Isolation and Identification of an Alkaliplilic Thermo-tolerant Protease producing *Bacillus* sp. from Dehloran Hot Spring: Production Optimization and Investigation of the Activity and Stability of the Enzyme

Maryam Mehrabi *
Assistant professor, Department of Biology, Faculty of sciences, Razi university, Kermanshah, Iran, m.mehrabi@razi.ac.ir
Lale Nazari
M.Sc., Department of Biology, Faculty of sciences, Razi university, Kermanshah, Iran, nazari.lale@stu.razi.ac.ir
Zhila Rostami
M.Sc., Department of Biology, Faculty of sciences, Razi university, Kermanshah, Iran, zh.rostami@razi.ac.ir

Abstract

Introduction: Thermophilic proteases can be used in various industries, including detergents, pharmaceuticals, food, etc. These enzymes are produced by thermophilic microorganisms, including bacteria.

Materials and methods: Sampling was carried out from Dehloran hot springs in Ilam province in the west of Iran to find new protease producing bacteria. Then, the effect of pH, temperature and finally the effect of different heating time on the production of protease enzyme were evaluated. Then, Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed to detect the strain. Protease was purified through anion exchange using DEAE-sepharose column and its molecular weight was estimated using SDS-PAGE technique. Then, activity and stability of the enzyme were investigated in temperature and pH range.

Results: Among isolated strains, bacteria Bacillus sp. DEM07 (registered in the World Gene Bank with access number KY392988) with the highest diameter of the protease clear zone, was selected to produce thermo tolerant alkaline protease. The maximum production of the alkaline protease enzyme was observed at 50 ° C, pH 7 and 48 hours after culture. The protease enzyme was purified by anionic chromatography and its molecular weight was estimated to be about 27.5 kDa after purification. The enzyme was active and stable at the temperature range of 30 to 55 ° C and the optimum temperature of the enzyme activity was observed at 50 ° C. The pH range for activity and its stability was from 4 to 11, and the optimum activity of the enzyme was observed at pH 10.

Discussion and conclusion: In this study, the protease enzyme purified from Bacillus sp. DEM07 is a thermo tolerant alkalophilic protease. On the other hand, by creating the optimal conditions for achieving high production of thermo-tolerant alkalophilic protease, this enzyme has a high potential for use in various industries.

Key words: Protease, Hot spring, Optimization, *Bacillus*

* Corresponding author
Received: August 11, 2018 / **Accepted:** November 13, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۲۹، بهار ۱۳۹۸، صفحه ۹۶- ۸۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۲۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۲

جداسازی و شناسایی یک گونه *باسیلوس* قلیادوست مقاوم به حرارت تولیدکنندهٔ پروتئاز از دریاچهٔ آب گرم دهلران: بهینه‌سازی تولید و بررسی فعالیت و پایداری دمایی

مریم مهرابی*: استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، m.mehrabi@razi.ac.ir
لاله نظری: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، nazari.lale@stu.razi.ac.ir
ژیلا رستمی: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، zh.rostami@razi.ac.ir

چکیده

مقدمه: پروتئازهای گرمادوست در صنایع مختلف ازجمله شوینده، دارویی، غذایی و ... استفاده می‌شوند و ریزموجودات گرمادوست ازجمله باکتری‌ها آنزیم‌های یادشده را تولید می‌کنند.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری از چشمهٔ آب گرم دهلران واقع در استان ایلام در غرب ایران به‌منظور یافتن باکتری‌های جدید تولیدکنندهٔ پروتئاز انجام شد. اثر اسیدیته، دما و درنهایت زمان گرماگذاری بر تولید آنزیم پروتئاز بررسی و سنجیده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای شناسایی مولکولی سویهٔ مدنظر انجام شد. آنزیم پروتئاز با کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE-Sephrose خالص‌سازی شد و وزن مولکولی آن به روش SDS-PAGE تخمین زده شد. فعالیت و پایداری آنزیم در گستره‌های دما و اسیدیته بررسی شد.

نتایج: از میان سویه‌های جداسازی‌شده، باکتری *باسیلوس* DEM07 (ثبت‌شده در بانک جهانی ژن با شماره دسترسی KY392988) با بیشترین قطر هالهٔ پروتئازی برای تولید آلکالین‌پروتئاز گرمادوست انتخاب شد. حداکثر تولید آنزیم آلکالین‌پروتئاز در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، اسیدیتهٔ ۷ و پس‌از ۴۸ ساعت کشت مشاهده شد. آنزیم پروتئاز با استفاده از کروماتوگرافی تعویض آنیونی خالص‌سازی شد و وزن مولکولی آن پس‌از خالص‌سازی حدود ۲۷/۵ کیلودالتون تخمین زده شد. آنزیم در محدودهٔ دمایی ۳۰ تا ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد فعال و پایدار بود و دمای بهینهٔ فعالیت آن در ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد مشاهده شد. گسترهٔ اسیدیته برای فعالیت و پایداری آنزیم ۴ تا ۱۱ بود و فعالیت بهینهٔ آنزیم در اسیدیتهٔ ۱۰ مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: آنزیم پروتئاز خالص‌شده از *باسیلوس* DEM07 در مطالعهٔ حاضر پروتئاز قلیادوست مقاوم به حرارت است. ایجاد شرایط بهینه برای دستیابی به تولید زیاد آلکالین‌پروتئاز مقاوم به حرارت پیشنهاد می‌کند این آنزیم قابلیت زیادی برای استفاده در صنایع مختلف دارد.

واژه‌های کلیدی: پروتئاز، چشمه‌های آب گرم، بهینه‌سازی، *باسیلوس*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

ریزموجودات گرمادوست موجوداتی هستند که با رشد بهینه در دماهای زیاد سازگار هستند و از مکان‌های دریایی و خاکی دارای درجه‌حرارت زیاد جدا می‌شوند؛ چشمه‌های آب گرم و بیابان‌ها رایج‌ترین این مکان‌ها هستند (۱). چشمه‌های آب گرم (یکی از زیستگاه‌های ریزموجودات گرمادوست) منبعی برای جداسازی مستقیم آنزیم مقاوم به حرارت در نظر می‌شوند (۲). آنزیم‌های مقاوم به حرارت ازنظر کاربردی دارای مزیت‌هایی مانند پایداری زیاد در برابر حلال‌های آلی، اسیدیته‌های به‌شدت قلیایی و اسیدی و مواد شوینده هستند (۳). امروزه آنزیم‌های میکروبی کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف دارند. پروتئازها از تجاری‌ترین گروه‌های آنزیم‌های میکروبی خارج سلولی هستند که کاربردهای گسترده‌ای در صنایع مواد شوینده، غذا، داروسازی، شیمیایی و چرم دارند. پروتئازها در میان آنزیم‌های صنعتی ۶۰ درصد کل فروش آنزیم‌ها در سراسر جهان و آلکالین‌پروتئازها ۸۹ درصد کل فروش پروتئازها را شامل می‌شوند (۴). طیف وسیعی از موجودات زنده شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و پستانداران آلکالین‌پروتئازها را تولید می‌کنند. گونه‌های *باسیلوس* توانایی ترشح مقدار زیادی آلکالین‌پروتئاز را ازنظر صنعتی دارند (۵). آلکالین‌پروتئازهای باکتریایی با فعالیت زیاد خود در اسیدیته‌های قلیایی (برای نمونه اسیدیتهٔ ۱۰) و ویژگی‌های پیش‌ماده‌ای گسترده شناخته می‌شوند. دمای بهینهٔ فعالیت این آنزیم‌ها حدود ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد است؛ این ویژگی آلکالین‌پروتئازهای باکتریایی را برای استفاده در صنعت شوینده‌ها مناسب می‌کند (۶)؛ ازاین‌رو، اگرچه پروتئازها در طبیعت بسیار گسترده هستند میکروب‌ها به‌علت رشد سریع، فضای محدود لازم برای کشت و دستکاری ژنتیکی آسان برای تولید آنزیم‌های جدید به‌عنوان منبع ترجیحی برای تولید آنزیم‌ها مطرح و برای کاربردهای مختلف مطلوب هستند (۷). تنوع گستردهٔ پروتئازها به همراه ویژگی‌های این آنزیم‌ها سبب شده است این آنزیم‌ها در زمینهٔ زیست‌فناوری و فیزیولوژیک درخور توجه بسیار در سراسر جهان باشند (۸). در سال‌های اخیر باتوجه‌به اهمیت صنعتی پروتئازها، جداسازی سویه‌های باکتریایی جدید با ویژگی‌های مطلوب اهمیت بسیاری یافته است. در مقایسه با ریزموجودات مزوفیل و حتی سرمادوست، مطالعه‌های کمتری در زمینهٔ جداسازی و غربال‌گری سویه‌های گرمادوست، محیط رشد آنها و بهینه‌سازی تولید آنزیم آنها انجام شده است (۹). در بررسی حاضر سویهٔ باکتریایی گرمادوست از چشمهٔ آب گرم استان ایلام جدا شد و پس‌از تعیین هویت، بهینه‌سازی شرایط تولید آن و تخلیص پروتئاز بررسی شد.

