دراسة بعض خواص أنزيم البروتياز القلوي المنتج من العزلة المحلية *Bacillus firmus* المعزولة من التربة

عبد الملك محمد عمران[1] و صياح أبو غرة[2]
و سحر خالد الفاهوم[3]

الملخص

تم إنتاج أنزيم البروتياز القلوي من عزلة محلية لبكتيريا العصوية *Bacillus firmus* المشخصة والمعزولة من ترب مختلفة من محافظة دمشق وريف دمشق (كلية الزراعة -حرستا -جديدة عرطوز) باستخدام وسط سائل مؤلف من: غلوكوز0.1 %، $(NH_4)_2HPO_4$ 1%، مسحوق فول الصويا منزوع الدهن 1%، والمحلول الملحي المتكون من K_2HPO_4 0.4 %، Na_2HPO_4 0.1 %، $CaCl_2$ 0.1 % ودرجة حموضة (pH) 9 ودرجة حرارة 35 مْ وزمن تخمر 48 ساعة وباستخدام الحاضنة الهزازة بسرعة 140 (دورة/دقيقة). ودُرست بعض خصائص الأنزيم حيث أظهر فعالية قصوى عند pH 9 وتراوحت درجة الحموضة المثلى للثبات بين pH 9 -12 مع ثباتية جيدة في مدى pH 6 -12، وكانت درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم 60 مْ، في حين تراوح المدى الحراري لثبات الأنزيم من 30 -80 مْ، أظهرت الدراسة ثبات الأنزيم تجاه SDS 5% H_2O_2 1% Tween 20 1%، وفوق بورات الصوديوم 2.5% مدة 24 ساعة، حيث احتفظ الأنزيم بقرابة 111.9%، 93%، 80% 81.6% من فعاليته على التوالي. كما أظهرت النتائج ارتفاع الفعالية الأنزيمية بنسبة 108%، 107.5%، 128.9%، 117% 111.6% بوجود بعض الأيونات المعدنية (5Mm) Mg^{+2} Ca^{+2} Zn^{+2} Cd^{+2} Co^{+2} وانخفاض الفعالية الأنزيمية إلى 48.7%، 82.9%، 74.8%، 79.8%، 70.4% بوجود بعض الأيونات Hg^{+2}، Mn^{+2} Cu^{+2} Fe^{+3} Al^{+3} على التوالي.

الكلمات المفتاحية: البروتياز القلوي، *Bacillus firmus*، خصائص الأنزيم.

[1] طالب دكتوراه [2] أستاذ مساعد، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، ص.ب. 30621، جامعة دمشق، سورية.
[3] أستاذ، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، سورية.

Study some properties of alkaline protease from the locally soil isolated *Bacillus firmus*

A. Amran[(1)] ; S. A. Ghurah[(2)] ; S Kh. Alfahoom[(3)]

ABSTRACT

Alkaline protease production from alocal isolate identified as *Bacillus firmus,* which had been isolated from different soils in Damascus area, and cultivated in liquid medium containing (w\v): Glucose 0.1%, $(NH_4)_2PO_4$ 1%, defatted soybean meal 1% and salt solution K_2HPO_4 0.4%, Na_2HPO_4 0.1%, $CaCl_2$ 0.1% .The pH of the medium was adjusted to 9 and maintained at 35c for 48 hours in a shaker incubator (140 rpm). The results revealed that the enzyme had an optimum pH of 9, maintained high stability between 9-12, and good stability between 6-12. Its optimum temperature was 60c, and exhibited stability between 30-80c. The alkaline protease showed stability towards SDS 5%, H_2O_2 1%, Tween 20 1%, sodium perborate 2.5% which retained its activity by 111.9 %, 93%, 80%, 81.6% respectively upon treatment for 24 hr. The enzyme activity was stimulated by 108%, 107.5%, 128.9%, 117%, 111.6% in presence of metal ions, such as Mg^{+2},Ca^{+2},Zn^{+2}, Cd^{+2},Co^{+2} respectively and decreased 48.7%, 82.9%,74.8%,79.8%,70.4% with ions like Hg^{+2}, $Mn^{+2}Al^{+3}$, Fe^{+3}, Cu^{+2} respectively.

Key Words: Alkaline protease, *Bacillus firmus*, Enzyme properties.

(1) Ph.D.Student.(2) Associate Prof., Food science department, Faculty of Agriculture, P.O.Box30621, Damascus University, Syria.
(3) Prof., Faculty of Pharmacy, Damascus University, Syria.

المقـــدمـــة

تعدُّ البروتيازات الميكروبية أهم الأنزيمات المحللة للبروتين (proteolytic enzymes) والتي درست بصورة مكثفة في مجال علم الأنزيمات، وهناك اهتمام متجدد ومتزايد في دراسة الأنزيمات المحللة للبروتين بصورة رئيسية كون هذه الأنزيمات تؤدي دوراً مهماً في عملية الاستقلاب داخل الخلايا وفي عملية تحلل البروتين خارج الخلايا لتمكين الخلية من امتصاص نواتج التحلل واستهلاكها إضافة إلى أهميتها في العديد من التطبيقات الصناعية كصناعة الأغذية والمنظفات والجلود والحرير ونواتج تحلل البروتين والمواد الصيدلانية ومعاملة الفضلات وغيرها من الصناعات (Gupta وآخرون، 2002a; Kalisz 1988).

