ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):143-150

Investigation of Organic Solvents-Resistant Extracellular Alkaline Protease from *Brevibacillus borstelensis* AMN Isolated from Hot Spring of Iran

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Nasre Taheri M.*[1] *MSc*,
Ebrahimipour Gh.H.[1] *PhD*,
Sadeghi H.[1] *PhD*

How to cite this article
Nasre Taheri M, Ebrahimipour Gh H, Sadeghi H. Investigation of Organic Solvents-Resistant Extracellular Alkaline Protease from *Brevibacillus borstelensis* AMN Isolated from Hot Spring of Iran. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):143-150.

[1]Microbiology Department, Biological Sciences Faculty, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Shahid Ehsanirad Street, Ahmad Abad Mostoufi, Azadegan Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 3353136846
Phone: +98 (21) 56276325
Fax: +98 (21) 56276636
ofoghi@irost.ir

Article History
Received: November 21, 2016
Accepted: March 1, 2018
ePublished: March 16, 2019

ABSTRACT

The Stability of protease in organic solvent media has been widely discussed for more than two decades. Proteases can catalyze synthetic reactions in organic media, by this way solvent stabilities of proteases are very important. In this study, we reported a bacterium isolated from hot spring of Geinarje, Iran producing an organic solvent stable protease. Protease producing bacteria were screened on skim milk agar and the formation of a clear zone around the bacterial colony was investigated. Proteolytic activity was assayed by a modified caseinolytic method using casein as a substrate. The best alkaline protease producing bacterium was selected and identified on the basis of 16S *rDNA* gene sequencing and morphological and biochemical characteristics. The effect of organic solvents, temperature, pH, and NaCl on proteolytic activity were examined. According to phylogenetic analysis, morphological and physiological tests, isolated, the bacterium was identified as a new strain of *Brevibacillus borstelensis*. This strain was able to produce an extracellular organic solvent-stable protease with 0.53U/ml enzyme activity. After 2 hour incubation at 30°C the protease of *Brevibacillus borstelensis AMN* was active in wide ranges of organic solvents, and its activity was enhanced in the presence of 25% (V/V) isopropanol. The biochemical properties of the enzyme revealed that the optimal pH and temperature for protease activity were 9.0 and 60°C, respectively. Our finding indicated that these robust properties of protease, like outstanding activity and stability in organic solvents and alkaline medium, might be applicable for various industrial biotechnologies.

Keywords Alkaline protease; Brevibacillus; Organic solvent; Enzyme activity; Enzyme Stability

CITATION LINKS

[1] Production, optimization and partial purification of protease from ... [2] Optimal conditions for production of extracellular ... [3] Isolation, optimization and characterization of protease producing bacteria from ... [4] Production and optimization of acid protease by Aspergillus spp ... [5] Biochemical and structural characterization ... [6] Versatility of microbial ... [7] Optimization of environmental and nutritional conditions ... [8] Studies on production, characterization and ... [9] Solvent tolerance acquired by Brevibacillus ... [10] A novel nonionic surfactant- and solvent-stable ... [11] Extraction, purification and application of thermostable ... [12] Organic solvent-tolerant ... [13] A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease ... [14] Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic ... [15] Two-step purification of a highly thermostable alkaline ... [16] Intracellular proteolytic systems in alcohol-induced ... [17] Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine ... [18] Production, purification, and biochemical characterization of thermostable ... [19] Optimization, purification and characterization of ... [20] Screening and characterization of the alkaline protease ... [21] Isolation and optimization of protease producing ... [22] Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant ... [23] Biochemical and molecular characterization ... [24] Expression, purification, and characterization of a thermophilic ... [25] Thermostable alkaline protease from a novel marine haloalkalophilic ... [26] Production and optimization of thermophilic ... [27] Alkaline protease from Thermoactinomyces ... [28] Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease ... [29] Purification and partial characterization of serine protease ... [30] Microbial ... [31] Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from ... [32] Salt-tolerant and thermostable alkaline protease ... [33] Enzymes which are stable in the presence ... [34] Optimization of conditions for protease production by Chryseobacterium ... [35] Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

بررسی مقاومت به حلال‌های آلی در پروتئاز قلیایی برون‌سلولی حاصل از *Brevibacillus borstelensis* AMN جداشده از چشمه آب گرم ایران

مهناز نصر طاهری* MSc
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
غلامحسین ابراهیمی‌پور PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
حسین صادقی PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده
پروتئازهای مقاوم به حلال‌های آلی بیش از دو دهه است که به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است. پروتئازها قادر به کاتالیز واکنش‌ها در محیط‌های آلی هستند، به همین دلیل پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی حائز اهمیت است. در این پژوهش از آب چشمه قینرجه در ایران باکتری جداسازی شد که قادر به تولید پروتئاز مقاوم به حلال‌های آلی است. غربالگری سویه مولد پروتئاز از طریق کشت در محیط اسکیم‌میلک آگار و سنجش قطر هاله انجام شد. سنجش فعالیت آنزیمی به روش هیدرولیز کازئین به‌عنوان سوبسترا صورت گرفت. باکتری که دارای بیشترین فعالیت پروتئازی بود براساس توالی‌یابی 16S rDNA، ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شد. اثر حلال‌های آلی، دما، pH و سدیم‌کلرید بر فعالیت پروتئازی مورد سنجش قرار گرفت. سویه جداسازی‌شده با مطالعه نتایج حاصل از تعیین توالی، خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی به‌عنوان سویه جدیدی از *Brevibacillus borstelensis* شناسایی شد که قادر به تولید پروتئاز برون‌سلولی مقاوم به حلال‌های آلی با فعالیت آنزیمی ۰/۵۳واحد بر میلی‌لیتر است. پروتئاز تولیدشده پس از ۲ساعت انکوباسیون در ۳۰°C، در طیف وسیعی از حلال‌های آلی قادر به فعالیت بود و بیشترین فعالیت پروتئولیتیک آن در حضور ۲۵% ایزوپروپانول مشاهده شد. بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم نشان داد که پروتئاز تولیدشده در pH برابر ۹ و دمای ۶۰°C بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج حاضر نشان داد که پروتئاز جداسازی‌شده دارای ویژگی‌های برجسته‌ای مانند فعالیت و پایداری نسبت به شرایط قلیایی و حلال‌های آلی است که برای استفاده در صنایع بیوتکنولوژی مختلف کاربرد دارد.

