گروه زیست شناسی

عنوان:

بررسی مولکولی و بهینه سازی تولید آنزیم آلکالین پروتئاز در ایزولههای باسیلوس

استاد راهنما:

دکتر صابر زهری

استاد مشاور:

دکتر اسدالله اسدی

توسط:

حمیدرضا رجبلو

دانشگاه محقق اردبیلی

زمستان ۱۳۸۹

نام خانوادگی دانشجو : رجبلو نام: حمیدرضا
عنوان پایان نامه: بررسی مولکولی و بهینه سازی تولید آنزیم آلکالین پروتئاز در ایزولههای باسیلوس
اساتید راهنما: دکتر صابر زهری استاد مشاور : دکتر اسدالله اسدی
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد رشته: زیست شناسی گرایش: سلولی و مولکولی دانشگاه: محقق اردبیلی دانشکده: علوم تاریخ فارغ التحصیلی: ۸۹/۱۲/۲۱ تعداد صفحه : ۱۲۶
کلید واژه ها: پروتئاز، باسیلوس، بهینهسازی

چکیده : پروتئازها یکی از مهمترین آنزیمهای صنعتی هستند. پروتئازها دارای کاربردهای زیادی در صنایع گوناگونی همچون صنایع غذایی، شویندهها، داروسازی، چرم و غیره میباشند. این آنزیمها معمولاً برای مصارف صنعتی بهوسیلهی باکتریهایی که متعلق به جنس باسیلوس هستند تولید میشوند. در این مطالعه، پروتئاز قلیایی تولید شده توسط سویهی RZ1 باسیلوس از چشمههای سبلان جداسازی شده بود. آنزیم در محدودهی pH از ۷ تا ۱۲ فعال بود و بهترین فعالیت را در pH برابر با ۹ داشت، اگرچه یک پیک کوچکی نیز در pH برابر با ۴ مشاهده شد که این حضور ۲ نوع پروتئاز را پیشنهاد میکرد. آنزیم در محدودهی دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجهی سانتیگراد فعال بود و در ۶۰ درجهی سانتیگراد بیشترین فعالیت را داشت. پروتئاز بطور ویژهای در حضور Zn^{+2}، Ba^{+2}، Cu^{+2} و Co^{+2} مهار شده درحالیکه بطور نسبی توسط Fe^{+2} و Na^{+2} مهار میشد. همچنین Mn^{+2}، Mg^{+2} و Ca^{+2} فعالیت آنزیم را تقویت میکردند . بررسی پروفایل پروتئینهای ترشحی در سطح SDS-PAGE نشانگر تعداد بسیار زیادی باند پروتئینی بود. بررسی اثر مهارکنندهها در غلظت ۵ میلیمولار نشان داد که EDTA قادر به مهارکردن پروتئاز بود درحالیکه PMSF مهار نسبیای داشت. این نتایج نشان داد که پروتئاز مورد مطالعه یک متالو آنزیم است. برخی برهم کنشها سبب کاهش فعالیت آن میشود که بهنظر میرسد یک ریشهی سرین در جایگاه فعالش دارد. K_m و فعالیت ویژهی آن بر روی کازئین محلول بهترتیب ۱/۶۲۵ mg/ml و ۱۱۴۴۳/۰۸۲ U/mg بود. این آنزیم دارای خصوصیات بیوشیمیایی خوبی همچون پایداری در دماها و pHهای بالا بود.

۱-مقدمه

۱-۱-آنزیمها

آنزیمها کاتالیستهای زیستی شناخته شدهای هستند که بسیاری از واکنشهای شیمیایی را انجام داده و در همهی سلولها وجود دارند و بصورت تجاری در شویندهها، صنایع غذایی، آزمونهای تشخیصی، صنایع شیمیایی و غیره بهکار میروند. تا به امروز بیش از ۳۰۰۰ نوع آنزیم مختلف بررسی شدهاند که اغلب آنها از ارگانیزمهای مزوفیلی جدا گردیدهاند. این آنزیمها اساساً در طیف باریکی از pH، دما و قدرت یونی عمل میکنند. بهعلاوه، کاربردهای تکنولوژیکی آنزیمها در مواجه با شرایط صنعتی سخت موجود سبب شده که آنزیمهای شناخته شده غیر قابل توصیه باشند. بنابراین جستجو برای یافتن منابع میکروبی جدید یک کار دائمی است. میکروارگانیزمهایی که از محیطهای خارجی و متنوع که دارای شرایط سخت (extremophiles) میباشند جدا میشوند مهمترین منابع برای آنزیمها هستند، زیرا خواص ویژهای را دارند که منجر به کاربردهای جدیدی از آنها میشود [1].

از مدتها قبل نقش آنزیمها در بیشتر فرآیندها شناخته شده است و استفاده از آنزیمها با تاریخ یونان قدیم مطابقت میکند. از زمانهای قدیم از آنزیمهای استخراجشده از میکروارگانیزمها در پختن نان، ساخت آبجو، تولید الکل و ساخت پنیر استفاده میگردید. با بهبود و پیشرفت دانش و ارتقای خالصسازی آنزیمها، کاربردهای آنها نیز چندین برابر افزایش یافت و با دسترسی به آنزیمهای مهندسیشده، کاربرد آنها در صنعت افزایش چشمگیری پیدا کرد [2].

تولید و استفاده از آنزیمهای صنعتی در طول چند دههی گذشته بطور قابل توجهی افزایش یافته است. مقادیر تخمینی فعلی فروش سراسری آنزیمهای صنعتی حدود یک میلیون دلار است. در این بین، پروتئازها یکی از سه گروه بزرگ آنزیمهای صنعتی را تشکیل میدهند و سهمی در حدود ۶۰ تا ۶۵ درصد بازار آنزیمهای صنعتی جهانی را به خود اختصاص دادهاند که اغلب آنها پروتئازهای قلیایی هستند. احتمال میرود سهم پروتئازها در بازارهای صنعتی در سالهای آینده بیشتر نیز گردد [3و33].

