

Pročišćavanje i karakterizacija nove izvanstanične haloproteaze Vpr izolirane iz soja bakterije *Bacillus licheniformis* KB111

SAŽETAK

Pozadina istraživanja. Haloalkalne proteaze spadaju u najzanimljivije komercijalne enzime koji se koriste u različitim industrijama zbog njihove vrlo specifične aktivnosti i stabilnosti pri ekstremnim uvjetima. Biokemijske značajke enzima bitne su za određivanje njihovog potencijala primjene u industriji. Većina je mikrobnih proteaza izolirana iz bakterija vrste *Bacillus* spp. U ovom je radu pročišćena i okarakterizirana izvanstanična haloproteaza dobivena iz soja bakterije *Bacillus* sp. KB111, prethodno izoliranog iz sedimenata šume mangrova za industrijsku primjenu.

Ekperimentalni pristup. Genom soja KB111 identificiran je sekvenciranjem DNA. Dobivena je proteaza pročišćena isoljavanjem i ionsko-izmjenjačkom kromatografijom, okarakterizirana na osnovi njezine aktivnosti i stabilnosti u supstratu, te identificirana pomoću LC-MS/MS.

Rezultati i zaključci. Soj KB111 identificiran je kao *Bacillus licheniformis*. Molekularna masa dobivene izvanstanične proteaze, nazvane KB-SP, procijenjena je na 70 kDa. Optimalna pH-vrijednost za djelovanje ove proteaze bila je 7, a temperatura 50 °C, a njezina je najveća aktivnost postignuta pri koncentraciji soli od 2 do 4 M. Proteaza je bila potpuno stabilna u alkalnom rasponu pH-vrijednosti 7–11 pri 50 °C, s vremenom poluraspada od 90 min. Utvrđeno je da ioni metala, kao što su K⁺, Ca²⁺ i Mg²⁺, mogu pospješiti aktivnost enzima. Stoga je zaključeno da se ova proteaza može uvelike primijeniti u prehrambenoj industriji, proizvodnji stočne hrane, te za obradu otpada, jer može hidrolizirati proteine pri alkalnim pH-vrijednostima i visokoj koncentraciji soli. Profil amino kiselina pročišćene proteaze KB-SP određen pomoću LC-MS/MS imao je veliki stupanj preklapanja s peptidazom S8 iz bakterije *B. licheniformis* LMG 17339, te je odgovarao zreloj domeni manje izvanstanične proteaze (Vpr). Analizom aminokiselinskog slijeda i 3D modeliranjem strukture proteaze KB-SP utvrđeno je da enzim ima konzerviranu katalitičku domenu, domenu povezanu s proteazom i C-terminalnu domenu.

Novina i znanstveni doprinos. Nova izvanstanična proteaza izolirana iz bakterije *B. licheniformis* je pročišćena, okarakterizirana i identificirana kao jedna od manjih izvanstaničnih proteaza (Vpr), te je ovo prvi izvještaj o njezinoj halotoleranciji. Ova je proteaza aktivna u nepovoljnim uvjetima, u širokom rasponu alkalnih pH-vrijednosti i saliniteta, stoga se može primijeniti u različitim industrijskim granama.

Ključne riječi: *Bacillus* sp.; serinska proteaza; halofilne bakterije; Vpr; modeliranje strukture