... حزيران 2005، ص 12-18

العلوم

تنقية وتوصيف أنزيم البروتييز القاعدي من بكتريا *B.stearothermophilus* المنتج بوساطة تخمرات الحالة الصلبة

عصام فاضل الجميلي، أسماء وليد داود

فرع التقنية الاحيائية، معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد

الخلاصة

تمت تنقية أنزيم البروتييز المنتج من العزلة المحلية *B. stearothermophilus AEAL2* بخطوات عدة تضمنت الترسيب بكبريتات الأمونيوم وكروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل الأيوني ثنائي اثيل أمينو اثيل - سليلوز (DEAE-Cellulose) والترشيح الهلامي في عمود سيفاروز 6B (Sepharose-6B) إذ تم فصل نوعين من البروتييزات وهي Protease I و Protease II وكانت عدد مرات التنقية 5.9 و 9.8 وحصيلة انزيمية 13 و 37 على التوالي. اختبرت نقاوة الانزيمين I و II باستخدام الترحيل الكهربائي الهلامي بوجود المواد المختزلة وقد بلغ الوزن الجزيئي حوالي 56234 و 69502 دالتون على التوالي و 13182 و 20892 دالتون عند تقديره بطريقة الترشيح الهلامي. أما الأرقام الهيدروجينية المثلى لفعالية الانزيمين تجاه الكازين 7 و 10 وتراوح الرقم الهيدروجيني الأمثل لثباتيتهما بين (6.5-7.5) و (8-10) على التوالي. احتفظ كل من البروتييز I و II بكامل فعاليتهما عند 60 و 60-65 °م ولمدة 15 دقيقة.

المقدمة

تشكل أنزيمات البروتييز أهمية صناعية كبيرة وتمثل نسبة 60% من الاستخدامات الصناعية للانزيمات المختلفة إذ يبلغ انتاج أنزيمات البروتييز من المصادر المايكروبية مئات الأطنان المستخلصة من بكتريا الـ *Bacillus* (1).

تمت تنقية انزيم Collagenolytic protease من بكتريا *Bacillus sp.* Mo-1 بعدة خطوات وشملت كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام DEAE-cellulose وفي الخطوة الأخيرة استخدم عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-300 HR وقد تم الحصول على حزمة بروتينية واحدة على هلام الأكريلامايد بوجود الـ SDS (2).

كذلك نقي انزيم البروتييز المنتج من *B. thermoruber* بعد التجزئة باستخدام كبريتات الأمونيوم ثم عمود DEAE-sephadex A-50 ثم عمود كروماتوغرافيا الألفة باستخدام α- Casein agarose بحصيلة انزيمية 38% (3). كما استخدمت تقنية كروماتوغرافيا الألفة باستخدام عمود Lysine لتنقية ثلاثة انواع من البروتييزات القاعدية المنتجة من *B. stearothermophilus* TLS33 (4). بينما قام (5) بتنقية أنزيم البروتييز من مصادر مايكروبية وبخطوة واحدة باستخدام كروماتوغرافيا الألفة باستخدام Keratin Controlled-pore glass وتم تنقية أنزيمات البروتييز القاعدية المنتجة من البكتريا *B. intermedius* باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لعدد مرات تنقية بلغت 200 مرة لاظهار التجانس وكانت الفعالية النوعية 950 وحدة/ ملغرام بروتين (6).

تهدف الدراسة الحالية إلى تنقية أنزيم البروتييز القاعدي ودراسة بعض خصائصه لتحديد مدى امكانية الاستفادة منه في الأغراض الصناعية.