مواد و روش‌ها.

نمونه‌برداری: ریزموجودات استفاده‌شده در پژوهش حاضر از چشمهٔ آب گرم دهلران واقع در استان ایلام (مختصات جغرافیایی 32°42'33.8"N 47°18'22.6"E) که در سه کیلومتری شهرستان دهلران، در دامنهٔ کوه سیاه‌کوه و نزدیک به غار خفاش قرار دارد و از شش محل متفاوت جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها در فلاسک‌های حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و در نسبت‌های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ با آب مقطر استریل رقیق شدند؛ سپس در ارلن‌های حاوی محیط‌کشت نوترینت‌براث و درون انکوباتور با دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در ۱۰۰rpm غنی‌سازی شدند. ۱۰۰

میکرولیتر از کشت‌ها روی پلیت‌های حاوی محیط‌کشت اسکیم‌میلک‌آگار[۱] کشت شد و پلیت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری[۲] شدند. درنهایت، ریزموجودی که بزرگ‌ترین هاله را در اطراف خود ایجاد کرده بود برای مطالعه‌های بیشتر انتخاب و استوک‌هایی از آن در دمای منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

جداسازی و غربال‌گری سویه‌های باکتریایی مولد پروتئاز: به‌منظور جداسازی سویه‌های باکتریایی دارای توانایی تولید پروتئاز، ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده پس‌از رقیق‌سازی متوالی به محیط‌های اسکیم‌میلک‌آگار حاوی آگار-آگار[۳] (۲۰ گرم‌درلیتر)، تریپتون[۴] (۸ گرم‌درلیتر) و عصارهٔ مخمر[۵] (۱۰ گرم‌درلیتر) تلقیح شد و محیط‌ها ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس‌از این مدت، تعدادی از کلنی‌های رشدیافته روی این محیط‌ها انتخاب و دوباره روی محیط اسکیم‌میلک‌آگار کشت شدند و ۴۸ ساعت در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند؛ درنهایت، کلنی‌های دارای هالهٔ شفاف به‌منزلهٔ سویهٔ مولد پروتئاز شناخته شدند. سویهٔ DEM07 از بین کلنی‌های جداشده بر اساس قطر هالهٔ ناشی از هیدرولیز اسکیم‌میلک سویهٔ برتر انتخاب و برای مطالعه‌های آنزیمی استفاده شد.

شناسایی سویهٔ باکتریایی جداشده: به‌منظور شناسایی نسبی سویه‌های جداشده، تعدادی از آزمون‌های بیوشیمیایی- میکروبی ازجمله رنگ‌آمیزی گرم[۶]، آزمون کاتالاز، آزمون حساسیت به پنی‌سیلین[۷] و سدیم‌آزید بر اساس کتاب سیستماتیک باکتری‌شناسی برگی[۸] انجام شدند (۱۰). شناسایی مولکولی باکتری با تکثیر قسمتی از ژن *16S rRNA* توسط آغازگرهای[۹] (5′AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3′) و (5′AAGGAGGTGGATCCAGCCGCA 3′) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۱۰] (PCR) در حجم نهایی ۱۵۰ میکرولیتر مطابق جدول ۱ با برنامهٔ زیر انجام شد:

۱. دمای اولیهٔ ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه برای تک‌رشته‌ای‌شدن کلی و اولیه؛

۲. دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه برای تک‌رشته‌ای‌شدن کلی؛

۳. دمای ۵۸ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگر؛

۴. دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه برای سنتز DNA؛

۵. تکرار از مرحلهٔ شمارهٔ ۲ برای ۳۵ دوره؛

۶. دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه برای تکمیل سنتز DNA.

محصول PCR پس‌از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از کیت استخراج DNA خالص‌سازی شد (۱۱). سپس توالی DNA با استفاده از توالی‌یاب DNA شرکت Bioneer واقع در کرهٔ جنوبی تعیین شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن *16S rRNA* سویهٔ هیدرولیزکننده به کمک نرم‌افزار BLAST با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم Gene Bank مقایسه شد؛ به‌این‌ترتیب نزدیک‌ترین سویه‌ها به ترادف *16S rRNA* سویهٔ هیدرولیزکننده تعیین شدند. توالی به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر در بانک ژنی NCBI ثبت و شمارهٔ دستیابی ژنی آن (KY392988) دریافت شد. درخت فیلوژنی با مقایسهٔ توالی *16S rRNA* سویه با توالی سایر سویه‌های *باسیلوس* حاصل از جست‌وجو در پایگاه اطلاعاتی Gene Bank به کمک نرم‌افزار Mega6 به روش neighbor joining ترسیم شد (۱۲).

جدول ۱- غلظت و حجم‌های بهینه‌شدهٔ واکنشگرهای PCR ژن *16S rRNA* درحجم نهایی ۱۵۰ میکرولیتر.

حجم (میکرولیتر)	غلظت	ماده	غلظت نهایی
۹۴/۸	-	ddH_2O	-
۱۵	۱۰X	PCR buffer	۱X
۴/۲	۵۰(mM)	MgCl2	۱/۴mM
۳	۱۰(mM)	dNTP	۰/۲mM
۶	۱۰(pmol/µl)	forward primer	۰/۴ µM
۶	۱۰(pmol/µl)	Reverse primer	۰/۴ µM
۳	۲۰(ng)	DNA template	-
۳	۵(U/µl)	Taq polymerase	۰/۱U/µl
۱۵۰	-	Total	-

بهینه‌سازی محیط تولید

اثر دما، اسیدیته و زمان: اثر دما بر رشد باکتری و تولید آلکالین‌پروتئاز سویهٔ منتخب در دماهای مختلف رشد (۳۰ تا ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد) در حالتی بررسی شد که دیگر شاخص‌ها ثابت بودند. به‌منظور بررسی اثر اسیدیتهٔ اولیه بر رشد و تولید پروتئاز سویهٔ منتخب، محیط تولید با اسیدیته‌های بین ۳ تا ۹ تهیه شد و رشد در دمای بهینه انجام و فعالیت آنزیمی سنجیده شد؛ به‌علاوه اثر زمان طی تخمیر بر رشد و تولید پروتئاز با گرماگذاری محیط‌کشت در شیکر انکوباتور و در زمان‌های مختلف (۶ تا ۹۶ ساعت پس‌از کشت) مطالعه شد.

