دانشکده علوم

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی علوم سلولی و مولکولی

عنوان:

جداسازی و شناسایی باکتری ترشح کننده ی پروتئاز خارج سلولی با قابلیت عملکرد در شرایط اسیدی

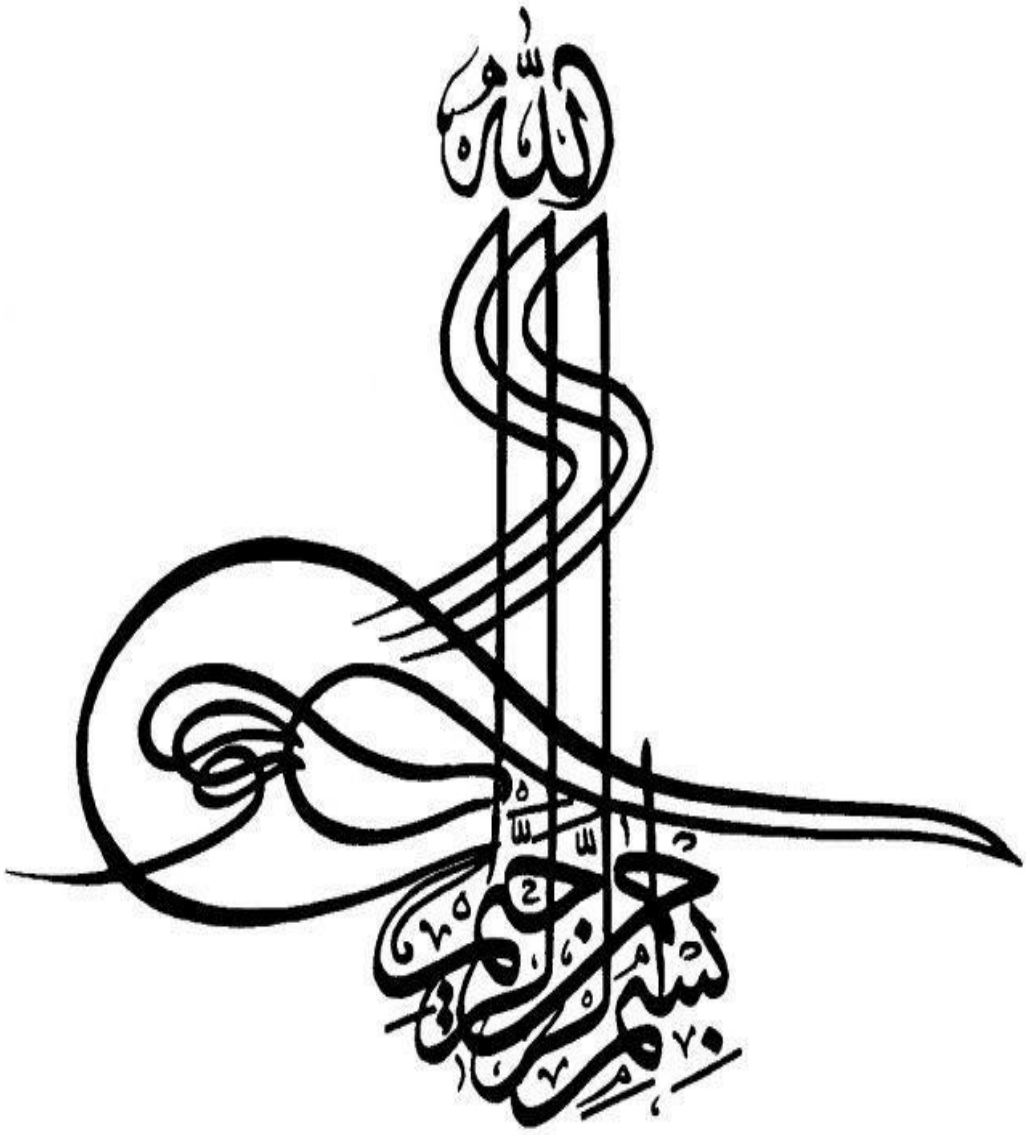
توسط:

هاجر رضانژاد بردجی

استاد راهنما:

