



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.

¹Microbiology 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 haloalkaliphilic ... [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 ...

بررسی مقاومت به حلال‌های آلی در پروتئاز قلیایی *Brevibacillus borstelensis* AMN گرم ایران

مهناز نصر طاهری * MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

غلامحسین ابراهیمی پور 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 اسکیممیک آگار و سنجش قطر هاله انجام شد. سنجش فعالیت آنزیمی به روش هیدرولیز کازئین به عنوان 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 سدیم کلرید بر فعالیت پروتئازی مورد سنجش قرار گرفت. سویه جداسازی شده با مطالعه نتایج حاصل از تعیین توالی، خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی به عنوان سویه جدیدی از *Brevibacillus borstelensis* شناسایی شد که قادر به تولید پروتئاز برون‌سلولی مقاوم به حلال‌های آلی با فعالیت آنزیمی ۰/۵۳ واحد بر میلی‌لیتر است. پروتئاز تولید شده پس از ۲ ساعت 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 تولید شده در pH برابر ۹ و دمای ۶۰°C بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج حاضر نشان داد که پروتئاز جداسازی شده 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: آکالین 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 میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند که از این میان میکروارگانیسم‌ها به دلیل سریع‌الرشد بودن، 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 به دلیل 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*)، آکالیزن (*Alcaligenes*)، آرتروباکتر (*Arthrobacter*)، باسیلوس (*Bacillus*)، هالوموناس (*Halomonas*)، سودوموناس (*Pseudomonas*) و سراسیا هستند[6] که از میان آنها باسیلوس‌ها شاخص‌ترین گروه برای تولید پروتئاز هستند[7]. به منظور کاربرد کارآمد پروتئازها در صنایع مختلف نیاز به پایداری و فعالیت آنزیم در شرایط سخت همچون pH بالا، دمای بالا، حلال‌های آلی و حضور سدیم کلرید 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 به عنوان 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 به دلیل غیرفعال شدن آنزیم‌ها در محیط‌های آلی محدود می‌شود، به همین دلیل دانشمندان به دنبال 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 حلال‌های 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 به دنبال آنزیم‌هایی با ویژگی‌های ویژه و خاص هستند[13]. سودوموناس آئروجینوزا (*P. aeruginosa* 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].

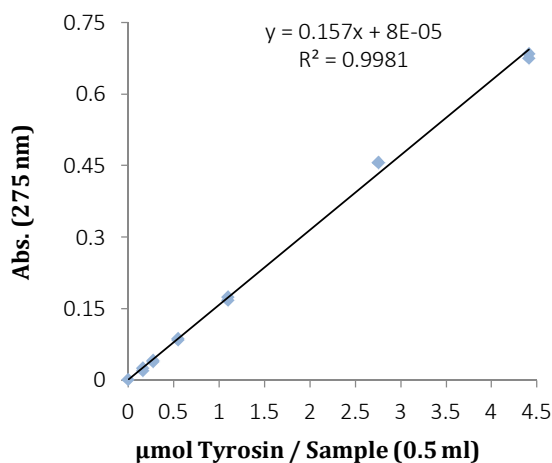
در پژوهش حاضر، یک باکتری تولیدکننده پروتئاز قلیایی برون‌سلولی از چشمه قینرجه واقع در استان اردبیل جداسازی شد و خصوصیات بیوشیمیایی آن مانند فعالیت، پایداری آن در دما و pHهای مختلف، حضور حلال‌های آلی و غلظت‌های مختلف سدیم کلرید مورد بررسی قرار گرفت.

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 استفاده شده در تکثیر قطعه ژن *rdna* 16S که شامل 27F و 1492R بودند، از شرکت پیشگام و مارکر وزن مولکولی ۱۰۰۰ (جفت‌بازی DNA از شرکت فرمنتاز تهیه شدند.