وتعدُّ الأحياء الدقيقة مصدر جذب لإنتاج أنزيمات البروتياز بكميات كبيرة وبوقت قصير باستخدام طرائق تخمر مختلفة، وأنزيمات البروتياز الميكروبية خارجية بطبيعتها تفرز مباشرة إلى وسط التخمر من الكائن المنتج لها، وهذا بدوره يسهل عملية الإنتاج واستخلاص الأنزيم مقارنة بالبروتيازات ذات المصدر النباتي أو الحيواني، وتعدُّ الأنواع التابعة للجنس *Bacillus* المصدر الرئيسي لإنتاج أنزيمات البروتياز القلوية التي تتميز بثباتها وفعاليتها في مدى واسع من الـ pH ودرجة الحرارة وملاءمتها لظروف التصنيع المختلفة (Rao وآخرون،1998 ;Kumar و Tagakim, 1999).

أكد Gupta وآخرون (2002b) أن ثبات أنزيمات البروتياز القلوية وفعاليتها في مدى واسع من الـ pH (8 -12) ودرجات الحرارة 50 -70 مْ، ومدى توافق الأنزيم مع بعض المكونات التي تدخل في صناعة المنظفات يعدُّ من أهم المعايير الرئيسية المستخدمة في تقدير كفاءتها والتي تحدد مدى إمكان استخدامها في صناعة المنظفات ودباغة الجلود.

هذا وقد أسهمت أنزيمات البروتياز المختلفة التي تم الحصول عليها من الأحياء الدقيقة في الاستفادة من مخلفات المسالخ ومعامل الأسماك والمواد البروتينية الرخيصة لإنتاج نواتج تحلل بروتينية ذات قيمة غذائية عالية يمكن إضافتها إلى أعلاف الحيوانات أو البروتينات الأخرى لتحسين خواصها الوظيفية (Functional properties)، ومن الأنزيمات التي استغلت في إذابة بروتينات مختلفة كلحوم الأبقار والدجاج والأسماك وفول الصويا أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *Bacillus subtilis* الذي يحتفظ بفعالية جيدة ضمن مجال pH تراوح من 6.5 11 وهو ذو كفاءة عالية في إذابة البروتينات (Reed 1975 Parkin 1993).

ونظراً لقلة الدراسات المتعلقة بالأنزيمات وتطبيقاتها الصناعية في سورية فقد هدفت هذه الدراسة إلى إنتاج أنزيم البروتياز القلوي الخارجي من العزلة المحلية *Bacillus firmus* المعزولة من التربة ودراسة بعض خواص الأنزيم كتحديد ثبات

الأنزيم وفعاليته في pH ودرجات حرارة مختلفة، وتقدير فعالية الأنزيم في وجود بعض الأيونات المعدنية وتعيين ثبات الأنزيم بوجود بعض العوامل المؤكسدة والعوامل المؤثرة في التوتر السطحي لمعرفة إمكان استخدام الأنزيم في بعض التطبيقات الصناعية.

مواد البحث وطرائقه

العزل والتشخيص للبكتيريا

عُزلت عصيات ***Bacillus*** من أنواع من التربة جمعت من مناطق مختلفة في محافظة دمشق وريف دمشق (كلية الزراعة -حرستا -جديدة عرطوز). علقت عينات التربة في الماء المقطر بواقع 1غم إلى 9 مل ماءً مقطراً. عوملت بدرجة حرارة 80 مْ مدة 10 دقائق. زرعت العينات على وسط آغار الحليب الفرز (Skim milk agar) المتكون من 10% حليب فرز، 2% آغار (MacCance و Harrigan 1976). تم الحضن في درجة حرارة 37 مْ مدة 24 -48 ساعة. وعُدَّ ظهور هالة شفافة (clear zone) حول النمو دلالة على إنتاج أنزيم البروتياز. واعتماداً على حجم الهالة الشفافة اختيرت العزلة التي أعطت أكبر هالة شفافة ودُرست الصفات الظاهرية والكيمياحيوية لها لغرض تشخيصها واستخدم نظام API20E ونظام API50CHB وبعض الاختبارات الأخرى لتشخيص العزلة قيد الدراسة وتبين أنها *Bacillus firmus* وفقاً لما ورد في Claus و Berkely (1986).

إنتاج الأنزيم

(أُجريت التجارب بمعدل مكرر واحد ــ مكررين فقط)

استخدمت العزلة المحلية *Bacillus firmus* المشخصة والمنشطة مدة 24 ساعة في إنتاج أنزيم البروتياز القلوي باستخدام الوسط السائل المتكون من: غلوكوز0.1 % $(NH_4)_2HPO_4$ 1%، مسحوق فول الصويا منزوع الدهن 1%، والمحلول الملحي المتكون من K_2HPO_4 0.4 %، Na_2HPO_4 0.1 %، $Cacl_2$ 0.1 %، وفي درجة pH 9 ودرجة حرارة 35 مْ ومدة تخمر 48 ساعة باستخدام الحاضنة الهزازة (Shaker incubator) بسرعة 140(دورة/دقيقة). فُصلت الخلايا البكتيرية بالتثفيل بسرعة 10000rpm مدة 15 دقيقة ودرجة حرارة 4 مْ. استَخدم المحلول الرائق (supernatant) كمصدر للأنزيم الخام لإجراء الدراسات اللاحقة .