دکتر حمید رضا کربلائی حیدری

بهمن ماه ۱۳۹۰


الله
بسم الله الرحمن الرحيم

به نام خدا

اظهارنامه

اینجانب هاجر رضانژاد بردجی (۸۸۰۵۵۷) دانشجوی رشته ی زیست شناسی گرایش سلولی- مولکولی دانشکده علوم اظهار می کنم که این پایان نامه حاصل پژوهش خودم بوده و در جاهائی که از منابع دیگران استفاده کرده ام، نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته ام. همچنین اظهار می کنم که تحقیق و موضوع پایان نامه ام تکراری نمی باشد و تعهد می نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاورد های آن را منتشر ننموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق با آیین نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: هاجر رضانژاد بردجی

تاریخ و امضاء:

به نام خدا

جداسازی و شناسایی باکتری ترشح کننده ی پروتئاز خارج سلولی با قابلیت عملکرد در شرایط اسیدی

بوسیله ی:

هاجر رضانژاد بردجی

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه شیراز به عنوان

بخشی از فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته ی

زیست شناسی سلولی-مولکولی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته ی پایان نامه، با درجه:

دکتر حمید رضا کربلائیحیدری ، استادیار بخش زیست شناسی (رئیس کمیته) .....

دکتر محمود امین لاری ، استاد بخش بیوشیمی دامپزشکی.....

دکتر علی مراد شاهی، دانشیار بخش زیست شناسی .....

دکتر رضا یوسفی، استادیار بخش زیست شناسی.....

بهمن ماه ۱۳۹۰

تقدیم به:

پدر و مادر بزرگوارم و تمام عزیزانی که در پیشرفت اینجانب سهیم بوده اند

سپاسگزاری

ذلک فضل من الله و کفی بالله علیما (۷۰ نساء)

چنین فضل از سوی یکتا خداست که داناییش بس همه خلق راست

به مصداق آیه «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر حمید رضا کربلائی حیدری که با پیشنهادات و راهنمایی های بسیار ارزشمند و سازنده ایشان راه بر من آسان گردید صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم و برای ایشان و خانواده محترمشان آرزوی سلامتی و کامیابی دارم. همچنین از جناب آقای دکتر محمود امین لاری و جناب آقای دکتر رضا یوسفی و جناب آقای دکتر علی مرادشاهی به خاطر مشاوره و رهنمود های سازنده شان در انجام این پروژه صمیمانه قدردانی می نمایم. از حضور نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر صابر صادقی در جلسه دفاع، سپاسگزارم.

از دوستان عزیزم که در انجام این کار مرا یاری نموده اند ،کمال تشکر را دارم.

در پایان از خانواده ی عزیزم که در همه حال حامی و مشوق من بوده و هستند از صمیم قلب تشکر و قدردانی می نمایم.

چکیده

جداسازی و شناسایی باکتری ترشح کننده ی پروتئاز خارج سلولی با قابلیت عملکرد در شرایط اسیدی

به کوشش

هاجر رضانژاد بردجی

در پژوهش حاضر، جداسازی یک باکتری با قابلیت رشد در شرایط اسیدی و توانایی تولید پروتئاز خارج سلولی مد نظر بود. جستجوی باکتری با نمونه گیری از خاک و آب مناطق دارای pH اسیدی انجام گرفت و بر اساس ویژگی های ظاهری و آنالیز توالی ۱۶S rRNA سویه HR-1 به عنوان بهترین سویه ترشح کننده آنزیم انتخاب و در جنس *Serratia* طبقه بندی گردید. بهینه سازی شرایط کشت نشان داد که باکتری مورد نظر در محیط TSB با ۵/۵ pH~ و دمای ۳۰ ^{o}C و شرایط هوادهی ۱۸۰rpm بالاترین میزان تولید پروتئاز را دارد. آنزیم ترشح شده بوسیله تلفیقی از روشهای رسوب دهی با آمونیوم سولفات و ستون کروماتوگرافی تعویض یونی SP-Sepharose و ژل فیلتراسیون Sephacryl S-200 خالص گردید. به کمک SDS-PAGE وزن مولکولی ظاهری آنزیم حدود ۵۰kDa تخمین زده شد. این آنزیم یک پروتئاز ساکروفیل با بهینه دما فعالیت بین^{o}C ۳۵-۳۰ و پایداری دمایی پایین می باشد که در مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد ۷۶٪ فعالیتش را از دست می-دهد. آنزیم دارای خصوصیت اسیدی بوده و pH بهینه آن ۴ می باشد. K_m و V_{max} این آنزیم به ترتیب ۵/۸ mg/ml ، ۰/۱۳۳۸ U می‌باشد. این پروتئاز به شدت توسط EDTA مهار می شود و به همین دلیل به عنوان یک متالوپروتئاز طبقه بندی گردید. از آن جایی که ۱و۱۰ فنانترولین اثری بر روی فعالیت پروتئولیتیک آنزیم نشان نداد، می توان گفت که آنزیم به فلز روی برای فعالیت خود وابسته نیست. در مجموع، بر اساس ویژگیهای این پروتئاز از جمله دارا بودن بهینه فعالیت در pH اسیدی و ساکروفیل بودن آن، می‌توان این آنزیم را به عنوان یک آنزیم با خصوصیات منحصر به فرد برای کاربرد در صنایع مختلف به خصوص صنایع لبنی معرفی نمود.

