مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره نهم، شماره سی و چهار - بهار ۱۳۹۸

Research Article
مقاله تحقیقی

بهینه‌سازی بیان و تخلیص آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز از باکتری هالوترموتولرانت *Bacillus licheniformis* SL-1

صبا بابکان[۱]، اعظم صفری[۲،۳]، رضوان منیری[۴،۵]، مریم حمزه میوه رود[۳،۶]، سیاوش دستمالچی[۳،۶*]

۱. دانشکده فنی مهندسی ۲، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز
۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های بافت هم بند، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴. مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
۵. گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
۶. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز (EC 3.4.21.19) متعلق‌به خانواده سرین پروتئازها است. این آنزیم می‌تواند با هیدرولیز اختصاصی پیوندهای پپتیدی در آنالیز ساختار پروتئین، سنتز پپتیدها به روش فاز جامد و تهیه نانوتیوب‌ها مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این مطالعه تولید آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز باکتری *Bacillus licheniformis* SL-1 مقاوم‌به حرارت که بومی ایران است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز از باکتری *Bacillus licheniformis* SL-1 در *E. coli* BL21 i به‌صورت پری‌پلاسمی در دماهای ۱۶، ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های ۰/۴، ۱ و ۲ میلی‌مولار القاگر بهینه سازی شد. با توجه‌به این‌که آنزیم نوترکیب تولید شده دارای دنباله هیستیدینی (His-tag) است از ستون نیکل سفارز برای تخلیص به روش کروماتوگرافی تمایلی استفاده گردید.

یافته‌ها: شرایط مختلف برای بیان آنزیم نوترکیب گلوتامات اندوپپتیداز بررسی گردید و بهترین نتایج برای بیان پری پلاسمیک و محلول آنزیم در میزبان *E. coli* BL21 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۲ میلی‌مولار IPTG به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: بررسی کیفی نتایج حاصل از بیان آنزیم تحت شرایط مختلف حاکی از آن‌ست‌که بیان پروتئین نوترکیب وابسته‌به دما بوده و نیازمند غلظت‌های بالای القاگر IPTG است. مطالعه حاضر نتایج اولیه بررسی امکان تولید نوترکیب آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در سیستم بیانی *E. coli* BL21 است. برای تولید هر چه بهتر آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز سایر پارامترهای مؤثر مانند سیستم‌های بیانی و روش‌های تخلیص جایگزین قابل بررسی و بهینه سازی است.

واژه‌های کلیدی: گلوتامات اندوپپتیداز، بیان پری پلاسمی، باکتری *B. licheniformis* SL-1

مقدمه

آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز (EC 3.4.21.19) متعلق به خانواده سرین پروتئازها است.

نویسنده مسئول:
تبریز، خیابان دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی
پست الکترونیکی: dastmalchi.s@tbzmed.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.34.6.6]

این آنزیم می‌تواند به‌طور اختصاصی پیوندهای پپتیدی بین آلفا-کربوکسیل و یا باقی‌مانده های اسید آمینه‌های گلوتامین وآسپاراژین را بشکند (۲). آنزیم گلوتامات اندو پپتیداز برای آنالیز ساختار پروتئین و سنتز فاز جامد پپتیدها مورد استفاده قرار می-گیرد (۱۹،۲۴،۲۶). آنزیم‌هایی که عملکرد اختصاصی بالایی دارند، به‌طور گسترده برای سنتز مواد آلی به‌عنوان کاتالیزهای زیستی استفاده شده‌اند (۷،۱۵،۱۸). هم‌چنین عملکرد اختصاصی این آنزیم در هیدرولیز α-lactulbumin منجر به تولید نانوتیوب‌هایی شده است که می‌تواند به‌عنوان حامل دارو در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار گیرد (۸،۹). تاکنون انواع مختلفی از گلوتامات اندوپپتیدازها از میکروارگانیسم‌های مختلف شامل *Streptomyces albidoflavus*، *Streptomyces fradiae*، *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermidis*، *Enterococcus faecalis*، *Bacillus intermedius*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus warneri* و *Bacillus licheniformis* تولید و مورد مطالعه قرار گرفته است (۳،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۷،۲۰،۲۳،۲۷). این اندوپپتیدازها ۳۰ الی ۸۰ درصد تشابه در توالی اسید آمینه نشان می‌دهند و به‌دلیل تنوع در توالی و ساختار، تفاوت‌هایی در فعالیت کاتالیکی آن‌ها بر روی سوبستراهای یکسان دیده شده است (۱۶).

