

Cloning and expression of alkaline protease gene from *Bacillus* strain isolated from hot spring samples of Tehran and Alborz provinces

Sakineh Yahyaei¹, Abbas Akhavan Sepahi¹, Jafar Amani², Ali Hatef Salmanian^{3*}

1. Department of Microbiology, Faculty of biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisoning Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Protease enzymes with wide applications in various industries have occupied a major part of the global enzyme market. Different bacterial species produce these enzymes. In the meantime, the proteases that can be active in harsh conditions, such as high temperature and pH, have attracted the attention of researchers. This study aimed to identify protease-producing strains from sources in harsh environmental conditions, such as hot springs.

Materials and Methods: In this study, after screening the bacteria isolated from the soil and water samples of hot springs, a strain of the genus *Bacillus* was identified based on 16S rDNA molecular analysis. After confirming the presence of the alkaline protease-producing subtilisin gene in this selected strain, this gene was isolated using the PCR technique and cloned into the pET28a expression vector. After confirming the correctness of cloning, the optimization of the production of this recombinant protein was investigated by IPTG induction.

Results: The results of this study showed that the selected strain is most closely related to *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis*. After creating the expression vector, the recombinant protease exhibited the highest expression values at 37°C within four hours of induction with 1 mM IPTG. Recombinant protein expression was confirmed by the presence of a 33kDa band in Western blot analysis.

Conclusion: The results of this study determined that the selected strain isolated from the hot springs sample has the potential to be used in various industries with the alkaline protease-producing gene.

Keywords: *Bacillus*, Recombinant protein, alkaline protease, Subtilisin, 16S rDNA.

*Corresponding author:

Ali Hatef Salmanian, Professor, Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

E-mail: Salman@nigeb.ac.ir

همسانه‌سازی و بیان ژن آلکالین پروتئاز قلیایی از سویه باسیلوس جداسازی شده از

نمونه‌های چشمه‌های آب گرم استان‌های تهران و البرز

سکینه یحیایی^۱، عباس اخوان سپهری^۱، جعفر امانی^۲، علی هاتف سلمانیان^{۳*}

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
۳. گروه زیست فراورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم‌های پروتئاز با کاربردهای وسیع در صنایع گوناگون بخش عمده‌ای از بازار جهانی آنزیم‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. گونه‌های مختلف باکتری، این آنزیم‌ها را تولید می‌کنند. در این میان، پروتئازهایی که بتوانند در شرایط سخت مانند دما و pH بالا فعال باشند، مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. این مطالعه با هدف شناسایی سویه‌های مولد پروتئازها از منابع موجود در شرایط محیطی سخت، مانند چشمه‌های آب گرم انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بعد از غربالگری باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های خاک و آب چشمه‌های آب گرم، براساس آنالیز مولکولی 16S rDNA یک سویه از جنس باسیلوس شناسایی شد. پس از تأیید وجود ژن سوبتیلیسین مولد پروتئاز قلیایی در این سویه منتخب، با کمک تکنیک PCR، این ژن جداسازی شده و در ناقل بیانی pET28a همسانه‌سازی شد. بعد از تأیید صحت همسانه‌سازی، بهینه‌سازی تولید این پروتئین نوترکیب با القای IPTG بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این بررسی نشان داد سویه منتخب بیشترین قرابت فیلوژنتیکی را با باسیلوس پومیلوس و باسیلوس سافنسیس دارد. بعد از ساخت ناقل بیانی، بیشترین مقادیر بیان پروتئاز نوترکیب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و طی ۴ ساعت بعد از القای IPTG یک میلی‌مولار به دست آمد. تأیید بیان پروتئین نوترکیب به‌واسطه حضور باند ۳۳ کیلودالتونی در آنالیز وسترن بلات مشخص شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه مشخص نمود که سویه منتخب جداسازی شده از نمونه چشمه‌های آب گرم با دارا بودن ژن مولد پروتئاز قلیایی، پتانسیل بالقوه‌ای برای کاربرد در صنایع مختلف دارد.

واژگان کلیدی: باسیلوس، پروتئین نوترکیب، آلکالین پروتئاز، سوبتیلیسین، 16S rDNA.

نویسنده مسئول: گروه زیست فراورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، تهران، ایران

-پست الکترونیکی: Salman@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰

۱- مقدمه

پروتئازها گروهی از آنزیم‌ها هستند که کاربردهای گسترده در زمینه‌های فیزیولوژیکی و تجاری داشته و حدود ۶۰ درصد از بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی را به خود اختصاص داده‌اند (۱-۳). این آنزیم‌ها از نظر اختصاصیت عملکرد به سه گروه اسیدی، خنثی و قلیایی تقسیم می‌شوند و در این بین پروتئازهای قلیایی از نظر فیزیولوژی و تجاری توجه بیشتری را جلب کرده‌اند، زیرا توانایی عملکرد در شرایطی با دما و pH بالا را دارند. پروتئازهای قلیایی در ابتدا در صنعت شوینده‌ها استفاده می‌شدند. این مواد نقش کاتالیتیکی خاصی در هیدرولیز پروتئین‌ها دارند (۴، ۵). این آنزیم‌ها می‌توانند از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی به‌دست آیند. منابع گیاهی و جانوری قادر به رفع میزان نیازمندی کنونی به این آنزیم‌ها نیستند. همچنین به علت رشد سریع میکروب‌ها، کشت آن‌ها در فضای کم و امکان دست‌کاری ژنتیکی آن‌ها، برای تولید آنزیم‌هایی با خواص جدید ارجحیت با منابع میکروبی است. پروتئازهای موجود در شوینده‌ها که در بازار به‌صورت تجاری به فروش می‌رسند، به‌طور عمده توسط سویه‌های مختلف باسیلوس^۱ تولید می‌شوند (۴-۶).

از میان انواع پروتئازها، پروتئازهای قلیایی تولیدشده توسط گونه‌های جنس باسیلوس به‌دلیل ثبات حرارتی و پایداری که در pHهای مختلف دارند، از اهمیت ویژه‌ای در صنایع شوینده برخوردارند. امروزه در جهان ۸۹ درصد از فروش سالیانه آنزیم‌های موجود در شوینده‌ها مربوط به پروتئازهاست (۷). چندین گونه باسیلوس از جمله باسیلوس سوبتیلیس^۲، باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس^۳، باسیلوس لیکنی‌فورمیس^۴ و باسیلوس سرئوس^۵ در فرایندهای بیوتکنولوژیکی برای تولید پروتئازها کاربرد وسیعی دارند. باسیلوس سوبتیلیس در تولید آنزیم پروتئاز قلیایی به‌نام سوبتیلیسین^۶ در این صنعت پیشرو است (۸ و ۹).