تقدير فعالية أنزيم البروتياز القلوي

قدرت فعالية أنزيم البروتياز القلوي حسب طريقة (Murachi, 1970) وتتلخص بإضافة 0.2 مل من مستخلص الأنزيم إلى 1.8 مل من محلول التفاعل المحتوي على

1% كازئين (مذاب في محلول موقي Tris pH 9). حضن المزيج في درجة حرارة 35 مْ مدة 10 دقائق، أوقف التفاعل بإضافة 3 مل من محلول حمض الخل ثلاثي الكلور TCA تركيز 5%. بعدها ثفل المحلول بسرعة 2500xg مدة 10 دقائق، ثم فصل الرائق بهدوء وتم قياس امتصاص الضوء على طول موجي 275nm. حضر محلول الشاهد (Blank) باتباع الخطوات السابقة نفسها عدا إضافة TCA إلى محلول التفاعل قبل إضافة الأنزيم. حسب التركيز المولي لمتحللات الكازئين الذائبة في TCA من المنحنى القياسي للتايروسين. وعّرفت وحدة الفعالية بأنها كمية الأنزيم التي تحرر 1 مايكرومول من التايروسين في الدقيقة الواحدة ضمن ظروف التجربة.

تعيين ثبات الأنزيم وفعاليته فيpH مختلف

تم قياس فعالية أنزيم البروتياز في pH مختلف (أذيب الكازئين 1% في محاليل موقية ذات pH مختلف) استخدم أولاً موقي السترات: الفوسفات (6 pH)، موقي الفوسفات 0.2M (pH 7, 8,12)، ثانياً محلول موقي غلا يسين - ماءات الصوديوم glycine – NaOH (pH 10,11)، موقي Tris pH 9) بعدها قُدرت الفعالية الأنزيمية بحضن خليط التفاعل في درجة حرارة 35 مْ ومدة 10 دقائق.

عُينت الثباتية بإضافة 1 مل من محلول الأنزيم إلى 2 مل من الموقي في درجات pH مختلفة تراوحت من 6 -13 حيث استخدم موقي السترات: الفوسفات (6 pH)، موقي الفوسفات 0.2 M (pH 7, 8,12)، موقي غلا يسين - ماءات الصوديوم –glycine NaOH (pH 10,11,13)، موقيTris (pH 9) مدة حضن ساعة واحدة في درجة حرارة 37 مْ، وقُدرت الفعالية الأنزيمية المتبقية (Residual activity). (Mosbach 1987).

تعيين ثبات الأنزيم وفعاليته في درجات حرارة مختلفة

قُدرت فعالية أنزيم البروتياز القلوي وذلك بحضن خليط التفاعل في درجات حرارة مختلفة تراوحت من 30 مْ إلى 70 مْ مدة 10 دقائق ثم قدرت الفعالية الأنزيمية.

عُيّن ثبات الأنزيم بحضن محلول الأنزيم الخام في درجات حرارة مختلفة تراوحت من30 -90 مْ مدة 20 دقيقة، ثم نقلت الأنابيب إلى حمام ثلجي لإيقاف التفاعل، وقُدرت الفعالية الأنزيمية المتبقية(Barfoed 1983).

قياس فعالية الأنزيم بوجود بعض الأيونات المعدنية

دُرس تأثير الأيونات المعدنية (على هيئة كلوريدات) الآتية Mn^{+2} Na^{+} Mg^{+2} Ca^{+2} Al^{+3} Fe^{+3} Hg^{+2} Cu^{+2} Co^{+2} Cd^{+2} Ca^{+2} Zn^{+2} في الفعالية الأنزيمية بإضافتها بتركيز 5mM إلى خليط التفاعل وتم قياس الفعالية الأنزيمية المتبقية.

ثبات الأنزيم بوجود بعض العوامل المؤكسدة وبعض العوامل المؤثرة على التوتر السطحي (Oxidizing and Surfactant agents)

حُضن محلول الأنزيم مع بعض العوامل المؤكسدة وبعض العوامل المؤثرة في التوتر السطحي وبتراكيز مختلفة (Tween 20 H_2O_2 (SDS) Sodium dodecyl sulphate) Sodium perborate) مدة 24 ساعة وفي درجة حرارة 4 مْ ثم قُدرت الفعالية الأنزيمية المتبقية.

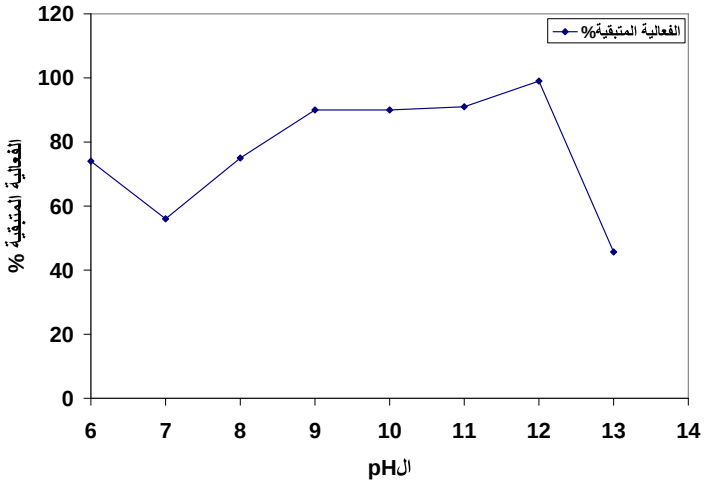
النتائج والمناقشة

العزلة المحلية *Bacillus firmus* عند تنميتها على وسط اغار الحليب الفرز مدة 48 ساعة ودرجة حرارة37 مْ

