

بهینه سازی بیان و تخلیص آنزیم گلوتامات اندوپتیداز از باکتری هالوترموتولرانت

Bacillus licheniformis SL-1

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

۱. دانشکده فنی مهندسی ۲، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز
۲. مرکز تحقیقات بیماری های 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 اندوپتیداز (EC 3.4.21.19) متعلق به خانواده سرین پروتئازها است. این آنزیم می تواند 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 اندوپتیداز باکتری *Bacillus licheniformis* SL-1 مقاوم به حرارت که بومی ایران است.

مواد و روش ها: در این مطالعه بیان آنزیم گلوتامات اندوپتیداز از باکتری *Bacillus licheniformis* SL-1 در *E. coli* BL21 به صورت پری پلاسمی در دماهای ۱۶، ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت های ۰/۴، ۱ و ۲ میلی مولار القاگر بهینه سازی شد. با توجه به این که آنزیم نوترکیب تولید شده دارای دنباله هیستیدینی (His-tag) است از ستون نیکل سفارز برای تخلیص به روش کروماتوگرافی تمایلی استفاده گردید.

یافته ها: شرایط مختلف برای بیان آنزیم نوترکیب گلوتامات اندوپتیداز بررسی گردید و بهترین نتایج برای بیان پری پلاسمیک و محلول آنزیم در میزبان *E. coli* BL21 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با غلظت ۲ میلی مولار IPTG به دست آمد.

نتیجه گیری: بررسی کیفی نتایج حاصل از بیان آنزیم تحت شرایط مختلف حاکی از آنست که بیان پروتئین نوترکیب وابسته به دما بوده و نیازمند غلظت های بالای القاگر IPTG است. مطالعه حاضر نتایج اولیه بررسی امکان تولید نوترکیب آنزیم گلوتامات اندوپتیداز در سیستم بیانی *E. coli* BL21 است. برای تولید هر چه بهتر آنزیم گلوتامات اندوپتیداز سایر پارامترهای مؤثر مانند سیستم های بیانی و روش های تخلیص جایگزین قابل بررسی و بهینه سازی است.

واژه های کلیدی: گلوتامات اندوپتیداز، بیان پری پلاسمی، باکتری *B. licheniformis* SL-1

مقدمه
آنزیم گلوتامات اندوپتیداز (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

پروتئازها با استفاده از روش های کروماتوگرافی تمایلی و تبادل یونی انجام می گیرد، با این حال به دلیل هزینه بالا و پیچیدگی مراحل، راندمان تولید به نسبت پایین است (۲۵). با پیشرفت بیوانفورماتیک و توسعه دست کاری ژن، تعداد زیادی پروتئین نو ترکیب با افزودن دنباله های تمایلی مانند His و GST به پروتئین به منظور تسهیل در بیان و تخلیص تولید شده اند (۴،۱۴).

هدف از این مطالعه بررسی بیان و تخلیص آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز باکتری *Bacillus licheniformis* SL-1 به صورت نو ترکیب در سیستم بیانی باکتریایی *E. coli* BL21 به صورت پری پلاسمی در شرایط مختلف محیطی شامل دما و غلظت های 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 غلظت های بالای نمک است. با توجه به تشابه ژنوم باکتری بومی *Bacillus licheniformis* SL-1 با سویه ATCC14580 انتظار می رود که آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز این باکتری فعالیت مناسبی همانند سویه ATCC14580 داشته باشد. لذا آنزیم های جداسازی شده از آن می تواند مناسب برای کاربردهای صنعتی باشد.

روش کار

باکتری ها، مواد و محیط های کشت

باکتری هالوترموتولرانت *Bacillus licheniformis* SL-1 باکتری 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، عصاره مخمر، گلیسرول و سدیم کلراید از (Applichem (Darmstadt, Germany) خریداری شدند. رزین Ni Sepharose از شرکت GE Healthcare Life Sciences (Sweden) تهیه شد. آنتی بادی مونوکلونال اولیه His-tag و آنتی بادی ثانویه goat anti-mouse IgG-HRP conjugated به ترتیب از شرکت GE Healthcare و Santa Cruz خریداری شدند.