کلیدواژه‌ها: آلکالین پروتئاز، Brevibacillus، حلال‌های آلی، فعالیت آنزیمی، پایداری آنزیمی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۱
*نویسنده مسئول: mnasretaheri@yahoo.com

۱- مقدمه
پروتئازها گروه بسیار وسیعی از آنزیم‌ها هستند که نزدیک به ۶۰% کل فروش آنزیم‌ها در جهان را به خود اختصاص داده‌اند[1]. پروتئازها علاوه بر این که نقش مهمی در فرآیندهای متابولیکی سلولی دارند، توجه بسیاری از جوامع صنعتی و بیوتکنولوژی را به خود معطوف کرده‌اند[2]. پروتئازها توسط تمام اشکال حیاتی شامل گیاهان، جانوران و میکروارگانیزم‌ها تولید می‌شوند که از این میان میکروارگانیزم‌ها به‌دلیل سریع‌الرشدبودن، نیازمند جای محدود برای رشد و قابلیت دست‌ورزی، برجسته‌ترین منبع تولید پروتئاز به شمار می‌روند[3]. پروتئازها براساس محدوده‌ای از pH که در آن فعالیت می‌کنند به سه گروه پروتئازهای اسیدی، خنثی و قلیایی تقسیم می‌شوند که پروتئازهای قلیایی به‌دلیل ثبات و مقاومت نسبت به شرایط سخت مانند pHهای بالا از اهمیت والایی برخوردار هستند[4] و می‌توانند در صنایع مختلف از جمله صنایع شوینده، صنایع غذایی، چرم‌سازی، دارویی، تشخیص پزشکی و غیره به کار گرفته شوند[5]. باکتری‌های شایع با توانایی تولید پروتئاز شامل آئروموناس (Aeromonas)، آلکالیژنز (Alcaligenes)، آرتروباکتر (Arthrobacter)، باسیلوس (Bacillus)، هالوموناس (Halomonas)، سودوموناس (Pseudomonas) و سراشیا هستند[6] که از میان آنها باسیلوس‌ها شاخص‌ترین گروه برای تولید پروتئاز هستند[7]. به‌منظور کاربرد کارآمد پروتئازها در صنایع مختلف نیاز به پایداری و فعالیت آنزیم در شرایط سخت همچون pH بالا، دمای بالا، حلال‌های آلی و حضور سدیم‌کلرید است[8]. واکنش‌های آنزیمی که در حلال‌های آلی یا مخلوط حلال آلی و آب انجام می‌شود، در مقایسه با واکنش‌هایی که در سیستم‌های آبی صورت می‌گیرند مزایای فراوانی دارند؛ در شرایطی که آب به‌عنوان محیط واکنش آنزیم استفاده شود، پروتئازها سبب هیدرولیز پیوندهای پپتیدی می‌شوند اما در صورت استفاده از حلال‌های آلی مسیر واکنش آنزیم عکس شده و به سمت سنتز پیوندهای پپتیدی پیش می‌رود[9].

از طرف دیگر، فعالیت پروتئازها در حضور حلال‌های آلی موجب پیشرفت فرآیندهای بیوتکنولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شود[10]. کاربرد آنزیم‌ها در محیط‌های آلی به‌دلیل غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها در محیط‌های آلی محدود می‌شود، به همین دلیل دانشمندان به‌دنبال راهکارهایی برای بهبود پایداری و فعالیت آنزیم در حضور حلال‌های آلی هستند[11]. روش‌های مختلفی برای افزایش پایداری و فعالیت این آنزیم‌ها برای استفاده در محیط‌های حاوی حلال‌های آلی به کار می‌رود، اما نیاز به پروتئازهایی که دارای مقاومت ذاتی در حلال های آلی هستند، روزبه‌روز افزایش می‌یابد[9].

انجام واکنش‌های آنزیمی در حلال‌های آلی کاربردهای صنعتی فراوانی از جمله افزایش حلالیت سوبستراهای غیرقطبی، جلوگیری از انجام واکنش‌های جانبی وابسته به آب و حذف آلودگی‌های میکروبی را در پی دارد. علاوه بر این حلال‌های آلی از طریق جداکردن مولکول‌های آب پروتئین، باعث شکستن مولکول آنزیم و در نتیجه توقف فعالیتش می‌شوند[12]. از این رو، جست‌وجو و یافتن پروتئازهایی با قابلیت پایداری در حضور حلال‌های آلی همواره مورد توجه پژوهشگران بوده و آنها به‌دنبال آنزیم‌هایی با ویژگی‌های ویژه و خاص هستند[13]. *سودوموناس آئروجینوزا* (*P. aeroginosa* PST-001) یکی از باکتری‌هایی است که پروتئاز مقاوم به حلال آلی تولید می‌کند، این اولین گزارش در مورد جداسازی پروتئاز مقاوم به حلال آلی است[14].

در پژوهش حاضر، یک باکتری تولیدکننده پروتئاز قلیایی برون‌سلولی از چشمه قینرجه واقع در استان اردبیل جداسازی شد و خصوصیات بیوشیمیایی آن مانند فعالیت، پایداری آن در دما و pHهای مختلف، حضور حلال‌های آلی و غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها
۲-۱- مواد شیمیایی: در پژوهش تجربی حاضر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش متعلق به شرکت مرک آلمان بود. پرایمرهای استفاده‌شده در تکثیر قطعه ژن *16S rDNA* که شامل 27F و 1492R بودند، از شرکت پیشگام و مارکر وزن مولکولی ۱۰۰۰جفت‌بازی DNA از شرکت فرمنتاز تهیه شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۲- جمع‌آوری نمونه: نمونه‌برداری در مرداد ۱۳۹۴ از آب چشمه قینرجه واقع در استان اردبیل انجام شد. دمای آب مورد آزمایش برابر ۶۰°C، pH آن حدود ۸/۶ و شوری آن ۰/۸% در محل اندازه‌گیری شد. آب چشمه زلال، بی‌رنگ، مزه‌اش کمی شور و گس است. نمونه‌ها توسط یک ظرف استریل حدوداً از عمق ۱۰سانتی‌متری برداشته شد و در بطری‌های استریل به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه‌ها، در طول مسیر در مخازن یخ بودند و تا هنگام بررسی در دمای ۴°C نگهداری شدند.

۲-۳- جداسازی و غربالگری باکتری مولد پروتئاز: به میزان ۵میلی‌لیتر از نمونه چشمه به محیط کشت پایه معدنی حاوی ۰/۵گرم بر لیتر دی‌پتاسیم‌فسفات، ۰/۲گرم بر لیتر منیزیم‌سولفات ۷آبه، ۰/۰۱گرم بر لیتر سولفات‌آهن ۷آبه، ۰/۰۱گرم بر لیتر کلسیم‌کلرید ۷آبه و ۲۰گرم بر لیتر اسکیم‌میلک (با pH میزان برابر ۹) به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی، اضافه شد. به‌منظور جداسازی باکتری‌های تولیدکننده پروتئاز، پس از تهیه سریال رقت، در محیط اختصاصی اسکیم‌میلک آگار کشت داده و به‌مدت ۴۸ساعت در دمای ۵۰°C قرار داده شد. وجود هاله اطراف کلنی‌ها نشان‌دهنده تولید پروتئاز توسط باکتری است که کلنی دارای بیشترین قطر هاله برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

۲-۴- شناسایی باکتری به روش فیلوژنتیکی و کلاسیک

۲-۴-۱- شناسایی فیلوژنتیکی: به‌منظور شناسایی مولکولی باکتری جداسازی‌شده از روش‌های توالی‌یابی *16S rDNA* استفاده شد. هر یک از گونه‌های باکتریایی دارای تولی *16S rDNA* منحصر به خود هستند. ابتدا باکتری روی محیط نوترینت‌براث کشت داده شد پس از ۲۴ساعت انکوباسیون در ۵۰°C، یک‌میلی‌لیتر از محیط کشت در دمای ۴°C به‌مدت ۱۰دقیقه با دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مراحل استخراج DNA طبق پروتکل کیت استخراج Cinnapure-DNA (سیناژن؛ ایران) صورت گرفت و برای بررسی میزان خلوص آن، جذب DNA در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰نانومتر اندازه‌گیری شد.