فهرست مطالب

صفحه

فصل اول(مقدمه)..... ۱

۱- آنزیم‌ها ۲

۱-۱- طبقه بندی آنزیم‌ها ۲

۱- ۲-پروتئازها ۳

۱-۲-۱- طبقه بندی پروتئازها ۴

۱-۲-۱-۱- اگزوپپتیدازها..... ۶

۱-۲-۱-۱-۱- آمینوپپتیدازها..... ۶

۱-۲-۱-۱-۲-کربوکسی پپتیدازها..... ۶

۱-۲-۱-۱-۳- امگاپپتیدازها..... ۷

۱-۲-۱-۲- اندوپپتیدازها..... ۷

۱-۲-۱-۲- ۱-سرین پروتئازها..... ۸

۱-۲-۱-۲- ۲-گلوتامیک پروتئازها..... ۹

۱-۲-۱-۲- ۳-سیستئین / تیول پروتئازها..... ۹

۱-۲-۱-۲- ۴-آسپارتیک پروتئازها..... ۹

۱-۲-۱-۲- ۵-متالو پروتئازها..... ۱۱

۱-۲-۳- مکانیسم عمل پروتئازها..... ۱۲

۱-۲-۳-۱- سرین پروتئازها..... ۱۲

۱-۲-۳-۲- گلوتامیک پروتئازها..... ۱۲

۱-۲-۳-۳- سیستئین / تیول پروتئازها..... ۱۳

۱-۲-۳-۴- آسپارتیک پروتئازها..... ۷

۱-۲-۳-۵- متالو پروتئازها..... ۱۴

۱-۲-۴- کاربردهای صنعتی پروتئازها..... ۱۵

۱-۲-۴-۱-کاربردهای تجاری پروتئازهای اسیدی..... ۱۶

۱-۲-۴-۱- ۱- تولید پنیر..... ۱۶

۱-۳- منابع آنزیم‌ها..... ۱۹

۱-۳-۱-پروتئازهای باکتریایی..... ۲۰

مروری بر پژوهش‌های انجام شده فرضیه..... ۲۰

اهداف ۲۸

فرضیه..... ۲۸

فصل دوم(موادو روشهای تحقیق)..... ۲۹
۲ -۱- (مواد شیمیایی)..... ۳۰
۲-۲- تهیه نمونه ها..... ۳۰
۲-۳- محیط‌های کشت باکتری..... ۳۱
۲-۳-۱- محیط پیش کشت (preculture)..... ۳۱
۲-۳-۲- کشت در محیط جامد..... ۳۱
۲-۳-۳- محیط پایه تولیدآنزیم پروتئاز..... ۳۲
۲-۳-۴- کشت باکتری با قابلیت تحمل شرایط اسیدی مولد پروتئاز..... ۳۳
۲-۳-۵- محیط‌های جایگزین برای میزان تولید پروتئاز توسط باکتری..... ۳۳
۲-۴- اثر پارمترهای مختلف بر روی رشد باکتری و تولید آنزیم پروتئاز..... ۳۴
۲-۴-۱- بررسی رشد باکتری و فعالیت پروتئازی در محیطهای کشت مختلف..... ۳۳
۲-۴-۲- بررسی سینتیک رشد و فعالیت پروتئازی باکتری در محیط کشت پایه..... ۳۴
۲-۴-۳- بررسی میزان رشد و فعالیت پروتئازی باکتری در pH های مختلف..... ۳۴
۲-۴-۴-بررسی میزان رشد و فعالیت پروتئازی باکتری در دماهای مختلف..... ۳۵
۲-۵- تعیین خصوصیات مورفولوژیکی باکتری..... ۳۵
۲-۵-۱- روش میکروسکوپی..... ۳۵
۲-۵-۲- استخراج DNA..... ۳۵
۲-۶- واکنش زنجیرهای پلیمراز(PCR)..... ۳۷
۲-۷- الکتروفورز محصول PCR..... ۳۹
۲-۷-۱- روش تهیه ی بافر تانک الکتروفورز..... ۳۹
۲-۷-۲- روش تهیه ژل آگارز ۱٪..... ۳۹
۲-۸- خالص سازی محصول PCR از ژل آگارز با استفاده ازکیت..... ۴۱
۲-۹- استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک برای تجزیه و تحلیل توالی بدست آمده..... ۴۲
۲-۱۰- مواد و روشهای استفاده شده در مراحل تخلیص و شناسایی پروتئاز..... ۴۲
۲-۱۰-۱- بافرهای لازم جهت دیالیز و تخلیص محلول آنزیمی..... ۴۲
۲-۱۰-۲- روش رسوبدهی با آمونیوم سولفات..... ۴۳
۲-۱۰-۳- روش استفاده از رزین SP-Sepharose وتهیه ستون..... ۴۳
۲-۱۰-۴-روش استفاده از رزین و تهیه ستون gel filteration..... ۴۴
۲-۱۱- سنجش پروتئین..... ۴۵
۲-۱۱-۱- سنجش کمی پروتئین به روش برادفورد..... ۴۵
۲-۱۲- روش سنجش فعالیت آنزیمی..... ۴۶
۲-۱۲-۱-روش سنجش..... ۴۷
۲-۱۳- SDS-PAGE پروتئینها..... ۴۸
۲-۱۳-۱- روش الکتروفورز پلی آکریل آمید ژل نمونه های پروتئینی..... ۴۸
۲-۱۳-۲- محلولهای لازم جهت تهیه ژلSDS-PAGE..... ۴۹
۲-۱۳-۳- ترکیبات لازم برای تهیه ۶ میلی لیتر ژل تفکیک کننده پلی آکریل آمید..... ۵۱