۱-۲- پروتئازها

پروتئازها، یک ردهی منفردی از آنزیمهای پروتئولیتیک هستند که برش پیوندهای پپتیدی را در سایر پروتئینها کاتالیز میکنند [۳۵]. این آنزیمها بطور تقریبی چیزی درحدود ۲ درصد از ژنوم انسان و ۱ تا ۱/۵ درصد از ژنوم ارگانیزمهای بیماریزا را تشکیل میدهند [۳۸]. پیشرفت در تکنیکها نشان داده که پروتئازها میتوانند با تنظیم بیشتر فرآیندهای فیزیولوژیکی، تغییرات بسیار ویژه و انتخابیای را همچون فعالسازی شکلهای زیموژنیک آنزیمها توسط پروتئولیز محدود، انعقاد خونی و لیز لختههای فیبرینی و پردازش و انتقال پروتئینهای ترشحی از عرض غشا را هدایت کنند و بدینترتیب یک نقش تنظیمی اساسیای را در لقاح، تولد، گوارش، رشد، بلوغ، پیری وحتی مرگ همهی ارگانیزمها بازی کنند [۳و۳۸]. پروتئازهای میکروبی از مهمترین آنزیمهای هیدرولیتیک میباشند که بشدت درحال مطالعه و بررسی هستند که این امر منجر به پیشرفت قابل ملاحظهی آنها در آنزیمشناسی شده است. آنها از اجزای اصلی همهی شکلهای زندگی که شامل پروکاریوتها، قارچها گیاهان و حیوانات میباشد بر روی زمین هستند که قادرند به مقدار زیاد و در زمان نسبتاً کوتاهی با روشهای تخمیری شناخته شده کشت بشوند و منابع منظم و فراوانی از محصولات مطلوب را تولید کنند. پروتئازها دو نقش سینتیکی و پروتئولیتیکی را بازی می کنند و عملکرد آنها از سطح سلول تا ارگان و ارگانیزم میباشد. پروتئازها در فرآیندهایی از جمله التهاب، عفونت، لقاح، واکنش های آلرژیک، رشد و مرگ سلولی، تشکیل لخته خونی، رشد تومور، بازسازی مجدد استخوان، مهاجرت سلولی، آرایش بافتی، تکامل، چرخه پروتئین، اسپورزایی و رویش جوانه نقش دارند. پروتئازهای درون سلولی نقش مهمی در تنظیم متابولیسم بازی می کنند و پروتئازهای خارج سلولی هیدرولیز پروتئینهای بزرگ به مولکولهای کوچکتر را کاتالیز می کنند. در سالهای اخیر استفاده از پروتئازهای قلیایی بهعنوان یک کاتالیزور صنعتی افزایش فوقالعادهای پیدا کرده است.

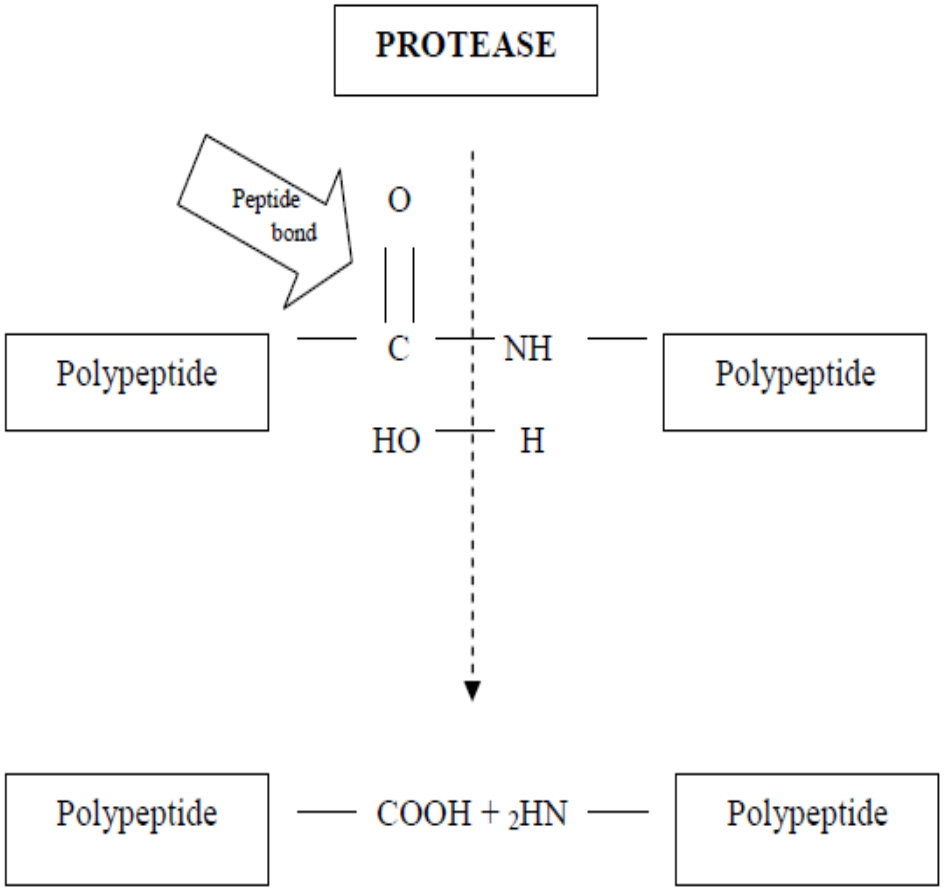
پروتئازهای قلیایی (EC.3.4.21-24,99) پروتئازهایی هستند که در pH خنثی تا pH قلیایی فعال بوده و به گروههای مختلف تقسیم میشوند که از بین آنها سرین پروتئازهای قلیایی مهمترین گروه از این آنزیمها هستند که تاکنون استخراج شدهاند [۴].

