول و به خصوص متانول این افزایش فعالیت به نحوی است که هر چه غلظت حلال آلی در محیط افزایش می یابد میزان فعالیت نیز بیشتر می گردد (۹). به نظر می رسد در این موارد حلال آلی نقش فعال کننده برای آنزیم دارد که البته اثبات چنین فرضی نیاز به آزمایشات تکمیلی دارد. اما در مورد حلال های آلی اتانول و ایزوپروپانول شرایط اندکی متفاوت است در حلال آلی ایزوپروپانول میزان فعالیت به تدریج از ۰ تا ۵۰٪ حلال آلی کاهش می یابد اما در غلظت ۶۰٪ مجددا فعالیت افزایش می یابد که این حالت در تکرارهای متوالی تایید شد. در حلال آلی اتانول هرچه غلظت حلال آلی افزایش می یابد میزان فعالیت کمتر می شود به نحوی که در حضور غلظت ۶۰٪(V/V) حلال میزان فعالیت تا کمتر از ۵۰٪(V/V) کاهش یافته و کمترین فعالیت در حضور این حلال مشاهده می گردد. جهت بررسی دقیق اثر حلال های آلی بر فعالیت و پایداری آنزیم ها لازم است به میزان قطبیت حلال ها توجه گردد. پارامتری که میزان قطبیت حلال های آلی را بطور کمی بیان می دارد LogP نام دارد که عبارت است از لگاریتم بر پایه ۱۰ ثابت تفکیک (P) که بعنوان نسبت غلظت حلال آلی به غلظت فاز آبی تعریف می شود:

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

هر چه میزان LogP بزرگتر باشد، میزان قطبیت حلال آلی کمتر است. بر اساس این تعریف LogP حلال های مورد استفاده در تحقیق حاضر بصورت اتانول< ایزوپروپانول< اتیلن گلیکول<گلیسرول<DMF>متانول می باشد. به عبارت دیگر ایزوپروپانول غیرقطبی ترین و گلیسرول قطبی ترین حلال مورد استفاده نسبت به آب است. بنابراین ارتباط مستقیم و مشخصی مابین قطبیت حلال آلی و مقاومت آنزیم به حلال آلی مشاهده نمی گردد. این در حالیست که پاژنگ و همکاران (۱۳) بیان داشته اند که در مورد آنزیم ترمولیزین هر چه LogP

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.8.2]

افزایش یابد مهار نیز بیشتر خواهد شد. از سوی دیگر یکی از ویژگی های الاستاز این است که در حضور طیف وسیعی از حلال آلی فعالیت آنزیمی بالا را نشان می دهد (۱۰). این فعالیت بالا از اهمیت کاربردی بسیاری برخوردار است چنانچه میزان فعالیت این آنزیم با آنزیم صنعتی ترمولیزین مقایسه گردد فعالیت بالای آنزیم الاستاز به خوبی آشکار می گردد (۱۱). چنانچه ترمولیزین در حضور غلظت ۴۰٪ حلال های آلی ایزوپروپانول ، دی متیل فرمامید و متانول به ترتیب در ۶، ۵، ۱۰ و ۱۶/۵٪ حلال آلی ۵۰٪ فعالیت خود را حفظ کرده است (۲). این تحقیق پیشنهاد می کند که الاستاز سودوموناس آئروجینوزا جایگزین بسیار مناسبی برای ترمولیزین جهت استفاده در حضور حلال های آلی به منظور کاربردهای صنعتی از جمله سنتز پپتید و آسپارتام می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله کمال تشکر را از آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده علوم پایه و معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان ابراز می دارند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.8.2]

منابع

(1) Asghari SM, Pazhang M, Ehtesham S, Karbalaei-Heidari HR, Taghdir M, Sadeghizadeh M, Naderi-Manesh H, Khajeh K. Remarkable improvements of a neutral protease activity and stability share the same structural origins. Protein Eng. Des. Sel. 2010; 23; 599-606.

(2) Badoei-Dalfard A, Khajeh K, Asghari SM, Ranjbar B. and Karbalaei-Heidari HR. Enhanced activity and stability in the presence of organic solvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. J Biochem. 2010;148; 231–238.

(3) Doukyu N, Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. Biochem. Eng. J. 2010; 48; 270-282.

(4) Gupta A, Khare SK. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresour. Technol. 2006; 97;1788–1793.

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

(6) Holland DR, Tronrud DE, Pley HW, K. M. Flahertykm, W. Starkw, J. N.Jansoniusjn, D. B. McKay DB and B. W. Matthews. Structural comparison suggests that thermolysin and related neutral proteases undergo hinge bending motion during catalysis. Biochemistry. 1992;31;11310-11316.

(7) Kessler E and Safrin M. Partial purification and characterization of an inactive precursor of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. J. Bacteriol. 1988;170;1215-1219.

(8) Leatherbarrow RJ and Fersht AR. Protein Engineering. Protein Engin. 1986;1;7-16.

(9) Ogino H, Watanabe F, Yamada M, Nakagawa S. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent tolerant *pseudomonas aeroginosa* PST-01. J. Biosci. Bioeng. 1998;87;61-68.

(10) Hiroyasu Ogino, Takeshi. Uchiho, Noriyuki. Doukyu, Masahiro. Yasuda, Kosaku. Ishimi and Harou. Ishikawa . Effect of exchange of amino acid residues of the surface region of the PST-01 protease on its organic solvent-stability. Biochem. Biophys. Res Commun. 2007;358;1028-1033.

(11) Adekoya OA, and Sylte I**.** The Thermolysin family (M4) of Enzyme :Therapeutic and biothechnological potential. Chem. Biol. Drug Des. 2009;73;7-16.

(12) Gupta MN, Roy I. Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. Eur. J. Biochem. 2004;271; 2575–2583.

(13) Mohammad Pazhang, Khosro Khajeh, Bijan Ranjbar and Saman Hosseinkhani. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. J. Biotechnol. 2006;127;45-53.

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

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.8.2]