المواد وطرق العمل

تم استخدام العزلة المحلية من بكتريا *B. stearothermophilus* AEAL2 لانتاج انزيم البروتييز وبطريقة تخمرات الحالة الصلبة (7) إذ تم تنميتها على وسط نخالة الحنطة والترطيب بمحلول فوسفات الصوديوم بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 9 وبنسبة ترطيب هي 1.5 (حجم / وزن) والرقم الهيدروجيني الابتدائي 9 وتم تلقيح الوسط بـ 10^{7} خلية / غرام مادة صلبة وحضن بدرجة حرارة 60 °م ولمدة 48 ساعة. قدر البروتين بالطريقة المطلقة (8). أما الفعالية الانزيمية فقد قدرت وفق الطريقة المذكورة (9) في تقدير فعالية أنزيم البروتييز وذلك بحساب 0.1 مليلتر، وتم تعريف وحدة الفعالية بكمية الانزيم التي تسبب زيادة في الامتصاص الضوئي على الطول الموجي 280 نانوميتر مقدارها 0.01 خلال دقيقة تحت الظروف القياسية، أما الفعالية النوعية Specific Activity فتم التعبير عنها بوحدات الفعالية لكل ملغرام بروتين.

تم معاملة المستخلص بالمعاملة الحرارية بدرجة 70 °م لمدة 3 ساعات لترسيب البروتينات غير المرغوب فيها ، بعدها تم تبريد المستخلص الى 4 °م ، ثم نبذ بسرعة 10000xg لمدة 10 دقائق وبدرجة 4 °م .

تنقية الانزيم

كروموتوغرافيا التبادل الايوني :

استخدم المبادل الايوني DEAE-cellulose وتم تحضيره طبقا لما وصفه (9) وبابعاد (2.5 × 11) سم والذي تمت موازنته بمحلول (0.05 مولار منظم الترس + 2 مايكرومول كلوريد الكالسيوم وبرقم هيدروجيني 8.0) ، اجريت عملية استرداد البروتينات المرتبطة على المبادل باستخدام تدرج ملحي خطي من كلوريد الصوديوم (0–1) مولار وبسرعة جريان 60 مليلتر / ساعة ، جمعت الاجزاء القريبة من ذروة منحنى الفعالية وقدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين فيها .

الترشيح الهلامي :

اضيف المحلول الانزيمي المركز الناتج من الخطوة السابقة الى عمود هلام Sepharose 6B (47 × 2 سم) الذي اجريت موازنته بمحلول فوسفات البوتاسيوم الداريء 0.2 مولار + كلوريد الكالسيوم بتركيز 2 مايكرومول وبرقم هيدروجيني 8.0) وتم الاسترداد بنفس المحلول وجمعت الاجزاء بسرعة 30 مليلتر / ساعة وبواقع 3 مل / جزء .

توصيف الانزيم : تم تقدير الوزن الجزيئي للانزيم باستخدام عدد من البروتينات القياسية ذات الاوزان الجزيئية المعروفة وباستخدام عمود السيفاروز 6B وتحت الظروف نفسها المعتمدة في خطوة الاسترداد السابق ذكرها ، وقيس الامتصاص على طول موجي 280 نانوميتر بهدف تحديد حجم الاسترداد لكل بروتين قياسي (1) . وحدد الوزن الجزيئي ايضا باستخدام الترحيل الكهربائي بوجود المادة المحورة SDS (SDS-PAGE) ومقارنته مع الترحيل الكهربائي للبروتينات القياسية (12) .

الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية وثبات الانزيم:

قدرت فعالية الانزيم المنقى لتعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم في ارقام هيدروجينية مختلفة (6–11) وبدرجة حرارة 60 °م لمدة 10 دقائق باستخدام محلول التفاعل الكازين بتركيز 0.8% وتحضن مع المحاليل الدارئة اعلاه . اما تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل للثبات فقد تم حضن الانزيم النقي مع محلول داريء برقم هيدروجيني معين (4–11) وحضن في حمام مائي بدرجة 50 °م ولمدة 30 دقيقة ثم نقلت الانابيب الحاوية على محلول الانزيم الى حمام ثلجي وقدرت الفعالية الانزيمية .