این آنزیمها، دارای مزایایی هستند که سبب میشود از اینها بهجای کاتالیزورهای شیمیایی مرسوم استفاده شود که از جمله این مزایا میتوان به موارد زیر اشاره کرد:

برای مثال آنها فعالیت کاتالیزوری بالایی نشان میدهند و یا اختصاصیت سوبسترای با درجهی بالایی دارند و همچنین میتوانند بهمقدار زیاد تولید شوند که این خصوصیات، آنها را از لحاظ اقتصادی پایدار و مقرون بهصرفه کرده است و سبب شده که پروتئازهای قلیایی میکروبی سهمی در حدود ۲/۳ از صنعت شویندگی را بهخود اختصاص دهند. اگرچه تولید آنزیم خصوصیت ذاتی همهی میکروارگانیزمها است اما این تنها میکروبها هستند که مقدار قابل توجهی پروتئاز خارج سلولی که بصورت تجاری استخراج می شوند را تولید میکنند. پروتئازهای قلیاییای که از سویههای باسیلوس منشأ میگیرند دارای قابلیتهای صنعتی قابل توجهی هستند که این بعلت کاربردهای وسیع و تنوع بیوشیمیایی آنها در صنایع غذایی و دباغی[1]، فرمولاسیونهای پزشکی، شویندهها و فرآوردههایی همچون حذف مواد زائد و باطله، بازیابی نقره، تجزیهی مخلوطهای آمینو اسیدی و غیره است [۵].

پروتئازها (EC.3.4.21-24,99 peptidyl-peptide hydrolases) آنزیمهایی هستند که پروتئینها را با اضافه کردن آب به باندهای پپتیدی هیدرولیز میکنند و سنتز پپتیدها را در حلالهای آلی و در حلال هایی با محتوای آبی کم کاتالیز میکنند [۲و۶]. همانطور که در شکل (۱-۱) نشان داده شده است هیدرولیز باندهای پپتیدی بهوسیلهی پروتئازها پروتئولیز نامیده میشود که محصول این فرآیند، قطعات پپتیدی و پروتئینی و اسیدهای آمینهی آزاد هستند.

1- tanery

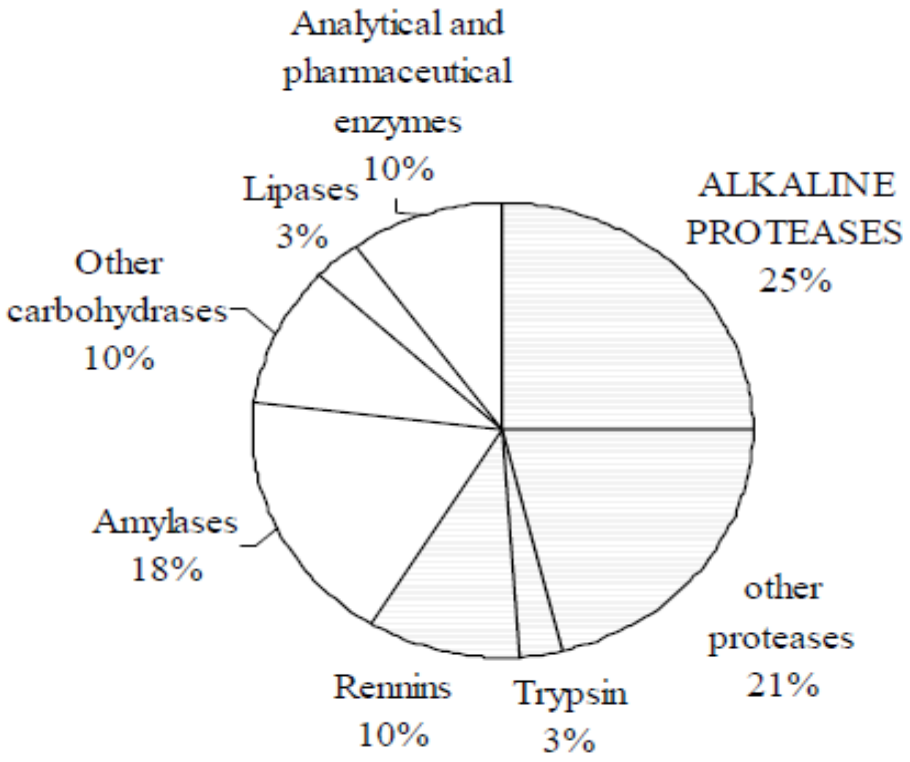


شکل(۱-۱) کاتالیز پیوندهای پپتیدی (پروتئولیز)

آنزیمهای پروتئولیتیک منحصربهفرد هستند و در همهی ارگانیزمهای زنده یافت میشوند و برای تمایز و رشد سلولی ضروریاند. بطورکلی امروزه علایق فراوانی در مطالعهی آنزیمهای پروتئولیتیک ایجاد شده و همچنین در جامعههای صنعتی توجه زیادی به این آنزیمها میشود که از دلایل آن میتوان به نقش مهم این آنزیمها در فرآیندهای متابولیک سلولی اشاره کرد [4]. پروتئازها مهمترین گروه از آنزیمهایی هستند که بطور تجاری تولید میشوند و در صنایع شویندگی، پروتئین، آبجو، گوشت، عکاسی، چرم ولبنی استفاده میشوند [7]. پروتئازها تاریخچهٔ طولانیای از عملکردها را در صنایع غذایی و لبنی دارند. کاربردشان در صنعت چرم برای موزدایی و کوبیدن [1] پوست روش نسبتاً جدیدی است که امروزه در حال

1- bating

استفاده است و این آنزیم را جایگزین مواد شیمیایی سمیای که بطور رایج در حال استفادهاند میکند [3].



شکل (۱-۲) توزیع آنزیمهای مختلف برای فروش جهانی. نقاط هاشور زده پروتئازها را نشان میدهد

پروتئازها در سال ۱۹۱۴ بهعنوان افزودنیهای شویندهها معرفی شدند و هماکنون نیز بطور وسیعی در صنایع شویندگی استفاده میشوند [4].

پروتئازهای مهم تجاری از منابع گیاهی و حیوانی و میکروبی تولید میشوند. آنها یک گروه پیچیده و خیلی بزرگی از آنزیمها را با خواص متفاوتی تشکیل میدهند که از آنجمله میتوان به اختصاصیت سوبسترا، جایگاه فعال و مکانیزم کاتالیزوری، وضعیت پایداری و فعالیت در دما و pH مربوطه و غیره اشاره کرد. پروتئازهای صنعتی دارای عملکردهایی با خواص کاتالیزوری و فیزیکی ویژه هستند که این

خصوصیات سبب شده که نسبت به انواع آنزیمهای پروتئولیتیک اختصاصی و منحصربهفرد دیگر برتری ویژهای داشته باشند [8]. این تنوع زیاد پروتئازها، در مقابل اختصاصیت عملکردشان توجه جهانیان را به کوشش برای استخراج کاربردهای بیوتکنولوژیکی و فیزیولوژیکی آنها جلب کرده است [3].