سنجش فعالیت پروتئازی نمونه: فعالیت آلکالین‌پروتئاز با استفاده از روش‌های گزارش‌شدهٔ قبلی با مقداری تغییر اندازه‌گیری شد (۱۳). برای سنجش فعالیت پروتئازی نمونه‌ها، ۵۰۰ میکرولیتر محلول کازئین[۱۱] ۰/۷۵ درصد (پیش‌ماده) به ۲۰۰ میکرولیتر محلول آنزیمی افزوده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و شرایط قلیایی (اسیدیتهٔ ۸) گرماگذاری شد. به‌منظور توقف واکنش آنزیمی، ۵۰۰ میکرولیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد به ظرف واکنش افزوده شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. نمونه به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm[۱۲] سانتریفوژ شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی آن برداشته و ۵۰۰ میکرولیتر سدیم‌کربنات ۵۰۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگی فولین‌سیوکالتو[۱۳] به آن اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۶۰ نانومتر خوانده شد. طبق تعریف، یک واحد[۱۴] آنزیم مقدار آنزیمی است که قادر به هیدرولیز کازئین و تولید رنگی معادل ۱ میکرومول تیروزین آزادشده به ازای ۱ دقیقه در اسیدیتهٔ ۸ و دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد است.

محیط تولید و تخلیص نسبی آنزیم پروتئاز: ابتدا یک لوپ از سویهٔ بهینه‌شده که روی محیط نوترینت‌آگار رشد کرده بود برداشته و به محیط مایع پیش‌کشت[۱۵] منتقل شد؛ سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با چرخش دورانی و دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد و دور ۱۲۰rpm قرار داده شد. پس‌از تکثیر باکتری در محیط پیش‌کشت، ۵ تا ۱۰ درصد حجم محیط تولید[۱۶] در شرایط استریل از محیط پیش‌کشت به محیط تولید منتقل شد. به‌منظور تولید آنزیم پروتئاز محیط‌های تولید به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با شیک دورانی و دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد و دور ۱۲۰rpm قرار داده شدند.

برای جداسازی پروتئین‌ها از سوپ رویی تغلیظ با نمک آمونیوم‌سولفات[۱۷] ۸۵ درصد انجام شد و سپس نمونه به‌مدت یک شب در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا پروتئین‌ها کاملاً رسوب کنند. پس‌از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، رسوب جدا و در بافر حل شد. برای جداسازی نمک آمونیوم‌سولفات

از پروتئین‌ها دیالیز[۱۸] در بافر تریس (اسیدیتهٔ ۸) انجام شد. محلول دیالیزشده از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز عبور داده شد. فرکشن‌های کروماتوگرافی جمع‌آوری شدند و فعالیت آنزیمی آنها بررسی شد. فرکشن حاوی بیشترین میزان آنزیم در مطالعه‌های بعدی بررسی شد.

زایموگرافی: زایموگرافی روشی مبتنی بر الکتروفورز برای آنزیم‌های هیدرولیزکننده است. میزان خلوص پروتئاز به روش SDS-[۱۹]PAGE اندازه‌گیری شد. پس‌از اتمام الکتروفورز ژل به‌طور متوالی با محلول‌های زیر شستشو شد:

۱. به‌منظور خارج‌سازی SDS، ژل به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد درون محلول ۲/۵ درصد تریتون X-100 (V/V) در آب مقطر قرار داده شد و طی این زمان ۳ بار محلول تریتون تعویض شد؛

۲. ژل با آب مقطر شسته شد و برای حذف تریتون X-100 به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیتهٔ ۷/۶) قرار داده شد و طی این مدت ۳ بار بافر تعویض شد؛

۳. ژل با آب مقطر شسته و درون بافر شامل پیش‌مادهٔ کازئین ۲ درصد، تریس ۱۰۰ میلی‌مولار و کلریدکلسیم ۴ میلی‌مولار (اسیدیتهٔ ۷/۶) به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. آنزیم در این بافر فعال می‌شود؛

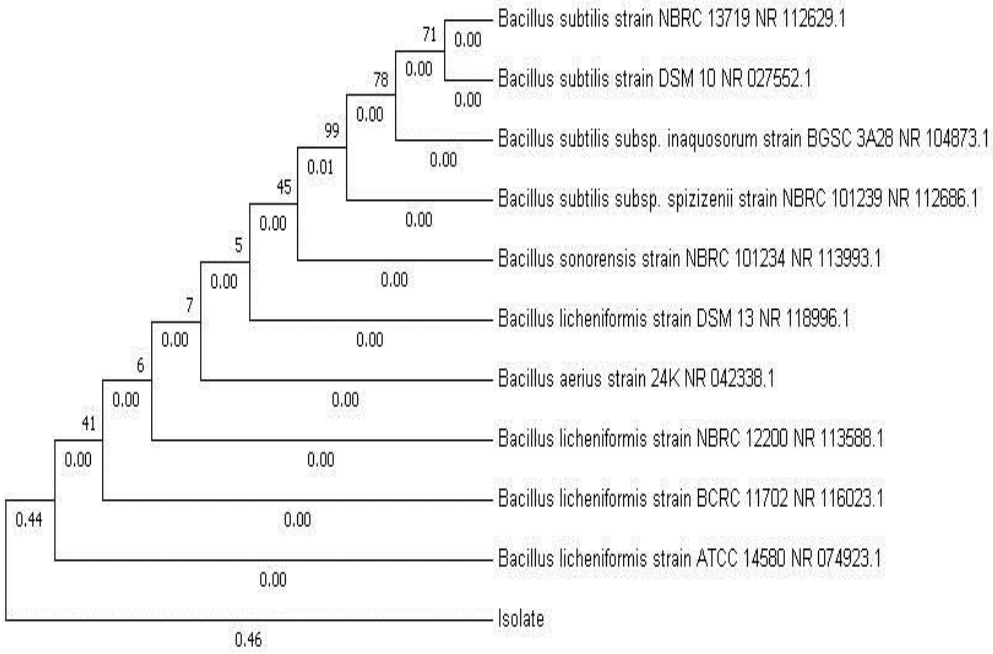
۴. پس‌از گرماگذاری، ژل به‌مدت ۱ ساعت در محلول رنگ کوماسی برلیان آبی R-250 رنگ‌آمیزی شد و در مرحلهٔ آخر به‌منظور ظهور باندهای شفاف حاصل از فعالیت آنزیم از محلول رنگ‌بر استفاده شد.