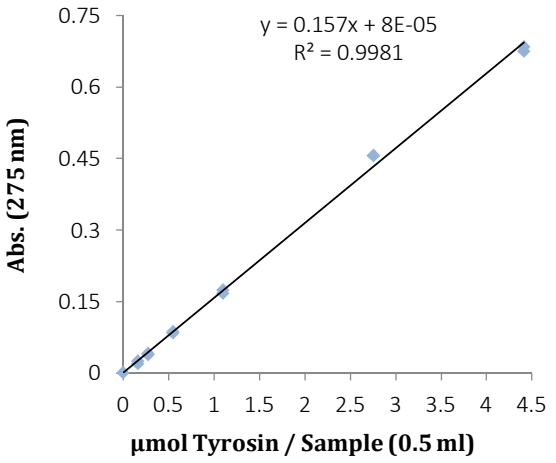
در این پژوهش از پرایمرهای عمومی (5'-27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ،5'-1492R: GGCTACCTTGTTACGACTT-3') که توانایی تکثیر *16S rDNA* ریبوزومی را برای بیشتر باکتری‌های حقیقی دارند، استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) نیز مطابق برنامه زیر انجام شد: ۱) دمای اولیه ۹۴°C برای مدت ۵دقیقه؛ ۲) ۳۰ سیکل که هر کدام شامل ۹۴°C به‌مدت یک‌دقیقه، ۵۳°C به‌مدت ۴۰ثانیه و ۷۲°C به‌مدت یک‌دقیقه؛ ۳) مرحله طویل‌شدن نهایی ۷۲°C به‌مدت ۱۰دقیقه، در نهایت محصول PCR توسط ژل ۱% آگارز الکتروفورز شد و تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول PCR (تکاپوزیست؛ ایران) صورت گرفت. پس از جفت‌کردن توالی‌های نوکلئوتیدی با نرم‌افزار Chromas Pro 2.1.3، این توالی‌ها به کمک نرم‌افزار Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مورد بررسی قرار گرفتند و هومولوژی آنها با اطلاعات موجود در بانک ژنی مقایسه شد.

۲-۴-۲- شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی: بدین‌منظور خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری انتخاب‌شده مانند تست‌هایی مانند رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، SIM و غیره مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۵- سنجش فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیمی براساس روش آنسون- هاگیهارا (Anson-Hagihara) با اندکی تغییرات مورد سنجش قرار گرفت که در آن از کازئین به‌عنوان سوبسترای طبیعی استفاده شد. پس از تلقیح و گرماگذاری به‌مدت ۴۸ساعت در دمای ۵۰°C، مقدار یک‌میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته و با دور ۱۰۰۰۰×g برای مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ و از محلول رویی فاقد باکتری برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. به ۰/۵میلی‌لیتر از سوپرناتانت، ۳میلی‌لیتر محلول واکنش (۰/۷% کازئین در بافر بوراکس-سدیم‌هیدروکسید، میزان pH برابر ۹، ۱۰میلی‌مولار) اضافه و به‌مدت ۱۰دقیقه در دمای ۶۰°C قرار داده شد. سپس ۳/۲میلی‌لیتر محلول متوقف‌کننده (TCA ۰/۱۱مولار، سدیم‌استات ۰/۲۲مولار و استیک‌اسید ۰/۳۳مولار) اضافه و پس از ۲۰دقیقه در دمای اتاق، محلول سانتریفیوژ شد[15]. برای تمام واکنش‌ها نمونه شاهد استفاده شد که قبل از افزودن سوپرناتانت، محلول متوقف‌کننده اضافه شده بود. فعالیت پروتئازی با تعیین مقدار تیروزین در محلول سانتریفیوژشده با سنجش میزان جذب نوری آن در طول موج ۲۷۵نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست‌آمده با منحنی استاندارد مقایسه و به‌صورت واحد آنزیمی گزارش شدند. هر واحد آنزیمی برابر یک‌میکرومول تیروزین به‌دست‌آمده بر میلی‌لیتر محلول آنزیمی در دقیقه و دمای ۶۰°C گزارش شد. تمام آزمایشات با سه بار تکرار صورت پذیرفت.

۲-۶- منحنی استاندارد تیروزین: برای تهیه منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلفی از تیروزین صفر، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر (معادل صفر، ۰/۱۷، ۰/۲۸، ۰/۵۵، ۱/۱۰، ۲/۷۶ و ۴/۴۲میکرومول بر میلی‌لیتر) را در ۳میلی‌لیتر بافر بوراکس و ۳/۲میلی‌لیتر متوقف‌کننده حل نموده و جذب آنها در طول موج ۲۷۵نانومتر سنجیده و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 منحنی استاندارد رسم شد. تمام آزمایشات بعدی با استفاده از این منحنی استاندارد و معادله خط همبستگی آن صورت گرفته است (نمودار ۱) [16].



نمودار ۱) منحنی استاندارد تیروزین

۲-۷- تعیین زمان بهینه تولید آنزیم

برای یافتن زمان بهینه تولید آنزیم، تولید پروتئاز در زمان‌های مختلف پس از کشت (۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴، ۹۶ و ۱۰۴ ساعت) با روش سنجش فعالیت آنزیمی بررسی شد.

۲-۸- تعیین ویژگی پروتئاز تولیدشده توسط *Brevibacillus borstelensis* AMN

۲-۸-۱- بررسی فعالیت پروتئاز در pHهای مختلف: برای بررسی فعالیت آنزیمی در pHهای مختلف، فعالیت آنزیمی در بافرهای با

www.SID.ir

pHهای مختلف شامل سدیم‌استات (میزان pH برابر با ۵)، سدیم‌فسفات (میزان pH برابر با ۶)، تریس-هیدروکلریدریک‌اسید (میزان pH برابر با ۷ و ۸) و بافر بوراکس (میزان pH برابر با ۹، ۱۰ و ۱۱) مورد سنجش قرار گرفت و اطلاعات به‌صورت نموداری نمایش داده شد. بالاترین فعالیت آنزیمی به‌عنوان ۱۰۰% در نظر گرفته شد[17].