ثبات أنزيم البروتياز القلوي وفعاليته فيpH مختلف

درست ثباتية أنزيم البروتياز القلوي المستحصل عليه في هذه الدراسة في درجات pH مختلفة 6 -13 وتراوح ال pH الأمثل لثبات الأنزيم بين 9 -12 الشكل (1) حيث احتفظ الأنزيم بقرابة 90 - 99 % من فعاليته في هذا المدى، ولوحظ حدوث انخفاض في ثبات الأنزيم عند درجات الـ pH المتعادلة والحامضية والقلوية التي تبعد عن هذا المدى ويعزى سبب هذا الانخفاض إلى تأثير الـ pH في تركيب جزيئة الأنزيم، والذي يؤدي إلى حدوث تغير في التركيب الثلاثي للبروتين وقد يحدث مسخ لا عكسي للأنزيم في المحاليل الحامضية والقلوية المتطرفة (Fersht 1984). كما أن انخفاض الـ pH يؤدي إلى حدوث تغير في تركيب الأنزيم وتأين المجموعات الموجودة في الموقع الفعال للأنزيم (Segel، 1976). وقد يعزى انخفاض فعالية أنزيمات البروتياز القلوية بالدرجة الرئيسية عند ارتفاع ال pH عن الحدود المثلى للثبات إلى الهضم الذاتي للأنزيم (Autodigestion) ورغم حدوث انخفاض في فعالية الأنزيم في درجات الـpH التي تقع خارج الحدود المثلى لثباته إلا أنه بقي محتفظاً بما يقارب 74 -75 % من فعاليته عند درجات الـ pH المنخفضة (6،7)، ويدل ذلك على أن الأنزيم له مدى ثبات واسع من القيم الحامضية إلى

القلوية مما يكسبه ميزة مهمة في التطبيقات الصناعية إذ يمكن استخدامه ضمن هذا المدى مع ضمان احتفاظه بنسبة جيدة من فعاليته. وهناك العديد من الدراسات التي تناولت توصيف أنزيمات البروتياز وتحديد الـ pH الأمثل للثبات حيث تختلف ثباتية الأنزيم باختلاف السلالات المنتجة إذ وجد Singh وآخرون (1999) أن أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *B.sphaericus* أظهر ثباتاً ضمن مجال pH تراوح بين 8.5 -11.5 إذ احتفظ هذا الأنزيم بأكثر من 70 % من فعاليته عند هذا المدى وبدرجة حرارة 37 مْ مدة ساعة واحدة. في حين أظهرت نتائج Shimogaki وآخرين (1991) أن درجات الpH المثلى لثبات أنزيم البروتياز القلوي المستحصل عليه من بكتيريا *Bacillus sp.* كانت 6 - 13 عند درجة حرارة 35 مْ مدة 24 ساعة وأن البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *Bacillus sp.*noAH-101 بقي محتفظاً بكامل فعاليته ضمن مجال pH تراوح من 5 -13.

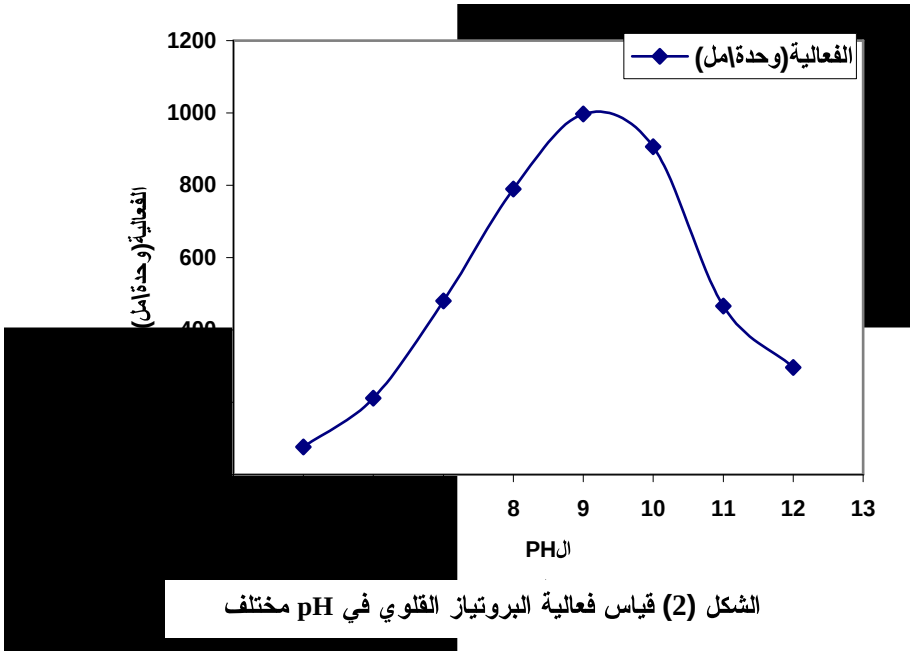


الشكل (1) ثبات أنزيم البروتيز القلوي في pH مختلف

وفي درجة حرارة 60 مْ مدة 10 دقائق (Takami وآخرون، 1989). في حين أشار Kaur وآخرون (2001) إلى أن أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *Bacillus sp.*P-2 احتفظ بقرابة 80% من فعاليته في مدى من الـpH 7 -10. في حين احتفظ أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا*Bacillus.subtilis* PE-11 بكامل فعاليته عند مدى من الـ pH 8 -10 (Adinarayana وآخرون، 2003).