۲-۱۳-۴- ترکیبات لازم برای تهیه ۵ میلی لیترژل متراکم کننده پلی آکریل آمید ۵۱
۲-۱۳-۵- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید ۵۲
۲-۱۳-۵-۱- محلولهای لازم جهت رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید ۵۲
۲-۱۴- ژل رنگ آمیزی فعالیت آنزیمی(Zymogram) ۵۲
۲-۱۵- روش های بررسی خصوصیات پروتئازهای خالص شده ۵۳
۲-۱۵-۱- اثرغلظت های مختلف سوبسترا برفعالیت پرتئولیتیک انزیم خالص شده ۵۳
۲-۱۵-۲- اثردما برفعالیت پرتئولیتیک آنزیم خالص شده ۵۳
۲-۱۵-۳- اثرpH بر فعالیت پروتئازی ۵۳
۲-۱۵-۴- بررسی پایداری حرارتی پروتئاز ۵۴
۲-۱۵-۵- اثر pH برپایداریآنزیم ۵۴
۲-۱۵-۶- بررسی اثر مهارکننده ها ویون های فلزی بر روی آنزیم ۵۴
۲-۱۵-۷- اثر آنزیم بر انعقاد شیر ۵۵
۲-۱۶- تولید پنیر ۵۵
۲-۱۷- کروماتوگرافی متیع با کارایی بالا فاز معکوس(RP-HPLC) ۵۶
فصل سوم (نتایج) ۵۷
۳-۱- شناسایی وخصوصیات ظاهری باکتریHR-1 ۵۸
۳-۲- استخراج DNA ۶۰
۳-۳- واکنش PCR ۶۰
۳-۴- موقعیت فیلوژنی باکتری *Serratia sp.* HR-1در میان سایر باکتری ها ۶۲
۳-۵-ثر پارامترهای مختلف بر روی رشد باکتری و تولید آنزیم پروتئاز ۶۳
۳-۵-۱-بررسی میزان رشد و فعالیت پروتئازی باکتری درpH های مختلف ۶۳
۳-۵-۲- بررسی اثر دما بر رشد و فعالیت پروتئازی باکتری ۶۴
۳-۵-۳-بررسی اثر محیط کشت‌های متنوع بر رشد و فعالیت پروتئازی باکتری ۶۵
۳-۶- سنتیک رشد باکتر و تولید آنزیم پروتئاز ۶۶
۳-۷- تخلیص آنزیم پروتئاز از باکتری ۶۷
۳-۸-نتایج حاصل از ژل پلی آکریل آمید ۶۹
۳-۸-۱- SDS-PAGE و Zymogram ۶۹
۳-۹- اثرغلظت های مختلف سوبسترا برفعالیت پروتئولیتیک آنزیم خالص شده ۷۱
۳-۱۰- اثر دما بر روی فعالیت پروتئاز ۷۳
۳-۱۱- اثر pH بر روی فعالیت پروتئاز ۷۳
۳-۱۲- غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم ۷۴