۱-۳- منابع پروتئازها

از آنجاییکه پروتئازها بطور فیزیولوژیکی برای ارگانیزمهای زنده ضروریاند، در نتیجه آنها منحصربه فرد هستند و در انواع وسیعی از منابع همچون گیاهان، حیوانات و میکروارگانیزمها یافت میشوند [۳]. خوشبختانه، آنزیمها این قابلیت را دارند که از سلولهای زنده جدا بشوند و عملکرد کاتالیزوری خودشان را در محیطی خارج از محیط فیزیولوژیکیشان اجرا کنند. پروتئازهای تجاری از بافتهای حیوانی، سلول های گیاهی و سلولهای میکروبی با تخمیر جدا میشوند.

۱-۳-۱- پروتئازهای گیاهی

استفاده از گیاهان بهعنوان منبع برای پروتئازها به فاکتورهایی همچون دسترسی به زمین برای کشت و مناسب بودن شرایط آب و هوایی برای رشد گیاه وابسته است. علاوه بر این، تولید پروتئاز از گیاهان یک فرآیند وقتگیر است. برمولائین [1]، پاپایین، کراتینازها و Ficin مثالهایی از چندین پروتئاز مشهور با منشأ گیاهی هستند [۳]. پاپایین و Ficin بهترتیب توسط استخراج آب از مواد خام ازCarica papaya و Ficus carcia فراهم میشوند. برمولائین معمولاً از ساقهٔ گیاه pine apple توسط استخراج و رسوبدهی حلال بدست میآید [۸]. برمولائین و پاپایین که از پروتئازهای مشتق شده از گیاهان هستند دارای تاریخچهی طولانی استفاده در صنایع غذایی هستند. پاپایین در صنعت برای تهیهی محصولات پروتئینی مطلوب و با حلالیت بالا استفاده میشود.

1- Bromelain

۱-۳-۲- پروتئازهای حیوانی

شناختهشدهترین پروتئازها با منشأ حیوانی عبارتند از تریپسین پانکراتیک، کیموتریپسین، پپسین و رنین که اینها به شکل خالص و در مقادیر بسیار زیاد تهیه میشوند. اما تولید این آنزیمها به عواملی همچون دسترسی به چارپایان اهلی برای کشتار وابسته است که این امر تحت کنترل و پیگیری مسئولین ادارهی کشاورزی و سیاستهای این ادارهها میباشد [۳].

تریپسین، مهمترین آنزیم هضمکنندهی روده است که مسئول هیدرولیز پروتئینهای غذایی میباشد [۳]. کیموتریپسین، در عصارهی پانکراسی حیوانات یافت میشود.کیموتریپسین خالص یک آنزیم گران قیمت است و تنها برای عملکردهای تشخیصی و تحلیلی استفاده میشود. پپسین یک پروتئاز اسیدی است که تقریباً در معدهی همهی مهرهداران یافت میشود [۳]. پپسین از قسمت انتهایی موی زبر شکم توسط استخراج و فیلتراسیون بدست میآید [۸]. این آنزیم در صنعت شویندگی در اوایل سال ۱۹۱۳ مورد استفاده قرار میگرفت اما امروزه در حال جایگزینی آن با مخلوطی از سرین پروتئازها و متالوپروتئازهای میکروبی هستند که بنظر میرسد که این آنزیمهای جایگزینشده کمتر تحت تأثیر شرایط قلیایی و دماهای بالا تجزیه میشوند و پایداری بهتری دارند [۹]. رنت یک پروتئاز شبهپپسین میباشد که بهشکل یک پیشساز غیرفعال در معدهی همهی پستانداران شیرخوار تولید میشود که آنزیم پپسین بر روی آن عمل کرده و رنت فعال را ایجاد میکند. رنت در صنعت لبنیات بشدت استفاده میشود و یک کشک مقاوم با طعم و مزهٔ خوب را ایجاد میکند [۳].

۱-۳-۳- پروتئازهای میکروبی

ناتوانی پروتئازهای حیوانی و گیاهی در پاسخگویی به خواستههای رایج جهانی منجر به افزایش توجه به پروتئازهای میکروبی شده است [۳]. پروتئازهای باکتریها، قارچها و ویروسها بطور فزایندهای در حال بررسی و مطالعه هستند که این بعلت اهمیت و کاربردهای متعاقب آنها در صنایع و بیوتکنولوژی است.

به لحاظ تجاری، پروتئازهای میکروبی بعلت سهولت نسبیشان در تولید در مقیاس وسیع ، دسترسی آسانتر به منابع تولید کننده و ... در مقایسه با همان پروتئازها با منشأ حیوانی و گیاهی مورد توجه

زیادی بوده است. پروتئازهای میکروبی تقریباً ۴۰ درصد از فروش آنزیمهای بازارهای جهانی را به خود اختصاص دادهاند. پروتئازهایی که از منابع میکروبی استخراج میشوند بعلت اینکه تقریباً همهی خصوصیات مطلوب را برای کاربردهای بیوتکنولوژیکیشان دارند بر پروتئازهایی که از منابع گیاهی و حیوانی استخراج میشوند ارجحیت دارند [۳]. میکروارگانیزمها منبع بسیار جالبی از پروتئازها هستند، زیرا میتوانند در مقادیر زیاد و در زمان نسبتاً کوتاه و با روشهای تخمیری شناخته شده تکثیر شده و مقادیر زیادی آنزیم تولید کنند و این تولید آنها در مقادیر بسیار زیاد و بطور منظم یک محصول مطلوب را ایجاد میکند. از سوی دیگر، پروتئازهای میکروبی را بهدلیل داشتن ژنهای کوچکتر میتوان بطور ژنتیکی دستکاری کرد تا آنزیمهایی با خصوصیات بهتر برای کاربردهای گوناگون تولید کرد [۴]. پروتئازهای میکروبی بخصوص آنهایی که از باسیلوس تولید میشوند بطور سنتی و مرسوم سهم غالبی از بازار فروش آنزیمهای صنعتی را در سراسر جهان به خود اختصاص دادهاند که بخش عمدهی آن در فرمولاسیون شویندهها بکار میرود [۲].