این آنزیم می تواند به طور اختصاصی پیوندهای پپتیدی بین آلفا-کربوکسیل و یا باقی مانده های اسید آمینه های گلوتامین و آسپاراژین را بشکند (۲). آنزیم گلوتامات اندو پپتیداز برای آنالیز ساختار پروتئین و سنتز فاز جامد پپتیدها مورد استفاده قرار می-گیرد (۱۹،۲۴،۲۶). آنزیم هایی که عملکرد اختصاصی بالایی دارند، به طور گستره برای سنتز مواد آلی به عنوان کاتالیزهای زیستی استفاده شده اند (۷،۱۵،۱۸). همچنین عملکرد اختصاصی این آنزیم در هیدرولیز α -lactulbumin منجر به تولید نانوتیوب هایی شده است که می تواند به عنوان حامل دارو در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار گیرد (۸،۹). تاکنون انواع مختلفی از گلوتامات اندوپپتیدازها از میکروارگانیسم های مختلف شامل *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces albidoflavus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus intermedius*, *Bacillus licheniformis* و *Staphylococcus warneri* 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 می دهند و به دلیل تنوع در توالی و ساختار، تفاوت هایی در فعالیت کاتالیکی آن ها 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 تشکیل شده 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 کاتالیکی بیشتر و اختصاصیت بالاتری دارد (۱۰). بنابراین شناسایی ساختار و ویژگی های 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

بیان آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز

بیان آنزیم نو ترکیب گلوتامات اندوپیتیداز با استفاده از سیستم بیانی پروکاریوتی در میزبان باکتریایی شامل *E. coli* BL21 به صورت پری پلاسمی در شرایط مختلف محیطی انجام گردید. به همین منظور پلاسمید نو ترکیب حاصل شده از مرحله کلونینگ pET22b-endo1 (دارای پپتید نشانه برای بیان در فضای پری پلاسمی) به روش شوک حرارتی به سلول های بیانی *E. coli* BL21 منتقل شدند.

در بیان پری پلاسمی، کشت آغازگر از کلنی های مثبت *E. coli* BL21 حاوی پلاسمید نو ترکیب pET22b-endo1 در محیط LB (۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم تریپتون و ۵ گرم سدیم کلراید در یک لیتر) مایع حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 میلی لیتر گلیسرول در یک لیتر) حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین تلقیح شد و در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه تا رسیدن به دانسیته ۱-۳/۱ هوادهی گردید. القای تولید پروتئین با افزودن IPTG در غلظت های ۰/۴، ۱ و ۲ میلی مولار به محیط کشت باکتری انجام شد. سپس محیط کشت باکتری به مدت ۱۶ ساعت در دماهای ۱۶، ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه هوادهی گردید.

استخراج و تخلیص آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز

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، پروتئین های سلولی به روش انجماد و ذوب در نیتروژن مایع و سپس به روش سونیکاسیون با شدت ۶۰ درصد، ۵ مرتبه به مدت ۳۰ ثانیه استخراج گردید. محصول لیز سلولی به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی که حاوی پروتئین های محلول است از رسوب جدا گردید.

تخلیص پروتئین به روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون Nickel Sepharose تهیه شده از شرکت GE Healthcare آمریکا انجام شد. محلول حاصل از استخراج پروتئین به همراه ۲۰ میلی مولار ایمیدازول به ستون حاوی رزین نیکل سفاروز اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد به منظور اتصال به رزین انکوبه شد. مرحله شست و شو با استفاده از بافر حاوی ۵۰ میلی مولار تریس، ۱۰۰ میلی مولار سدیم کلراید، ۱/۰ درصد بتامرکاپتواتانول و ۲۰ میلی مولار ایمیدازول انجام شد. پروتئین هدف دارای دنباله هیستیدین با استفاده از بافر حاوی ۵۰۰ میلی مولار ایمیدازول، ۲۰ میلی مولار سدیم فسفات و ۵۰۰ میلی مولار سدیم کلراید از رزین های نیکل جدا شده و جمع آوری گردید.

الکتروفورز پروتئین و وسترن بلائینگ

تمام نمونه های به دست آمده از مراحل استخراج و تخلیص پروتئین بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. پس از الکتروفورز، پروتئین نو ترکیب توسط بافر انتقال (۲۵ میلی مولار تریس، ۱۹۲ میلی مولار گلیسین، ۱۵ درصد متانول) به کاغذ پلی وینیلیدین دی فلورید (PVDF) منتقل شد. مرحله بلاکینگ در دمای ۴ درجه سانتی گراد با استفاده از محلول ۵ درصد Skim milk به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. آنتی بادی اولیه علیه His-Tag با رقت ۱ به ۳۰۰۰ و آنتی بادی 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 اندوپیتیداز در سیستم باکتریایی *E. coli* BL21 در فضای پری پلاسمی غلظت های مختلف از IPTG و دمای های متفاوت در جدول ۱ نشان داده شده است. آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز در سیستم *E. coli* BL21 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت ۲ میلی مولار IPTG به صورت محلول بیان شد. شکل ۱ الکتروفورز فاز محلول و نامحلول پروتئین استخراج شده و شکل ۲ نتایج مربوط به تخلیص آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز در ستون نیکل سفاروز را بر روی ژل، یله آکریل آمید با وزن مولکولی ۳۵