۳-۱۳- اثر pH بر روی پایداری پروتئاز ۷۵
۳-۱۴-اثر یون‌ها بر فعالیت آنزیمی ۷۶
۴-۱۵- اثر مهارکننده بر روی فعالیت پروتئازی آنزیم خالص شده ۷۸
۳-۱۶-اثر آنزیم بر انعقاد شیر ۸۰
۳-۱۸- کروماتوگرافی متیع با کارایی بالا فاز معکوس(RP-HPLC) ۸۱

فصل چهارم (بحث).....۸۳

فصل پنجم (منابع).....۸۹

چکیده انگلیسی.....۹۸

فهرست جدول ها

عنوان صفحه

جدول ۱-۱- تقسیم بندی آنزیم‌ها بر اساس نوع کاتالیز واکنش..... ۳
جدول ۱-۲-طبقه بندی پروتئازها..... ۸
جدول ۲- ۱- مخلوط واکنش PCR..... ۳۷
جدول ۲-۲- برنامه تنظیم شده برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ۳۸
جدول ۲-۳- روش تهیه بافر TAE 50 x..... ۳۹
جدول ۳-۱- اثر ترکیبات محیط بر رشد و تولید پروتئاز سویه HR-1..... ۶۵
جدول ۳-۲- اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیمی پروتئاز..... ۷۷
جدول ۳-۳-اثر مهارکننده‌های مختلف بر فعالیت پروتئازی ۷۸

فهرست شکل ها و تصاویر

عنوان صفحه

شکل ۲-۱- منحنی استاندارد حاصل از قرار دادن نمونه‌های پروتئینی..... ۴۴

شکل ۳-۱- تصویر باکتری کشت داده شده در پلیتskim milk ۵۸

شکل ۳-۲- تصویر باکتریHR-1 پس از رنگ آمیزی گرم و رشد باکتری روی پلیت EMB ۵۹

شکل ۳-۳- ژل الکتروفورز DNA استخراج شده از باکتری *Serratia-sp*. HR-1..... ۶۰

شکل ۳-۴- محصول ژل الکتروفورز PCR..... ۶۱

شکل ۳-۵- نتیجه توالی یابی محصول 16s rRNAPCR ,باکتری*Serratia-sp*. HR-1 ..... ۶۱

شکل ۳-۶- موقعیت*Serratia-sp*. HR-1 .در میان سایر باکتری ها..... ۶۲

شکل ۳-۷-نمودار میزان رشد و فعالیت پروتئازی باکتری در ۵ محیط کشت یکسان با pHهای مختلف..... ۶۳

شکل ۳-۸- نمودار میزان رشد و فعالیت پروتئازی در محیط کشت یکسان با دماهای مختلف..... ۶۴