۲-۸-۲- بررسی فعالیت آنزیم در دماهای مختلف: برای بررسی فعالیت کاتاکیتیک پروتئاز در دماهای مختلف، فعالیت آنزیمی در دماهای ۲۰ تا ۹۰°C (با فاصله ۱۰°C) سنجیده و نتایج به‌صورت نموداری نمایش داده شد. بالاترین فعالیت آنزیمی به‌عنوان ۱۰۰% در نظر بود[17].

۲-۸-۳- بررسی پایداری آنزیم در حضور سدیم‌کلرید: برای بررسی تاثیر سدیم‌کلرید، غلظت‌های (صفر، ۱%، ۵%، ۱۰%، ۲۵% و ۳۵%) از سدیم‌کلرید به سوپرناتانت اضافه شد و به‌مدت یک‌ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از مدت مقرر فعالیت آنزیمی باقی‌مانده طبق روش ذکرشده سنجیده شد[18].

۲-۸-۴- بررسی پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی: بدین‌منظور غلظت ۲۵% (حجمی/حجمی) از حلال‌های آلی شامل اتانول، متانول، بنزن، ایزوپروپانول، هگزان و استون در بافر بوراکس با اسیدیته مورد نظر تهیه شد. سپس سوپرناتانت با حلال‌های ذکرشده درون لوله درپیچ‌دار مخلوط شد. لوله‌ها در دمای ۳۰°C با دور ۱۲۰rpm به‌مدت ۲ساعت انکوبه شدند و درنهایت فعالیت آنزیمی باقی‌مانده سنجیده شد. مقدار غلظت نهایی حلال ۲۵% (حجمی/حجمی) بود. در نمونه شاهد به جای حلال از آب مقطر استفاده شد[19].

۲-۹- آنالیز آماری

تمامی آزمایشات در سه تکرار و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد.

۳- یافته‌ها

۳-۱- جداسازی و شناسایی گونه باکتری مولد پروتئاز قلیایی برون‌سلولی

چشمه قینرجه دارای دمای ۶۰°C و اسیدیته ۸/۵ است. پس از رقت‌سازی از محیط کشت پایه معدنی دارای باکتری و کشت در محیط اختصاصی اسکیم‌میلک آگار، کلنی با بزرگ‌ترین هاله شفاف به‌عنوان سویه برتر از نظر تولید آنزیم برای ادامه مطالعه انتخاب و پس از چند کشت متوالی خالص شد (شکل ۱ و ۲).

۳-۲- شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی

نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان داد که سویه مورد نظر یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای، دارای آنزیم کاتالاز، فاقد آنزیم اکسیداز، عدم رشد در شرایط بی‌هوازی و متحرک است. همچنین نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن *16S rDNA* نشان داد که این سویه متعلق به گونه *Brevibacillus borstelensis* است و با شماره دستیابی KY933393 در NCBI با نام *Brevibacillus borstelensis AMN* ثبت شد. درخت فیلوژنتیکی سویه مورد نظر در شکل ۳ آمده است.

۳-۳- بررسی میزان فعالیت پروتئازی باکتری *Brevibacillus borstelensis AMN*

میزان فعالیت پروتئازی براساس روش آنسون- هاگیهارا[15]، در دمای ۶۰°C، pH برابر ۹ و در عدم حضور حلال‌های آلی ۰/۵۳واحد بر میلی‌لیتر به دست آمد که به این معنا است که سوپرناتانت در هر دقیقه ۰/۵۳میکرومول تیروزین در نتیجه هیدرولیز کازئین ایجاد می‌کند.

۳-۴- بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم

فعالیت پروتئازی و تولید آنزیم در زمان‌های مختلف ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴، ۹۶ و ۱۰۸ساعت پس از رشد باکتری در دمای ۵۰°C اندازه‌گیری شد. با توجه به نمودار، باکتری بعد از ۴۸ساعت بیشترین میزان پروتئاز را تولید می‌کند و بعد از آن تولید آنزیم کاهش یافته است (نمودار ۲).

۳-۵- تاثیر عوامل مختلف بر فعالیت آنزیم

۳-۵-۱- تاثیر دماهای مختلف بر فعالیت پروتئولیتیکی: فعالیت آنزیمی پروتئاز در دماهای مختلف سنجیده شد. بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۶۰°C بود که این فعالیت مربوط به زیستگاه طبیعی باکتری است. در دماهای پایین‌تر (۲۰°C و ۳۰°C) فعالیت کاهش یافته است. به‌طور کلی آنزیم در دماهای ۵۰°C تا ۷۰°C دارای ۸۱% فعالیت است (نمودار ۳).

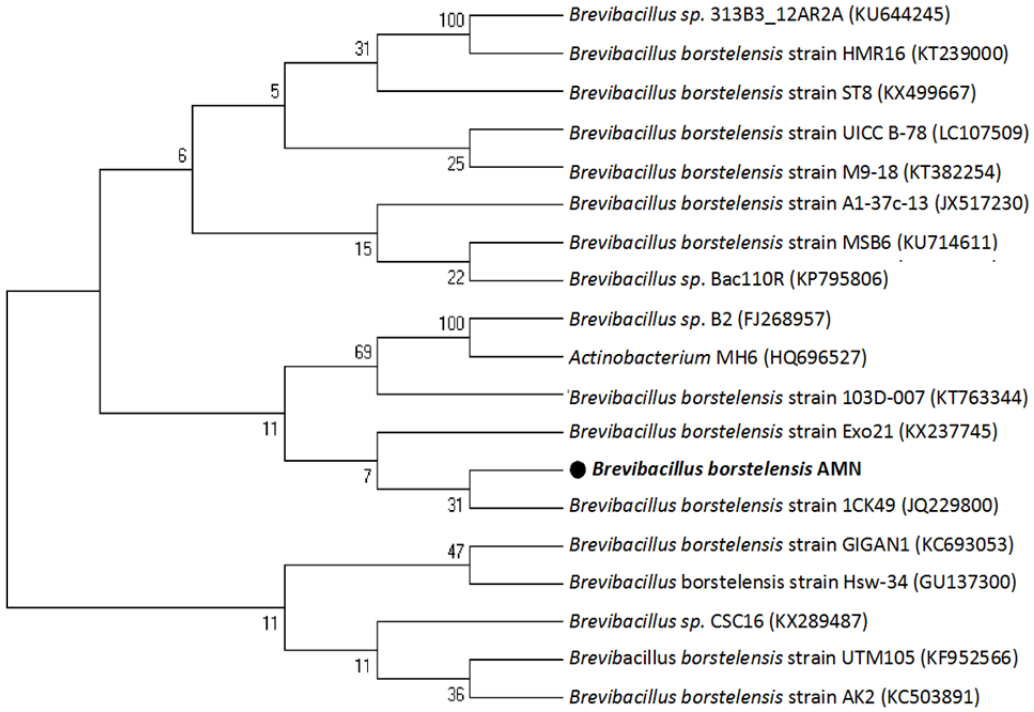
۳-۵-۲- تاثیر pHهای مختلف بر فعالیت آنزیمی: نتایج حاصل از فعالیت پروتئاز سویه جداشده نشان داد که میزان فعالیت در شرایط قلیایی بیشتر از اسیدی است و حداکثر فعالیت در pH برابر ۹ بوده و آنزیم حدود ۷۲% فعالیت خود را در دامنه ۸ تا ۱۰ حفظ کرده است. بنابراین پروتئاز تولیدشده یک پروتئاز قلیایی است (نمودار ۴).