کازئین به‌عنوان سوبسترای طبیعی استفاده شد. پس از تلقیح و گرماگذاری به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰°C، مقدار یک میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته و با دور ۱۰۰۰۰xg برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و از محلول رویی فاقد باکتری برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. به ۵/۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت، ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش (۷/۰٪ کازئین در بافر بوراکس-سدیم‌هیدروکسید، میزان pH برابر ۹، ۱۰ میلی‌مولار) اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰°C قرار داده شد. سپس ۳/۲ میلی‌لیتر محلول متوقف‌کننده (TCA ۱۱/۱ مولار، سدیم‌استات ۲۲/۰ مولار و استیک‌اسید ۳۳/۰ مولار) اضافه و پس از ۲۰ دقیقه 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 سانتریفیوژ شده با سنجش میزان جذب نوری آن در طول موج ۲۷۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست‌آمده با منحنی استاندارد مقایسه و به‌صورت واحد آنزیمی گزارش شدند. هر واحد آنزیمی برابر یک میکرومول 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 ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (معادل صفر، ۰/۱۷، ۰/۲۸، ۰/۵۵، ۰/۱۱۰، ۰/۱۷۶ و ۰/۲۷۶ میکرومول بر میلی‌لیتر) را در ۳ میلی‌لیتر بافر بوراکس و ۳/۲ میلی‌لیتر متوقف‌کننده حل نموده و جذب آنها در طول موج ۲۷۵ نانومتر 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 pH های مختلف: برای بررسی فعالیت آنزیمی در pH های مختلف، فعالیت آنزیمی در بافرهای با

۲-۲- جمع‌آوری نمونه: نمونه‌برداری در مرداد ۱۳۹۴ از آب چشمه قینرجه واقع در استان اردبیل انجام شد. دمای آب مورد آزمایش برابر ۶°C، pH آن حدود ۸/۶ و شوری آن ۸/۸٪ در محل اندازه‌گیری شد. آب چشمه زلال، بی‌رنگ، مزه‌اش کمی شور و گس است. نمونه‌ها توسط یک ظرف استریل حدوداً از عمق ۱۰ سانتی‌متری 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 ۵ میلی‌لیتر از نمونه چشمه به محیط کشت پایه معدنی حاوی ۵/۵ گرم بر لیتر دی‌پتاسیم فسفات، ۲/۰ گرم بر لیتر منیزیم سولفات ۷/۰ آب، ۱/۰ گرم بر لیتر سولفات آهن ۷/۰ آب، ۰/۱ گرم بر لیتر کلسیم کلرید ۷/۰ آب و ۲۰ گرم 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 ۴۸ ساعت 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 جداسازی شده از روش‌های توالی‌یابی *16S rDNA* استفاده شد. هر یک از گونه‌های باکتریایی دارای توالی *16S rDNA* منحصر به خود هستند. ابتدا باکتری روی محیط نوترینت‌براث کشت داده شد پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۵۰°C، یک میلی‌لیتر از محیط کشت در دمای ۴°C به‌مدت ۱۰ دقیقه 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 ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

در این پژوهش از پرایمرهای عمومی 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (27F) و 5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3' (1492R) که توانایی تکثیر *16S rDNA* ریبوزومی را برای بیشتر باکتری‌های حقیقی دارند، استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) نیز مطابق برنامه زیر انجام شد: ۱) دمای اولیه ۹۴°C برای مدت ۵ دقیقه؛ ۲) ۳۰ سیکل که هر کدام شامل ۹۴°C به‌مدت یک دقیقه، ۵۳°C به‌مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت یک دقیقه؛ ۳) مرحله طول‌شدن نهایی ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه، 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) با بانک مورد بررسی قرار گرفتند و همولوژی 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

دقیقه ۵۳/۰ میکرومول تیروزین در نتیجه هیدرولیز کازئین ایجاد می‌کند.

۴-۳- بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم

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

۵-۳- 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 جدا شده 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 تولید شده یک پروتئاز قلیایی است (نمودار ۴).



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



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

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 و ۱۰) 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 کاتاکتیک 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].

۳-۸-۲- 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 ذکر شده سنجیده شد [18].

۴-۸-۲- 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 ذکر شده درون لوله در پیچ‌دار مخلوط شد. لوله‌ها در دمای ۳۰°C با دور ۱۲۰۰ rpm به‌مدت ۲ ساعت انکوبه شدند و در نهایت 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].