شکل ۳-۹- بررسی منحنی رشد و تولید آنزیم پروتئولیتیک در مدت ۷۲ ساعت..... ۶۶

شکل ۳-۱۰- نمودار کروماتوگرام مراحل خالص سازی فعالیت پروتئولیتیک حاصل از باکتری HR-1 ..... ۶۸

شکل ۳-۷- ژلSDS-PAGEو Zymogramاز نمونه HR-1..... ۶۹

شکل۳-۱۲- نمودار وزن مولکولی به نسبت مسافت طی شده توسط پروتئین در مقایسه با وزنهای مشخص . ۷۰

شکل۳-۱۳- نمودار وزن مولکولی به نسبت حجم خروجی پروتئین به حجم خروجیvoid volume ۷۰

شکل ۳-۱۴- نمودار میکائیلس و منتن..... ۷۱

شکل۳-۱۵- نمودار لاین وروبرک ۷۲

شکل ۳-۱۶- اثر دما بر فعالیت کازئینولیتیک پروتئاز در pH= ۴ ..... ۷۳

شکل ۳-۱۷- اثر pH بر فعالیت پرتئولیتیک آنزیم در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد..... ۷۴

شکل۳-۱۸- بررسی پایداری دمایی پروتئاز در دماهای مابین ۷۰-۲۰ درجه سانتیگراد..... ۷۵

شکل ۳-۱۹- بررسی پایدار پروتئاز در pH های مختلف..... ۷۶

شکل ۳-۲۰ – اثر آنزیم بر روی انعقاد شیر..... ۸۰

شکل ۳-۲۱ –RP-HPLC..... ۸۲

فصل اول

مقدمه

مقدمه

۱ -آنزیم ها

تقریباً تمامی واکنش‌های موجودات زنده بوسیلهٔ مولکول‌های کروی پروتئینی موسوم به آنزیم‌تسریع می‌شوند؛ به طوری که بدون وجود آنزیم استمرار حیات تقریباً غیر ممکن می-نماید.آنزیم‌ها سرعت فرآیندهای بیوشیمیایی را میلیون‌ها بار افزایش می دهند. بنابراین یکی از خصوصیات بارز آنزیم‌ها قدرت کاتالیتیکی بالایآن‌ها می‌باشد. معماری مولکولی دهانهٔ فعال آنزیم اغلب طوری طراحی شده است که سوبسترا و محصول را به طور اختصاصی شناسایی می‌کند. بنابراین دومین خصوصیت بارز آنزیمها ویژگی برای سوبسترا و در اغلب موارد سوبسترا و محصول است.

۱-۱- طبقه بندی آنزیم ها

بیشتر آنزیم‌ها فرآیند انتقال الکترون، اتم یا گروه عاملی را کاتالیز می‌کنند. بر این اساس آنزیم‌ها به شش خانوادهٔ اصلی تقسیم می‌شوند. در دهانهٔ فعال برخی آنزیم‌ها یون فلزی موسوم به کوفاکتور یا شکل فعال ویتامینی موسوم به کوآنزیم ایفای نقش می‌کنند که کاربرد این آنزیم‌ها به دلیل گران بودن محدود می‌باشد.هیدرولازها، لیازها و ایزومرازها آنزیم‌های کاربردی در صنعت می‌باشند؛ بدلیل آنکه اغلب نیازی به کوفاکتور و کوآنزیم ندارند.

جدول ۱-۱- تقسیم بندی آنزیم ها بر اساس نوع کاتالیز واکنش

دسته آنزیمی	نوع کاتالیز واکنش
۱ -**اکسیدوردوکتاز**	اکسیداسیون و احیا
۲ -**ترانسفراز**	انتقال دهندۀ گروه عاملی
۳ -**هیدرولاز**	هیدرولیز
۴ -**لیاز**	ایجاد پیوند دوگانه بدون مصرف آب
۵ -**ایزومراز**	تغییر ایزومری
۶ -**لیگاز**	ایجاد پیوند به کمک ATP یاNAD

۱-۲-پروتئازها

هیدرولازهایی که پیوندهای پپتیدی را می شکنند، پروتئازها یا آنزیم های پروتئولیتیک نامیده می شوند.پروتئازها از جمله آنزیم هایی هستند که بیشترین مطالعات روی آن ها صورت گرفته است و خصوصیات بیوشیمیایی و ساختاری و عملکردی تعداد زیادی از آنها بطور جزئی بررسی شده است. این گروه آنزیمی با توجه به کاربردهایشان در هر دو زمینه ی فیزیولوژیکی و صنعتی، جایگاه مهم و اساسی دارا می باشند.