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم:

تم حضن محلول التفاعل (0.8% كازين برقم هيدروجيني 9) بدرجات حرارية مختلفة تراوحت من (30–95) °م لمدة 15 دقيقة ثم اضيف له محلول الانزيم النقي وترك لمدة 10 دقائق بنفس الدرجات الحرارية نفسها ثم اوقف التفاعل بواسطة محلول TCA بتركيز 10% وقدرت الفعالية الانزيمية .

تعيين الثبات الحراري للانزيم:

حضن محلول الانزيم المنقى في حمام مائي بدرجات حرارية مختلفة تراوحت من (30–95) °م لمدة 15 دقيقة ثم نقلت الانابيب الحاوية على محلول الانزيم الى حمام ثلجي بعدها نقلت الى حمام مائي بدرجة حرارة 60 °م واضيف اليها محلول التفاعل (0.8% كازين برقم هيدروجيني 9 وحضنت لمدة 10 دقائق ثم اوقف التفاعل باضافة محلول TCA بتركيز 10% وقدرت الفعالية الانزيمية .

النتائج والمناقشة

يوضح الجدول (1) خطوات تنقية انزيم البروتييز القاعدي المنتج من العزلة المحلية *B. stearothermophilus AL162* وباستخدام المعاملة الحرارية على درجة 70 °م ولمدة 3 ساعات وقد اعطت هذه الخطوة تنقية جزئية مقدارها 1.7 مرة وبحصيلة 97% ، وتلت خطوة التبادل الايوني بعمود التبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose حيث اعطت عدد مرات تنقية 3.3 مرة وبحصيلة انزيمية 53%.

جدول (1): تنقية أنزيـــم البروتيـــز القاعدي المنتج من العزلة المحلية *B.steraothermophilus* AEAL2 .

خطوات التنقية	الحجم (مليلتر)	الفعالية (وحدة / مليلتر)	البروتين (ملغم /مليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين)	الفعالية الكلية(وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية (%)
المستخلص الانزيمي الخام	13	1467	0.362	4052	19071	1	100
المعاملة الحرارية 70 مئوي لمدة 3 ساعات	9	2062	0.294	7013	18558	1.7	97
التبادل الايوني بعمود ثنائي اثيل امينو اثيل سليلوز	40	257	0.019	13596	10280	3.3	53
الترشيح الهلامي بعمود السيفاروز 6B-							
I	13	192	0.008	24000	2490	5.9	13
II	20	360	0.009	40000	7200	9.8	37

يوضح الشكل (1) القمة البروتين المرتبط الذي استرد بتدرج منحى خطي من كلوريد الصوديوم (0-1 مولار) ، ونستنتج من ذلك أن معظم فعالية أنزيم البروتييز تقع في الاجزاء المستردة مما يدل على أنه تحمل شحنة سالبة في الظروف المستخدمة جعله يرتبط بالمبادل.

لقد انحصرت الفعالية الانزيمية في قمة واحدة (الشكل1) وبعد جمع أجزاء قمة الفعالية والديلزة، وجاءت خطوة الترشيح الهلامي باستخدام عمود هلام السيفاروز 6B- بعد خطوة التبادل الايوني لاستكمال تنقية الانزيم ، وقد نتج عن خطوة التنقيـــة هذه للنموذج المسترجع الذي تم تركيـــزه وديلزتـــه مقابل المحلول المنظـــم ظهور قمتين للبروتين والفعالية في الاجزاء المستردة وكانت قمة الفعالية الثانية أعلى من قمة الفعالية الاولى وهذا يدل على قدرة العزلة المحلية المستحصل عليها من هذه الدراسة على انتاج نوعين من انزيمات البروتييز . أن ظهور أكثر من قمة للفعالية يدل على وجود اكثر من نوع من البروتييزات (I, II) . وقد لوحظت مثل هذه النتائج في دراسات أخرى تناولت تنقية انزيمات البروتييز من سلالة RM-67 تعود الى مجموعة *B. stearothermophilus* (10) .