در حال حاضر هزینه تولید این آنزیم‌ها بسیار بالا بوده و با توجه به مصارف بالای پروتئازهای قلیایی، جست‌وجو برای یافتن منابع آنزیمی جدید در جهت تولید داخلی آن،

به‌طوری‌که از لحاظ تجاری و اقتصادی مقرون‌به‌صرفه باشد لازم است. برای تولید آلکالین پروتئازها به‌صورت مقرون‌به‌صرفه تلاش‌هایی برای همسانه‌سازی و بیان آن‌ها در سیستم‌های هترولوگ^۷ انجام شده است.

Suberu و همکاران همسانه‌سازی و بیان یک سرین آلکالین پروتئاز از سویه RD7 باسیلوس سوبتیلیس را گزارش کرده‌اند که پروتئین نوترکیب وزن مولکولی ۴۳ کیلودالتون داشته و پایداری دمایی خوبی نشان داده است (۹). نتایج مطالعه Aghaei Jeshvaghani و همکاران برای همسانه‌سازی و بیان سرین پروتئاز yyxA از سویه باسیلوس لیکنی‌فورمیس نشان داده که توالی پروتئینی به‌دست‌آمده شباهت زیادی را با توالی‌های دیگر انواع باسیلوس از جمله باسیلوس گوبینسیس^۸ و باسیلوس سوبتیلیس دارد (۱۰). Joshi و Satyanarayana با بیان هترولوگ ژن آلکالین پروتئاز باکتری باسیلوس لهنسیس^۹، پروتئینی نوترکیب با وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتون تخلیص کرده‌اند که در دامنه گسترده‌ای از pH و دما فعالیت قابل توجهی از خود نشان داده است (۱۱).

Ageitos و همکاران ژن Epr از باسیلوس لیکنی‌فورمیس را به‌صورت نوترکیب در E. coli بیان کرده و فعال‌سازی صحیح آن برای واکنش پروتئازی را گزارش کرده‌اند (۱۲). پروتئین نوترکیب بیان‌شده در مطالعه Bhatt و Singh از سویه باسیلوس لهنسیس پایداری دمایی بالایی داشته و در طیف گسترده‌ای از pH قادر به فعالیت بوده است (۱۳).

هدف این مطالعه جداسازی باسیلوس قلیادوست از نمونه‌های خاک و آب چشمه‌های آب گرم و امکان تولید آنزیم و خالص‌سازی پروتئاز قلیایی از سویه جداسده می‌باشد. در همین راستا بعد از غربالگری باکتری‌های جداسده از این منابع، سویه‌های متعلق به جنس باسیلوس شناسایی و وجود ژن مولد پروتئاز قلیایی در آن‌ها موردبررسی قرار گرفت. به‌دنبال شناسایی سویه مناسب، مراحل همسانه‌سازی و بیان این ژن مولد پروتئاز قلیایی در میزبان هترولوگ انجام گرفته و پروتئین نوترکیب خالص‌سازی شد.

⁷ Heterologous Systems

⁸ *Bacillus Gobiensis*

⁹ *Bacillus Lehnensis*

¹ *Bacillus*

² *Bacillus Subtilis*

³ *Bacillus Amyloliquefaciens*

⁴ *Bacillus Licheniformis*

⁵ *Bacillus Cereus*

⁶ *Subtilisin*

۲- مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی و حلال‌های آلی از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌های مورد استفاده در این بررسی از چندین ناحیه با pH قلیایی و شرایط دمایی بالای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از جمله چشمه‌علی (شهرری) و خاک‌های منطقه فردآباد (استهارد کرج) جمع‌آوری شدند. پس از خشک نمودن نمونه‌های خاک (۵ تا ۱۰ سانتی‌متر از سطح خاک) در آزمایشگاه، ۱ گرم از نمونه در اِرن با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. بعد از وُرتکس شدید، مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. بعد از سانتریفیوژ نمونه‌ها (آب و خاک) در ۱۰۰۰۰ rpm مدت ۱۰ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوپرناتانت روی محیط کشت LB کشت داده شدند و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به منظور کنترل دما و رطوبت به مدت ۲ شبانه‌روز نگهداری شدند.

۲-۲- جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های مولد پروتئاز قلیایی

شناسایی باکتری‌های باسیلوس با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک آن روی محیط کشت غربالگری اولیه شامل پپتون ۰/۲ درصد، عصاره مخمر^۱ ۰/۲ درصد، گلوکز ۰/۱ درصد، KH_2PO_4 ۰/۰۰۲ درصد، MgSO_4 ۰/۰۰۵ درصد و آگار ۲ درصد انجام شد. باکتری‌های باسیلوس با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی مشخص از سایر کلونی‌ها، قابل تمایز هستند. برای شناسایی باکتری‌های تولیدکننده پروتئاز، کشت آن‌ها در محیط‌های حاوی شیرخشک^۲ بدون چربی یا کازئین^۳ به عنوان سوسترا انجام شد. بدین منظور، کلونی‌هایی که در مرحله غربالگری اولیه به دست آمده بودند روی محیط کشت غربالگری ثانویه شامل پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۳ درصد، سدیم کلرید ۰/۵ درصد، کازئین ۱ درصد، شیرخشک بدون چربی ۱ درصد و آگار ۲ درصد در پلیت‌های شیشه‌ای تحت شرایط استریل کشت داده شدند (۸). تأیید شناسایی گونه‌های

مورد بررسی بر اساس لام میکروسکوپی، رنگ آمیزی گرم و در سطح جنس انجام شد (۱۴).

۲-۳- شناسایی مولکولی باکتری‌های غربال شده

شناسایی مولکولی باکتری‌های غربال شده بر اساس تکثیر ناحیه ریبوزومی rDNA ۱۶S با روش PCR به کمک آغازگرهای:

8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و

1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

انجام و ناحیه ریبوزومی به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز تکثیر شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت (10pmol)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمراز (5U/μL)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۲۰۰ μmol)، ۱ میکرولیتر MgCl_2 (۱/۵ mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (1X) و ۳ میکرولیتر الگوی DNA ژنومی با برنامه زیر انجام شد: ۱- دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشتگی اولیه، ۲-۳۵ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۳- دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه برای تکثیر نهایی.

بر اساس نتایج آزمایش‌های انجام شده، کلونی‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ از محصولات PCR جهت تعیین توالی ارسال شدند. نتایج تعیین توالی با داده‌های موجود در بانک ژن (NCBI) با کمک نرم‌افزار BLAST بررسی و مقایسه شد. درخت فیلوژنی با مقایسه توالی سایر سویه‌های باسیلوس حاصل از جست‌وجو در پایگاه اطلاعاتی Gene Bank به کمک نرم‌افزار Mega6 و به روش neighbor-joining ترسیم شد (۱۵).