فعالیت آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز تولید شده از *B. licheniformis* ATCC14580 مانند تریپسین و کیموتریپسین می باشد. فعالیت این آنزیم بر روی سوبسترای حاوی آسپاراژین حدود ۰/۳ فعالیت آن بر روی سوبسترای حاوی گلوتامین است که نشان دهنده عملکرد اختصاصی آن بر روی پیوندهای پپتیدی تشکیل‌شده توسط گروه آلفا-کربوکسیل و گلوتامین است (۱۷). گلوتامات اندوپپتیداز تولید شده توسط باکتری *B. licheniformis* در مقایسه با گلوتامات اندوپپتیداز باکتری *S. aureus*، فعالیت کاتالیتیکی بیشتر و اختصاصیت بالاتری دارد (۱۰). بنابراین شناسایی ساختار و ویژگی‌های بیوشیمیایی اندوپپتیدازهای مختلف از منابع باکتریایی متفاوت می تواند اساسی برای گسترش کاربرد این آنزیم ها در صنایع مختلف غذایی، دارویی و بیوتکنولوژی باشد. امروزه به دلیل عدم تولید آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز به صورت خالص در مقیاس بالا، کاربرد آن در صنایع محدود شده است. تولید و استخراج آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز از مخلوط پروتئازها با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی تمایلی و تبادل یونی انجام می‌گیرد، با این‌حال به‌دلیل هزینه بالا و پیچیدگی مراحل، راندمان تولید به‌نسبت پایین است (۲۵). با پیشرفت بیوانفورماتیک و توسعه دست‌کاری ژن، تعداد زیادی پروتئین نوترکیب با افزودن دنباله‌های تمایلی مانند His و GST به پروتئین به‌منظور تسهیل در بیان و تخلیص تولید شده‌اند (۴،۱۴).

هدف از این مطالعه بررسی بیان و تخلیص آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز باکتری *Bacillus licheniformis* SL-1 به‌صورت نوترکیب در سیستم بیانی باکتریایی *E. coli* BL21 به‌صورت پری‌پلاسمی در شرایط مختلف محیطی شامل دما و غلظت‌های مختلف القاگر است. این باکتری بومی ایران بوده و از دریاچه نمک آران و بیدگل جداسازی و مورد شناسائی قرار گرفته است. این سویه بسیار مقاوم به دما و غلظت‌های بالای نمک است. با توجه‌به تشابه ژنوم باکتری بومی *Bacillus licheniformis* SL-1 با سویه ATCC14580 انتظار می‌رود که آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز این باکتری فعالیت مناسبی همانند سویه ATCC14580 داشته باشد. لذا آنزیم‌های جداسازی شده از آن می‌تواند مناسب برای کابردهای صنعتی باشد.

روش کار

باکتری‌ها، مواد و محیط‌های کشت

باکتری هالوترموتولرانت *Bacillus licheniformis* SL-1 بومی ایران جدا شده از دریاچه نمک آران-بیدگل (۲۱) و *E. coli* B21 از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه شدند. تریپتون، عصاره‌مخمر، گلیسرول و سدیم کلراید از Applichem (Darmstadt, Germany) خریداری شدند. رزین Ni Sepharose از شرکت GE Healthcare Life Sciences (Sweden) تهیه شد. آنتی‌بادی مونوکلونال اولیه His-tag و آنتی‌بادی ثانویه goat anti-mouse IgG-HRP conjugated به‌ترتیب از شرکت GE Healthcare و Santa Cruz خریداری شدند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.34.6.6]

بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز

بیان آنزیم نوترکیب گلوتامات اندوپپتیداز با استفاده از سیستم بیانی پروکاریوتی در میزبان باکتریایی شامل *E. coli* BL21 به‌صورت پری‌پلاسمی در شرایط مختلف محیطی انجام گردید. به‌همین منظور پلاسمید نوترکیب حاصل شده از مرحله کلونینگ pET22b-endo1 (دارای پپتید نشانه برای بیان در فضای پری پلاسمی) به‌روش شوک حرارتی به سلول‌های بیانی *E. coli* BL21 منتقل شدند.

در بیان پری پلاسمی، کشت آغازگر از کلنی‌های مثبت *E. coli* BL21 حاوی پلاسمید نوترکیب pET22b-endo1 در محیط LB (۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم تریپتون و ۵ گرم سدیم کلراید در یک لیتر) مایع حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تهیه و به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه هوادهی گردید. کشت آغازگر با نسبت ۱ به ۲۰ به محیط تازه و استریل TB (۲۴ گرم عصاره مخمر، ۱۲ گرم تریپتون و ۴ میلی‌لیتر گلیسرول در یک لیتر) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تلقیح شد و در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه تا رسیدن به دانسیته ۱-۳/۱ هوادهی گردید. القای تولید پروتئین با افزودن IPTG در غلظت‌های ۰/۴، ۱ و ۲ میلی‌مولار به محیط کشت باکتری انجام شد. سپس محیط کشت باکتری به‌مدت ۱۶ ساعت در دماهای ۱۶، ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه هوادهی گردید.

استخراج و تخلیص آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز

محیط کشت باکتری پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. با توجه به وزن سلول ته نشین شده بافر لیزکننده به رسوب اضافه گردید. پس از حل شدن کامل رسوب در بافر لیزکننده، پروتئین‌های سلولی به‌روش انجماد و ذوب در نیتروژن مایع و سپس به‌روش سونیکاسیون با شدت ۶۰ درصد، ۵ مرتبه به‌مدت ۳۰ ثانیه استخراج گردید. محصول لیز سلولی به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی که حاوی پروتئین‌های محلول است از رسوب جدا گردید.

تخلیص پروتئین به‌روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون Nickel Sepharose تهیه شده از شرکت GE Healthcare آمریکا انجام شد. محلول حاصل از استخراج پروتئین به‌همراه ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول به ستون حاوی رزین نیکل سفاروز اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌منظور اتصال به رزین انکوبه شد. مرحله شست‌و شو با استفاده از بافر حاوی ۵۰ میلی‌مولار تریس، ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلراید، ۱/۰ درصد بتامرکاپتواتانول و ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول انجام شد. پروتئین هدف دارای دنباله هیستیدین با استفاده از بافر حاوی ۵۰۰ میلی مولار ایمیدازول، ۲۰ میلی‌مولار سدیم فسفات و ۵۰۰ میلی‌مولار سدیم کلراید از رزین‌های نیکل جدا شده و جمع‌آوری گردید.

الکتروفورز پروتئین و وسترن بلاتینگ

تمام نمونه‌های به‌دست آمده از مراحل استخراج و تخلیص پروتئین بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. پس از الکتروفورز، پروتئین نوترکیب توسط بافر انتقال (۲۵ میلی‌مولار تریس، ۱۹۲ میلی‌مولار گلیسین، ۱۵ درصد متانول) به کاغذ پلی‌وینیلیدین‌دی‌فلورید (PVDF) منتقل شد. مرحله بلاکینگ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از محلول ۵ درصد Skim milk به‌مدت ۱۶ ساعت انجام شد. آنتی‌بادی اولیه علیه His-Tag با رقت ۱ به ۳۰۰۰ و آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱ به ۸۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله آخر باندهای پروتئینی با استفاده از کیت BM chemiluminescence در اتاق تاریک بر روی فیلم عکاسی ظاهر شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج مربوط به بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در سیستم باکتریایی *E. coli* BL21 در فضای پری‌پلاسمی غلظت‌های مختلف از IPTG و دمای‌های متفاوت در جدول ۱ نشان داده شده است. آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در سیستم *E. coli* BL21 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۲ میلی‌مولار IPTG به‌صورت محلول بیان شد. شکل ۱ الکتروفورز فاز محلول و نامحلول پروتئین استخراج شده و شکل ۲ نتایج مربوطبه تخلیص آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در ستون نیکل سفاروز را بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید با وزن مولکولی ۳۵