في دراسات أخرى تم تنقية ثلاثة انواع من البروتيـــــــزات من بكتريا *B. stearothermophilus* TLS33 بثلاث خطوات تنقية تضمنت كروماتوغرافيا الالفة باستخدام عمود اللايسين (Lysine) وكروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني (Q hyper D) وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام عمود (Ultrogel AcA44) (4) .
كما تم تنقية انزيم البروتييز القاعدي من بكتريا *B. stearothermophilus* F1 باستعمال المعاملة الحرارية 70 °م لمدة 3 ساعات تلتها خطوة الترشيح الفائق ثم الترشيح الهلامي باستخدام عمود السيفادكس G-100 مرتين وقد نتج عن ذلك عدد مرات تنقية 128.3 بحصيلة انزيمية 75% (11)، وفي أنزيم

الترسيب بالاسيتون وبعد ذلك تم تحميل الانزيم على عمود DEAE-Sephadex A-50 ثم عمود الترشيح الهلامي الحاوي على هلام Sephadex G-75 وكانت الحصيلة الانزيمية 8.2% وبعدد مرات تنقية 46.3 (12) .

تعيين الوزن الجزيئي لانزيم البروتييز

تم تعيين الوزن الجزيئي لانزيمي البروتييز (I, II) المستحصل عليهما من هذه الدراسة بطريقتين هما طريقة الترشيح الهلامي باستخدام هلام سيفاروز 6B- وطريقة الترحيل الكهربائي في هلام المتعدد اكريل امايد بوجود SDS (SDS-PAGE) ، فتبين ان الوزن الجزيئي للانزيم الاول والثاني بالطريقة الاولى (الشكل 3) 13182.567 و 20892.961 دالتون على التوالي وبالطريقة الثانية 56234.132 و 69502 دالتـــــون على التوالي (الشكل 4) .
ان نتائج هذه الدراسة قد تكون متقاربة مع قيم تم الحصول عليها من قبل عدد من الباحثين اذ اشار (11) الى ان الوزن الجزيئي لانزيـــم البروتييـــز القاعـــــدي المنتـــج من بكتريا *B. stearothermophilis* F1 كان 20000 دالتون عند تقديره بالترشـــيح الهلامي ، بينما كان الوزن الجزيئي لانزيم البروتييز القاعدي المنتج من بكتريا *Bacillus sp.* No. AH-101 الذي تم تقديره بطريقة الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي كان 12500 دالتون و 29000 دالتون على التوالي (13) . كما حدد الوزن الجزيئي لنوعين من انزيمات البروتييز المنتجة من بكتريا *B. stearothermophilus* RM-67 بطريقة الترشيح الهلامي 67610 دالتون للانزيم الاول و 19950 دالتون للانزيم الثاني (9) .
يبين الشكل(5) الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية انزيمي البروتييز (I,II) المستحصل عليهما في هذه الدراسة ، إذ وجد أن الفعالية الانزيمية للبروتييز (I) تزداد بزيادة الرقم

أما الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية انزيم البروتييز (II) فهو 10 ، ولقد تم ملاحظة انخفاض في الفعالية الانزيمية عند الارقام الهيدروجينية الحامضية والقاعدية البعيدة عن الحد الامثل لكلا الانزيمين (I,II) 7 و 10 على التوالي.

هنالك دراسات أخرى تناولت قدرة سلالات مختلفة من بكتريا B. stearothermophilus على انتاج اكثر من نوع من انزيمات البروتييز ، إذ وجد (4) ان بكتريا B. stearothermophilus TLS33 قادرة على انتاج ثلاثة انواع من انزيمات البروتييز ، وتم توصيف هذه الانزيمات ، ووجد ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية هذه الانزيمات عند استخدام الكازين مادة اساس كانت 8.5 و 7.5 و 7.0 . كما وجد (4) ان انزيم البروتييز القاعدي المستخلص من بكتريا B. sphaericus يمتلك اقصى فعالية عند رقم هيدروجيني 10.5 بينما وجد ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية انزيم البروتييز المنتج من بكتريا B. subtilis كان 8 (4).