پیشرفت ها در زمینه ی تکنیک های آنالیتیکی، نشان می دهد که پروتئازها تغییرات بسیار ویژه و انتخابی را بر روی پروتئین ها انجام می دهند که شامل فعال سازی اشکال زیموژنی آنزیم ها از طریق پروتئولیز محدود شده، لخته شدن خون و لیز شدن لخته های فیبرینی، آماده سازی و انتقال پروتئین های ترشحی از میان غشاها می باشد. از طرف دیگر، پروتئازها در بین مهمترین آنزیم های صنعتی و در واقع یکی از سه گروه بزرگ آنزیم های صنعتی می باشند و

تقریبا ۶۰ درصد از کل فروش آنزیم ها را در بازار جهانی تشکیل می دهند. این آنزیم ها در تولیدات صنعتی مختلف از جمله شوینده ها، داروها، مواد غذایی، صنایع چرم، بازیافت نقره و تیمار مواد زائد کاربرد دارند. همچنین کاربرد آن ها در زمینه های کلینیکی، دارویی و شیمی رو به پیشرفت و گسترش می باشد. نیاز رو به افزایش پروتئازها، بیوتکنولوژیست ها را به سمت منابع جدید پروتئازی هدایت کرده است.

پروتئازها اعمال بسیار متنوعی را از سطح سلولی تا اندام و موجود کامل برای تولید سیستم های آبشاری نظیر هموستازیس و التهاب از خود نشان می دهند. آنها مسئول فرآیندهای پیچیده‌ای در فیزیولوژی طبیعی و حتی در شرایط بیماری در سلول می باشند. نقش این آنزیم ها در چرخه‌ی حیات موجودات بیماری‌زا منجر به این شده است که آنها را به عنوان یک هدف برای ساخت مواد دارویی حتی بر علیه بیماری های کشنده ای نظیر سرطان و ایدز در نظر بگیرند.

پروتئازها دارای تاریخچه‌ی طولانی در صنایع غذایی و دترجنت نیز هستند. همچنین کاربردشان در صنایع چرم برای موزدایی و جایگزینی مواد شیمیایی سمی از کاربردهای نسبتاً جدید این آنزیم ها به حساب می آید. تنوع بالای پروتئازها و ویژگی عملشان سبب شده است که جامعه‌ی علمی توجه ویژه‌ای برای تحقیق در مورد کاربردهای فیزیولوژیکی و بیوتکنولوژیکی آنها به خرج دهد (Poldermans et al., 1990).

۱-۲-۱-طبقه بندی پروتئازها

بر طبق تصمیم کمیته ی نامگذاری مجمع بین المللی بیوشیمی و زیست شناسی مولکولی (International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB))، پروتئازها در زیر گروه ۴ از گروه ۳ (هیدرولازها) طبقه بندی می شوند. اما

پروتئازها به واسطه ی تنوع عملکردی و ساختاری شان به آسانی با سیستم عمومی نامگذاری آنزیم ها قابل طبقه بندی نیستند. در سال ۱۹۹۴، پروتئازها را بر پایه ی سه معیار اصلی زیر طبقه بندی کردند:

۱- نوع واکنشی که کاتالیز می کنند.

۲- طبیعت شیمیایی جایگاه کاتالیتیکی.

۳- روابط تکاملی با رجوع به ساختارشان.

به عبارتی همه پپتیدازها واکنش یکسانی کاتالیز می کنند، در واقع پیوند پپتیدی را هیدرولیز می کنند. اما آنها در انتخاب جایگاه پیوند پپتیدی در سوبسترا به صورت اختصاصی عمل می کنند؛ که از این لحاظ به دو گروه اصلی طبقه بندی می شوند: اگزوپپتیدازها و اندوپپتیدازها.