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.34.6.6]

کیلودالتون نشان می‌دهد. هم‌چنین نتایج وسترن بلاتینگ، بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز را در فاز محلول سیستم بیانی *E. coli* BL21 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۲ میلی-مولار IPTG را مورد تأیید قرار داد (شکل ۲). این در حالی-است که در دماهای ۱۶ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد با غلظت‌های ۰/۴ و ۱ میلی‌مولار از IPTG در سیستم بیانی *E. coli* BL21 در فاز محلول پروتئین، باند ۳۵ کیلودالتونی مربوط به بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید مشاهده نگردید.

بحث

باکتری *B. licheniformis* SL-1 با ۹۷ درصد تشابه به سویه *B. licheniformis* ATCC14580 به‌عنوان اولین گزارش جداسازی این باکتری از دریاچه‌های پرنمک در ایران و دنیا معرفی شده است. باکتری *B. licheniformis* یک باکتری گرم مثبت تولیدکننده اندوسپور است که از خاک، مواد گیاهی و رسوبات دریایی جداسازی شده است، اما تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر جداسازی این باکتری از دریاچه نمک وجود نداشته است (۲۱). در این مطالعه بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز از باکتری *B. licheniformis* SL-1 به‌صورت نوترکیب درسیستم‌های بیانی *E. coli* BL21، شرایط دمایی و غلظت‌های مختلف از IPTG مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که بیان محلول آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در فضای پری‌پلاسمی سیستم *E. coli* BL21 انجام شده است که می‌تواند تأییدکننده فولدینگ مناسب و تشکیل پیوندهای سولفیدی درون مولکولی این آنزیم در شرایط اکسید موجود در فضای پری‌پلاسمی *E. coli* BL21 باشد. با توجه‌به نتایج جدول ۱، سیستم بیانی *E.coli* BL21 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۲ میلی‌مولار از IPTG بیان محلول دارد. در مطالعه‌ای مشابه از Ye و همکاران در سال ۲۰۱۲، بیان آنزیم گلوتامات‌اندوپپتیداز در فضای سیتوپلاسمی سیستم بیانی *E.coli* BL21 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۱ میلی‌مولار منجر به تشکیل اینکلوژن بادی شده است (۲۵). نتایج این مطالعه نشان دهنده عدم بیان مناسب و محلول آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در شرایط احیای سیتوپلاسمی سیستم بیانی *E.coli* BL21 است که تأیید کننده نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر است. در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۶، Sharma و همکاران بیان محلول و مناسب نوع دیگری از اندوپپتیداز را از باکتری *Staphylococcus simulans* در فضای سیتوپلاسمی سیستم بیانی *E.coli* BL21 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت نهایی ۰/۴ میلی‌مولار IPTG را انجام داده‌اند که (۲۲) با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد.

آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز باکتریایی، آنزیمی جدید مشابه کیموتریپسین حیوانی است که ژن کدکننده آن در چندین نوع باکتری از جنس‌های *Staphylococcus*، *Bacillus*، *Streptomyces*، *Mycoplasma* و *Heamophilus* گزارش شده است (۲۸،۲۰،۶،۵،۱).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز از باکتری بومی *B. licheniformis* SL-1 شناسایی و به‌صورت محلول در فضای پری‌پلاسمی سیستم *E. coli* BL21 بیان و تخلیص شد. بررسی متغیرهای دما و غلظت IPTG در سیستم‌های بیانی *E. coli* BL21 نشان داد که تولید آنزیم در سویه *E. coli* BL21 در محیط کشت ساده LB با غلظت ۲ میلی‌مولار از IPTG و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌صورت محلول در فضای پری‌پلاسمی انجام شد. مطالعه حاضر نتایج اولیه بررسی امکان تولید نوترکیب آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در سیستم بیانی *E. coli* BL21 است. برای تولید هر چه بهتر آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز سایر پارامترهای مؤثر مانند سیستم‌های بیانی و روش‌های تخلیص جایگزین قابل بررسی و بهینه‌سازی است.