۹-۲- آنالیز آماری

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

۳- یافته‌ها

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

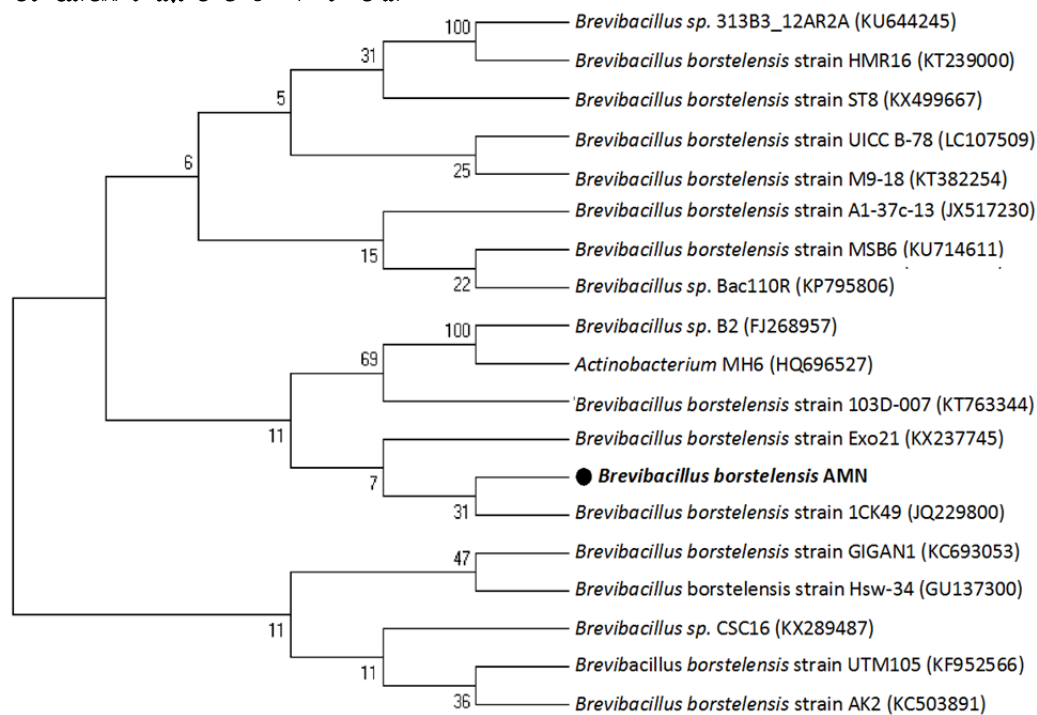
چشمه قیبرجه دارای دمای ۶۰°C و اسیدیته ۸/۵ است. پس از رقت‌سازی از محیط کشت پایه معدنی دارای باکتری و کشت در محیط اختصاصی اسکیم‌میلک آگار، کلنی با بزرگ‌ترین هاله شفاف به‌عنوان سویه برتر از نظر تولید آنزیم برای ادامه مطالعه انتخاب و پس از چند کشت متوالی خالص شد (شکل ۱ و ۲).

۲-۳- شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی

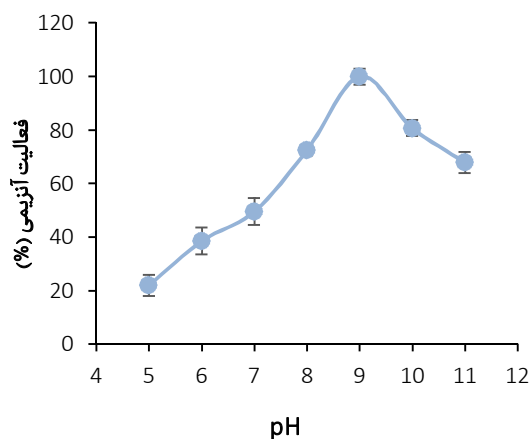
نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان داد که سویه مورد نظر یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای، دارای آنزیم کاتالاز، فاقد آنزیم اکسیداز، عدم رشد در شرایط بی‌هوازی و متحرک است. همچنین نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن 16S rDNA نشان داد که این سویه متعلق به گونه *Brevibacillus borstelensis* است و با شماره دستیابی KY933393 در 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 ۵۳/۰ واحد بر میلی‌لیتر به دست آمد که به این معنا است که سوپرناتانت در هر