بررسی اثر اسیدیته و دما بر فعالیت و پایداری آنزیم: یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های آنزیم‌ها به‌ویژه آنزیم‌های صنعتی فعالیت و پایداری آنها در محدودهٔ گسترده‌ای از اسیدیته به‌ویژه اسیدیته‌های قلیایی است (۱۴). اثر اسیدیته بر فعالیت و پایداری آنزیم در اسیدیته‌های مختلف ۴ تا ۱۱ اندازه‌گیری شد. بافرهای استفاده‌شده برای اسیدیته‌های مختلف شامل گلایسین (اسیدیته‌های ۹ تا ۱۱)، تریس (اسیدیته‌های ۸ و ۹)، سدیم‌فسفات (اسیدیته‌های ۶ و ۷)، سدیم‌استات (اسیدیته‌های ۴ تا ۶) بودند. اثر دما بر فعالیت آنزیم پروتئاز با اندازه‌گیری فعالیت و پایداری آنزیم در بافری با اسیدیتهٔ بهینهٔ فعالیت آنزیم و در محدودهٔ دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد بررسی شد.

نتایج

غربال‌گری و شناسایی سویه‌های باکتریایی مولد پروتئاز: به‌منظور غربال‌گری باکتری مولد پروتئاز گرمادوست، کلنی‌ها روی محیط اسکیم‌میلک‌آگار کشت شدند و هالهٔ شفاف (نشان‌دهندهٔ فعالیت پروتئولیتیک) اطراف برخی کلنی‌های باکتریایی تشکیل شد (شکل ۱). بزرگ‌ترین هالهٔ روشن در بین جدایه‌های آزمایش‌شده اطراف جدایهٔ شمارهٔ ۷ مشاهده شد که نشان‌دهندهٔ توانایی تولید بیشینهٔ آنزیم پروتئاز است. برخی آزمون‌های بیوشیمیایی به‌منظور شناسایی ابتدایی سویه‌های باکتریایی مولد پروتئاز انجام شدند و مشاهده شد سویهٔ باکتریایی جداشده گرم مثبت، دارای شکل باسیل، کاتالاز مثبت و حساس به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و سدیم‌آزید است توالی ژن *16S rRNA* این سویهٔ باکتریایی با گونه‌های نزدیک موجود در NCBI مقایسه شد. نتایج تطبیق توالی و درخت فیلوژنی نشان دادند گونهٔ یادشده به *Bacillus licheniformis* نزدیک است (شکل ۲). توالی نوکلئوتیدی ارائه‌شده در بانک ژنی NCBI با شماره دسترسی KY392988 ثبت شد.

شکل ۱- تأیید فعالیت پروتئازی سویهٔ *باسیلوس* DEM07. هالهٔ روشن اطراف جدایه روی محیط اسکیم‌میلک‌آگار نشان‌دهندهٔ تولید پروتئاز خارج سلولی در این سویه است.

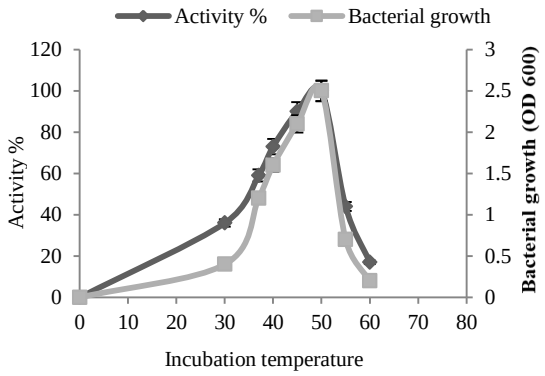


شکل ۲- درخت فیلوژنی سویهٔ *باسیلوس* DEM07 جداشده از چشمهٔ آب گرم دهلران. درخت بر اساس روش neighbor-joining رسم شده است و مقیاس‌ها بر اساس درصدی از ۱۰۰۰ تکرار بیان شده‌اند.

بهینه‌سازی تولید آلکالین‌پروتئاز: تولید اندک آنزیم‌ها و متابولیت‌ها در اکسترموفیل‌ها یکی از مشکلات اصلی تولید صنعتی آنهاست (۱۵). مشخص شده است تولید آنزیم و رشد میکروبی به میزان زیادی تحت‌تأثیر ترکیبات محیط‌کشت ازجمله منابع کربن، نیتروژن و حضور قندها، یون‌ها و مواد معدنی و همچنین عوامل فیزیکی مانند میزان هوادهی، دمای گرماگذاری، اسیدیته و زمان گرماگذاری قرار دارد (۹)؛ باوجوداین، بهینه‌سازی شرایط محیط‌کشت برای تولید مقادیر زیاد آنزیم اقدام ارزشمندی است که بازدهی تولید آنزیم را به‌مراتب افزایش می‌دهد.

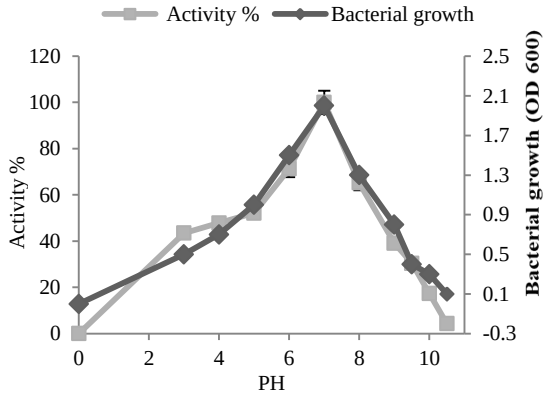
بررسی تولید بهینهٔ آنزیم پروتئاز در حضور متغیرهای مختلف

اثر دمای گرماگذاری، اسیدیتهٔ محیط و زمان هوادهی: دمای رشد، اسیدیتهٔ محیط و هوادهی شاخص‌هایی حیاتی هستند که بر رشد باکتری و تولید آنزیم مؤثرند (۱۶ و ۱۷). دما ازجمله مهم‌ترین عوامل اثرگذار بر ساختار ذاتی آنزیم است. ازآنجاکه بیشتر فرایندهای صنعتی در دماهای زیاد انجام می‌شوند یافتن آنزیم‌هایی که در دماهای زیاد ساختار خود را حفظ کنند و فعال بمانند اهمیت بسیاری دارد؛ ازاین‌رو، رشد سلولی و تولید آلکالین‌پروتئاز توسط سویهٔ DEM07 در دماهای رشد مختلف (۳۰ تا ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد) بررسی شد. دمای بهینه برای تولید آلکالین‌پروتئاز و همچنین رشد باکتری ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد تعیین شد (شکل ۳) و در دماهای بیشتر کاهش شدیدی در تولید آنزیم مشاهده شد. تولید آنزیم در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد ادامه داشت اما تولید آن در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به صفر رسید که نشان می‌دهد سویهٔ آزمایش‌شده موجودی گرمادوست است. باکتری در دماهای ۵۵ و ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد رشد اندکی داشت و با تعداد اندک باکتری در محیط‌کشت، تولید آنزیم بسیار کم شد. تأثیر دما بر تولید آنزیم به رشد موجود بستگی دارد.