سپاسگزاری

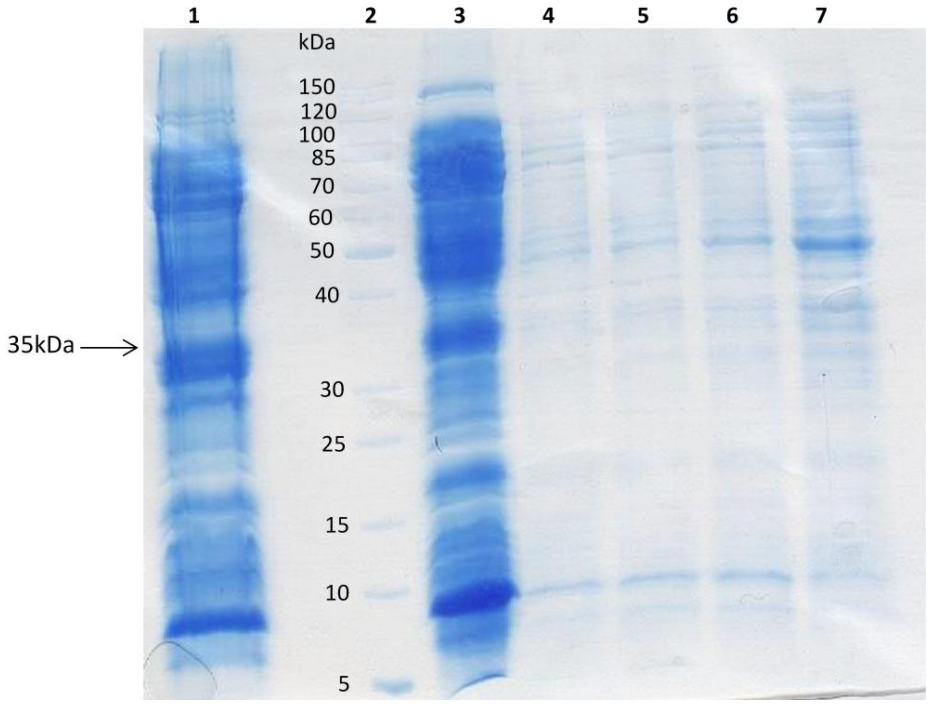
از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای حمایت اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.34.6.6]

جدول ۱- بررسی بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در فضای پری‌پلاسمی سویه *E. coli* BL21 در شرایط مختلف دمایی و غلظت‌های مختلف القاگر

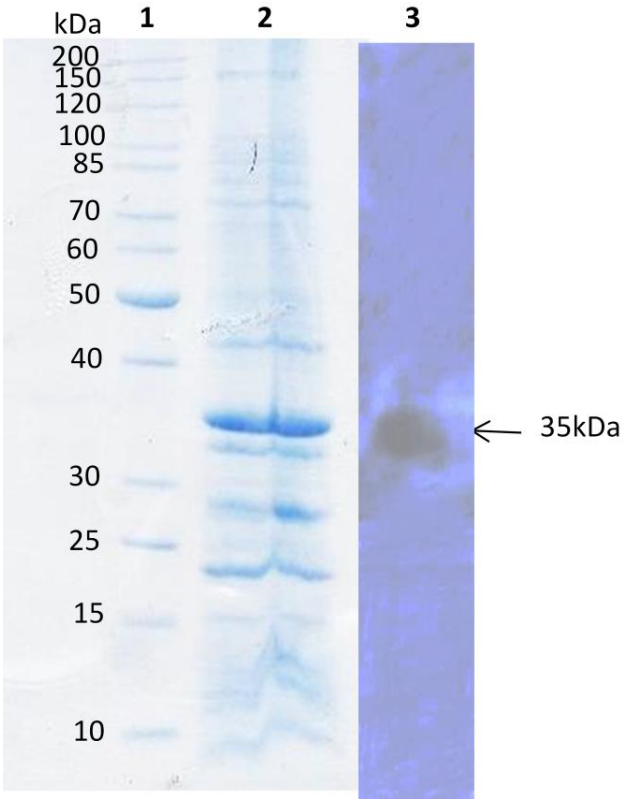
نوع سویه	محل بیان پروتئین	دما (°C)	IPTG (mM)	محیط کشت	بیان پروتئین
		۱۶	۰/۴	LB	-
E. coli BL21	پری پلاسم	۲۰	۱	LB	-
		۳۷	۲	TB	+