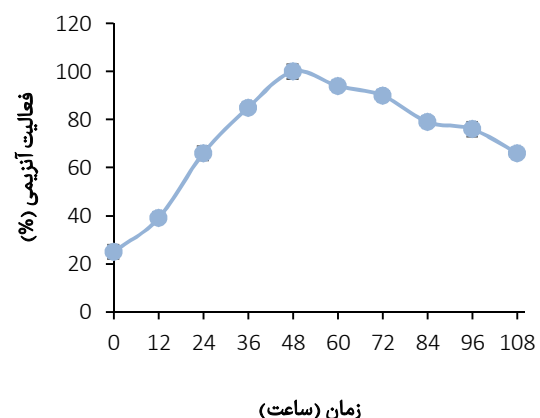
شکل ۳) درخت فیلوژنی باکتری مولد پروتئاز قلیایی برون‌سلولی مقاوم به حلال آلی جدا شده از چشمه قینرجه



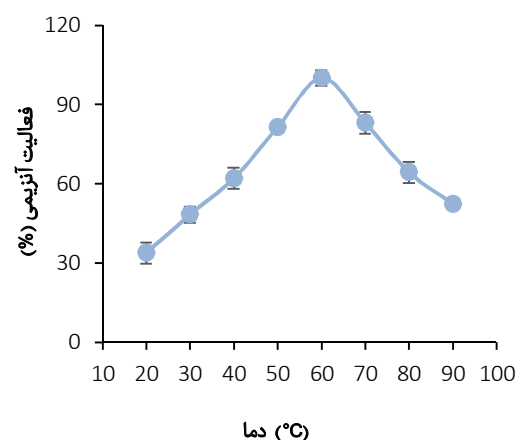
نمودار ۴) تاثیر pH روی فعالیت آنزیمی؛ فعالیت پروتئازی در دمای ۶۰°C و در بافرهای سدیم استات (با میزان pH برابر ۵)، بافر فسفات (با میزان pH برابر ۶)، تریس-HCl (با میزان pH برابر ۷ و ۸)، و بوراکس (با میزان pH برابر ۹ و ۱۰ و ۱۱)، مورد سنجش قرار گرفت. پروتئاز تولید شده در pH برابر ۹ بالاترین فعالیت را داشته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

۳-۵-۳- اثر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید بر پایداری پروتئازی: تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید (صفر، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۳۵٪) بر پایداری آنزیمی در نمودار نمایش داده شده است. آنزیم پروتئاز پس از یک ساعت در حضور ۱۰٪ و ۵٪ سدیم کلرید به ترتیب 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 ۲ ساعت انکوباسیون در حضور ۲۵٪ حلال‌های آلی نشان داد که بین حلال‌های آلی به ترتیب 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

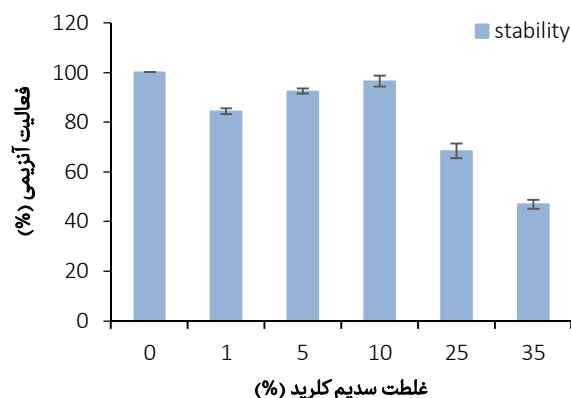


نمودار ۲) بهینه‌سازی زمان تولید پروتئاز توسط باکتری *Brevibacillus borstelensis* AMN. در محیط کشت نوترینت براث، دمای ۵۰°C و میزان pH برابر ۹، باکتری بعد از ۴۸ ساعت بالاترین میزان پروتئاز را تولید کرده است.