۱-۳-۳-۱- باکتریها

پروتئازهای تجاری که عموماً در محدودهی خنثی و قلیایی فعالیت دارند اساساً توسط جنس باسیلوس تولید میشوند که نوع خنثی در محدودهی باریک pH بین ۶ تا ۸ فعالیت دارند و بطور نسبی تحمل به دمای کمتری دارند و بعلت سرعت محدودشان در واکنشها، تلخی کمتری را در واکنش هیدرولیز پروتئینهای غذایی نسبت به پروتئینازهای حیوانی تولید میکنند و از اینرو برای استفاده در صنایع غذایی ارزشمندتر هستند. Neutrase، که یک پروتئاز خنثی است به مهارکنندههای پروتئینازی گیاهی غیرحساس است و بنابراین در صنعت آبجو مفید است. برخی از پروتئازهای خنثی به نوع متالوپروتئاز تعلق دارند و به یونهای فلزی دو ظرفیتی برای فعالیتشان نیازمندند درحالیکه برخی دیگر، سرین پروتئازهایی هستند که توسط معرفهای شلاتکننده تحت تأثیر قرار نمیگیرند.

پروتئازهای قلیایی باکتریایی توسط فعالیت زیادشان در محدودههای pH قلیایی همچون pH برابر با ۱۰ و اختصاصیت سوبسترای وسیعشان توصیف میشوند. دمای بهینهی آنها حدود ۶۰ درجهی سانتیگراد است که این خصوصیت، آنها را برای استفاده در صنعت شویندگی مناسب ساخته است.

۱-۳-۳-۲- قارچها

قارچها انواع وسیعتری از آنزیمها را نسبت به باکتریها ترشح و معرفی کردهاند. مثلاً آسپرژیلوس. اریزه ۴ انواع پروتئازهای اسیدی، خنثی و قلیایی را ترشح میکند. پروتئازهای قارچی در محدودهی وسیعی از تا ۱۱ فعالیت دارند و اختصاصیت سوبسترای وسیعتری دارند اما آنها سرعت واکنش کمتر و تحمل دمایی کمتری را نسبت به آنزیمهای باکتریایی دارند.

۱-۳-۳-۳- ویروسها

پروتئازهای ویروسی درگیر در پردازش پروتئینهای ویروسیای که در بیماریهای جنینی مشخصی همچون AIDS و سرطان نقش دارند اهمیت ویژهای دارند و همهی آنها اندوپپتیداز هستند [۳]. بنابراین، اگرچه پروتئازها در طبیعت بطور گستردهای پراکنش دارند اما منابع میکروبی بهترین منابع برای این آنزیمها هستند که دلیل آن هم رشد سریع آنها، فضای محدود مورد نیاز برای کشت و پرورش و سهولت دستکاریهای ژنتیکی برای تولید آنزیمهای جدید با خواص تغییریافتهای که آنها را برای کاربردهای گوناگون مطلوب سازد میباشد.

۱-۴- رده بندی پروتئازها

بر طبق نامگذاری کمیتهٔ واحد بینالمللی زیستشناسی سلولی و مولکولی، پروتئازها در زیرگروه ۴ از گروه۳ (هیدرولازها) طبقه بندی میشوند [۳]. همچنین پروتئازها میتوانند بر طبق سه معیار اصلی طبقه بندی شوند که عبارتند از:

i) نوع واکنشی که کاتالیز میکنند

ii) ماهیت شیمیایی جایگاه کاتالیتیک

iii) ارتباطات تکاملی که بهوسیلهی ساختار آنها آشکار میشود [۳۵].

پروتئازها در یک طبقهبندی وسیعتر و بزرگتر به ۲ گروه اگزوآنزیمها و اندوآنزیمها بر اساس جایگاهی از زیرواحدهای پروتئینی که بر روی آن عمل میکنند تقسیمبندی میشوند [۳].

آنها در یک دستهبندی جدیدتر به شش نوع تقسیم میشوند که شامل سرین، ترئونین، سیستئین، متالو، آسپارتات و گلوتامیک پروتئازها هستند که هر یک از اینها دارای فرآیندهای زیستی و عملکردی متفاوتی میباشد اما همهی این شش نوع پروتئاز یک نقش تنظیمی اصلیای را در عملکردهای اصلی زندگی همچون تنفس، پیری، رشد، بلوغ و هضم دارند.

پروتئازها همچنین بر اساس روابط تکاملیشان و توالیهای آمینواسیدیشان به دستهها و خانوادههای مختلفی تقسیمبندی میشوند و همچنین بر اساس اینکه در چه pHای فعالیت بهینه را دارند به انواع اسیدی، قلیایی و خنثی تقسیم میشوند [۳].

۱-۴-۱- تقسیم بندی بر اساس جایگاه عمل پروتئازها

۱-۴-۱-۱- اگزوپپتیدازها

اگزوپپتیدازها فقط در انتهای زنجیرههای پلیپپتیدی عمل میکنند و بر اساس جایگاه عملشان بر روی انتهای آمینی یا کربوکسیلی بهترتیب به دو گروه آمینوپپتیدازها و کربوکسیپپتیدازها تقسیمبندی میشوند [۳].

۱-۴-۱-۱-۱- آمینوپپتیدازها

آمینوپپتیدازها در انتهای آمینی آزاد زنجیرههای پلیپپتیدی عمل میکنند و یک ریشهی آمینو اسیدی منفرد یا یک دیپپتید و یا یک تریپپتید آزاد میکنند. آنها به برداشتن متیل انتهای آمینی که ممکن است در پروتئینهایی که بطور هترولوگوس بیان میشوند یافت شود مشهور هستند. آمینوپپتیدازها در انواع وسیعی از گونههای میکروبی همچون باکتریها و قارچها یافت میشوند. بطور کلی آمینوپپتیدازها آنزیمهای درون سلولی هستند اما گزارشهایی نیز وجود دارد که آمینوپپتیدازهایی را نشان میدهد که

بصورت خارج سلولی ترشح شدهاند که از آنجمله میتوان به آنزیمهایی که بهوسیلهی آسپرژیلوس اریزه تولید شده است اشاره کرد [۳].

