بسم الله الرحمن الرحيم

١٤٣٤١٦

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

دانشگاه شهید بهشتی

بسمه تعالی

« صورتجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد»

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
تلفن: ۲۹۹۰۱

بازگشت به مجوز دفاع شماره ۲۰۰/۲۶۹۲/ د مورخ ۸۹/۶/۲۶جلسه هیأت داوران ارزیابی پایان نامه آقای سید محسن عباسی حسینی به شماره شناسنامه۴۸۲۰ صادره از مشهد متولد ۱۳۶۴ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی– میکروبیولوژی

با عنوان :

کلون سازی و بیان ژن رمز کننده پروتئاز قلیایی جدا شده از Bacillus cluseii در میزبان Bacillus subtilis

به راهنمائی:

۱- خانم دکتر فرشته افتخار
۲-آقای دکتر بیژن بمبیء

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۱۳۸۹/۶/۲۰ تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ۱۹/۱۷ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما: خانم دکتر فرشته افتخار

۲- استاد راهنما: آقای دکتر بیژن بمبیء

۳- استاد مشاور: آقای دکتر باقر یخچالی

۴- استاد داور : آقای دکتر غلامرضا احمدیان باغبادرانی

۵- استاد داورونماینده تحصیلات تکمیلی : آقای دکتر سید مسعود حسینی

وزارت علوم تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
IRANDOC

۱۴۹۳۱۶

۱۳۸۹/۱۰/۱۹

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

و تقدیم به

برادر و خواهران مهربانم

تشکر و قدردانی

با استعانت از خداوند متعال بدین وسیله مراتب قدر دانی خود را نسبت به تمامی تمامی سروران و عزیزانی که در انجام این پروژه مرا یاری نموده اند ابراز می دارم:

با سپاس فراوان از:
استاد عزیزم سرکار خانم دکتر فرشته افتخار که راهنمایی این پایان نامه را تقبل فرموده و در تمامی مراحل تحقیق از نظرات ارزشمند ایشان بهره فراوان بردم.

با سپاس فراوان لز:
اساتید ارجمند آقایان دکتر داریوش مینایی تهرانی، دکتر بیژن بمبئی و دکترغلامرضا احمدیان که همولره در حل مسائل و مشکلات پروژه همراه من بودند و دکتر باقر یخچالی که مشاوره بنده را بعهده داشتند.

با سپاس فراوان از:
اساتید ارجمند آقایان دکتر حسین ریاحی، دکتر مسعود حسینی و دکتر غلامحسین ابراهیمی پور که در دوره کارشناسی ارشد از محضر درس ایشان بهره فراوان بردم.

با تشکر صمیمانه از:
دوستان غزیزم آقایان: فراز صالحی، سینا هدایتی، محمد دولتخواه و منصور رستگار و همچنین سرکار خانم دکتر فرشته راعی، سرکار خانم الناز سیف و سرکار خانم عاطفه آذر پیرا، که در تمامی لحضات مشوق و حامی بنده بودند.

با سپاس فراوان از کارمندان محترم دانشکده علوم زیستی:
آقایان: مهندس فخاری، مهدویان، مهندس بهداد، حبیبی، کوهی و مرادی و همچنین سرکار خانم شبیبی

چکیده

امروزه پروتئازها نقش مهمی را در صنایع گوناگون از قبیل شوینده ها، صنایع غذایی، دارویی و چرم دارند، بطوریکه حدود ۶۰ درصد از فروش سالیانه آنزیم ها به این آنزیم اختصاص دارد. از پرکاربردترین مصارف آنها استفاده در مواد شوینده است که به علت شرایط قلیایی موجود در این مواد، نوع قلیایی آنزیم از اهمیت بیشتری برخوردار است. گونه های مختلف *Bacillus* از جمله *Bacillus clausii* قادر به تولید انواع پروتئاز های خارج سلولی هستند. اینگونه باکتری های محیطی به علت کند رشد بودن و احتیاج به شرایط خاص برای تولید آنزیم معمولا کمتر در مقیاس صنعتی بکار می رود. بنابراین بیشتر سعی می شود این آنزیم به شکل نوترکیب در صنایع تولید گردد. در میان سیستم های کارآمد بیان پروتئین های نوترکیب، سیستم بیان *E. coli* رایج ترین میزبان برای مهندسی ژنتیک می باشد. اما در دو دهه اخیر، بیان پروتئین های ترشحی نوترکیب توسط *Bacillus subtilis* بعلت فقدان غشای خارجی و ساده تر بودن تخلیص پروتئین نوترکیب توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است.