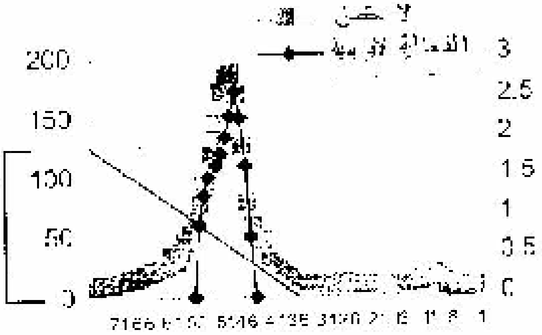
درست ثباتية كل من انزيمي البروتييز الأول (I) والثاني (II) المستحصل عليهما من هذه الدراسة بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 4-11 باستخدام محلول الكازين كمادة أساس ، إذ تراوحت الارقام الهيدروجينية المثلى لثبات الانزيم الأول بين [6.5-7.5] والثاني [8-10] على التوالي الشكل (6) .

هنالك العديد من الدراسات التي تناولت توصيف انزيمات البروتييز وتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثباتية الانزيم إذ وجد (16) أن الانزيم المنتج من بكتريا Bacillus sp. GX6638 يحتفظ بـ 95-100% من فعاليته عند ارقام هيدروجينية بين 6-11 عند درجة حرارة 25 °م لمدة 24 ساعة ، وان انزيم البروتييز القاعدي المنتج من بكتريا B. sphaericus كان ثابتاً عند ارقام هيدروجينية بين 8.5-11.5 ، إذ احتفظ هذا الانزيم بأكثر من 70% من فعاليته عند هذه الارقام عند درجة حرارة 37 °م لمدة ساعة واحدة (14) ، أن انزيم البروتييز القاعدي المنتج من بكتريا B. stearothermophilus F1 يكون ثابتاً عند الارقام الهيدروجينية 6-11 وبدرجة حرارة 70 مئوية لمدة 30 دقيقة (11) .

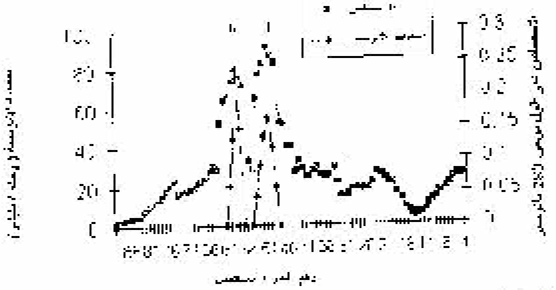
تمت دراسة تأثير درجات حرارية مختلفة في فعالية كل من الانزيم الأول (I) والانزيم الثاني (II) ، وجرى التفاعل الانزيمي بدرجات حرارية تراوحت بين 30-95 °م ولوحظ زيادة في فعالية الانزيم مع ارتفاع درجة الحرارة لغاية درجة حرارة 65 °م للانزيم الأول و درجة حرارة 85 °م للانزيم الثاني (الشكل 7).

يختلف تأثير درجات الحرارة في البروتييزات باختلاف السلالات المنتجة فقد وجد (16) بأن أقصى فعالية لانزيم البروتييز المنتج من بكتريا B. stearothermophilus كانت عند درجة حرارة 85 °م ، أما البروتييزات الثلاثة التي تم الحصول عليها من بكتريا B. stearothermophilus TLS33 فإن اقصى فعالية انزيمية لها تم الحصول عليها عند درجات حرارية هي 70 و 85 و 90 °م (4) . أما البروتييز القاعدي المنتج من بكتريا B. sphaericus فكانت درجة الحرارة المثلى لفعاليته 50-55 °م (14) ، وأشار (15) الى ان اعلى فعالية لانزيم البروتييز المنتج من بكتريا B. subtilis كانت 50 °م . أما البروتييز المنتج من بكتريا Nocardia mugadh فكانت درجة الحرارة المثلى لفعاليته 60 °م (18) .