جدول۱-۱- ردهبندی پروتئازها

protease	EC no.
Exopeptidases	3.4.11
Aminopeptidases	3.4.14
Dipeptidyl peptidase	3.4.14
Tripeptidyl peptidase	3.4.16-3.4.18
Carboxypeptidase	3.4.16
Serine type protease	3.4.17
Metalloprotease	3.4.18
Cysteine type protease	3.4.15
Peptidyl dipeptidase	3.4.13
Dipeptidases	3.4.19
Omega peptidases	3.4.19
Endopeptidases	3.4.21-3.4.34
Serine protease	3.4.21
Cysteine protease	3.4.22
Aspartic protease	3.4.23
Metallo protease	3.4.24
Threonine protease	3.4.25

Glutamic protease	3.4.21
Enopeptidases of unknown catalytic mechanism	3.4.99

۱-۴-۱-۱-۲- کربوکسیپپتیدازها

این آنزیمها بر روی انتهای کربوکسیلی زنجیرهٔ پلیپپتیدی عمل میکنند و یک آمینو اسید منفرد و یا یک دیپپتید را آزاد میکنند. کربوکسیپپتیدازها میتوانند به سه گروه اصلی که عبارتند از سرین کربوکسیپپتیدازها، متالو کربوکسیپپتیدازها و سیستئین کربوکسیپپتیدازها تقسیم شوند که این تقسیمبندی بر اساس ماهیت ریشهٔ آمینواسیدیای که در جایگاه فعال این آنزیمها حضور دارد میباشد [۳].

۱-۴-۱-۲- اندوپپتیدازها

اندوپپتیدازها بهخاطر اینکه بطور ترجیحی بر روی پیوند پپتیدی در زنجیرهی پلیپپتیدی و دور از انتهای کربوکسیلی و آمینی زنجیره عمل میکنند به این نام توصیف شدهاند. حضور گروه کربوکسیل و یا آمینوی آزاد، تأثیر منفی بر روی فعالیت آنزیم دارد. این گروه از آنزیمها به شش گروه بر اساس مکانیزم کاتالیزوریشان تقسیم میشوند که در جدول ۱-۱ آمده است [۳].

۱-۴-۱-۲-۱- سرین پروتئازها

تقریباً ۱/۳ از همهی پروتئازها بهعنوان سرین پروتئازها ردهبندی میشوند که این نامگذاری بعلت حضور ریشهی سرین هستهدوست در جایگاه فعالشان است [۳۷]. فراوانی این آنزیمها در بین ویروسها، باکتریها و یوکاریوتها بسیار بالا بوده و از این رو تصور میشود برای ارگانیزمها حیاتی باشند [۳]. سرین پروتئازها توسط مهار غیر قابل برگشتشان بهوسیلهی 3,4-dichloroisocoumarin(3,4-DCI)، 1-3 tosyl-l-lysine ،leucylamido(4-guanidine) butane(E64) carboxytrans 2,3-epoxypropyl-

phenyl methyl sulfonyl fluride، chloromethyl ketone(TLCK)، diisopropylfluorophosphate(DFP) شناخته میشوند. سرین پروتئازها بطور عمومی در pH قلیایی و خنثی فعال هستند و دارای pH بهینهای در محدودهی ۷ تا ۱۱ میباشند. آنها دارای سوبستراهای اختصاصی وسیعی هستند که از آنجمله میتوان به فعالیتهای آمیدازی، فیبرینولیتیکی، ژلاتینولیتیکی و استرئولیتیکی آنها اشاره کرد. سرین پروتئازها معمولاً یک واکنش دو مرحلهای را برای هیدرولیز دنبال میکنند که با تشکیل یک حدواسط آنزیم- پپتید بهوسیلهی یک پیوند کووالان و در نتیجهی از دست دادن یک قطعهی پپتیدی یا آمینو اسیدی همراه است که این ۲ مرحله شامل یک مرحلهی آسیلاسیون و بهدنبال آن یک فرآیند دآسیلاسیون است که بهوسیلهی یک حملهی نوکلئوفیلی توسط آب بر روی حدواسط اتفاق میافتد که منجر به هیرولیز پپتید میشود. میزان وزن مولکولیشان بین ۱۸ و ۳۵ کیلو دالتون است و نقطهی ایزوالکتریک آنها بطور عمومی در محدودهی pH برابر با ۴ و ۶ است. سرین آلکالین پروتئازهایی که در pHهای بسیار بالای قلیایی فعال هستند نشاندهندهی بزرگترین زیرگروه از سرین پروتئازها هستند [۳].

سرین آلکالین پروتئازها توسط باکتریها، کپکها، مخمرها و قارچها تولید میشوند. آنها پیوند پپتیدی دارای تیروزین، فنیلآلانین یا لوسین در سمت کربوکسیلی پیوند شکافته شده را هیدرولیز می کنند. pH بهینهی پروتئازهای قلیایی در حدود ۱۰ میباشد و نقطهی ایزوالکتریک آنها در pH برابر با ۹ است. وزن مولکولیشان در محدودهی بین ۱۵ تا ۳۰ کیلودالتون است. اگرچه سرین آلکالین پروتئازها به وسیلهی چندین باکتری همچون Streptomyces، Arthrobacter و سویههایی از flavobacterium تولید میشوند اما از بین آنها سوبتیلیزینها [۱] که بهوسیلهٔ سویههای باسیلوس تولید میشوند یکی از مشهورترینها هستند [۳].