۲-۴- بررسی وجود ژن مولد پروتئاز قلیایی

(سوبتیلیسین) در باکتری‌های خانواده باسیلوس

به منظور تکثیر ژن سوبتیلیسین واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی

F-سوبتیلیسین:

(AGAGGCAAAAAAGTATGGATCAGTTTG)

و

R-سوبتیلیسین:

(CTGAGCTGCCGCCTGTACG)

در ۳۵ چرخه در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای هر دو ژن با استفاده از آنزیم Taq روی کلونی‌های ۵، ۶، ۷ و ۸

¹ Yeast extract

² Skim milk

³ Casein

انجام شد. ترکیب واکنش PCR مشابه با ترکیب بیان‌شده در بخش شناسایی مولکولی باکتری‌های غربال‌شده است. نتیجه PCR روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

۲-۵- همسانه‌سازی ژن مولد پروتئاز قلیایی در حامل بیانی جایگاه‌های برشی آنزیم‌های EcoRI در آغازگر رفت Yahya-F (ATATATGAATTCGCGCAGTCCGTGCCTTAC)

HinDIII در آغازگر برگشت Yahya-R: (ATATATAAGCTTCTGAGCTGCCGCTGTACG) به‌منظور همسانه‌سازی در ناقل pET28a تعبیه شد. تکثیر ژن سوبتیلیسین با استفاده از این آغازگرهای اختصاصی در واکنش PCR متشکل از ۳۵ چرخه و دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد با استفاده از آنزیم Pfu انجام شد. به‌منظور همسانه‌سازی ناقل pET28a و قطعه ژنی سوبتیلیسین حاصل از PCR، هضم آنزیمی دوتایی (EcoRI و HinDIII) برای ایجاد دو انتهای چسبناک متناظر در ناقل و قطعه ژنی با آنزیم‌های مناسب انجام گرفت. پس از هضم آنزیمی، قطعه سوبتیلیسین و ناقل pET28a بر اساس دستورالعمل ارائه‌شده کیت تخلیص از ژل خالص‌سازی شد. سپس به‌منظور اتصال قطعه هدف با ناقل برش‌خورده، به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پلاسمید نوترکیب pET28a-سوبتیلیسین به سلول‌های مستعد BL21 به‌روش شوک حرارتی^۱ منتقل گردید (۱۶). جهت اطمینان از همسانه‌سازی صحیح، ناقل نوترکیب واجد ژن سوبتیلیسین با آنزیم‌های EcoRI و HinDIII برش داده شدند. همچنین کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای T7 روی کلونی‌های رشد کرده انجام گرفت. در نهایت کلونی‌های تأییدشده حاوی سازه نوترکیب برای مرحله بعدی بررسی مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۶- بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب

به‌منظور بررسی بیان ژن در ناقل pET28a، آنالیز اولیه روی چند کلونی انجام گرفت. در این شرایط کلونی‌هایی با توانایی تولید پروتئین بیشتر انتخاب می‌شوند. برای این منظور چهار کلونی در محیط‌های LB مایع حاوی ۵۰ µg/mL کانامایسین به‌مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شدند.

مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر کشت به‌طور جداگانه به ۵ میلی‌لیتر محیط جدید LB دارای ۵۰ µg/mL کانامایسین اضافه و مجدداً در انکوباتور شیکردار نگهداری شدند. پس از رسیدن کدورت رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰.۷ IPTG با غلظت نهایی یک میلی‌مولار در شرایط استریل، اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه گرمادهی شد. یک لوله شاهد نیز بدون افزودن IPTG طبق شرایط فوق تهیه گردید. در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت پس از القا، مقدار یک میلی‌لیتر از هر کدام از لوله‌های موردآزمون مربوط به هر کلونی و همچنین نمونه شاهد، درون لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به کمک سانتریفیوژ در سرعت ۳۵۰۰× به‌مدت ۵ دقیقه سلول‌ها جمع شدند. سلول‌های جمع شده مستقیماً با بافر نمونه^۲ مخلوط پس از جوشانیدن به‌مدت ۵ دقیقه در ژل پلی‌آکریل‌آمید دیناتوره (SDS-PAGE) ۱۰ درصد الکتروفورز شد.

۲-۷- تخلیص پروتئین نوترکیب و برآورد غلظت

تخلیص پروتئین نوترکیب به‌وسیله ستون کروماتوگرافی میل‌ترکیبی Ni-NTA طبق روش ارائه‌شده شرکت سازنده انجام گرفت. در روش نامحلول ۵۰ میلی‌لیتر باکتری اشیریشیاکلی^۴ BL21(DE3) که پلاسمید pET28a واجد ژن نوترکیب را دریافت کرده بود، ۴ ساعت پس از القا با IPTG، در ۳۵۰۰×g مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری در ۱ میلی‌لیتر محلول لیزکننده (pH ۷/۴) حل و به‌مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر افقی قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ، محلول شفاف رویی روی ستون Ni-NTA اضافه شد. ستون با ۵ میلی‌لیتر بافر شست‌وشو (pH ۵/۹)، شست‌وشو داده شد. در آخر ستون با ۲ میلی‌لیتر در چهار fraction ۵۰۰ میکرولیتری بافر استخراج (pH ۴/۵) شست و شو داده و خروجی جمع‌آوری شد. در روش محلول، رسوب باکتری در یک میلی‌لیتر محلول لیزکننده حل شده و لیزوزیم^۵ با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر به آن اضافه گردید. سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر افقی قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ، محلول شفاف رویی، بر روی ستون Ni-NTA اضافه شد. ستون

² Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

³ Sample Buffer

⁴ *Escherichia coli*

⁵ Lysozyme

¹ Heat shock

حفظ کرده و در زیر میکروسکوپ بنفش و باکتری‌های گرم منفی قرمز دیده می‌شوند (شکل ۱-ب).



شکل ۱- غربالگری باکتری‌های جداشده. (الف) محیط شیرخشک بدون چربی-آگار، (ب) رنگ‌آمیزی گرم مثبت خانواده باسیلوس.