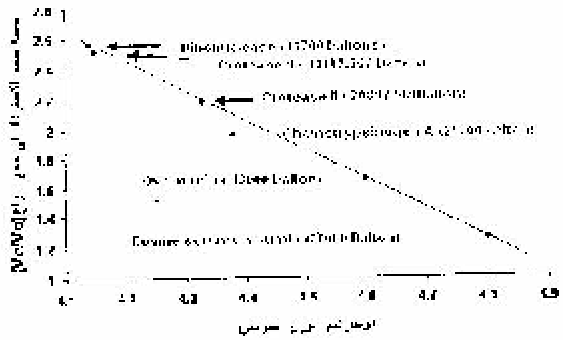
ويتضح من الشكل (8) ان ثباتية انزيمي البروتييز الأول (I) والثاني (II) المنتج من العزلة المحلية B. stearothermophilus AEAL2 تجاه درجات حرارية مختلفة عند رقم هيدروجيني 8 لمدة 15 دقيقة ، إذ احتفظ الانزيم الأول (I) والثاني (II) بكامل فعاليتهما عند درجة حرارة 60 و(60، 65) درجة مئوية على التوالي بينما احتفظ كل من الانزيم الأول (I) والثاني (II) عند درجة حرارة 65 °م بـ 18% و40% من فعاليته على التوالي .



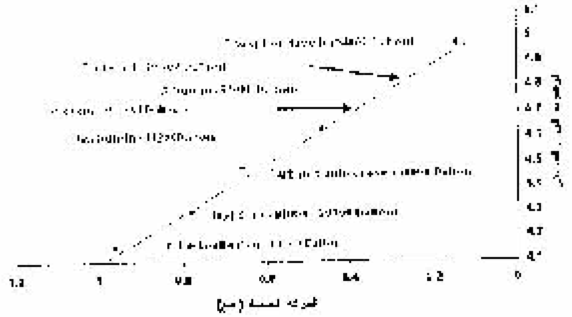
الشكل (1): يوضح كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم البروتييز القاعدي المنتج من العزلة المحلية B. stearothermophilus AEAL2 ، باستخدام عمود DEAE- Cellulose (11 × 3.5) سم والذي تم موازنته بمحلول الترس الداريء 0.05 مولار و 2- مايكروايثانول كلوريد الكالسيوم ذو رقم هيدروجيني 8 .وقد تم الاسترداد بمحلول ملحي خطي من كلوريد الصوديوم (0-1) مولار ، سرعة الجريان 60 ملليتر / ساعة (حجم الجزء 5 ملليتر) .



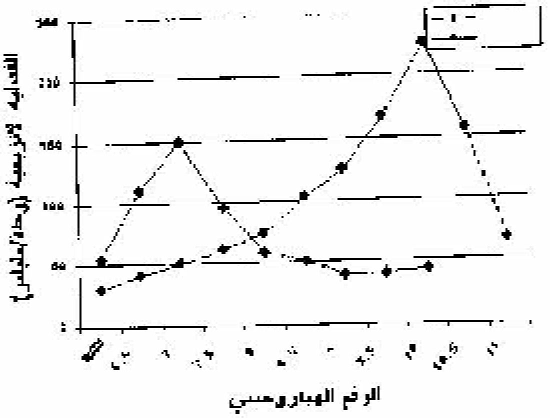
الشكل(2) : كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية أنزيم البروتييز القاعدي المنتج من العزلة المحلية B.stearothermophilus AEAL2 ، باستخدام عمود السيفاروز 6B (2.0 × 47) سم والذي سبقت موازنته بمحلول الترس 0.2 مولار ذي رقم هيدروجيني 8.0 ، واسترد الانزيم بمحلول الموازنة نفسه ، بسرعة الجريان 30 مليلتر / ساعة ، بواقع 5 مليلتر / جزء.