سوبتیلیزینها با منشأ باسیلوس دومین خانوادهی بزرگ سرین پروتئازها هستند. دو نوع متفاوت از پروتئازهای قلیایی به نامهای سوبتیلیزین کارلزبرگ و سوبتیلیزین Novo یا همان bacterial protease Nagase (BPN̓)، شناسایی شدهاند. سوبتیلیزین کارلزبرگ که بهوسیلهی باسیلوس لیکنیفرمیس ترشح و تولید میشود در سال ۱۹۴۷ توسط Linderstorm، Lang و Ottesen در آزمایشگاه Carlsberg کشف شد

1- subtilisins

و امروزه بطور گستردهای در شویندهها بکار میرود . سوبتیلیزین Novo یا BPN' که اهمیت تجاری کمتری دارد بهوسیلهٔ باسیلوس آمیلولیکو فاسینس تولید میشود. هر دوی این سوبتیلیزینها دارای وزن مولکولی ۲۷/۵ کیلو دالتون هستند اما بهوسیلهی پنجاه و هشت آمینو اسید از یکدیگر متمایز میشوند. آنها دارای خواص مشابهی همچون دمای بهینهی برابر با ۶۰ درجهی سانتیگراد و pH بهینهی ۱۰ هستند [۳]. بعضی از این خواص در جدول ۱-۲ آورده شده است.

جدول ۱-۲- بعضی خواص سوبتیلیزین کارلزبرگ و سوبتیلیزین BPN'

خصوصیات	سوبتیلیزین کارلزبرگ	سوبتیلیزین BPN'
تعداد زنجیرههای پپتیدی	۱	۱
تعداد اسیدهای آمینه	۲۷۴	۲۷۵
تعداد اسیدهای آمینه مشابه	۲۱۷	۲۱۷
pI	۹/۴	۹/۱
وابستگی به کلسیم برای پایداری به دما و pH	کم	زیاد
pH بهینه	۱۰-۱۱	۱۰-۱۱
بیشترین فعالیت در pH=7 به ٪	۴۰-۷۰	۲۰
مهار کنندهها	DFP,[1]PMSF	DFP,PMSF

1- Phenyl methyl sulfonyl fluoride

۱-۴-۱-۲-۲- آسپارتیک پروتئازها

آسپارتیک اسید پروتئازها، که عموماً بهعنوان پروتئازهای اسیدی شناخته میشوند، اندوپپتیدازهایی هستند که برای فعالیت کاتالیزوریشان به ریشههای اسید آسپارتیک وابستهاند. یک مکانیزم کاتالیتیکی بازی عمومی برای هیدرولیز پروتئینها برای آسپارتیک پروتئازها ارائه شده است. پروتئازهای اسیدی در سه خانوادهی پپسین، رتروپپسین و آنزیمهایی از پارارترو ویروسها گروهبندی میشوند. بیشتر آسپارتیک پروتئازها بیشترین فعالیت را در pHهای کم نشان میدهند و نقطهٔ ایزو الکتریکی در محدودهی pH ۳ تا ۴/۵ دارند. وزن مولکولیشان در محدودهٔ ۳۰ تا ۴۵ کیلو دالتون است. آسپارتیک پروتئازها توسط پپستاتین[1] مهار میشوند [۳].

۱-۴-۱-۲-۳- سیستئین پروتئازها یا سیستئین/تیول پروتئازها

سیستئین پروتئازها هم در پروکاریوتها و هم در یوکاریوتها وجود دارند. بطور کلی، سیستئین پروتئازها تنها در حضور عناصر احیاء کنندهای همچون HCN[2] یا سیستئین فعال هستند. در مکانیزم کاتالیزوری سیستئین پپتیدازها، گروه تیول (ترکیب دارای SH-) یک ریشهی سیستئین منفرد، نقش اصلی را بازی میکند. این گروه تیولی مستعد برای اکسیداسیون است و میتواند با انواعی از معرفها، فلزات سنگین، یدو استات، N- اتیل مالئیمید [3] و ... واکنش دهد [۱۱]. مکانیزم عمل این دسته از پروتئازها به سرین پروتئازها شباهت دارد. اینها مشتقات اسیدی کربوکسیلیک را از طریق یک مسیر جایگزینی دوگانه هیدرولیز میکنند که تشکیل اسید-باز عمومی و هیدرولیز حدواسط آسیل-تیول را درگیر میکند [۳].

سیستئین پروتئازها بر اساس اختصاصیت زنجیرهی جانبیشان، در یک طبقهبندی وسیعتر به چهار گروه تقسیمبندی میشوند که عبارتند از: (i) شبه تریپسین، (ii) شبه پاپایین، (iii) گروه وابسته و اختصاصی برای گلوتامیک اسید که امروزه این گروه جدا شده و در دستهبندی جدیدی قرار گرفته است،

1- pepstatin 2- Hydrogen cyanide 3- N-ethyl-maleimide

(iv) و سایر موارد که در بین اینها پاپایین معروفترین و شناختهشدهترین سیستئین پروتئاز است. لازم به ذکر است که سیستئین پروتئازها دارای pH بهینهای در محدودهٔ خنثی هستند.

۱-۴-۱-۲-۴- متالو پروتئازها

متالو پروتئازها به این علت که برای فعالیتشان به یک یون فلزی دو ظرفیتی احتیاج دارند به این نام توصیف شدهاند. این گروه از آنزیمها متنوعترین نوع کاتالیتیکی پروتئازها هستند و حدود ۳۰ خانواده از آنها تابهحال شناخته شده است که میتوان به کلاژناز بدست آمده از موجودات عالیتر و ترمولیزین که از باکتریها بدست میآید اشاره کرد. بیشتر متالوپروتئازها آنزیمهایی هستند که دارای موتیف His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) بهعنوان نقطهی اتصال فلز میباشند که بهوسیلهی کریستالوگرافی اشعهی X مشخص شده است. متالوپروتئازها بر اساس ماهیت آمینواسیدی که به جایگاه متصل شونده به فلز میچسبد دستهبندی میشوند و همچنین بر اساس اختصاصیت عملکردشان میتوانند به چهار گروه تقسیمبندی شوند که عبارتند از: (i) خنثی، (ii) قلیایی، (iii) میگزوباکتر۱ و (iv) میگزوباکتر۲ که همه ی اینها توسط معرفهای شلات کنندهای همچون EDTA مهار میشوند درحالیکه توسط معرفهای سولفیدریلی یا DFP مهار نمیشوند. مکانیزم عمل آنها نیز به آسپارتیک و سرین پروتئازها شباهت دارد [۳].