شکل۳- اثر دمای محیط بر تولید پروتئاز و رشد باکتری

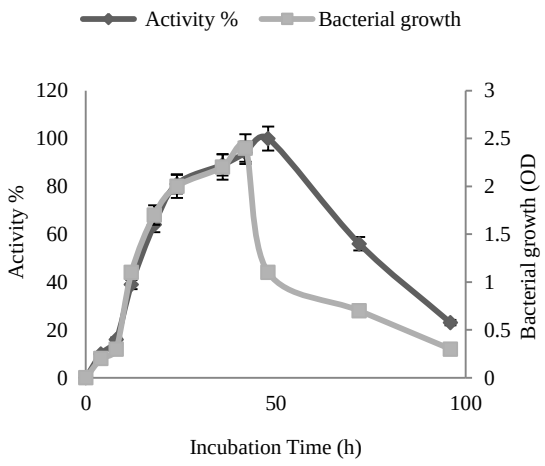
در میان شاخص‌های فیزیکی مؤثر بر تولید آنزیم، اسیدیته با القای تغییرات ریخت‌شناختی در موجود و تأثیر بر ترشح آنزیم نقش عمده‌ای را ایفا می‌کند. تغییر اسیدیته طی رشد موجود بر پایداری محصولات تولیدشده تأثیر می‌گذارد (۱۸). در باکتری آزمایش‌شده (*باسیلوس* DEM07) بیشترین تولید پروتئاز در اسیدیتهٔ ۷ اتفاق افتاد و میزان تولید آنزیم در اسیدیته‌های بیشتر و کمتر کاهش یافت (شکل ۴). این اسیدیته نزدیک به اسیدیتهٔ چشمه‌ای بود که باکتری از آن جدا شده بود. احتمالاً در این اسیدیته، پروتئاز تولیدشده پایداری زیادی دارد و یا رشد باکتری مناسب‌تر است.



شکل ۴- اثر اسیدیتهٔ محیط بر تولید پروتئاز و رشد باکتری

هنگام کشت باکتری‌ها، تعداد باکتری‌ها با گذشت زمان افزایش می‌یابد و ازآنجاکه تولید پروتئاز با تعداد باکتری‌های تولیدکننده متناسب است تولید پروتئاز هم افزایش می‌یابد. در بسیاری از باکتری‌ها تولید آنزیم در مرحلهٔ نمایی رشد باکتری آغاز می‌شود و در مرحلهٔ پایا[۲۰] به بیشینهٔ خود می‌رسد. پس‌از این مرحله سطح آنزیم کاهش می‌یابد که به‌علت پاره‌شدن باکتری‌ها و یا تغییرات شدید اسیدیتهٔ محیط است (۱۹ و ۲۰)؛ باوجوداین تولید آنزیم در برخی از باکتری‌ها تا مرحلهٔ مرگ ادامه دارد (۲۱).

همان‌طور که در شکل ۵ دیده می‌شود تولید آلکالین‌پروتئاز توسط سویهٔ DEM07 طی ۹۶ ساعت کشت در شرایط بهینه بررسی شد. این یافته‌ها در زمینهٔ تولید آنزیم طی فاز پایا نقش غالب پروتئازهای خارج سلولی در حفظ و نگهداری اکولوژیکی، متابولیسم و بقای این ریزوجود را به‌وضوح نشان می‌دهند (۱۵ و ۲۲). هماهنگ‌بودن ترشح پروتئاز با الگوی رشد نشان می‌دهد حداکثر تولید آنزیم در مرحلهٔ پایا اتفاق می‌افتد.

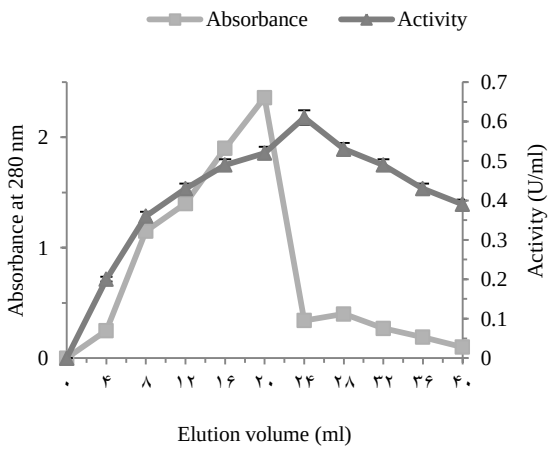


شکل ۵- تولید پروتئاز در طول رشد در محیط کشت

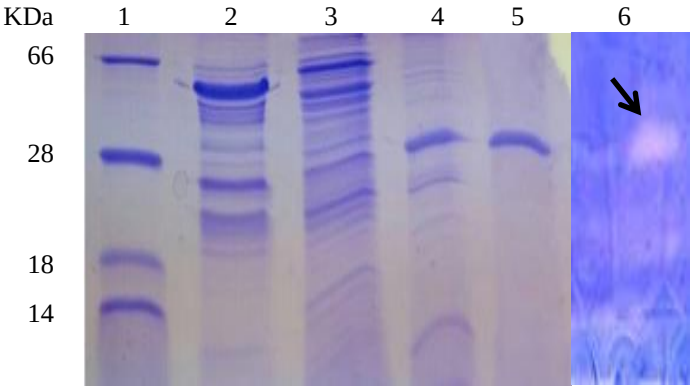
هرچه متغیرهای بیشتری در تولید آنزیم بررسی و بهینه شوند بازدهی تولید آنزیم بیشتر می‌شود. سه متغیر زمان برداشت، اسیدیتهٔ محیط‌کشت و دمای محیط بررسی شدند و مقادیر بهینه برای تولید آنزیم به دست آمد. تولید آنزیم با بهینه‌سازی شرایط محیط‌کشت افزایش محسوسی نسبت به شرایط پیش‌از بهینه‌سازی نشان داد؛ ازاین‌رو برای تولید پروتئاز در مقادیر زیاد، اسیدیتهٔ محیط تولید به ۷ رسانده شد، مدت زمان کشت در محیط تولید ۴۸ ساعت انتخاب شد و محیط در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد.

خالص‌سازی آلکالین‌پروتئاز: خالص‌سازی پروتئین‌ها شامل مراحل متعددی است که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد. کروماتوگرافی تعویض یون برای خالص‌سازی پروتئین‌های ناشناخته یکی از روش‌هایی است که بیشتر استفاده می‌شود. پس‌از آنکه ستون با بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار به تعادل رسید محتویات کیسهٔ دیالیز روی ستون DEAE بارگیری شد. ستون دارای بار مثبت بود پس ابتدا پروتئین‌های متصل‌نشده جمع‌آوری شدند. با اعمال شیب غلظت نمکی ۱ مولار (صفر تا ۱۰۰ درصد) پروتئین‌های متصل‌شده که بار منفی داشتند جدا شدند؛ هم‌زمان، جذب فرکشن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و فرکشن‌های حاوی پروتئین مشخص شدند (شکل ۶).

نتایج الکتروفورز این کروماتوگرافی نشان می‌دهند باند حدود ۲۷/۵ کیلودالتونی به قله مربوط است و درنتیجه پروتئاز به باکتری *باسیلوس* DEM07 دارای وزن مولکولی ۲۷/۵ کیلودالتون تعلق دارد. فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم به روش زایموگرافی نیز بررسی شد (شکل ۷).



شکل ۶- کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز



شکل ۷- ارزیابی خلوص آنزیم پس‌از کروماتوگرافی DEAE- سفاروز با استفاده از SDS-PAGE. ستون ۱. نشانگر وزن مولکولی، ستون ۲. سوپرناتنت محیط‌کشت باکتری، ستون ۳. سوپرناتنت باکتری پس‌از تغلیظ با نمک آمونیوم‌سولفات ۸۵ درصد، ستون ۴. فرکشن دارای فعالیت پروتئازی مرحلهٔ اول ستون تعویض آنیونی DEAE- سفارز، ستون ۵. فرکشن دارای فعالیت پروتئازی مرحلهٔ دوم ستون تعویض آنیونی DEAE- سفارز، ستون ۶. زیموگرافی پروتئاز، موقعیت باند پروتئاز با فلش روی شکل مشخص شده است.