يوضح الشكل (2) الـPh الأمثل لفعالية أنزيم البروتياز القلوي المنتج من العزلة *Bacillus firmus* إذ وجد أن الفعالية تزداد بزيادة الـ pH إلى أن تصل أقصاها عند pH 9. ويلاحظ انخفاض في الفعالية الأنزيمية عند درجات الـpH الحامضية والقلوية البعيدة

عن الحد الأمثل لفعالية الأنزيم ويعود سبب هذا الانخفاض إلى تأثير الـ pH لوسط التفاعل في مجموعات معينة قابلة للتأين توجد في الأنزيم وفي مادة الركيزة وفي معقد الأنزيم الركيزة، ومعقد الأنزيم - الناتج، والتي تؤثر في ارتباط الركيزة أو تحولها إلى الناتج، وفي ثبات الأنزيم (Parkin 1993).



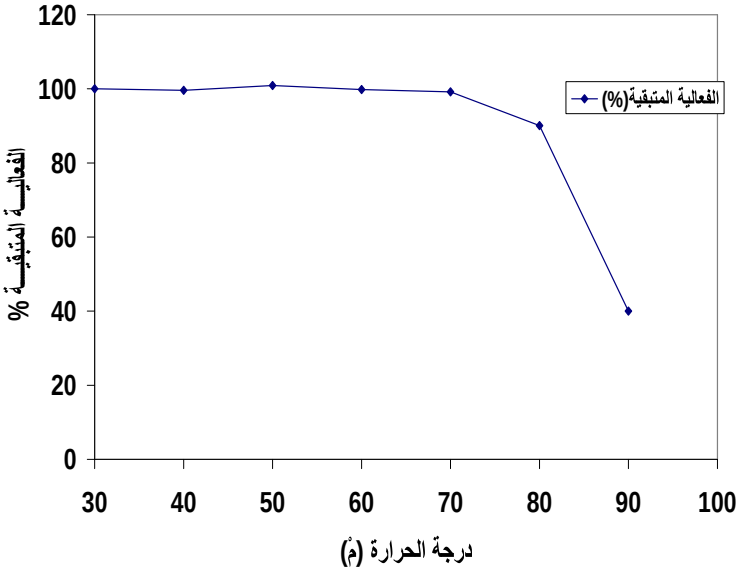
الشكل (2) قياس فعالية البروتياز القلوي في pH مختلف

في حين وجد Singh وآخرون (1999) أن أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *B.sphaericus* يمتلك أقصى فعالية عند pH 10.5، في حين وجد أن الـ pH الأمثل لفعالية أنزيم البروتياز المنتج من بكتيريا *B.subtilis* كان 8 (Yang وآخرون، 2000). كذلك أظهرت نتائج Nascimento و martins (2004) أن أنزيم البروتياز المنتج من بكتيريا *Bacillus* sp. المحبة للحرارة أظهر أعلى فعالية عند pH 8. في حين أظهرت نتائج Joo وآخرين (2003) أن الـ pH الأمثل لفعالية أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *Bacillus clausii* كان 11.