۱-۴-۱-۲-۵- ترئونین پروتئازها

خانوادهای از پروتئازها هستند که یک ریشهی ترئونین در جایگاه فعالشان قرار دارد. این دسته از پروتئازها در تجزیهی زیرواحدهای پروتئازوم درگیر هستند. ترئونین پروتئازها دارای یک ناحیهی حفاظت شده در انتهای آمینی جایگاه فعالشان میباشند. پروتئینهای پیشساز که زیرواحدهای βی کاتالیتیک هستند وقتی فعال میشوند که انتهای آمینی برش پیدا کند. این حالت سبب میشود که ترئونین انتهای آمینی ایجاد شود. ترئونین پروتئازها توسط آمینهای اولیه فعال میشوند. مکانیزم آنها برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ شرح داده شد که بیان میدارد که برش پیوند پپتیدی، یک ریشهی آمینواسیدی (معمولاً

سرین، ترئونین و یا سیستئین) یا یک مولکول آب را پدید میآورد که یک نوکلئوفیل مناسبی برای حملهی نوکلئوفیلیک به گروه کربوکسیل پپتید هستند که خود این ریشهی آمینواسیدی که در اینجا ترئونین است معمولاً توسط ریشهی هیستیدین فعال میشود [۳].

۱-۴-۱-۲-۶- گلوتامیک پروتئازها

بر طبق آخرین ردهبندی در پایگاه اطلاعاتی MEROPS، این خانواده از پروتئازها بهعنوان ششمین نوع کاتالیتیک پپتیدازها شناخته شدهاند (خانوادهی G_1). این خانواده قبلاً بهعنوان خانوادهی A_4 از آسپارتیک اندوپپتیدازها شناخته میشدند ولی این آنزیمها با آنالیزهای اخیر ساختار مولکولی و مکانیزم کاتالیتیکی شان بهعنوان خانوادهی جدیدی از پروتئازها بهنام Equlisins (از ریشههای جایگاه فعال یعنی E (گلوتامیک اسید) و Q (گلوتامین) مشتق شده است) شناخته شدهاند که گلوتامیک موجود در جایگاه فعال، آب نوکلئوفیلیک را فعال میکند و گلوتامات، حدواسطهای چهارگانهی روی مسیر هیدرولیتیک را پایدار میکند. لازم به ذکر است بعلت اینکه این آنزیمها تابهحال فقط در قارچها یافت شدهاند تصور می شود این خانواده از آنزیمها تنها در قارچها وجود دارند [۴۲و۴۳].

۱-۴-۲- تقسیم بندی بر اساس محدودهی فعالیت pH پروتئازها

۱-۴-۲-۱- پروتئازهای خنثی

این دسته از آنزیمها در محدودهی pH برابر با ۷ و کمی به سمت قلیایی و یا کمی به سمت اسیدی فعال هستند. یکی از دلایل مهم مطالعهی پروتئازهای خنثی علاوهبر تولیدات و کاربردهای صنعتیشان در صنایعی همچون شویندهها، تندریزاسیون گوشت و ...، مسئلهی فهم آسانتر مکانیزمهای درگیر در پایداری گرمایی آنزیمها توسط این دسته از آنزیمها است. زیرا آلودگی کمتری طی این مطالعات ایجاد میکنند [۴۱]. پاپایین، برمولائین و فیسین برخی از پروتئازهای گیاهی هستند.

۱-۴-۲-۲- پروتئازهای اسیدی

پروتئازهای اسیدی (E.C.3.4.23)، اندوپپتیدازهایی هستند که دارای جرم مولکولیای در محدودهی ۳۰ تا ۴۵ کیلودالتون میباشند که برای فعالیت کاتالیتیکیشان به ریشههای اسید آسپارتیک وابستهاند و بیشترین فعالیت را در pHهای پایین نشان میدهند. آسپارتیک پروتئازهای میکروبی میتوانند در یک دستهبندی وسیعتر به دو دستهی آنزیمهای شبهپپسین و آنزیمهای شبهرنین تقسیمبندی شوند [۳۹]. این دسته از پروتئازها بیشتر در سلولهای حیوانی، کپکها و مخمرها یافت میشوند و بندرت در باکتری ها وجود دارند. بسیاری از آنزیمهای این دسته دارای اسیدآمینهی آسپارتات در جایگاه فعال هستند و اختصاصیت این آنزیمها بهوسیلهی حضور زنجیرههای جانبی آروماتیک در هر دو طرف پیوند برشیافته تعیین میشود. محتوای کربوهیدراتی این آنزیمها بر مقاومت گرمایی این کاتالیستهای زیستی تأکید میکند. اسید پروتئازهای شبهپپسین که از سویههای آسپرژیلوس و ریزوپوس مشتق میشوند مثالهایی از این دسته هستند [۳]. یکی از خصوصیات پروتئازهای اسیدی توانایی آنها به کوآگوله کردن پروتئینها است که این مسئله مدرکی برای نشاندادن کاربرد وسیع آنها در صنایع لبنی میباشد.

بهواسطهی این خصوصیت است که این پروتئازها جایگزین رنت (آنزیم استخراجی از گوساله) شدهاند و توسعهی صنایع تولید پنیر را تسهیل کردهاند [۱۰]. این پروتئازها در تندریزاسیون گوشت، در تولید غذاهای تخمیرشده و همچنین در ترکیبات تمیزکنندهی اسیدی کاربرد دارند [۴۰].

۱-۴-۲-۳- پروتئازهای قلیایی

پروتئازهای قلیایی (EC.3.4.21-24,99) بهعنوان آن دسته از پروتئازهایی که در محدودهی pH خنثی بهسمت قلیایی فعال هستند تعریف میشوند [۳۵]. آنها اکثراً دارای یک مرکز سرین(سرین پروتئازها) یا یک مرکز از نوع فلز(متالو پروتئازها)هستند و همچنین این دسته مهمترین گروه از آنزیمها هستند که بصورت تجارتی استخراج میشوند [۴]. این پروتئازها بیشتر در مقادیر pH حدود ۱۰ فعال هستند. آنها به DFP و یک مهارکنندهای که از سیبزمینی استخراج شده حساس هستند اما به TLCK و یا TPCK(tosyl-L- phenylalanine chloromethyl Ketone) حساس نیستند. آنها همچنین بطور اختصاصی بر روی ریشههای اسید آمینهی آبگریز یا آروماتیک در سمت کربوکسیل جایگاه شکاف عمل