اگزوپپتیدازها پیوند پپتیدی را در نزدیکی انتهای آمینو یا کربوکسی سوبسترا می شکنند، در حالی که اندوپپتیدازها در فاصله ای دور از انتهاهای سوبسترا عمل می کنند (Hartley et al., 1960).

بر پایه ی توالی آمینواسیدی‌شان نیز پروتئازها را به خانواده های مختلف و قبیله هایی طبقه بندی می کنند تا بتوانند پپتیدازهایی را که از یک جدّ مشترک منشأ گرفته اند؛ در یک گروه قرار دهند. برای تسهیل در رجوع سریع و غیر مبهم به یک خانواده ی ویژه از پروتئازها، در سال ۱۹۹۳، Rawlings و Barrettهر خانواده از پپتیدازها را با یک کد نشانه گذاری کردند که بر نوع کاتالیز، یعنی S، C، A، M یا U برای سرین، سیستئین، آسپارتیک، متالو یا نوع نامشخص به ترتیب دلالت دارد (Rawlings and Barret, 1993).

۱-۲-۱-۱- اگزو پپتیدازها

اگزو پپتیداز ها به یک گروه آزاد آمین در انتهای N، یا گروه آزاد کربوکسیل در انتهای C نیازمند هستند. این دسته از پروتئازها تنها نزدیک انتهای زنجیره های پلی پپتیدی عمل می کنند و حداکثر سه باقی مانده آمینواسیدی را با هیدرولیز یک پیوند پپتیدی از انتها جدا می کنند و بر پایه ی جایگاه عملشان در انتهای N یا C، به عنوان آمینوو کربوکسی پپتیدازها به ترتیب طبقه بندی می شوند.

۱-۲-۱-۱-۱- آمینوپپتیدازها

در انتهای N آزاد زنجیره ی پلی پپتیدی عمل کرده و یک آمینواسید منفرد، یک دی پپتید، یا یک تری پپتید آزاد می کند. این گروه از اگزو پپتیدازها مسئول برداشتن متیونین انتهای N شناخته شده اند که در پروتئین های بیان شده ی هترولوگ بر خلاف بسیاری از پروتئین های بالغ طبیعی، دیده می شوند. آمینو پپتیدازها در یک گستره ی وسیعی از گونه های میکروبی شامل باکتری ها و قارچ ها یافت می شوند. عموماً این دسته از آنزیم های اگزوپپتیدازی، آنزیم های داخل سلولی اند، اما یک گزارش در مورد آمینو پپتیداز خارج سلولی تولید شده توسط *A. oryzae* در سال ۱۹۷۴ وجود دارد(Labbe et al.,1974).

۱-۲-۱-۱-۲-کربوکسی پپتیدازها

در انتهاهای C زنجیره ی پلی پپتیدی عمل کرده و یک آمینواسید تنها یا یک دی پپتید آزاد می کنند. کربوکسی پپتیدازها را می توان به سه گروه اصلی تقسیم بندی کرد:

۱) سرین کربوکسی پپتیدازها، ۲) متالو کربوکسی پپتیدازها و ۳) سیستئین کربوکسی پپتیدازها.

۱-۲-۱-۱-۳-امگا پپتیدازها

امگا پپتیداز ها یک نوع اگزوپپتیداز می باشد که تنها نزدیک انتهای زنجیره های پلی پپتیدی عمل می کنند، اما به گروه آزاد کربوکسیل و آمین انتهای C و N نیاز ندارد.

۱-۲-۱-۲- اندو پپتیدازها

این گروه از پروتئازها از طریق تمایلشان در شکستن پیوندهای پپتیدی در نواحی داخلی زنجیره ی پلی پپتیدی و دور از انتهاهای Cو N شناسایی می شوند. وجود گروه آمینو و کربوکسی آزاد، اثر منفی بر فعالیت آنزیم دارد. اندو پپتیدازها به پنج زیر گروه بر پایه ی مکانیسم کاتالیتیکی شان تقسیم می شوند:

۱ -سرین پروتئازها

۲ -آسپارتیک پروتئازها

۳ -سیستئین پروتئازها

۴ -متالوپروتئازها

۵ -گلوتامیک پروتئازها