۲-۳- شناسایی مولکولی سویه‌های باسیلوس غربال شده

آنالیز محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که بیشتر سویه‌ها دارای باند حدود ۱۵۰۰ جفت‌بازی هستند (شکل ۲). براساس نتایج تست PCR با آغازگرهای ناحیه ریبوزومی (16S)، کلونی‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ جهت تعیین توالی ارسال گردید. بررسی نتایج حاصل از آنالیز BLAST نشان داد که کلونی‌های ۵، ۶ و ۸ مربوط به جنس پروتئوس^۳ و گونه میرابیلیس^۴ می‌باشند. نتیجه تعیین توالی مشخص نمود که تنها کلونی شماره ۷ از جنس باسیلوس و عمدتاً گونه‌های باسیلوس سافنسیس^۵ و باسیلوس پومیلوس^۶ است. مطالعه‌های فیلوژنتیکی با استفاده از روش neighbor-joining و فاکتور تصحیح Like Maximum lihood با نرم‌افزار MEGA 6 انجام شد. انجام هم‌ردیفی^۷ هم با همین نرم‌افزار و گرینه Clustal W انجام شد. مقدار Bootstrap روی ۵۰۰ تکرار تنظیم شد. کلونی شماره ۷ که براساس نتایج توالی‌یابی و BLAST از جنس باسیلوس تشخیص داده شده بود، برای رسم درخت فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیز درخت فیلوژنتیکی نشان داد که کلونی شماره ۷ که از خاک اطراف چشمه‌های قلیایی منطقه اشتهازد کرج نمونه‌برداری شده بود، بیشترین قرابت را با باسیلوس پومیلوس با ارزش بوت‌استرپ^۸ ۴۸ و در درجه دوم با باسیلوس سافنسیس با

با ۵ میلی‌لیتر بافر شست و شو حاوی ۳۰ میلی‌مولار ایمیدازول شست‌وشو داده شد. سپس ستون با ۲ میلی‌لیتر در چهار fraction ۵۰۰ میکرولیتری بافر استخراج و حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول شست‌وشو داده و خروجی جمع‌آوری شد. نمونه‌ای از خروجی‌های ستون روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد الکتروفورز شد. به‌منظور تأیید بیان پروتئین در سویه BL21(DE3) وسترن بلائینگ با کمک آنتی‌بادی درمقابل دنباله هیستیدینی متصل به HRP^۱ (Anti His tag HRP-) انجام شد. برای محاسبه میزان پروتئین استخراج‌شده، میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس یک میلی‌لیتر معرف برادفورد^۲ به آن اضافه شده و کاملاً مخلوط می‌گردد. بعد از گذشت ۵ دقیقه در دمای اتاق، جذب نمونه در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌گردد و غلظت پروتئین برحسب $\mu\text{g/mL}$ براساس منحنی استاندارد تعیین می‌شود.

۳- نتایج

۳-۱- غربالگری باکتری‌های مولد پروتئاز قلیایی باکتری‌های باسیلوس دارای کلونی‌های عمدتاً پهن با حاشیه مضرس بوده و به راحتی قابل شناسایی از سایر گونه‌ها هستند. بدین ترتیب، در بین نمونه‌های خاک و آب کشت داده شده روی محیط غربالگری اولیه، تعداد ۳۲ نمونه باسیلوس مورد شناسایی قرار گرفت. به منظور غربالگری باکتری مولد پروتئاز گرمادوست، کلونی‌ها روی محیط شیرخشک بدون چربی-آگار کشت شدند. باکتری‌هایی که دارای این ویژگی باشند، کازئین موجود در محیط کشت را تجزیه کرده و هاله‌ای شفاف در اطراف خود ایجاد می‌کنند. قطر ناحیه شفاف اطراف سویه‌های بررسی شده با یکدیگر متفاوت بوده که نشانگر تفاوت در میزان تولید آنزیم پروتئاز است. از ۳۲ کلونی مورد بررسی، تعداد ۱۰ کلونی هاله شفاف در اطراف خود ایجاد کردند (شکل ۱-الف). در رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌های گرم مثبت میله‌ای (خانواده باسیلوس) به دلیل تشکیل کمپلکس کریستال ویوله-ید-ریبونوکلات، رنگ بنفش کریستال ویوله را در خود

³ *Proteus*

⁴ *mirabilis*

⁵ *Bacillus safensis*

⁶ *Bacillus pumilus*

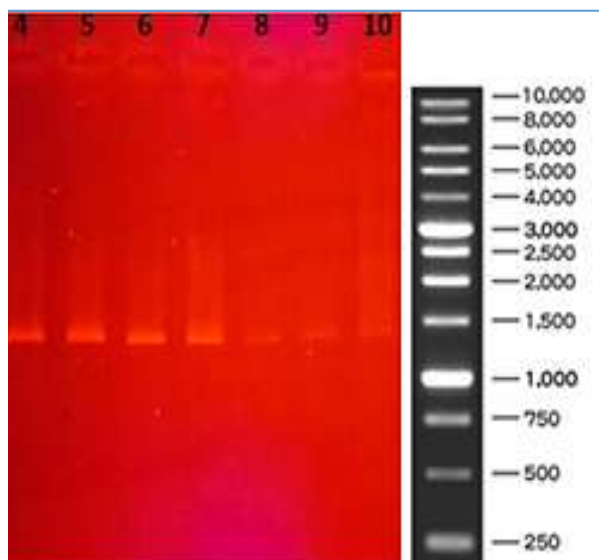
⁷ alignment

⁸ Bootstrap

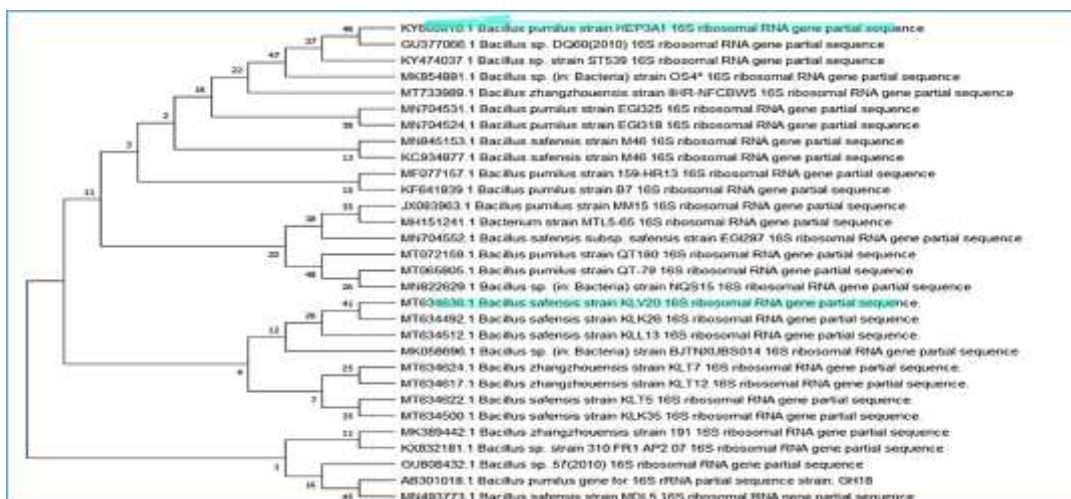
¹ Horseradishperoxidase

² Bradford

ارزش بوت‌استرپ ۴۱ دارد. همچنین کمترین قرابت را با باسیلوس ژانگژوانسیس^۱ دارد (شکل ۳).



شکل ۲- تکثیر ناحیهٔ ریبوزومی باکتری‌های غربال‌شده با آغازگرهای *16S rDNA*. چاهک‌های ۱-۱۰: کلونی‌های منتخب، چاهک M: نشانگر 1kb.