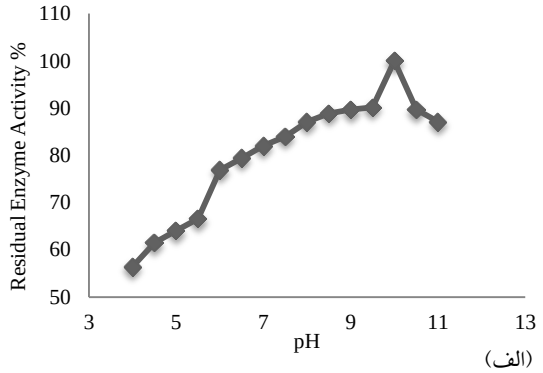
طی خالص‌سازی این آنزیم فعالیت ویژهٔ آنزیم از ۱/۵۴ U/mg در محیط‌کشت به ۲۲ U/mg در نمونهٔ خالص افزایش یافت که نشان‌دهندهٔ خالص‌سازی به میزان ۱۴/۲۸ برابر است. این خالص‌سازی با ۲۰ درصد بازدهی همراه بود (جدول ۲). برای محاسبهٔ بازدهی، فعالیت کل در هر مرحله بر فعالیت کل اولیه (فعالیت کل محیط‌کشت) تقسیم و به‌شکل درصد در جدول آورده شد. روش‌های گوناگونی برای خالص‌سازی پروتئاز از باکتری‌های مختلف گزارش شده‌اند. در پژوهش حاضر آنزیم خالص تنها به روش کروماتوگرافی تعویض آنیونی تهیه و آنزیم خالص‌شده برای تعیین ویژگی‌ها استفاده شد.

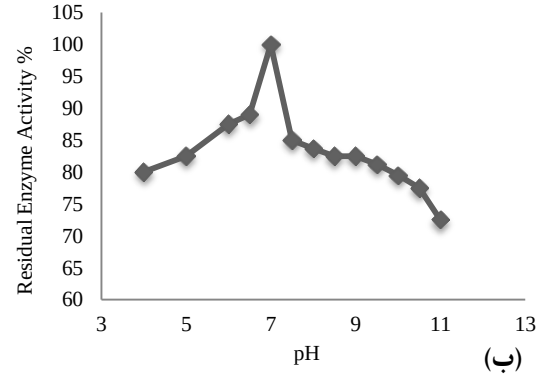
جدول ۲- مراحل خالص‌سازی آنزیم پروتئاز مربوط به باکتری *Bacillus* sp. DEM07

مرحله تخلیص	فعالیت کل (U)	پروتئین کل (mg)	فعالیت ویژه (U/mg)	بازدهی(درصد)	مرتبه تخلیص
محیط کشت	۲۹۹۰	۱۹۴۲	۱/۵۴	۱۰۰	۱
سولفات‌آمونیوم ۸۵ درصد	۱۸۲۶	۳۷۱	۴/۹۲	۶۱	۳/۱۹
ستون اول کروماتوگرافی DEAE- سفارز	۸۸۰	۱۴۲	۶/۱۹	۲۹	۴
ستون دوم کروماتوگرافی DEAE- سفارز	۶۱۶	۲۸	۲۲	۲۰	۱۴/۲۸

ویژگی‌های آنزیم پروتئاز خالص‌شده

تأثیر اسیدیته بر فعالیت و پایداری پروتئاز: در بررسی اثر اسیدیته بر فعالیت آنزیم (شکل ۸، الف) بیشترین فعالیت (۱۰۰ درصد) آنزیم در اسیدیتهٔ ۱۰ مشاهده شد که نشان می‌دهد آنزیم خالص‌شده جزو آلکالین‌پروتئازهاست. این آنزیم در محدودهٔ اسیدیتهٔ ۷ تا ۱۱ نیز فعالیت زیادی نشان داد؛ به‌طوری‌که در اسیدیته‌های ۷ و ۱۱ به‌ترتیب ۸۲ و ۸۷/۱ درصد فعالیت داشت و سپس فعالیت آن کاهش یافت. در بررسی پایداری آنزیم در اسیدیته‌های مختلف، همان‌طور که در شکل ۸، ب دیده می‌شود آنزیم در اسیدیتهٔ ۷ بیشترین پایداری را نشان داد. همچنین آنزیم در محدودهٔ گسترده‌ای از اسیدیته (اسیدی تا قلیایی) پایدار بود. آنزیم خالص‌شده پس‌از ۱ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد ۷۹/۵ درصد فعالیت اولیهٔ خود در اسیدیتهٔ بهینه یعنی ۱۰ را حفظ کرد.

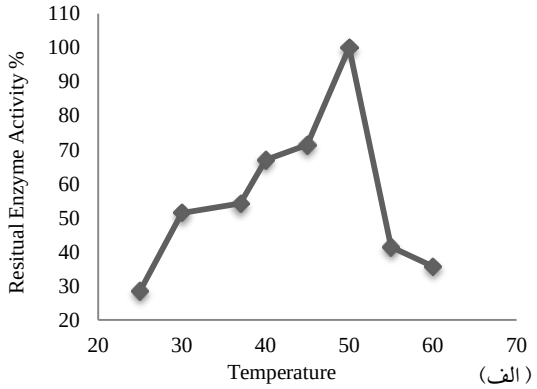


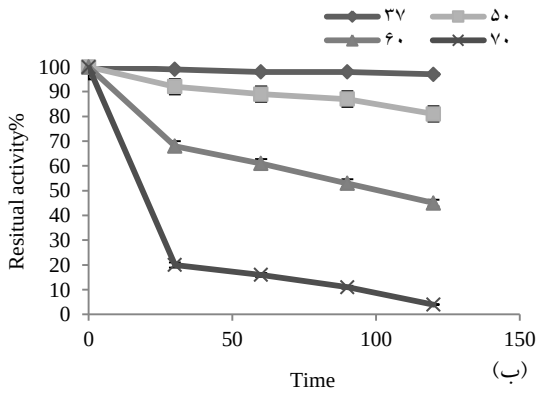


شکل ۸- منحنی فعالیت و پایداری آنزیم در اسیدیته‌های مختلف. الف. آنزیم دارای محدودهٔ وسیع فعالیت در اسیدیته‌های ۷ تا ۱۱ است و اسیدیتهٔ بهینه آن ۱۰ است، ب. حداکثر پایداری آنزیم در اسیدیتهٔ ۷ است.

تأثیر دما بر فعالیت و پایداری پروتئاز: آنزیم‌ها به‌طور عمده ماهیت پروتئینی دارند و دما بر عملکرد و ساختار ذاتی آنها مؤثر است. ازآنجاکه بیشتر فرایندهای صنعتی در دماهای زیاد انجام می‌شوند استفاده از آنزیم‌هایی که توانایی فعالیت و حفظ ساختار خود را در دماهای زیاد داشته باشند اهمیت بسزایی دارد. به‌منظور تعیین درجه‌حرارت مناسب برای عملکرد آنزیم، محلول واکنش در دماهای مختلف تا ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و میزان فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند آنزیم در محدودهٔ دمایی ۴۰ تا ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد بیش از ۶۰ درصد فعالیت دارد هرچند دمای بهینه برای فعالیت آن (۱۰۰ درصد) ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد است. مطابق شکل ۹، الف میزان فعالیت آنزیم با افزایش دما به ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌سرعت کاهش می‌یابد؛ به‌طوری‌که آنزیم در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد حدود ۴۰ درصد فعالیت خود دارد.