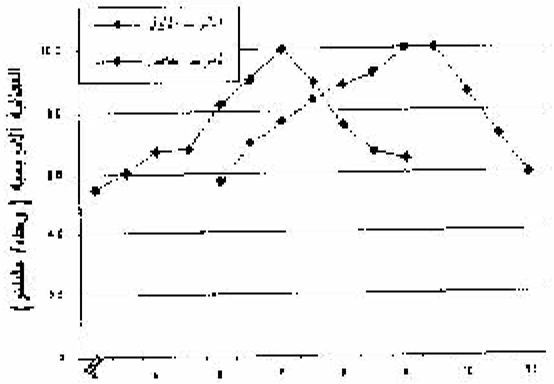
الشكل(3): العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي ونسبة حجم الاسترداد الى حجم الفراغ (V_e/V_o) للبروتينات القياسية لعمود السيفاروز 6B.



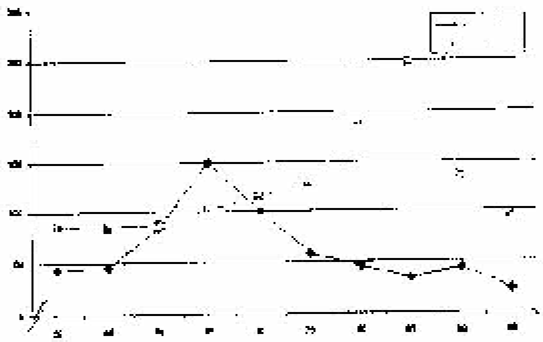
الشكل (4): تعيين الوزن الجزيئي لانزيم البروتييز القاعدي (I,II) المنتج من العزلة المحلية *B. stearothermophilus* AEAL2 بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد المتعدد بوجود المواد المسخنة للبروتين SDS .



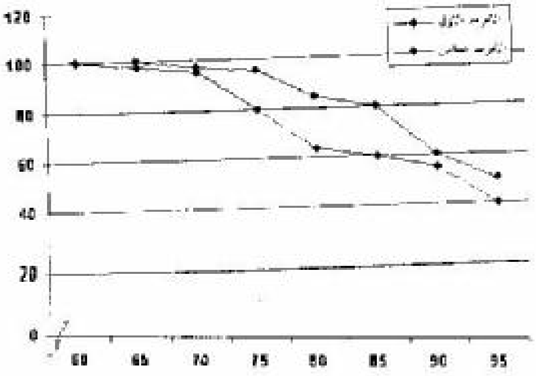
الشكل (5): الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم البروتييز القاعدي (I,II) من العزلة المحلية *B. stearothermophilus* AEAL2.



الشكل (6): الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات أنزيم البروتييز القاعدي (I,II) من العزلة المحلية *B. stearothermophilus* AEAL2.



الشكل (7): الثبات الحراري لفعالية أنزيم البروتييز القاعدي (I ,II) المنتج من العزلة *B. stearthromphilus* AEAL2 ، حضن الانزيم بدرجات حرارية مختلفة (50- 95) °م لمدة 15 دقيقة .



الشكل(8): الثبات الحراري لفعالية أنزيم البروتييز القاعدي (I, II) المنتج من العزلة *B. stearthromphilus* AEAL2 . حضن الانزيم بدرجات حرارية مختلفة (60-95) °م لمدة 15 دقيقة .