شکل ۳- رسم درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی‌یابی با آغازگرهای *16S rDNA* با استفاده از روش neighbor-joining و فاکتور تصحیح Maximum Likelihood و نرم‌افزار MEGA 6 انجام شد. کلونی شماره ۷، بیشترین قرابت را با باسیلوس پومیلوس با ارزش بوت‌استرپ ۴۸ و در درجهٔ دوم با باسیلوس سانسینسیس با ارزش بوت‌استرپ ۴۱ و کمترین قرابت را با باسیلوس

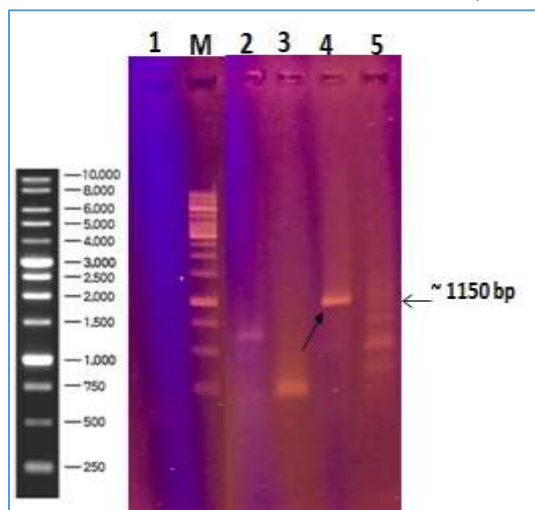
^۱ *Bacillus zhangzhouensis*

۳-۳- بررسی وجود ژن مولد پروتئاز قلیایی

سوبتیلیسین در باکتری‌های خانواده باسیلوس

نتیجه PCR با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن سوبتیلیسین مشخص کرد که تنها کلونی شماره ۷ که

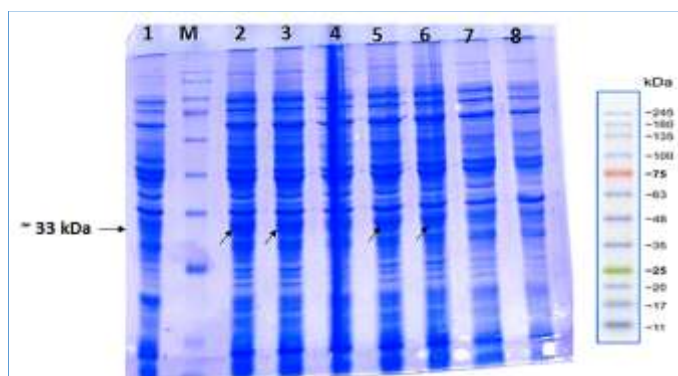
در آنالیزهای قبلی از جنس باسیلوس تعیین شده بود، واجد باند ژنی سوبتیلیسین (۱۱۵۰ جفت‌باز) می‌باشد. سایر کلونی‌ها که از جنس پروتئوس بودند، فاقد باند موردنظر هستند (شکل ۴).



شکل ۴- تکثیر باند حدود ۱۱۵۰ جفت‌بازی مربوط به ژن سوبتیلیسین با استفاده از آنزیم Taq. چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کلونی شماره ۵، چاهک ۳: کلونی شماره ۶، چاهک ۴: کلونی شماره ۷، چاهک ۵: کلونی شماره ۸، چاهک M: نشانگر 1kb. باند موردنظر تنها در کلونی شماره ۷ مشاهده می‌شود.

۳-۴- بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب در حامل بیانی

بعد از تایید کلونی‌های حاوی ناقل نوترکیب pET28a- سوبتیلیسین با کلونی PCR و هضم آنزیمی، بیان پروتئین نوترکیب در زمان‌های مختلف پس از القا توسط IPTG در آن‌ها روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بررسی شد.

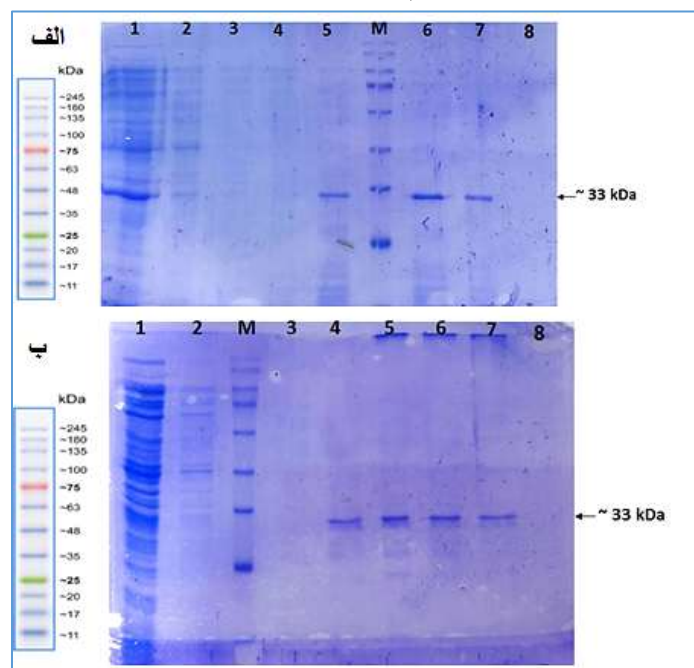


شکل ۵- آنالیز بیان پروتئین سوبتیلیسین n روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. چاهک ۱: نمونه قبل از القا. چاهک ۲ الی ۴: به ترتیب کلونی‌های شماره ۱ تا ۳ پس از القا با IPTG ۱ میلی‌مولار ۲ ساعت پس از القا، چاهک ۵ الی ۷: به ترتیب کلونی‌های ۱ تا ۳، پس از ۴ ساعت القا. چاهک ۸: کلونی ۱، پس از یک شبانه روز از القا. چاهک M: نشانگر پروتئینی.

۳-۵- تخلیص پروتئین نو ترکیب و تعیین غلظت آن

تخلیص پروتئین نو ترکیب به وسیله ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA در شرایط محلول (براساس تغییر غلظت ایمیدازول) و نامحلول (براساس تغییر pH) انجام

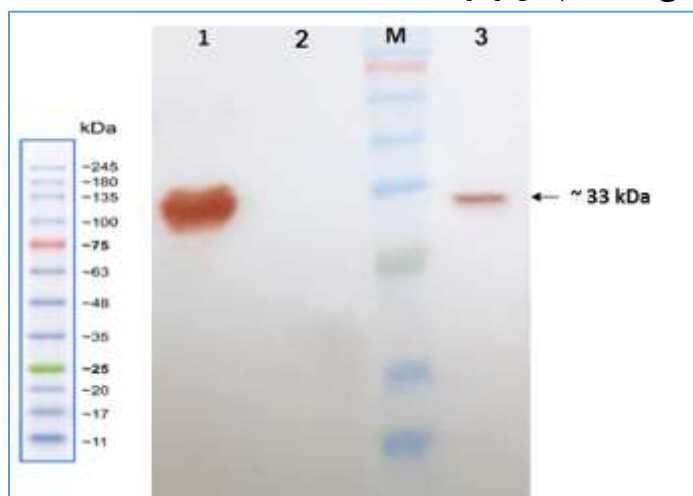
گرفت (شکل ۶). همان طور که در شکل مشخص است در خروجی ستون در روش محلول، باند پروتئینی شدت بیشتری نسبت به روش نامحلول دارد.