شکل ۱) هاله ایجادشده در نتیجه تجزیه پروتئین‌های موجود در محیط اسکیم‌میلک آگار توسط سویه *Brevibacillus borstelensis AMN* جداشده از آب چشمه، پس از ۲۴ساعت انکوباسیون در دمای ۵۰°C

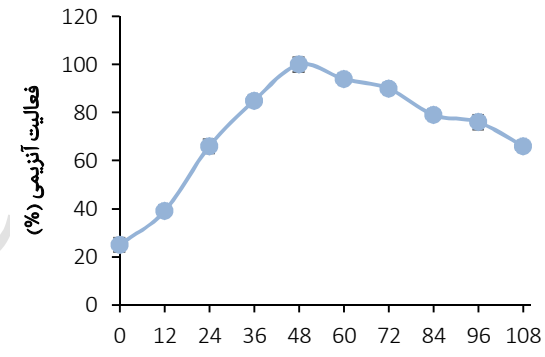
شکل ۲) باسیل‌های گرم مثبت *Brevibacillus borstelensis AMN* در رنگ‌آمیزی گرم (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰X)

Archive of SID

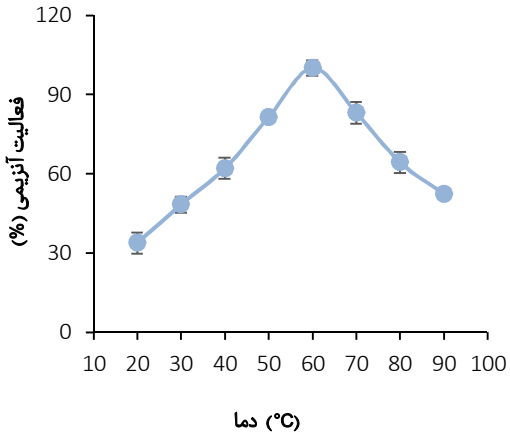
www.SID.ir



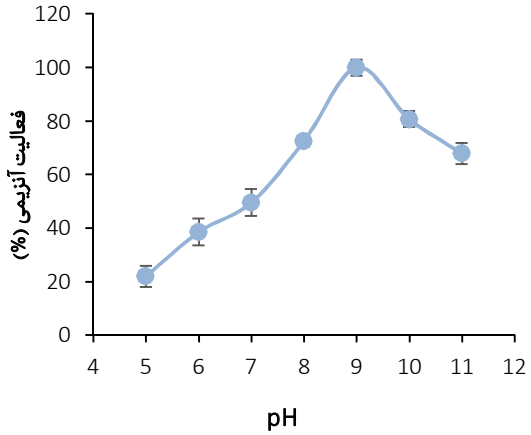
شکل ۳) درخت فیلوژنی باکتری مولد پروتئاز قلیایی برون‌سلولی مقاوم به حلال آلی جداشده از چشمه قینرجه



نمودار ۲) بهینه‌سازی زمان تولید پروتئاز توسط باکتری *Brevibacillus borstelensis AMN*، در محیط کشت نوترینت‌براث، دمای ۵۰°C و میزان pH برابر ۹، باکتری بعد از ۴۸ساعت بالاترین میزان پروتئاز را تولید کرده است.



نمودار ۳) تاثیر دما بر فعالیت پروتئازی سوپرناتانت، سوپرناتانت به همراه کازئین ۰/۷% در دماهای ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰°C به‌مدت ۱۰دقیقه انکوبه شد. بالاترین فعالیت آنزیمی در دمای ۶۰°C بوده است.



نمودار ۴) تاثیر pH روی فعالیت آنزیمی؛ فعالیت پروتئازی در دمای ۶۰°C و در بافرهای سدیم‌استات (با میزان pH برابر ۵)، بافر فسفات (با میزان pH برابر ۶)، تریس_HCl (با میزان pH برابر ۷ و ۸)، و بوراکس (با میزان pH برابر ۹، ۱۰ و ۱۱)، مورد سنجش قرار گرفت.پروتئاز تولیدشده در pH برابر ۹ بالاترین فعالیت را داشته است.

۳-۵-۳- اثر غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید بر پایداری پروتئازی:

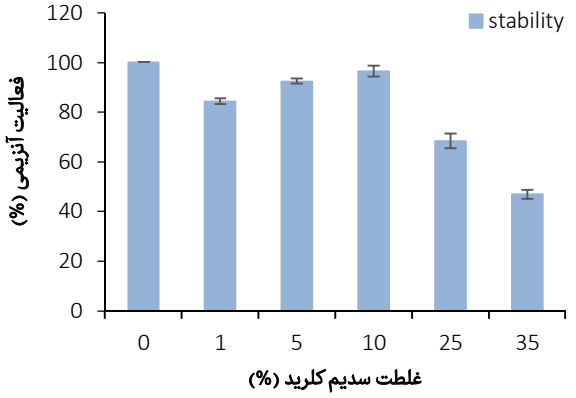
تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید (صفر، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۳۵%) بر پایداری آنزیمی در نمودار نمایش داده شده است. آنزیم پروتئاز پس از یک‌ساعت در حضور ۱۰% و ۵% سدیم‌کلرید به‌ترتیب ۹۶/۴۱% و ۹۲/۳۶% فعالیت خود را حفظ کرده است، با افزایش غلظت به تدریج از فعالیت آنزیم کاسته شده است (نمودار ۵).