ثبات الأنزيم وفعاليته في درجات حرارة مختلفة

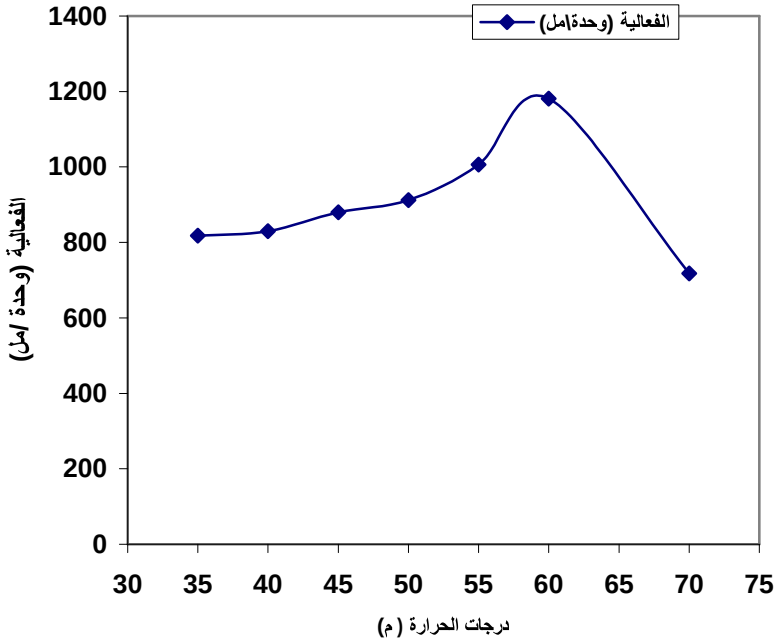
يلاحظ من الشكل (3) أن أنزيم البروتياز القلوي احتفظ بكامل فعاليته تقريباً عند حضنه في درجة حرارة 30 -70مْ مدة 20 دقيقة، ثم بدأت الفعالية بالانخفاض مع ارتفاع درجة الحرارة عن 70مْ وهو ما يلاحظ عموماً في معظم أنواع الأنزيمات إذ تكون هذه الأنزيمات أكثر ثباتاً في درجات الحرارة المنخفضة، لذا يفضل حفظها في درجات حرارة منخفضة للمحافظة على فعاليتها، وتختلف حساسية الأنزيمات تجاه الحرارة فبعضها شديد الحساسية إذ تفقد فعاليتها في درجة حرارة 35 مْ كأنزيم الكاتلاز المستخلص من كبد الأبقار (Godfrey 1983). وبعضها يبقى فعالاً عدة دقائق في درجة 100مْ كأنزيم الريبونيوكليز ولبعض صفات الأنزيم كوزنه الجزيئي ومدى تعقيده (Complexity of enzyme) علاقة بحساسية الأنزيم تجاه الحرارة، فغالباً ما تكون الأنزيمات ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة المتكونة من سلسلة ببتيدية واحدة والمحتوية على روابط الكبريت الثنائية (S-S bond) أكثر ثباتاً في درجات الحرارة العالية من الأنزيمات المعقدة ذات الأوزان الجزيئية العالية، ويسهم تركيب الوسط المحيط في تعزيز حساسية الأنزيمات أو انخفاضها تجاه الحرارة كال pH ووجود مواد أخرى مع الأنزيم (Segel 1976).

إن انخفاض فعالية الأنزيم قيد الدراسة عند حضنه في درجات حرارة أعلى من 70 مْ يأتي نتيجة تأثير الحرارة في التركيب الثلاثي للبروتين، وتتباين أنزيمات البروتياز المنتجة من سلالات مختلفة في ثباتها تجاه درجات الحرارة العالية إذ بقي أنزيم البروتياز المنتج من بكتيريا *B.stearothermophilus* F1 محتفظا بكامل فعاليته عند حضنه في درجة حرارة 70 75 80مْ مدة 15 دقيقة عند (pH) 9 (Abd-Rhman وآخرين، 1994). وجد Yang وآخرون (2000) أن أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *B.subtilis* احتفظ بفعاليته عند درجة حرارة 25 -50 مْ كما احتفظ أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *B.pumilus* بـ 100% من فعاليته عند درجة حرارة 45 مْ مدة 30 دقيقة(Feng وآخرون، 2001).



الشكل (3) الثبات الحراري لأنزيم البروتيز القلوي المنتج من العزلة المحلية *Bacillus firmus*.

دُرس تأثير درجات حرارة مختلفة في فعالية الأنزيم، وجرى التفاعل الأنزيمي في درجات حرارة تراوحت بين 35 - 70 مْ ولوحظت زيادة في فعالية الأنزيم مع ارتفاع درجة الحرارة حتى درجة حرارة 60 مْ، حيث بلغت الفعالية الأنزيمية 1181 وحدة /مل (الشكل 4)، ويعزى ذلك إلى أن سرعة التفاعل الأنزيمي تزداد بزيادة درجة الحرارة ضمن مدى معين بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات؛ مما يؤدي إلى زيادة التصادمات بين جزيئات الأنزيم والركيزة. كما لوحظ انخفاض في الفعالية الأنزيمية بزيادة درجة الحرارة عن 60 مْ وسبب هذا الانخفاض يعود إلى أن الارتفاع في درجة الحرارة يؤدي إلى تغير في تركيب الأنزيم نتيجة تأثير الحرارة في البنية الثالثية للبروتين وإلى تغير في تركيب الموقع الفعال للأنزيم؛ مما يؤدي إلى تناقص في فاعليته (Parkin 1993). ويختلف تأثير درجة الحرارة في البروتيازات باختلاف السلالات المنتجة فقد وجد Singh وآخرون (1999) أن البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *B.sphaericus* أظهر أعلى فعالية عند درجة حرارة 50 - 55 مْ، في حين أشار Yang وآخرون (2000) إلى أن أعلى فعالية لأنزيم البروتياز المنتج من بكتيريا *B.subtilis* كانت 50 مْ .



الشكل (4) قياس فعالية أنزيم البروتياز في درجات حرارة مختلفة

ثبات الأنزيم بوجود بعض العوامل المؤكسدة والعوامل المؤثرة على التوتر السطحي

أظهرت نتائج دراسة ثبات أنزيم البروتياز القلوي بوجود بعض العوامل المؤكسدة مثل H_2O_2 Sodium perborate وبعض العوامل المؤثرة في التوتر السطحي غير الأيونية Tween 20، والأيونية SDS التي تدخل في تركيب أنواع مختلفة من المنظفات (جدول1) حدوث انخفاض الفعالية الأنزيمية إلى 55% وارتفاع فعالية الأنزيم إلى 111.9% بوجود SDS عند تركيز 1%، 5% على التوالي. وقد يعزى انخفاض الفعالية إلى حدوث تغير في التركيب الثلاثي للبروتين في حين قد يعزى ارتفاع الفعالية الأنزيمية عند تركيز 5% إلى إمكان ارتباط هذه المادة مع المثبطات الطبيعية الموجودة في المستحضر الأنزيمي الخام والتي من الممكن أن تثبط فعالية الأنزيم (Whitaker 1972). في حين احتفظ الأنزيم بقرابة 80% من فعاليته عند 1% Tween20 60 -93 % من الفعالية الأنزيمية بوجود بعض العوامل المؤكسدة القوية، وفقد الأنزيم 40 % من الفعالية الأنزيمية بوجود 5 % H_2O_2. وهذه النتائج تختلف وتتوافق مع العديد من الدراسات حيث أشار Kobayashi وآخرون (1995) إلى احتفاظ أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا

Bacillus sp.KSM-K16 بقرابة 75% من فعاليته بوجود 5% SDS مدة 4 ساعات. كذلك احتفظ أنزيم subtilisin-like protease المنتج من *Bacillus* sp.KSM-KP43 بكامل فعاليته تقريباً عند 10% H_2O_2 مدة 30 دقيقة (Saeki وآخرون،2002). في حين احتفظ أنزيم البروتياز القلوي المنتج من *B.clausii* بقرابة 75%، 110% من فعاليته بوجود 5% SDS و10% H_2O_2 على التوالي 103.4% من فعاليته بوجود 2.5% Sodium perborate (Joo وآخرون، 2003).

الجدول(1) ثبات أنزيم البروتياز القلوي بوجود بعض العوامل المؤكسدة والمؤثرة في التوتر السطحي مدة 24 ساعة.

العوامل المؤكسدة المؤثرة في التوتر السطحي	الفعالية الأنزيمية المتبقية % (Remaining enzyme activity)
Control	100
SDS 1%	55
SDS 5%	111.9
H_2O_2 1%	93
H_2O_2 5%	60
Tween 20 1%	80
Soduim perborate 1%	90
Soduim perborate 2.5%	81.6

تأثير الأيونات المعدنية في فعالية الأنزيم

يلاحظ من الجدول (2) تأثير الأيونات المعدنية في فعالية أنزيم البروتياز القلوي إذ لوحظ ارتفاع في فعالية الأنزيم بوجود الأيونات Mg^{+2} Zn^{+2} Cd^{+2} Co^{+2} Ca^{+2} بنسبة 108%، 128.9%، 117%، 111.6%، 107.5% على التوالي، في حين لم يظهر تأثير منشط لأيون Na^{+} حيث احتفظ الأنزيم بكامل فعاليته تقريباً 99.7% وكان لبعضها تأثير مثبط بنسب متفاوتة كما في أيونات الزئبق التي أدت إلى تثبيط وانخفاض واضح في فعالية الأنزيم إلى 48.7% كما انخفضت الفعالية إلى 82.9% 74.8% 79.8% 70.4% عند إضافة الأيونات Mn^{+2} Al^{+3}، Fe^{+3} Cu^{+2} على التوالي. يمكن تفسير الارتفاع في الفعالية الأنزيمية إلى دور بعض الأيونات التي تدخل في تركيب بعض الأنزيمات (Cofactor) أما الانخفاض الملاحظ في فعالية الأنزيم فقد يعزى ذلك إلى أن الأيونات الفلزية تؤثر في تركيب الأنزيم أو في موقعه الفعال فأيونات الفلزات الثقيلة كالزئبق والنحاس لها تأثير مثبط لا تنافسي (None-competitive inhibition) لبعض الأيونات. كما تشير النتائج إلى تأثير أيونات هذه الفلزات في الأنزيم من جهة وفي الركيزة من جهة أخرى بتكوين معقدات مع البروتين مما قد يؤدي إلى إعاقة ارتباط الأنزيم بالركيزة (Mahler وCodes 1971; Gupta وآخرون، 2002b).

وتتباين أنزيمات البروتياز المختلفة في مدى تأثير الأيونات في فعاليتها فقد وجد Adinarayana وآخرون (2003) أن فعالية أنزيم البروتياز القلوي المنتج من بكتيريا *B.subtilis* PE-11 ازدادت بوجود الأيونات Zn^{+2} Al^{+3} Cu^{+2} Cd^{+2}. في حين أظهرت نتائج Nascimento و Martins (2004) حدوث تثبيط وانخفاض في فعالية البروتياز المنتج من بكتيريا *Bacillus sp.* بوجود أيونات Zn^{+2} Cu^{+2} وحدث تثبيط كامل للأنزيم بوجود أيون Hg^{+2} في حين ارتفعت الفعالية بوجود الأيونات Cd^{+2} Mn^{+2} .

الجدول (2) تأثير الأيونات المعدنية (5Mm) في فعالية انزيم البروتياز القلوي المنتج من العزلة المحلية*Bacillus firmus* .