المصادر

1. Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnology aspects of microbial. Proteases. Microbiol. Molecul. Biol. Rev. 62(3): 597-635.
2. Okamoto, M.; Yonejima, Y.; Tsujimoto, Y.; Suzuki, Y. and Watanabe, K. (2001). A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus sp.* Strain MO-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 103-108.
3. Manachini, P.L.; Fortina, M.G. and Parini, C. (1988). Thermostable alkaline protease produced by *B. thermoruber* a new species of *Bacillus* . Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 409-413.
4. Sookkheo, B.; Sinchaikul, S.; Phutrakul, S. and Chen, S. (2000). Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *B. stearothermophilus* TLS33 protein expression and purification. 20: 142-151.
5. Grzywnowicz, K. and Lobarzewski, J. (1994). A purification method from specific serine proteases using one-step affinity chromatography. J. Chem. Tech. Biotechnol. 60: 153-160.
6. Balaban, N.P.; Sharipova, M.R. ; Usmanova, A.M.; Itskovich, E.L. and Leschinskaia, I.B. (1993). Alkaline extracellular proteinase from *B.intermedium*. Isolation , purification and some properties of the enzyme. Biokhimiia. 58: 1923-1928.
7. Dawood, A.W. (2003). Purification of Alkaline proteasefrom local *Bacillus stearothermophilus* and determination of their efficiency in some industrial application. M.Sc. thesis . Genetic Engineering and Biotechnology Institute , Baghdad University. (In Arabic)
8. Whitaker, J.R. and Granum, P.E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in adsorbance at 235 and 280 nm . Analytical Biochem. 109: 6-159.
9. Brock, F.M.; Forsberg, C.W. and Buchanan. J.G. (1982). Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. Appl. Environ. Microbiol. 44: 561-569.
10. Chopra, A.K. and Mathur, D.K. (1985). Purification and characterization of heat-stable protease from *B. stearothermophilus* RM-67. J. Dairy Sci. 68: 3202-3211.
11. Abd-Rahman, R.N.Z.; Razak, C.N.; Ampon. K.; Basri, M.; Yunus, W.M.W. and Salleh. (1994). Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *B. stearothermophilus* F1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 822-827.
12. Ohta, H.O.; Katoh, T. and Fujio, Y. (1995). Purification and some properties of a thermostable protease, BSP2, produced from *B. stearothermophilus* . No.2.J. Fac. Agr. 40(1): 9-17.
13. Takami, H.; Akiba. T. and Horikoshi. K. (1989). Production of extremely thermostable alkaline protease from *B.sp.* no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 120-124.
14. Singh. J.; Vohra. R.M. and Sahoo, P.K. (1999). Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *B. sphaericus*. Biotechnol. Lett. 21: 921- 924.
15. Yang, J.; Shih, I.; Tzeng, Y. and Wang, S. (2000). Production and purification of protease from a *B. subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme. Microbial. Thecnol. 26: 406-413.
16. Durham, D.R.; Strwart, D.B. and Stellwag, E.J. (1987). Novel alkaline- and heat stable serine protease from alkalophilic *Bacillus* sp. Strain GX6638. J. Bacter. 169(6): 2762- 2768.
17. Razak, N.A.; Samad, M.Y.A.; Basri, M.; Yunus, W.M.Z.W.; Ampon, K. and Salleh, A.B. (1994). Thermostable extracellular protease of *B. stearotherophilus*: factors affecting ts production. World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 260-263.
18. Gimenez, M.I.; Studdert, C.A.; Sanchez, J.J. and Decastro, R.E. (2000). Ectracellular protease of *Natrialba magadii* : purification and biochemical characterization. Extremophiles.4:181-188.

Abstract

Alkaline protease was purified from *B. stearothermophilus* AEAL2 by several steps included heat treatment, DEAE-Cellulose ion exchange chromatography and gel filtration on Sepharose-6B column. Gel filtration resulted in separation of the enzyme preparation into protease I

and protease II, the obtained purification folds were 5.9 and 9.8 respectively and recovery was 13 and 37 respectively.

The molecular weight of the purified protease I and Protease II were 13182 and 20892 daltons as determined by gel filtration and 56234 and 69502 daltons respectively a determined by SDS-PAGE.

The optimal pH for activity protease I and II on casein were 7 and 10 respectively while the protease I and protease II were most stable in pH range (6.5-7.5) and (8-10) respectively using casein as a substrate.

The maximum purified proteases activity was observed at 65 and 85 °C respectively. The protease I and II retained 100% activity at 60 and 65 °C for 30 min.