۳-۵-۴- تاثیر حلال‌های آلی بر پایداری آنزیمی

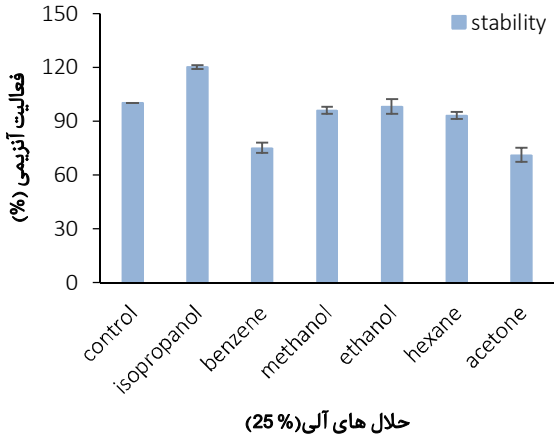
نتایج حاصل از ۲ساعت انکوباسیون در حضور ۲۵% حلال‌های آلی نشان داد که بین حلال‌های آلی به‌ترتیب ایزوپروپانول و اتانول باعث افزایش فعالیت پروتئولیتیکی نسبت به نمونه کنترل (فاقد حلال) شده و در مقابل سایر حلال‌های آلی تغییری زیادی در فعالیت پروتئازی ایجاد نکرده‌اند. با مقایسه نمودار می‌توان به این نتیجه رسید که پایداری آنزیم در حضور ایزوپروپانول بیشتر از نمونه

www.SID.ir

کنترل بوده است. میزان فعالیت پروتئازی باقی‌مانده در حضور سایر حلال‌ها، بیش از ۷۱% بوده است (نمودار ۶).



نمودار ۵) تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید بر پایداری پروتئولیتیکی آنزیم پروتئاز تولیدشده توسط سویه AMN *B. borstelensis*



نمودار ۶) پایداری پروتئولیتیکی آنزیم سویه AMN پس از ۲ساعت انکوباسیون در حضور ۲۵% از حلال‌های آلی و دمای ۳۰°C و دور شیکر ۱۲۰rpm؛ تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

۴- بحث

در این پژوهش از نمونه چشمه قینرجه باکتری *B. borstelensis* AMN جداسازی شد که می‌تواند پروتئاز قلیایی تولید کند. در سال ۲۰۱۲ وانگ و همکاران از چشمه آبگرم اندونزی باکتری Brevibacillus sp. PLI-1 را جدا کردند که قادر به تولید پروتئاز قلیایی است[20].

زمان انکوباسیون تاثیر بسزایی بر میزان ترشح آنزیم دارد که در این پژوهش باکتری بعد از ۴۸ساعت بالاترین میزان پروتئاز را تولید می‌کند. در پروسه‌های صنعتی، زمان از اهمیت والایی برخوردار است و هر چه زمان انجام واکنش کمتر باشد باعث صرفه‌جویی در هزینه‌ها می‌شود. *کوبران* و همکاران در سال ۲۰۱۰ پروتئازی را از جنس باسیلوس جدا کردند که ۲۴ساعت پس از انکوباسیون بیشترین میزان پروتئاز را تولید می‌کند[21].

با توجه به نمودار بالاترین فعالیت پروتئولیتیکی در دمای ۵۰°C تا ۷۰°C است و در دماهای ۸۰°C و ۹۰°C نیز بیشتر از ۵۰% فعالیت خود را حفظ کرده است که نشان‌دهنده این است که آنزیم گرمادوست بوده و می‌توان از آن در صنایع مختلف که نیازمند دماهای بالا است، بهره برد. یکی از اصول بیوتکنولوژیکی در فرآیندهای صنعتی این است که این فرآیندها در دمای بالا و pH قلیایی انجام می‌شوند تا از خطر آلودگی توسط میکروارگانیزم‌های مزوفیل یا اسیددوست مصون باشند[17]. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که دمای بهینه برای فعالیت پروتئازی از ۴۵°C تا ۹۰°C متفاوت است. نتایج مشابهی نیز در مطالعات گذشته گزارش شده است، مانند *ابراهیم* و همکاران در سال ۲۰۱۶ پروتئاز قلیایی را از Bacillus sp. NPST-AK15 جدا کردند که بهینه فعالیتش در دماهای ۶۰ و ۶۵ °C ۶۵ است[22]. همچنین پروتئاز تولیدشده توسط *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* NH1 (*B. licheniformis* NH1) ۱۰۰% فعالیت خود را در دمای ۶۰°C حفظ می‌کند[23]. پروتئاز تولیدشده توسط *باسیلوس استیروترموفیلوس* (*B. stearothermophilus*) [24]، Brevibacillus sp. PLI-1 [20] و *باسیلوس کلاوسی* (*B. clausii*) [25] بیشترین فعالیت آنزیمی را به‌ترتیب در دماهای ۶۵، ۷۰ و ۸۰°C دارند.

در پژهش انجام‌شده، با بررسی نمودار pH نیز مشخص شد که بیشترین فعالیت در pH برابر ۹ است، همچنین در pHهای ۸ تا ۱۱، ۶۷% فعالیت آن باقی‌مانده است. مشابه این نتایج در پروتئازهای جداشده از جنس استرپتومایسس (Streptomyces sp. CN90) [26]، ترموآکتینومیست (Thermoactinomyces sp. RS1) [27]، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis* AP-MSU 6) [28]، *باسیلوس لتروسپوروس* AK1 (*Bacillus laterosporus*- AK1) [29] مشاهده شد که فعالیت بهینه‌ای در pH برابر ۹ داشتند. میزان pH بهینه یک پروتئاز قلیایی از Brevibacillus sp. PLI-1 نیز ۹ گزارش شده است[20]. *کامران* و همکاران در سال ۲۰۱۵ یک پروتئاز قلیایی از باسیلوس با pH بهینه ۸ را گزارش کردند[17].

نتایج مشاهده‌شده در این پژوهش، موید این است که بالاترین میزان فعالیت آنزیمی در pH برابر ۹ حاصل می‌شود. فعال‌بودن آنزیم در این محدوده، نشان از خاصیت قلیایی آن دارد که این موضوع از لحاظ بیوتکنولوژی قابل توجه است. این ویژگی مهم برای استفاده از پروتئاز قلیایی به‌عنوان افزودنی در مواد شوینده است زیرا pH مواد شوینده رختشویی به‌طور کلی ۱۲-۹ است[30].

در این پژوهش، فعالیت پروتئازی در حضور نمک نیز مورد بررسی قرار گرفت. نمودار نشان می‌دهد پروتئاز حاصل در طیف گسترده‌ای از غلظت‌ها فعال بوده و بالاترین فعالت آنزیمی در حضور ۱۰% سدیم‌کلرید مشاهده شد. در بالاترین غلظت (۳۵%) دارای ۴۶% فعالیت است.