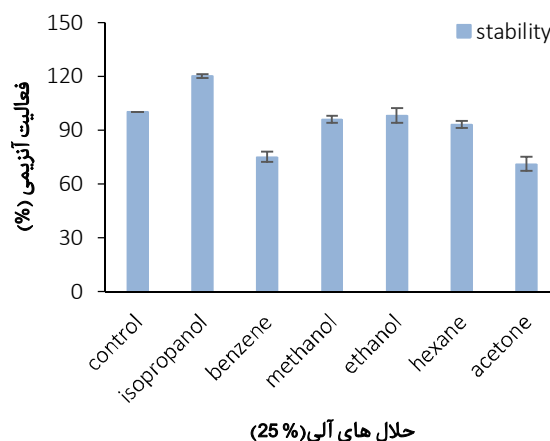


نمودار ۳) تاثیر دما بر فعالیت پروتئازی سوپرناتانت، سوپرناتانت به همراه کازئین ۷٪ در دماهای ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰°C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. بالاترین فعالیت آنزیمی در دمای ۶۰°C بوده است.

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



نمودار ۵) تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید بر پایداری پروتئولیتیکی آنزیم *B. borstelensis* AMN توسط سویه



نمودار ۶) پایداری پروتئولیتیکی آنزیم سویه AMN پس از ۲ ساعت 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 قینجره باکتری *B. borstelensis* 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 ۴۸ ساعت 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. کوپران و همکاران در سال ۲۰۱۰ پروتئازی را از جنس باسیلوس جدا کردند که ۲۴ ساعت 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 از 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 میکروارگانیسم‌های 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 است [22]. همچنین پروتئاز تولیدشده توسط باسیلوس لیکنی‌فرمیس *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 به ترتیب در دماهای ۶۵، ۷۰ و ۸۰°C دارند.

در پژوهش 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 استریتومایسس *(Streptomyces* sp. CN90) [26] *Thermoactinomyces* sp. CN90 [26]، ترمواکتینومیست *(Bacillus* AP-MSU 6) [27] RS1) *Bacillus subtilis* AP-MSU 6) [28]، باسیلوس لتروسپوروس *(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. فعال بودن 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 ۹-۱۲ 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 فعالیت آنزیمی در حضور ۱۰٪ سدیم کلرید مشاهده شد. در بالاترین غلظت (۳۵٪) دارای ۴۶٪ فعالیت است.

در صنایع شوینده نمک سدیم کلرید 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 الویونسز *CAS 5 (Bacillus alveayuensis)* یک پروتئاز قلیایی مقاوم به نمک تولید می‌کند که در طیف گسترده‌ای از غلظت سدیم کلرید فعال بوده و حداکثر فعالیت آن در حضور ۳۰٪ سدیم کلرید است [11]. آنانملای و همکاران در سال ۲۰۱۴ سویه‌ای به نام باسیلوس فیرموس *CAS 7 (Bacillus firmus)* شناسایی کردند که پروتئاز قلیایی تولید می‌کند که بیشترین فعالیت آن در

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 بیوتکنولوژی 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.

تاییدیه اخلاقی: 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 منافی 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.

حضور ۳۰٪ سدیم‌کلرید و حتی ۸۵٪ فعالیت خود را در نمک با غلظت ۳۵٪ حفظ کرده است^[31]. در حالی که *بر/هیم* 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 استفاده 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 ۲ ساعت انکوباسیون به ترتیب 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 اضافه کردن 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 آلیوینسیز CAS 5 (Bacillus alveayuensis CAS 5)* در حضور استونیتریل و ایزوپروپانول به ترتیب ۱۸/۳۴٪ و ۱۱۲/۲۶٪ افزایش یافته است^[11]. وانگ و همکاران پروتئاز حاصل از *کریزیوپاکتریوم تایننس C. TKU001 (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 CAS7 (Bacillus firmus CAS 7)* 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 فراهم شدن 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 ضد میکروبی 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.

- 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.
- 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, Zerafi Jaouadi N, Rekik H, Bejar W, Boulkour Touiou 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* TW13 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.