سیتوپلاسمی سیستم بیانی *E. coli* BL21 است که تأیید کننده نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر است. در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۶، Sharma و همکاران بیان محلول و مناسب نوع دیگری از اندوپیتیداز را از باکتری *Staphylococcus simulans* در فضای سیتوپلاسمی سیستم بیانی *E. coli* BL21 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با غلظت نهایی ۰/۴ میلی مولار IPTG را انجام داده اند که (۲۲) با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی ندارد.

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

نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز از باکتری بومی *B. licheniformis* SL-1 شناسایی و به صورت محلول در فضای پری پلاسمی سیستم *E. coli* BL21 بیان و تخلیص شد. بررسی متغیرهای دما و غلظت IPTG در سیستم های بیانی *E. coli* BL21 نشان داد که تولید آنزیم در سویه *E. coli* BL21 در محیط کشت ساده LB با غلظت ۲ میلی مولار از IPTG و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به صورت محلول در فضای پری پلاسمی انجام شد. مطالعه حاضر نتایج اولیه بررسی امکان تولید نو ترکیب آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز در سیستم بیانی *E. coli* BL21 است. برای تولید هر چه بهتر آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز سایر پارامترهای مؤثر مانند سیستم های بیانی و روش های تخلیص جایگزین قابل بررسی و بهینه سازی است.

سپاسگزاری

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

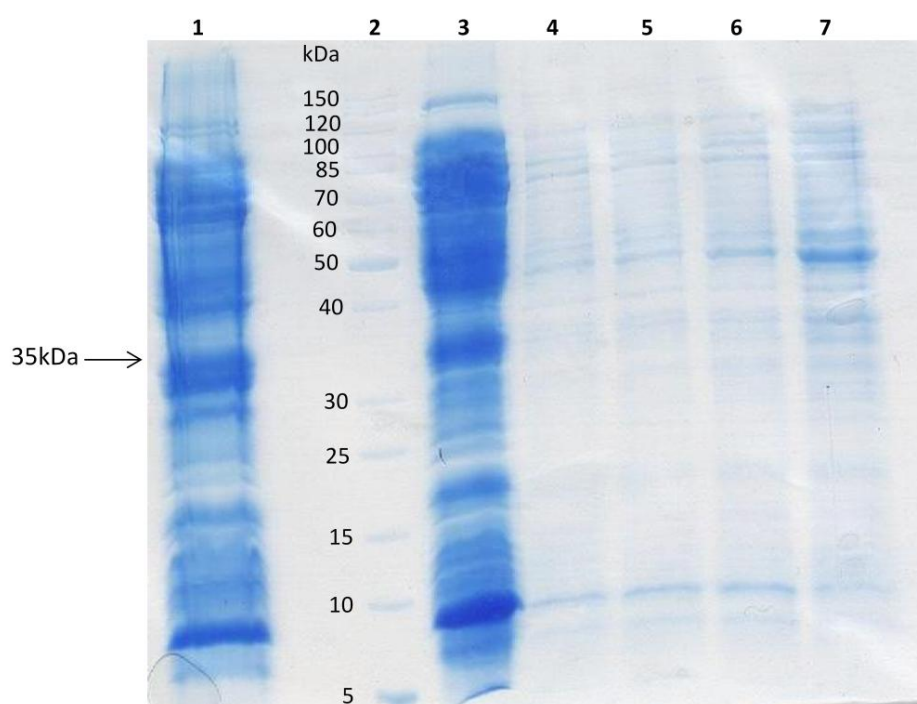
کیلودالتون نشان می دهد. هم چنین نتایج وسترن بلاتینگ، بیان آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز را در فاز محلول سیستم بیانی *E. coli* BL21 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت ۲ میلی-مولار IPTG را مورد تأیید قرار داد (شکل ۲). این در حالی- است که در دماهای ۱۶ و ۲۰ درجه سانتی گراد با غلظت های ۴/۰ و ۱ میلی مولار از IPTG در سیستم بیانی *E. coli* BL21 در فاز محلول پروتئین، باند ۳۵ کیلودالتونی مربوط به بیان آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز بر روی ژل پلی آکریل آمید مشاهده نگردید.