در بررسی پایداری آنزیم خالص‌شده در محدودهٔ دمایی یادشده مشخص شد پس‌از گذشت ۲ ساعت از زمان گرماگذاری، آنزیم در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد بیشترین پایداری را دارد و تا دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد بیش از ۸۰ درصد فعالیت خود را حفظ می‌کند؛ اما با افزایش دما ساختار خود را از دست می‌دهد و فعالیت باقیماندهٔ آن کاهش می‌یابد (شکل ۹، ب).





شکل ۹- منحنی فعالیت و پایداری آنزیم در دماهای مختلف. االف. حداکثر فعالیت آنزیم در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد مشاهده می‌شود، ب. پایداری آنزیم در دماهای مختلف پس‌از یک ساعت گرماگذاری در آن دما

بحث

بیشتر مطالعه‌ها در زمینهٔ تولید آنزیم آلکالین‌پروتئاز با استفاده از سویه‌های استاندارد انجام شده است. تولید زیاد آنزیم در سویهٔ مطالعه‌شده که از منبعی باکتریایی و در دسترس مانند چشمهٔ آب گرم تهیه می‌شود برای کاربردهای صنعتی، دارویی و غذایی مناسب است. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند دمای بهینه برای تولید آلکالین‌پروتئاز و رشد باکتری ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد است که با نتایج آبیدی[۲۱] و همکاران (۲۰۱۱) دربارهٔ آلکالین پروتئاز تولیدی توسط باکتری *بوتریتیس سینره*[۲۲] مطابقت دارد (۲۳). آنامالای[۲۳] و همکاران (۲۰۱۴) دمای بهینهٔ ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد را برای آنزیم آلکالین‌پروتئاز باکتری *باسیلوس فیرموس* CAS7[۲۴] گزارش کرده‌اند (۲۴). دمای بهینهٔ کمتر از ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد برای تولید پروتئاز توسط سویهٔ *باسیلوس* گرمادوست گزارش شده است (۲۵). در سال ۲۰۰۴ دمای بیش از ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد برای سویهٔ *باسیلوس* SMIA-2 گزارش شده است. دمای کشت با تأثیر بر واکنش‌های بیوشیمیایی درون سلول و درنتیجه تحریک یا سرکوب تولید آنزیم بر سنتز پروتئین اثر می‌گذارد (۲۶).

اسیدیته یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کنندهٔ رشد و ریخت‌شناسی ریزموجودات است؛ زیرا آنها به غلظت یون‌های هیدروژن موجود در محیط حساس هستند. در میان شاخص‌های فیزیکی، اسیدیتهٔ محیط رشد نقش مهمی در ایجاد تغییرات ریخت‌شناختی در موجود و ترشح آنزیم ایفا می‌کند. مطالعه‌های پیشین نشان می‌دهند باکتری‌ها به اسیدیتهٔ خنثی برای رشد مطلوب نیاز دارند. باتوجه‌به اینکه ریزموجودات محیط‌های خنثی تا اندکی اسیدی را برای رشد و متابولیسم ترجیح می‌دهند و اسیدیته‌های شدیداً قلیایی باعث رسوب‌کردن نمک‌ها و املاح ضروری برای رشد ریزموجودات می‌شوند، کاهش چشمگیر رشد و تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در اسیدیته‌های قلیایی مشاهده می‌شود. در پژوهش حاضر تولید بهینهٔ آنزیم پروتئاز قلیایی در اسیدیتهٔ اولیهٔ ۷ مشاهده شد. این یافته با نتایج مطالعهٔ گودو[۲۵] در سال (۲۰۰۹) همخوانی دارند (۲۷). اسیدیتهٔ بهینهٔ بیشتر گونه‌های *باسیلوس* برای تولید پروتئاز ۷ تا ۱۱ گزارش شده است (۲۸ و ۲۹).

در پژوهشی رشد سلولی و تولید پروتئاز سویهٔ *باسیلوس* APP1 پس‌از اسیدیتهٔ ۹ کاهش یافت؛ همچنین در محدودهٔ اسیدیتهٔ ۵ تا ۱۲ به‌خوبی رشد کرد اما تولید بهینهٔ پروتئاز در اسیدیتهٔ ۹ مشاهده شد (۳۰).

در مطالعهٔ حاضر فعالیت آنزیم پس‌از اسیدیتهٔ ۱۱به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. آنزیم در طیف وسیع اسیدیته از ۷ تا ۱۱ بیشترین فعالیت را دارد و در اسیدیتهٔ ۷ بسیار پایدار است. آنزیم‌های مهم مواد شوینده، سوبتیلیزین[۲۶] Carlberg و سوبتیلیزین Novo حداکثر فعالیت را در اسیدیته‌های ۸ تا ۱۰ نشان می‌دهند (۳۱).

دما شاخصی ضروری است که باید کنترل شود و معمولاً تأثیر آن در موجودات مختلف متفاوت است. پروتئاز مطالعه‌شده ۹۹ درصد فعالیت اولیهٔ خود را در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد پس‌از ۶۰ دقیقه گرماگذاری حفظ کرد. برخی گزارش‌ها مربوط به پروتئاز مقاوم به حرارت فعالیت درخور توجهی را در دمای ۴۰ تا ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد نشان می‌دهند اما آنزیم در دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌طور کامل غیرفعال می‌شود (۳۲-۳۴).

در پژوهش حاضر تولید بهینهٔ آلکالین‌پروتئاز طی ۴۸ ساعت گرماگذاری و رشد سلولی بهینه طی ۴۸ تا ۶۰ ساعت بود؛ ازاین‌رو، دورهٔ بهینهٔ گرماگذاری ازنظر تولید پروتئاز و رشد سلولی مطلوب در دورهٔ ۴۸ ساعت

گرماگذاری مشاهده شد که با نتایج ردی[۲۷] و همکاران درمورد گونه‌های *باسیلوس* (۲۰۱۱) همخوانی دارد (۳۵). گونهٔ هالوباکتریوم که حداکثر تولید پروتئاز را در دورهٔ گرماگذاری ۹۶ ساعت دارد (۳۶) و گونهٔ *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* TD4 که دارای دورهٔ کوتاه‌تر (۲۴ ساعت) گرماگذاری برای تولید پروتئاز است (۳۷) نیز گزارش شده‌اند.

بهینه‌سازی شاخص‌های مختلف تخمیر به افزایش رشد و بازدهی تولید آنزیم در سویهٔ DEM07 منجر شد. پایداری زیاد آنزیم آلکالین‌پروتئاز خارج سلولی این سویه در دما و اسیدیته‌های مختلف نشان‌دهندهٔ پتانسیل چشمگیر این آنزیم برای کاربردهای مختلف در صنایع چرم و صنایع شوینده و داروسازی و ... است. مراحل به‌کاررفته در بررسی حاضر برای خالص سازی آنزیم در مقایسه با گزارش‌های سایر پژوهشگران کوتاه و مقرون‌به‌صرفه بودند.