شکل ۶- آنالیز تخلیص پروتئین سوبتیلیسین در شرایط الف) نامحلول (Denature) و ب) محلول (Native) روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. چاهک ۱: خروجی ستون پس از بارگذاری پروتئین، چاهک ۲: شست و شو با بافرهای washing، چاهک ۳ الی ۷: Elution ها، چاهک M: نشانگر پروتئین.

باند ۳۳ کیلو دالتونی در روش وسترن بلاتینگ تأیید کننده بیان و تخلیص موفق پروتئین نو ترکیب است (شکل ۷).

غلظت پروتئین سوبتیلیسین پس از تخمین به روش برادفورد در شرایط محلول و نامحلول در اجزای خروجی جمع آوری شده از ستون به ترتیب در فاز محلول و نامحلول به ترتیب ۳۳۲ و ۲۵۲ میکروگرم می باشد. همچنین وجود



شکل ۷- آنالیز و تأیید پروتئین های نو ترکیب تخلیص شده سوبتیلیسین با استفاده از وسترن بلاتینگ با آنتی بادی ضد هیستیدین. چاهک M- نشانگر پروتئین چاهک ۱: کنترل مثبت، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۳: نمونه پروتئین تخلیص شده سوبتیلیسین.

۴- بحث

پروتئازها، گروه مهمی از آنزیم‌ها هستند که نقش‌های فیزیولوژیکی زیادی در رشد و تمایز سلولی جانداران دارند. این آنزیم‌ها با کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف از جمله غذا، دارو و مواد شوینده، جایگاه مهمی در بازار تجاری آنزیم‌ها را به خود اختصاص داده‌اند (۴، ۹، ۱۹). طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها قادر به تولید پروتئازها هستند، اما نسبت عمده‌ای از آنزیم‌های پروتئاز در دسترس از سویه‌های باسیلوس به دست آمده‌اند، به این دلیل که پروتئاز تولیدی توسط آن‌ها دارای فعالیت پروتئولیتیکی قابل توجه و پایداری در شرایط دمایی و pH بالا می‌باشد (۹، ۱۹ و ۲۰). اما همچنان نیاز به شناسایی منابع میکروبی جدید تولیدکننده این پروتئازها در مقادیر بالا و دارای ویژگی‌های جالب توجه در صنعت وجود دارد. در باکتری‌ها پنج دسته کاتالیتیکی پروتئازها براساس گروه عملکردی موجود در جایگاه فعال شناسایی شده‌اند: سرین، ترهونین، سیستئین، آسپارتیک و متالوپروتئازها. پروتئازهای مورد استفاده در صنعت اغلب برطبق دامنه pH عملکردی خود به گروه‌های اسیدی، قلیایی و خنثی تقسیم‌بندی می‌شوند که از این بین، آلکالین پروتئازها سهم عمده را دارا هستند (۲۲ و ۲۳).

در مطالعه حاضر در بین نمونه‌های خاک و آب کشت داده شده روی محیط غربالگری اولیه، ۳۲ نمونه باسیلوس مورد شناسایی قرار گرفت. در مرحله بعد کلونی‌هایی که در مرحله غربالگری اولیه به دست آمده بودند، روی محیط کشت غربالگری ثانویه کشت شدند تا باکتری‌های تولیدکننده پروتئاز به واسطه تجزیه کازئین موجود در محیط کشت و ایجاد هاله‌ای شفاف در اطراف خود، شناسایی شوند. از ۳۲ کلونی مورد بررسی، تعداد ۱۰ کلونی هاله شفاف در اطراف خود ایجاد کردند.

شناسایی مولکولی ناحیه ریبوزومی 16S rDNA در این باکتری‌های غربال شده با استفاده از آغازگرهای عمومی 16S و آزمایش PCR انجام گرفت و تکثیر باند حدود ۱۵۰۰ جفت‌بازی روی ژل آگارز در تمام این سویه‌ها تأیید شد. بعد از بررسی نتایج تعیین توالی با داده‌های موجود در بانک ژن (NCBI) مشخص شد که تنها کلونی شماره ۷ از جنس باسیلوس و عمدتاً گونه‌های سافنسیس و پومیلوس است. نتایج آنالیز درخت فیلوژنتیکی نیز نشان داد که کلونی شماره ۷ که از خاک اطراف چشمه‌های قلیایی

منطقه اشتهارد کرج نمونه‌برداری شده بود، بیشترین قرابت را با باسیلوس پومیلوس و باسیلوس سافنسیس دارد. تنها کلونی شماره ۷ است که در آنالیزهای قبلی مشخص شده که جنس آن باسیلوس است، واجد باند ژنی سوبتیلیسین (۱۱۵۰ جفت باز) می‌باشد. سایر کلونی‌ها فاقد باند مورد نظر می‌باشند. بنابراین این کلونی برای تکثیر ژن سوبتیلیسین و همسانه‌سازی آن در ناقل بیانی به کار گرفته شد. نتایج به دست آمده توسط کلونی PCR با آغازگرهای T7 حاکی از حضور باند حدود ۱۱۵۰ bp مربوط به ژن سوبتیلیسین روی ژل آگارز ۱ درصد در کلونی‌های حاوی ناقل سوبتیلیسین-pET28a نوترکیب است. همچنین هضم دوتایی با آنزیم‌های EcoRI و HindIII. صحت مراحل همسانه‌سازی را نشان داد. دما نیز نقش مهمی در تولید آنزیم توسط میکروارگانیسم دارند چرا که با تأثیر بر واکنش‌های بیوشیمیایی درون سلول و در نتیجه تحریک یا سرکوب تولید آنزیم بر میزان سنتز پروتئین اثر می‌گذارد (۲۴ و ۲۵). بیان پروتئین نوترکیب در دماهای مختلف (۱۶، ۲۲، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و غلظت‌های IPTG (یک دهم، نیم و یک میلی‌مولار) مورد سنجش قرار گرفت و نمونه‌های بیانی در زمان ۲، ۴ و ۲۴ ساعت پس از القای IPTG جمع‌آوری گردید. بیشترین میزان بیان پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۴ ساعت پس از القای IPTG با غلظت یک میلی‌مولار مشاهده گردید. در این راستا، در مطالعه Hoseini, Jeshvaghani و Bhatt همکاران شرایط بهینه برای بیان پروتئین نوترکیب را با شرایط گزارش شده مطالعه اخیر هم‌خوانی دارد (۱۵ و ۲۶). Hoseini و همکاران مطالعه‌ای در زمینه جداسازی، همسانه‌سازی و بیان ژن سرین پروتئاز yyxA از سویه باسیلوس لیکنی-فورمیس در باکتری اشیشیاکلی داشتند. درستی همسانه‌سازی به وسیله توالی‌یابی تأیید شد. تولید پروتئین نوترکیب با القاء IPTG به میزبان حاوی پلاسمید pET28a-yyxA با موفقیت انجام شد. بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب نیز مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین مقادیر بیان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و طی زمان ۴ ساعت و با IPTG ۱ میلی‌مولار به دست آمد که هم‌راستا با نتایج تحقیق حاضر است. نتایج حاصل از بررسی‌های فیلوژنتیکی و توالی پروتئینی، شباهت زیادی را با توالی‌های سایر باسیلوس‌ها از قبیل باسیلوس سوبتیلیس،