در این پژوهش ، ژن تولید کننده پروتئاز قلیایی (*aprE*) در سویه بومی *B. clausii* جدا شده از خاک، با استفاده از روش PCR بر اساس توالی موجود از آن در بانک اطلاعات ژنی NCBI در باکتری *E. coli* سویه DH5α کلون شد. سپس برای بیان مناسب، استفاده از وکتور بیانی pWB980 تحت کنترل پروموتر P43، در میزبان *Bacillus subtilis* سویه WB600، ژن پروتئاز کلون شد. بررسی و مقایسه میزان تولید پروتئاز بصورت کمی و کیفی بین سویه وحشی و میزبان نوترکیب نشان داد که تولید آنزیم بوسیله باکتری نوترکیب حدود ۳ برابر بیشتر از سویه وحشی بود. مقایسه باند های پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئینی (SDS-PAGE) بین سوپرناتانت کشت ۲۴ ساعته WB600 و WB600 حاوی pWB980-*aprE* نشان داد که جرم مولکولی آنزیم مورد نظر حدود 31KD بود. همچنین الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید حاوی سوبسترای ژلاتین (Zymogram) فعالیت پروتئازی باند پروتئینی را در نا حیه 31KD نشان داد. نهایتا برای اطمینان از حضور ژن پروتئاز قلیایی در میزبان نوترکیب، توالی آن تعیین و نشان داده شد که ژن کلون شده، ۹۸ درصد با ژن آلکالین سرین پروتئاز خارج سلولی تولید شده توسط *Bacillus clausii* سویه KSM-K16 شباهت دارد.

کلمات کلیدی: پروتئاز قلیایی، کلونینگ، بیان، پروتئین نوترکیب، *Bacillus clausii*، *B. subtilis*

فهرست مطالب

عناوین **صفحه**

فصل اول ٦

مقدمه ٦

مقدمه و تاریخچه ٧

١-١- منابع تولید کنندهٔ پروتئاز ٨

١-١-١- گیاهان ٨

١-١-٢- جانوران ٨

١-١-٣- میکروارگانیسمها ٩

١-١-٣-١- باکتریها ٩

١-١-٣-٢- قارچها ١٠

١-١-٣-٣- ویروسها ١٠

١-٢- دسته بندی پروتئازها ١١

١-٢-١- اگزوپپتیدازها ١١

١-٢-١-١- آمینو پپتیدازها ١١

١-٢-١-٢- کربوکسی پپتیدازها ١١

١-٢-٢- اندوپپتیدازها ١٢

١-٢-٢-١- سرین پروتئازها ١٢

١-٢-٢-٢- آسپارتیک پروتئازها ١٤

١-٢-٢-٣- سیستئین پروتئازها ١٤

١-٢-٢-٤- متالو پروتئازها ١٥

١-٣- مکانیسم عمل سرین پروتئازها ١٦

١-٤- ویژگیهای پروتئازهای قلیایی ١٦

١-٤-١- pH و دمای بهینه ١٦

١-٤-٢- جرم مولکولی ١٧

۱-۴-۳- احتیاج به یونهای فلزی ۱۷
۱-۴-۴- مهار کنندههای پروتئازها ۱۷
۱-۴-۵- محدود سوبسترا ۱۷
۱-۴-۶- عوامل پایدار کننده ۱۸
۱-۵- مهندسی ژنتیک پروتئازهای میکروبی ۱۸
۱-۵-۱- سیستم های بیان ۱۹
۱-۵-۱-۱- سیستم بیان *E. coli* ۱۹
۱-۵-۱-۲-سیستم بیان *Bacillus subtilis* ۲۰
۱-۶- ابزارهای مهندسی ژنتیک ۲۱
پلاسمید ها ۲۱
۱-۶-۱- ناقل های تک میزبانه ۲۲
۱-۶-۲- ناقل های دو میزبانه ۲۳
۱-۶-۳- آنزیم ها ۲٤
۱-۶-۴- نشانگرها ۲۵
۱-۷- وضعیت مستعد ۲۵
۱-۸- مکانیسم های انتقال پلاسمید ۲۵
۱-۸-۱- ترنسفورمیشن ۲٦
۱-۸-۲- ترنسداکشن ۲۷
۱-۸-۳- ایجاد پروتوپلاست ۲۸
۱-۸-۴- الکتروپوریشن یا الکتروترانسفورمیشن ۲۸
۱-۹- کلونینگ ۲۹
۱-۱۰- سیستم *Bacillus subtilis* ۳۱
هدف پژوهش ۳۲
فصل دوم ۳۳
مواد و روش ها ۳۳
تجهیزات آزمایشگاهی ۳٤
۲-۱- مواد شیمیایی ۳۵