شکل ۱- ژل پلی آکریل آمید بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در سیستم *E.coli* BL21 ستون۱، فاز نامحلول، ستون۲، مارکر پروتئین، ستون۳، فاز محلول پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون؛ ستون۴ ، سه ساعت بعد از القا؛ ستون ۵، دو ساعت بعد از القا؛ ستون ۶، یک ساعت بعد از القا؛ ستون۷، بدون القای IPTG

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.34.6.6]



شکل۲- ژل پلی آکریل آمید تخلیص آنزیم گلوتامات اندو پپتیداز بیان شده در فضای پری‌پلاسمیک سیستم بیانی *E.coli* BL21؛ ستون۱، مارکر پروتئین؛ ستون۲، آنزیم متصل شده به رزین‌های نیکل سفاروز، ستون۳، نتیجه وسترن بلاتینگ.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.34.6.6]

منابع

1. Alexandra J, Barbosa R, Saldanha JW, Garratt RC, Novel features of serine protease active sites and specificity pockets: sequence analysis and modelling studies of glutamate-specific endopeptidases and epidermolytic toxins. Protein Eng. 1996;9(7):591-601.
2. Birktoft JJ, Breddam K. Glutamyl endopeptidases. In: Methods Enzymol, 1994. 244: p. 114-126.
3. Bressollier P, Letourneau F, Urdaci M, Verneuil B, Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. Appl. Environ. Microbiol. 1999;65(6):6-2570.
4. Chen H, Xu Z, Xu N, Cen P, Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. J. Biotechnol. 2005;115(3):15-30.7.
5. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al, Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science. 1995;269(5223):496-512.
6. Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, et al, The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium. Science. 1995; 270(5235):397-404.
7. García-Junceda E, Lavandera I, Rother D, Schrittwieser JH, (Chemo) enzymatic cascades-Nature's synthetic strategy transferred to the laboratory. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2015;114:1-6.
8. Graveland-Bikker JF, Ipsen R, Otte J, de Kruif CG, Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolyzed α-lactalbumin. Langmuir. 2004; 20(16):6-6841.
9. Ipsen R, Otte J, Self-assembly of partially hydrolysed α-lactalbumin. Biotechnol. Adv. 2007; 25(6): 5-602.
10. Kakudo S, Kikuchi N, Kitadokoro K, Fujiwara T, Nakamura E, Okamoto H, et al, Purification, characterization, cloning, and expression of a glutamic acid-specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. J. Biol. Chem. 1992; 267(33):8-23782.
11. Kakudo S, Yoshikawa K, Tamaki M, Nakamura E, Teraoka H, Secretory expression of a glutamic-acid-specific endopeptidase (SPase) from *Staphylococcus aureus* ATCC12600 in *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992; 38(2):33-226.
12. Kawalec M, Potempa J, Moon JL, Travis J, Murray BE, Molecular diversity of a putative virulence factor: purification and characterization of isoforms of an extracellular serine glutamyl endopeptidase of *Enterococcus faecalis* with different enzymatic activities. J. Bacteriol. 2005; 187(1):75-266.
13. Kitadokoro K, Nakamura E, Tamaki M, Horii T, Okamoto H, Shin M, et al, Purification, characterization and molecular cloning of an acidic amino acid-specific proteinase from *Streptomyces fradiae* ATCC 14544. Biochim Biophys Acta Prot Struct Mol Enzymol. 1993; 1163(2):57-149.
14. Kou G, Shi S, Wang H, Tan M, Xue J, Zhang D, et al, Preparation and characterization of recombinant protein ScFv (CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 2007; 52(1):8-131.
15. Lozano P, De Diego T, Carrié D, Vaultier M, Iborra JL, Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2003; 21(1):9-13.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.34.6.6]