بحث

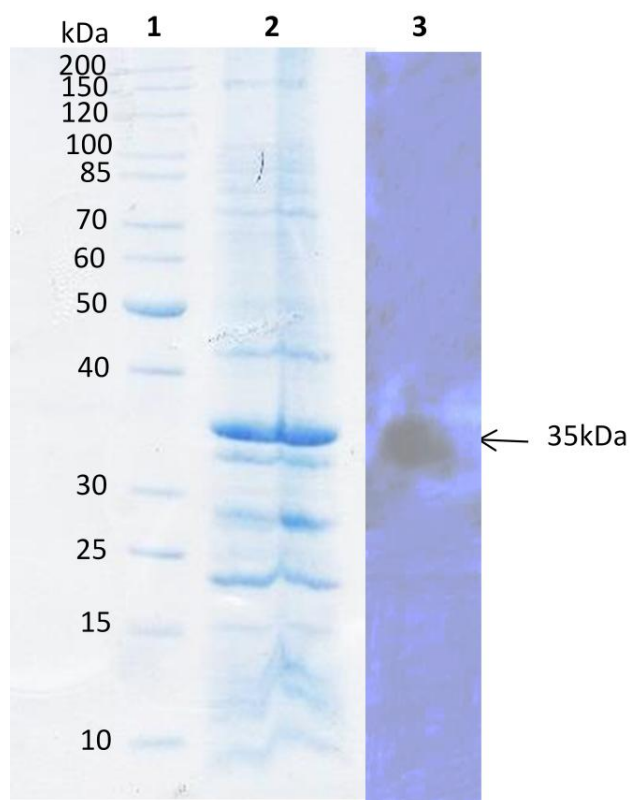
باکتری *B. licheniformis* SL-1 با ۹۷ درصد تشابه به سویه *B. licheniformis* ATCC14580 به عنوان اولین گزارش جداسازی این باکتری از دریاچه های پرنمک در ایران و دنیا معرفی شده است. باکتری *B. licheniformis* یک باکتری گرم مثبت تولیدکننده اندوسپور است که از خاک، مواد گیاهی و رسوبات دریایی جداسازی شده است، اما تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر جداسازی این باکتری از دریاچه نمک وجود نداشته است (۲۱). در این مطالعه بیان آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز از باکتری *B. licheniformis* SL-1 به صورت نو ترکیب در سیستم های بیانی *E. coli* BL21، شرایط دمایی و غلظت های مختلف از IPTG مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج جدول ۱ نشان می دهد که بیان محلول آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز در فضای پری پلاسمی سیستم *E. coli* BL21 انجام شده است که می تواند تأییدکننده فولدینگ مناسب و تشکیل پیوندهای سولفیدی درون مولکولی این آنزیم در شرایط اکسید موجود در فضای پری پلاسمی *E. coli* BL21 باشد. با توجه به نتایج جدول ۱، سیستم بیانی *E. coli* BL21 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت ۲ میلی مولار از IPTG بیان محلول دارد. در مطالعه ای مشابه از Ye و همکاران در سال ۲۰۱۲، بیان آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز در فضای سیتوپلاسمی سیستم بیانی *E. coli* BL21 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با غلظت ۱ میلی مولار منجر به تشکیل اینکلوژن بادی شده است (۲۵). نتایج این مطالعه نشان دهنده عدم بیان مناسب و محلول آنزیم گلوتامات اندوپیتیداز در شرایط احیای

جدول ۱- بررسی بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در فضای پری پلاسمی سویه *E. coli* BL21 در شرایط دمایی و غلظت های مختلف القاگر

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



شکل ۱- ژل پلی آکریل آمید بیان آنزیم گلوتامات اندوپپتیداز در سیستم *E. coli* BL21. ستون ۱، فاز نامحلول، ستون ۲، مارکر پروتئین، ستون ۳، فاز محلول پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون؛ ستون ۴، سه ساعت بعد از القا؛ ستون ۵، دو ساعت بعد از القا؛ ستون ۶، یک ساعت بعد از القا؛ ستون ۷، بدون القای IPTG



شکل ۲- ژل پلی آکریل آمید تخلیص آنزیم گلوتامات اندو پتیداز بیان شده در فضای پری پلاسمیک سیستم بیانی *E.coli* BL21؛ ستون ۱، مارکر پروتئین؛ ستون ۲، آنزیم متصل شده به رزین های نیکل سفاروز، ستون ۳، نتیجه وسترن بلاتینگ.

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.

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, Khatr 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.