(۱۳، ۱۵). بنابراین وزن مولکولی پروتئاز بیان شده توسط سویه انتخابی این مطالعه در محدوده پروتئازهای باسیلوس گزارش شده است. Suberu و همکاران همسانه سازی و بیان یک سرین آلکالین پروتئاز از سویه باسیلوس سوبتیلیس RD7 را گزارش کرده اند که پروتئین نو ترکیب وزن مولکولی ۴۳ کیلودالتون داشته و پایداری دمایی خوبی نشان داده است (۱۰). Joshi و Satyanarayana با بیان هترولوگ ژن آلکالین پروتئاز باکتری باسیلوس لهنسیس، پروتئینی نو ترکیب با وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتون تخلیص کردند که در دامنه گسترده ای از pH و دما فعالیت قابل توجهی از خود نشان داده است (۱۳).

وجود باند ۳۳ کیلودالتونی در وسترن بلات تأیید کننده بیان آلکالین پروتئاز قلیایی نو ترکیب است. غلظت پروتئین سوبتیلیسین در شرایط محلول و نامحلول در اجزای خروجی جمع آوری شده از ستون با روش برادفورد به ترتیب ۳۳۲ و ۲۵۲ میکروگرم برآورد شد. این پروتئین تخلیص شده می تواند از نظر ویژگی های پروتئازی آنالیز شود و با بررسی عوامل مختلف روی میزان فعالیت و پایداری آن به عنوان کاندیدی بالقوه برای کاربرد آن در صنایع مختلف از جمله شوینده ها مورد استفاده قرار گیرد.

۵- نتیجه گیری

پروتئازهای قلیایی گروه مهمی از آنزیم ها هستند که با داشتن ویژگی های خاص مانند مقاومت در برابر دما و pH بالا، مقاومت در برابر سورفکتانت ها و حلال های آلی کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف دارند. براین اساس نیاز به شناسایی و جداسازی سویه های جدید مولد این آنزیم ها وجود دارد. مطالعه کنونی توانسته سویه ای از جنس باسیلوس را از نمونه های آب و خاک چشمه های آب گرم شناسایی و جداسازی کند. مراحل همسانه سازی و بیان آلکالین پروتئاز جداسازی شده از این سویه جدید در میزبان بیانی انجام شد و پروتئین نو ترکیب خالص سازی شد. با بررسی بیشتر فعالیت و پایداری این پروتئین می توان پتانسیل بالقوه آن را در صنایع مختلف به ویژه مواد شوینده و دارویی مدنظر قرار داد. همچنین با بهینه کردن شرایط می توان میزان تولید این آنزیم و پایداری آن را نیز بهبود بخشید.

باسیلوس گوبینسیس^{۲۷} و باسیلوس پومیلوس نشان دادند (۲۶). Hosseini و Hesaree جداسازی گونه های باسیلوس گرمادوست، مولد آنزیم پروتئاز از چشمه های آب گرم محلات را بررسی و قابلیت تولید آنزیم پروتئاز در این گونه ها را ارزیابی نمودند. ۹ گونه باکتریایی توسط تست های بیوشیمیایی به عنوان گونه های برتر مولد آنزیم پروتئاز جداسازی شدند. طبق نتایج، در بررسی بیان ژن پروتئاز و توالی یابی ژن 16S rRNA، ۷ گونه باکتریایی بیشترین قرابت را با گونه های باسیلوس نشان دادند (۲۷). پروتئین نو ترکیب بیان شده در مطالعه Bhatt و Singh از سویه باسیلوس لهنسیس پایداری دمایی بالایی داشته و در طیف گسترده ای از pH قادر به فعالیت بوده است (۱۵). Ageitos و همکاران ژن Epr از B. licheniformis را به صورت نو ترکیب در اشریشیاکلی بیان کرده و فعال سازی صحیح آن برای واکنش پروتئازی را گزارش کرده اند (۱۴). افزایش مدت زمان انکوباسیون باعث کاهش تولید آنزیم شده که احتمالاً مرتبط با محدودیت های غذایی، تجمع مواد مهار کننده و تغییر ساختار آنزیم است (۲۸). برچسب ۶-هیستیدین دارای چند خصوصیت مطلوب از جمله اندازه کوچک که به ندرت با عملکرد و ساختار پروتئین تداخل می کند، سطوح پایین سمیت و ایمنی زایی بوده که در شرایط تخلیص محلول و نامحلول استفاده می شود (۲۹). به طور کلی وزن مولکولی پروتئازهای حاصل از گونه های مختلف باسیلوس در محدوده ۲۵ تا ۷۱ کیلودالتون گزارش شده است (۲۳، ۳۰). اندازه پروتئین تخلیص شده در بررسی کنونی حدود ۳۳ کیلودالتون بود که اندازه ای مشابه پروتئاز تخلیص شده در مطالعه Manavalan می باشد. Manavalan و همکاران یک پروتئاز قلیایی مقاوم در برابر حرارت و منحصربه فرد از سویه پروتئولیتیک TK1-باسیلوس مگاتریم^{۲۸} از منبع آب دریا برای صنعت شوینده و چرم را جداسازی و شناسایی نمودند. طبق نتایج، پروتئاز جداسازی شده وزن مولکولی نسبی ۳۳ کیلودالتون، عملکرد بهینه آنزیم در pH ۸ و حداکثر عملکرد در ۷۰ درجه سانتی گراد را نشان داد (۲۳).