در صنایع شوینده نمک سدیم‌کلرید از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و باعث دانه‌دانه‌سازی پروتئاز پیش از اضافه‌شدن به ترکیبات شوینده می‌شود، همچنین پایداری نسبت به نمک بالا ویژگی ممتازی برای استفاده در فرآیندهای صنعتی و بیوتکنولوژی (که به انجام در محیطی با نمک بالا یا فشار اسمزی نیاز دارد) است[31]. در غلظت بالای نمک با ایجاد پل‌های نمکی در اطراف پروتئین‌ها از هیدرولیز آنها توسط آنزیم جلوگیری شده به همین دلیل فعالیت آنزیمی کاهش یافته است[32]. *باسیلوس الویونسیز* CAS 5 (*Bacillus alveayuensis* CAS 5) یک پروتئاز قلیایی مقاوم به نمک تولید می‌کند که در طیف گسترده‌ای از غلظت سدیم‌کلرید فعال بوده و حداکثر فعالیت آن در حضور ۳۰% سدیم‌کلرید است[11]. *آنانمالای* و همکاران در سال ۲۰۱۴ سویه‌ای به نام *باسیلوس فیرموس* CAS 7 (*Bacillus firmus* CAS 7) شناسایی کردند که پروتئاز قلیایی تولید می‌کند که بیشترین فعالیت آن در

Archive of SID
www.SID.ir

حضور ۳۰% سدیم‌کلرید و حتی ۸۵% فعالیت خود را در نمک با غلظت ۳۵% حفظ کرده است[31]. در حالی که *ابراهیم* و همکاران یک پروتئاز قلیایی با بالاترین فعالیت در حضور ۵% سدیم‌کلرید گزارش کردند. برای درمان چشمه‌های آب‌های زیرزمینی می‌توان از آنزیم‌های پایدار در برابر غلظت بالای نمک استفاد کرد[22].

آنزیم در حضور طیف گسترده‌ای از حلال‌های آلی فعالیت داشته و پایدار باقی می‌ماند. بیشترین فعالیت آن در غلظت ۲۵% ایزوپروپانول به میزان ۱۲۴% مشاهده شد. میزان فعالیت آن در ۲۵% اتانول، هگزان، استون، بنزن و متانول پس از ۲ساعت انکوباسیون به‌ترتیب ۱۰۶%، ۹۵%، ۹۱%، ۸۹% و ۷۹% بوده است. بنابراین نتایج به وضوح نشان‌دهنده این است که آنزیم حاصل از سویه AMN یک پروتئاز مقاوم به حلال آلی است که بیش از نیمی از فعالیتش را در حضور ۲۵% از حلال‌های آلی مختلف حفظ کرده است و می‌توان از آن در فرآیندهای سنتزی آلی و با اهمیت تجاری که ناپایدار یا نامحلول در آب هستند و سنتز آنها نیازمند حضور حلال‌های آلی است، بهره برد.

به‌کارگیری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی و مایعات یونی یک موضوع جذاب و قابل پیشرفت در بیوتکنولوژی بوده و هست[33]. بعضی از مواد مورد استفاده در واکنش‌های آنزیمی (سوبسترا) نامحلول در آب هستند و به‌منظور انجام فرآیند به حضور حلال نیاز است. در حضور حلال‌های آلی آنزیم‌های هیدرولیتیک، واکنش‌های سنتزی که عکس فرآیند هیدرولیز است، را نیز کاتالیز می‌کنند. با اضافه‌کردن حلال آلی، نسبت تعداد مول‌های آب به کل مول‌های مواد موجود در محیط واکنش کاهش می‌یابد و مسیر واکنش را به سمت سنتز تغییر می‌دهد[12].

فعالیت پروتئاز حاصل از *باسیلوس آلویونسیز* (*Bacillus alveayuensis* CAS 5) در حضور استونیتریل و ایزوپروپانول به‌ترتیب ۱۱۸/۳۴% و ۱۱۲/۲۶% افزایش یافته است[11]. *وانگ* و همکاران پروتئاز حاصل از *کریزوباکتریوم تاینانس* (*C. taeanense* TKU001) را گزارش کردند که ۷۶% فعالیت خود را در حضور حلال‌های آلی حفظ می‌کند[34]. ایزوپروپانول افزاینده فعالیت پروتئولیتیکی پروتئاز قلیایی حاصل از *باسیلوس فیرموس* (*Bacillus firmus* CAS 7) CAS7 تا ۱۱۵/۶% است[31]. همچنین پروتئاز تولیدشده توسط *باسیلوس سرئوس* کمتر از ۸۰% فعالیت خود را در حضور حلال‌هایی مانند استون، بنزن و ایزوپروپانول حفظ می‌کند[35].

از آنجایی که فعالیت پروتئازی بالایی در حضور نمک نیز مشاهده شد و نمک ممکن است موجب کاهش فعالیت آب شود، بنابراین پایداری نسبت به حلال‌ها راه حل مناسبی برای استفاده در واکنش‌های آبی و آلی است[31]. با توجه به مزیت‌های مشاهده‌شده، می‌توان گفت که پروتئاز حاصل می‌تواند انتخاب مناسبی برای استفاده در صنایع شوینده و سنتز مواد آلی در محیط‌های غیرآبی شود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم فراهم‌شدن امکانات و تجهیزات لازم برای انجام آزمایشات کلونینگ و بیان ژن تولیدکننده پروتئاز و تولید پروتئازهای نوترکیب دیگر برای افزایش غلظت آنزیم تولیدی اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی خاصیت ضدمیکروبی آنزیم، آزمایشات بیوسورفاکتانت و بررسی ساختار آنزیم به‌منظور به‌کارگیری در صنایع دیگر مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین می‌توان با بهره‌گیری از روش‌های بیوتکنولوژیکی عملکرد و پایداری آنزیم را افزایش داد.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری جداشده قادر به تولید پروتئازی است که دارای خصوصیات متمایزی مانند فعالیت در دمای بالا و pH قلیایی و پایداری قابل توجه در حضور حلال‌های آلی دارد که هر کدام از آنها در صنایع بیوتکنولوژی سنتزی اهمیت بالایی دارند. با توجه به این ویژگی‌ها، این آنزیم را می‌توان به‌عنوان یکی از آنزیم‌های صنعتی معرفی کرد تا در صنایع دارویی و بیوتکونولوژی برای تولید ترکیبات مهم دارویی و صنعتی در محیط‌های آلی از آن بهره برد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از دانشگاه شهید بهشتی برای تامین منابع مالی این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تاییدیه‌اخلاقی: با توجه به اینکه در پژوهش حاضر از هیچ نمونه انسانی یا حیوانی استفاده نشده است، به کد اخلاق پزشکی نیازی نیست.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مهناز نصرطاهری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳۰%)؛ غلامحسین ابراهیمی‌پور (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۶۰%)؛ حسین صادقی (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۱۰%)

منابع مالی: منابع مالی طرح توسط دانشگاه شهید بهشتی تامین شده است.

منابع

1- Pant G, Prakash A, Pavani JVP, Bera S, Deviram GVNS, Kumar A, et al. Production, optimization and partial purification of protease from Bacillus subtilis. J Taibah Univ Sci. 2015;9(1):50-5.

2- Uyar F, Porsuk I, Kizil G, Yilmaz EI. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated Bacillus cereus strain CA15. Eurasian J Biosci. 2011;5(1):1-9.