References

(1) Antranikian G. and Egorova K. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology. *American Society of Microbiology* 2007; 361-406.

(2) Zilda DS., Harmayani E., Widada J., Asmara W., Irianto HE., Patantis G., et al. Screening of thermostable protease producing microorganisms isolated from Indonesian hot spring. *Squalen* 2012; 7(3): 105-114.

(3) Zeikus JG., Vieille C., Savchenko A. Thermozymes: biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles* 1998; 2(3): 179-183.

(4) Vijayaraghavan P., Vijayan A., Arun A., Jenisha J., Vincent SGP. Cow dung: a potential biomass substrate for the production of detergent-stable dehairing protease by alkaliphilic Bacillus subtilis strain VV. *Springerplus* 2012; 1(1): 76-77.

(5) Mani P., Johnbastin TMM., Arunkumar R., Lalithambikai B., Brindha B., Rinikarunya R., Kannan VR. Thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its application as a laundry detergent additive. *International Journal of Bioscience and Medicine* 2012; 1(2) 18-26.

(6) Rawlings ND., Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* 1993; 290(1): 205-218.

(7) Singh RP., Nath Jha P. Characterization and optimization of alkaline protease production from bacillus licheniformis hsw-16 isolated from sambhar salt lake. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology* 2015; 3(2): 347-351.

(8) Fox J., Shannon J., Bjarnason J. Proteinases and their inhibitors in biotechnology. enzymes in biomass conversion. *ACS Symposium* Series 1991; 460(6) 62-79.

(9) Babu KR., Satyanarayana T. Alpha-amylase production by thermophilic *Bacillus* coagulans in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 1995; 30(4): 305-309.

(10) Whitman WB., Goodfellow M., Kampfer P., Busse HJ., Trujillo ME., Ludwig W., et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag; 2012.

(11) Azadian F., Badoei-Dalfard A., Namaki-Shoushtari A., Hassanshahian M. Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from Bacillus licheniformis AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. *Molecular Biology Research Communications* 2016; 5(3): 143-155.

(12) Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology* and *Evolution* 2007; 24(8): 1596-1599.

(13) Lowry OH., Rosebrough N., Farr A., Rundall R. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193(1): 265-275.

(14) Gupta R., Beg Q., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology* and *Biotechnology* 2002; 59(1): 15-32.

(15) Joshi RH., Dodia MS., Singh SP. Production and optimization of a commercially viable alkaline protease from a Haloalkaliphilic bacterium. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2008; 13(5): 552-559.

(16) Pathak AP., Deshmukh KB. Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic Bacillus licheniformis KBDL4: A Lonar soda lake isolate. *Indian Journal of Experimental Biology* 2012; 50(8): 569-576.

(17) Srividya S., Mala M. Influence of process parameters on the production of detergent compatible alkaline protease by a newly isolated Bacillus sp. Y. *Turkish Journal of Biology* 2011; 35(2): 177-182.

(18) Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami VK., Chauhan B. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 2003; 38(11): 1599-1616.

(19) Haseltine C., Rolfsmeier M., Blum P. The glucose effect and regulation of α-amylase synthesis in the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus. *Journal of Bacteriology* 1996; 178(4): 945-950.

(20) Hamilton LM., Kelly CT., Fogarty WM. Purification and properties of the raw starch degrading α-amylase of Bacillus sp.IMD434. *Biotechnology Letters* 1999; 21(2): 111-115.

(21) Sarikaya E. Increase of the α-amylase yield by some Bacillus strain. *Turkish Journal of Biology* 2000; 24(2): 299-308.

(22) Patel RK., Dodia MS., Joshi RH., Singh SP. Production of extracellular halo-alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic Bacillus sp. isolated from seawater in Western India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2006; 22(4): 375-382.

(23) Abidi F., Chobert J., Haertle Th., Marzouki M. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from Botrytis cinerea. *Process Biochemistry* 2011; 46(12): 2301-2310.

(24) Annamalai N., Veeramuthu Rajeswari M., Kumar Sahu S., Balasubramanian Th. 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 Biochemistry* 2014; 49(6): 1012-1019.

(25) Nascimento WCA., Martins MLL. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 2004; 35(1): 91-96.

(26) Bakermans C., Nealson KH. Relationship of critical temperature to macromolecular synthesis and growth yield in Psychrobacter cryopegella. *Journal of Bacteriology* 2004; 186(8): 2340-2345.

(27) *Gouda MK*. Optimization and purification of alkaline proteases produced by marine Bacillus sp. MIG newly isolated from eastern harbour of Alexandria. *Polish Journal of Microbiology* 2006; 55(2): 119-126.

(28) Joo HS., Chang CS. Production of protease from a new alkalophilic Bacillus sp. I-312 grown on soybean meal: Optimization and some properties. *Process Biochemistry* 2005; 40(3): 1263-1270.

(29) Shivanand P., Jayaraman G. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry* 2009; 44(10): 1088-1094.

(30) Chu WH. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of Bacillus. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2007; 34(3): 241-245.

(31) Gupta R., Beg QK., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 59(1): 15-32.

(32) Abusham RA., Zaliha RN., Salleh B., Basri M. Optimization of physical factors affecting the production of thermo-stable organic solvent-tolerant pro- tease from a newly isolated halotolerant B. subtilis strain Rand. *Microbial Cell Factories* 2009; 8(20): 1-9.

(33) Nilegaonkar SS., Zambare VP., Kanekar PP., Dhake- phalkar PK., Sarnaik SS. Production and partial characterization of dehairing protease from Bacil- lus cereus MCMB-326. *Bioresource Technology* 2007; 98(6): 1238-1245.

(34) Rai SK., Roy JK., Mukherjee AK. Characterisation of a detergent-stable alkaline protease from a novel thermophilic strain Paenibacillus tezpurensis sp. nov. AS-S24-II. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 85(5): 1437-1450.

(35) Reddy NM., Kumar CG., Swathi K., Nagamani B., Venkateshwar S., Rao LV. Extracellular alka-line protease production from isolated Bacillus subtilis SVR-07 by using submerged fermentation. *International Journal of Pharmaceutical Research Development* 2011; 3(1): 216-223.

(36) Anand SV., Hemapriya J., Selvin J., Kiran S., Global J. Production and Optimization of Haloalkaliphilic Protease by an Extremophile -Halobacterium SP Js1, Isolated from Thalassohaline Environment. *Biotechnology and Biochemistry* 2010; 5(1): 44-49.

(37) Suganthi C., Mageswari A., Karthikeyan S., Anbalagan M., Sivakumar A., Gothandam KM. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 2013; 11(1): 47-52.

---

[1]- Skim Milk Agar
[2]- Incubation period
[3]- Agar-agar
[4]- Tripton
[5]- Yeast extract
[6]- Gram
[7]- Penicillin
[8]- Bergey
[9]- Primer
[10]- Polymerase chain reaction
[11]- Casein
[12]- Revolutions per minute
[13]- Folin-Ciocalteu`s phenol reagent
[14]- Unit
[15]- Preculture medium
[16]- Production medium
[17]- Ammonium sulfate
[18]- Dialysis
[19]- Sodium dodecyl sulphate
[20]- Stationary
[21]- Abidi
[22]- *Botrytis cinerea*
[23]- Annamalai
[24]- *Bacillus firmus CAS7*
[25]- *Gouda*
[26]- Subtilisin
[27]- Reddy