در چندین مطالعه روی بیان آلکالین پروتئازهای باسیلوس پومیلوس پروتئین نو ترکیب تخلیص شده در محدوده اندازه ۳۵ تا ۳۹ کیلودالتون وزن داشته است

²⁷ *Bacillus gobiensis*

²⁸ *Bacillus megaterium*

۶- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال قدردانی می‌نمایند.

۸- تعارض منافع

ندارد.

۹- سهم نویسندگان

همه نویسندگان در طرح و ایده‌پردازی مطالعه مشارکت داشتند. تهیه مطالب، جمع‌آوری داده‌ها و تحلیل آن‌ها توسط سکینه یحیایی، عباس اخوان سپهی، علی هاتف سلمانیان و جعفر امانی انجام شد. پیش‌نویس اولیه نسخه خطی توسط سکینه یحیایی نوشته شد و همه نویسندگان در مورد نسخه خطی اظهارنظر نموده و نیز نسخه خطی نهایی را خواندند و تأیید نمودند.

۱۰- کد اخلاق

ندارد.

۱۱- منابع

1. Sayaniya AV, Patel P. Isolation and Characterization of Detergent Compatible Alkaline Protease Producing *Bacillus Subtilis* APO-1. *Biomed J Sci Tech Res*. 2021; 35(5):27949–55.
2. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 1998; 62(3):597–635.
3. Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczak W, et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol*. 2001; 48(1):1–20.
4. Devi MK, Banu AR, Gnanaprabhal GR, Nbsp BVP and MP. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J Sci Technol*. 2008; 1(7): 1–6.
5. Akcan N, Uyar F. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. *EurAsian J Biosci*. 2011; 5: 64–72.
6. Hashmi S, Iqbal S, Ahmed I, Janjua HA. Production, Optimization, and Partial Purification of Alkali-Thermotolerant Proteases from Newly Isolated *Bacillus subtilis* S1 and *Bacillus amyloliquefaciens* KSM12.2022; 10(6): 1050.
7. Asker MMS, Mahmoud MG, El Shebwy K, Abd el Aziz MS. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *J Genet Eng Biotechnol*. 2013;11(2):103–9.
8. Boominadhan U, Rajakumar R, Sivakumaar PKV, Joe M. Optimization of Protease Enzyme Production Using *Bacillus* Sp. Isolated from Different Wastes. *Bot Res Int*. 2009; 2: 83–7.
9. Vijayaraghavan P, Vijayan A, Arun A, Jenisha JK, 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: 76.
10. Suberu Y, Akande I, Samuel T, Lawal A, Olaniran A. Cloning, expression, purification and characterisation of serine alkaline protease from *Bacillus subtilis* RD7. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019; 20: 101264.
11. Wong SL, Price CW, Goldfarb DS, Doi RH. The subtilisin E gene of *Bacillus subtilis* is transcribed from a sigma 37 promoter in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; 81(4):1184–8.
12. Xie G, Shao Z, Zong L, Li X, Cong D, Huo R. Heterologous expression and characterization of a novel subtilisin-like protease from a thermophilic *Thermus thermophilus* HB8. *Int J Biol Macromol*. 2019; 138: 528–35.
13. Joshi S, Satyanarayana T. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. *Bioresour Technol*. 2013; 131:76–85.
14. Ageitos JM, Vallejo JA, Serrat M, Sánchez-Pérez A, Villa TG. In vitro $\text{Ca}^{(2+)}$ -dependent maturation of milk-clotting recombinant Epr: minor extracellular protease: from *Bacillus licheniformis*. *Mol Biotechnol*. 2013; 54(2): 304–11.
15. Bhatt HB, Singh SP. Cloning, Expression, and Structural Elucidation of a Biotechnologically Potential Alkaline Serine Protease from a Newly Isolated Haloalkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26. *Front Microbiol*. 2020; 11:941.
16. Joo HS, Kumar CG, Park GC, Kim KT, Paik SR, Chang CS. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem*. 2002; 38(2):155–9.
17. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software. *Molecular Biology and Evolution*. 2023. <https://academic.oup.com/mbe/article/24/8/1596/1105236>
18. Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972; 69(8): 2110–4.
19. Balakrishnan D, Sindhu AP. Optimization and Phylogenetic Analysis of Alkaline Protease Production by *Bacillus sonorensis* SNP3 Isolated from Soil. *International J Adv Biotechnol Res*. 2019; 9(1): 1-12.
20. Mahakhan P, Apiso P, Srisunthorn K, Vichitphan K, Vichitphan S, Punyappa-Path S, et al. Alkaline Protease Production from *Bacillus gibsonii* 6BS15-4 Using Dairy Effluent and Its Characterization as a Laundry Detergent Additive. *J Microbiol Biotechnol*. 2023; 33(2): 195–202.
21. Ullah N, Rehman MU, Sarwar A, Nadeem M, Nelofer R, Shakir HA, et al. Purification, Characterization, and Application of Alkaline Protease Enzyme from a Locally Isolated *Bacillus cereus* Strain. *Fermentation*. 2022; 8(11): 628.

22. Harwood CR, Kikuchi Y. The ins and outs of *Bacillus* proteases: activities, functions and commercial significance. *FEMS Microbiol Rev.* 2022; 46(1): fuab046.
23. Manavalan T, Manavalan A, Ramachandran S, Heese K. Identification of a Novel Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus megaterium*-TK1 for the Detergent and Leather Industry. *Biology.* 2020; 9(12):472.
24. Verma J, Pandey S. Characterization of partially purified alkaline protease secreted by halophilic bacterium *Citricoccus* sp. isolated from agricultural soil of northern India. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2019; 17: 605–12.
25. Bakermans C, Nealson KH. Relationship of Critical Temperature to Macromolecular Synthesis and Growth Yield in *Psychrobacter cryopegella*. *J Bacteriol.* 2004; 186(8): 2340–5.
26. Aghaei Jeshvaghani Z, Hoseini R. Isolation, Molecular Cloning, and Expression of *yyxA* Serine Protease Gene Extracted from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Agric Biotechnol J.* 2021; 13(4):35–54.
27. Hosseini S.D, Hesaree M. Isolation and protease enzyme activity survey in *Bacillus* isolates collected from Mahalat warm water springs. *J Animal Environ.* 2020; 11(4):389-396. <https://sid.ir/paper/206584/en>.
28. Hamed A, Khedr M, Abdelraof M. Molecular characterization of alkaline protease-coding gene from *Bacillus licheniformis* MK90 mutants with biofilm inhibitory activity. *Egypt Pharm J.* 2019;18: 419.
29. Kaur J, Kumar A, Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int J Biol Macromol.* 2018; 106: 803-822. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080. Epub 2017.
30. Fahmy NM, El-Deeb B. Optimization, partial purification, and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by *Halobacillus* sp. HAL1 using fish wastes as a substrate. *J Genet Eng Biotechnol.* 2023; 21(1)