3- Bizuye A, Sago A, Admasu G, Getachew H, Kassa P, Amsaya M. Isolation, optimization and characterization of protease producing bacteria from soil and water in Gondar town, North West Ethiopia. Int J Bacteriol Virol Immunol. 2014;1(3):020-4.

4- Radha S, Nithya VJ, Himakiran Babu R, Sridevi A, Prasad N, Narasimha G. Production and optimization of acid protease by Aspergillus spp under submerged fermentation. Arch Appl Sci Res. 2011;3(2):155-63.

5- Raval VH, Pillai S, Rawal CM, Singh SP. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. Process Biochem. 2014;49(6):955-62.

6- Jisha VN, Smitha RB, Pradeep S, Sreedevi S, Unni KN, Sajith S, et al. Versatility of microbial proteases. Adv Enzyme Res. 2013;1(3):39-51.

7- Shafee N, Aris SN, Raja Noor Zaliha Abd Rahman, Basri M, Salleh AB. Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium Bacillus cereus strain 146. J Appl Sci Res. 2005;1(1):1-8.

8- Singhal P, Nigam VK, Vidyarthi AS. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. Int J Adv Biotechnol Res. 2012;3(3):653-69.

www.SID.ir

9- Moreno B, Vivas A, Nogales R, Benitez E. Solvent tolerance acquired by Brevibacillus brevis during an olive-waste vermicomposting process. Ecotoxicol Environ Saf. 2009;72(8):2109-14.
10- Li GY, Cai YJ, Liao XR, Yin J. A novel nonionic surfactant- and solvent-stable alkaline serine protease from Serratia sp. SYBC H with duckweed as nitrogen source: Production, purification, characteristics and application. J Ind Microbiol Biotechnol. 2011;38(7):845-53.
11- Annamalai N, Rajeswari MV, Balasubramanian T. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from Bacillus alveayuensis CAS 5 using marine wastes. Food Bioprod Process. 2014;92(4):335-42.
12- Doukyu N, Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. Biochem Eng J. 2010;48(3):270-82.
13- Ben Elhoul M, Zaraî Jaouadi N, Rekik H, Bejar W, Boulkour Touioui S, Hmidi M, et al. A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from Streptomyces koyangensis TN650. Int J Biol Macromol. 2015;79:871-82.
14- Ogino H, Watanabe F, Yamada M, Nakagawa S, Hirose T, Noguchi A, et al. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant Pseudomonas aeruginosa PST-01. J Biosci Bioeng. 1999;87(1):61-8.
15- Thumar J, Singh SP. Two-step purification of a highly thermostable alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic Streptomyces clavuligerus strain Mit-1. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007;854(1-2):198-203.
16- Donohue TM Jr, Osna NA. Intracellular proteolytic systems in alcohol-induced tissue injury. Alcohol Res Health. 2003;27(4):317-24.
17- Kamran A, Ur Rehman H, Ul Qader SA, Baloch AH, Kamal M. Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic Bacillus sp. J Genet Eng Biotechnol. 2015;13(1):59-64.
18- Anandharaj M, Sivasankari B, Siddharthan N, Rani RP, Sivakumar S. Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metallo-protease from novel Bacillus alkalitelluris TWI3 isolated from tannery waste. Appl Biochem Biotechnol. 2016;178(8):1666-86.
19- Annamalai N, Rajeswari MV, Thavasi R, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T. Optimization, purification and characterization of novel thermostable, haloalkaline, solvent stable protease from Bacillus halodurans CAS6 using marine shellfish wastes: A potential additive for detergent and antioxidant synthesis. Bioprocess Biosyst Eng. 2013;36(7):873-83.
20- Wang Sh, Lin X, Huang X, Zheng L, Zilda DS. Screening and characterization of the alkaline protease isolated from PLI-1, a strain of Brevibacillus sp. collected from Indonesia's hot springs. J Ocean Univ China. 2012;11(2):213-8.
21- Kuberan T, Sangaralingam S, Thirumalai Arasu V. Isolation and optimization of protease producing bacteria from halophilic soil. J Biosci Res. 2010;1(3):163-74.
22- Ibrahim ASS, Al-Salamah AA, Elbadawi YB, El-Tayeb MA, Ibrahim SSS. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic Bacillus sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. Electron J Biotechnol. 2015;18(3):236-43.
23- El Hadj-Ali N, Agrebi R, Ghorbel-Frikha B, Sellami-Kamoun A, Kanoun S, Nasri M. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated Bacillus licheniformis NH1. Enzyme Microb Technol. 2007;40(4):515-23.
24- Zhang M, Zhao C, Du L, Lu F, Gao C. Expression, purification, and characterization of a thermophilic neutral protease from Bacillus stearothermophilus in Bacillus subtilis. Sci China C Life Sci. 2008;51(1):52-9.
25- Ganesh Kumar C, Joo HS, Koo YM, Paik SR, Chang CS. Thermostable alkaline protease from a novel marine haloalkalophilic Bacillus clausii isolate. World J Microbiol Biotechnol. 2004;20(4):351-7.
26- Lazim H, Mankai H, Slama N, Barkallah I, Limam F. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by Streptomyces sp. CN902. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009;36(4):531-7.
27- Verma A, Ansari MW, Anwar MS, Agrawal R, Agrawal S. Alkaline protease from Thermoactinomyces sp. RS1 mitigates industrial pollution. Protoplasma. 2014;251(3):711-8.
28- Maruthiah T, Esakkiraj P, Prabakaran G, Palavesam A, Immanuel G. Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine Bacillus subtilis AP-MSU 6. Biocatal Agric Biotechnol. 2013;2(2):116-9.
29- Arulmani M, Aparanjini K, Vasanthi K, Arumugam P, Arivuchelvi M, Thangavelu Kalaichelvan P. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic Bacillus laterosporus-AK1. World J Microbiol Biotechnol. 2007;23(4):475-81.
30- Kalisz HM. Microbial proteinases. In: Arnaud A. Enzyme studies. Berlin: Springer; 1988. pp. 1-65.
31- Annamalai N, Rajeswari MV, Sahu SK, Balasubramanian T. Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from Bacillus firmus CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability. Process Biochem. 2014;49(6):1012-9.
32- Kembhavi AA, Kulkarni A, Pant A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from Bacillus subtilis NCIM no. 64. Appl Biochem Biotechnol. 1993;38(1-2):83-92.
33- Ogino H, Ishikawa H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. J Biosci Bioeng. 2001;91(2):109-16.
34- Wang SL, Yang CH, Liang TW, Yen YH. Optimization of conditions for protease production by Chryseobacterium taeanense TKU001. Bioresour Technol. 2008;99(9):3700-7.
35- Doddapaneni KK, Tatineni R, Vellanki RN, Rachcha S, Anabrolu N, Narakuti V, et al. Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from Bacillus cereus. Microbiol Res. 2009;164(4):383-90.

Archive of SID
www.SID.ir