الأيونات المعدنية	الفعالية الأنزيمية المتبقية %
Control	100
Mg^{+2}	108
Ca^{+2}	107.5
Na^{+}	99.7
Mn^{+2}	82.9
Zn^{+2}	128.9
Al^{+3}	74.8
Fe^{+3}	79.8
Hg^{+2}	48.7
Cd^{+2}	117
Co^{+2}	111.6
Cu^{+2}	70.4

الاستنتاجات

بينت نتائج الدراسة أن أنزيم البروتياز المنتج من العزلة المحلية *Bacillus firmus* أظهر أعلى فعالية في ظروف قلوية وفي ارتفاع الحرارة، كما أظهر الأنزيم ثباتية عالية في مدى واسع من درجة الحرارة والـpH، وتبين من خلال الدراسة ثبات الأنزيم تجاه بعض المواد المؤكسدة والمؤثرة على التوتر السطحي التي تدخل في تركيب العديد من المنظفات، كما تبين من النتائج ارتفاع الفعالية الأنزيمية وانخفاضها بوجود بعض الأيونات المعدنية؛ مما يسمح بإمكان استخدام الأنزيم في العديد من التطبيقات الصناعية مثل صناعة المنظفات ودباغة الجلود وتحضير المتحللات البروتينية (Protein hydrolysates) وغيرها من الصناعات.

REFERENCES

Abd-Rhaman, R. N.; Razak, C. N.; Ampon, K.; Basri, M. Yunus, W. M. and Salleh, A. (1994). Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *B.stearothermophilus* F1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:822-827.

Adinarayana, K.; P. Elijah and D. Prasad. (2003). Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. Apps. Pharm.Sci.Tech.; 4 (4) Article 56.

Barfoed, H. C. (1983). Detergent .In:Industerial enzymology .(Eds. Godfrey, T. and Reichelt,T.) pp.284-293.The Nature Press.New York.

Claus, D. and R. C. W. Berkeley. (1986). Genus Bacillus In: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2 (ed.Sneath,P.H.A.). The Williams and Wilkins Company Baltimore.

Feng, Y. Y.; W. B. Yang; S. L. Ong; Y. HuJ and W. J. Ng. (2001). Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:153-160.

Fersht, A. (1984). Enzyme structure and mechanism. W. H. Freeman and Company New York.

Gupta, R.; Beg, Q. K. and P. Lorenz. (2002a). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.Appl.Microbiol. Biotechnol. 59:15-35.

Gupta, R.; Beg, Q. K.; Khan, S. and B. Chauhan. (2002b). An overview onfermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline protease. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:381-395.

Godfrey, T. (1983). Comparison of key characteristics of industrial enzymes type and source.In:Industrial enzymology (eds.T.Godfrey and J.Reichelt), pp:466-502.The Nature Press.

Harrigan, M. F. and MacCance, M. E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press New York.

Joo, H. S, Kumar, C. G., Park, G. C., Paik and Chang, C. S. (2003). Oxidant and SDS-stable alkaline protease from Bacillus clausii 1-52: production and some properties. J. Appl. Microbiol. 95:267-272.

Kalisz, H. M. (1988). Microbial proteinases. dv. Biochem. Engin. Biotechnol. 36:1-56.

Kaur, S.; Vohra, R. M.; Kapoor, M.; Beg, Q. 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.

Kumar, C. G. and Tagaki, H.(1999). Microbial alkaline proteases:from a bioindustrial Viewpoint. Biotechnology Advances 17:561-594.

Mahler, H. R. and Cordes,E. A. (1971). Biological chemistry. Harper and Row Publisher. New York.

Mosbach, K. (1987). Methods in enzymology. Vol. 135:Academic Press.New York.

Murachi, T. (1970). B romelain enzymes .In:Methods in enzymology (eds. G. E. Perlman and L.Lorand) Vol.19:273-284. Academic Press New York.

Nascimento, W. C. and M. L. Martins (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp*.Brazilian J. Microbiol. 35:91-96.

Parkin, K. L. (1993).Environmental effects on enzyme activity .In:Enzymes in food processing (3eds.Nagodawithana,T.and Reed,G.).Academic Press Inc.New York.

Rao, M. B.; A. M. Tanksale; M. S. Ghatge and F. Deshpande.(1998).Molecular and biotechnology aspects of microbial proteases. Microbiol.Molecul. Biol.Rev.63(3):597-635.

Reed, G. (1975). Enzymes in food processing .Academic Press .New York.

Saeki, K.,Hitomi, J., Okuda, M., Hatada, Y., Kageyama, Y., Takaiwa, M., Kubota, H., Hagihara, H., Kobayashi, T., Kawai, S. and Ito, S.(2002). A novel species of alkalophilic *Bacillus* that produces an oxidativley stable alkaline serine protease. Extremophiles 6:65-72.

Segel, I. H. (1976). Biochemical Calculations, John Wiley and Sons.Inc.New York.

Shimogaki, H.; Takeuchi, K.; Nishino,T; Ohdera, M.;Kudo,T.; Ohba, K.; Iwama, M. and Irie, M. (1991). Purification and properties of a novel surface-active agent-and alkaline resistant protease from *Bacillus sp*. Y. Agric. Biol. Chem. 55:2251-2258.

Singh,J.; R. M. Vohra and P. K. Sahoo. (1999). Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *B.sphaericus*. Biotechnol.Lett.21:921-924.

Takami, H.; Akiba, T. and Horikoshi, K. (1989). Production of extremely thermostable alkaline protease from Bacillus sp.no.AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol.30:120-124.

Whitaker, J. R. and P. E. Granum. (1972). Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker,INC.New York.

Yang, S.; I. Shih, Y. Tzeng and S. Wang. (2000).Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme Microbial Technol.26:406-413.

Received	2005/06/12	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2005/08/08	قبول البحث للنشر