16. Milgotina E, Shcheglov A, Lapa G, Chestukhina G, Voyushina TL, Enzymatic synthesis of chromogenic substrates for Glu, Asp-specific proteinases. J Pept Res. 2001; 58(1):6-12.
17. Ohara-Nemoto Y, Ikeda Y, Kobayashi M, Sasaki M, Tajika S, Kimura S, Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. Microb Pathog. 2002; 33(1):33-41.
18. Phuah E-T, Lai O-M, Choong TS-Y, Tan C-P, Lo S-K, Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by Rhizomucor miehei lipase. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2012; 78:7-91.
19. Prabakaran S, Tepp W, DasGupta B. Botulinum neurotoxin types B and E, purification, limited proteolysis by endoproteinase Glu-C and pepsin, and comparison of their identified cleaved sites relative to the three-dimensional structure of type A neurotoxin. Toxicon. 2001; 39(10): 31-1515.
20. Rebrikov DV, Akimkina TV, Shevelev AB, Demidyuk IV, Bushueva AM, Kostrov SV, et al, *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase. Molecular cloning and nucleotide sequence of the structural gene. J. Protein Chem. 1999; 18(1):7-21.
21. Safary A, Moniri R, Mirhashemi SM, Nikzad H, Khiavi MA, Phylogenetic and biochemical characterization of a new halo-thermotolerant, biofilm-forming *Bacillus* from Saline Lake of Iran. Pol J Microbiol*;* 2012; 62(4):25-419.
22. Sharma R, Sharma PR, Choudhary ML, Pande A, Khatri GS, Cytoplasmic expression of mature glycylglycine endopeptidase lysostaphin with an amino terminal hexa-histidine in a soluble and catalytically active form in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 2006; 45(1):15-206.
23. Sloma A, Rudolph C, Rufo G, Sullivan B, Theriault K, Ally D, et al, Gene encoding a novel extracellular metalloprotease in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 1990; 172(2):9-1024.
24. Wehofsky N, Wissmann J-D, Alisch M, Bordusa F, Engineering of substrate mimetics as novel-type substrates for glutamic acid-specific endopeptidases: design, synthesis, and application. Biochim biophys acta Prot Struct Mol Enzymol. 2000; 1479(1):22-114.
25. Ye W, Liu J, Wang H, Wang J, Wang X, Cloning, expression, purification, and characterization of a glutamate-specific endopeptidase from *Bacillus licheniformis*. Protein Expr Purif. 2012; 82(1):43-138.
26. Ye W, Liu T, Zhang W, Tan G, Sun Z, Li H. Expression, purification, and characterization of soluble and active glutamate-specific endopeptidase in Bacillus licheniformis and Pichia pastoris. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2016;132:24-30.
27. Yokoi K-j, Kakikawa M, Kimoto H, Watanabe K, Yasukawa H, Yamakawa A, et al, Genetic and biochemical characterization of glutamyl endopeptidase of *Staphylococcus warneri* M. Gene. 2001; 281(1):22-115.
28. Yoshikawa K, Tsuzuki H, Fujiwara T, Nakamura E, Iwamoto H, Matsumoto K, et al, Purification, characterization and gene cloning of a novel glutamic acid-specific endopeptidase from *Staphylococcus aureus* ATCC 12600. Biochim Biophys Acta Prot Struct Mol Enzyme. 1992;1121(1):8-221.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.34.6.6]