۲-۲- آنتی بیوتیک ها ۳۵
۲-۳- باکتری ها ۳۵
۲-۴- پلاسمید ها ۳۶
۲-۵- محیط های کشت باکتری ۳۷
۲-۵-۱- محیط کشت مایع LB (Luria-Bertani) ۳۷
۲-۵-۲-محیط کشت LB حاوی 2% Skim milk ۳۷
۲-۵-۳- محیط تغییریافته Spizizen ۳۷
۲-۶- الیگونوکلئوتیدهای آغازگر(پرایمرها) ۳۸
۲-۷- کیت های آزمایشگاهی ۳۹
۲-۸- آنزیم ها ۳۹
۲-۹- نشانگرهای وزن مولکولی DNA و پروتئین: ۴۰
۲-۱۰- نگهداری و کشت نمونه ها ۴۰
۲-۱۱- استخراج DNA ژنومی *Bacillus clausii* ۴۱
۲-۱۱-۱- بافرهای استخراج DNA کروموزومی ۴۱
۲-۱۱-۲- آنزیم Rnase ۴۱
۲-۱۱-۳- متعادل کردن فنل یا تنظیم pH ۴۱
۲-۱۱-۴- مراحل استخراج DNA ژنومی *Bacillus clausii* ۴۲
۲-۱۲- تعیین غلظت و خلوص DNA ۴۳
۲-۱۳- تکثیر ژن آلکالین پروتئاز *aprE* ۴۳
۲-۱۳-۱- مخلوط واکنش PCR جهت جداسازی ژن *aprE* ۴۳
۲-۱۳-۲- برنامه PCR برای جداسازی ژن*aprE* ۴۵
۲-۱۴- الکتروفورز ژل آگارز: ۴۵
۲-۱۴-۱- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز برای الکتروفورز ژل آگاروز (الکتروفورز افقی) ۴۵
۲-۱۴-۱-۱- محلول TAE ۴۵
۲-۱۴-۱-۲- بافرلودینگ DNA ۴۶
۲-۱۴-۲- روش تهیه ژل آگارز ۴۶
۲-۱۴-۳- رنگ‌آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید: ۴۶

۲-۱۵- استخراج DNA پلاسمیدی *E. coli* با روش شکستن قلیایی ٤٧
۲-۱۶- استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت: ٤٩
۲-۱۷- هضم آنزیمی پلاسمید pBluescript II KS(+/-) توسط *Eco*RV ٥١
۲-۱۸- بازیافت قطعات DNA از روی ژل آگارز با استفاده از کیت ٥١
۲-۱۹- ساخت وکتور نوترکیب حاوی ژن *aprE* ٥٣
۲-۲۰- تهیه سلولهای مستعداز باکتری *E. coli* ٥٣
۲-۲۱- ترنسفورم کردن باکتریهای مستعد ٥٤
۲-۲۲- غربال‌کردن کلون‌های واجد پلاسمید نوترکیب ٥٥
۲-۲۲-۱- روش PCR ٥٦
۲-۲۲-۲- برش‌های آنزیمی ٥٧
۲-۲۲-۳- تعیین توالی نوکلئوتیدی ٥٧
۲-۲۳- استخراج DNA پلاسمیدی از *Bacillus* با روش لیز قلیایی ٥٧
۲-۲۴- هضم آنزیمی پلاسمید pWB980 و پلاسمید نوترکیب pBlue-*aprE* ٥٨
۲-۲۵- ترنسفورمیشن طبیعی *Bacillus subtilis* با استفاده از محیط تغییر یافته Spizizen ٥٨
۲-۲۶- غربالسازی برای کلنی های تولید کننده پروتئاز قلیایی ٥٩
۲-۲۷- تکنیک های بررسی تولید پروتئاز در کلون های نو ترکیب ٥٩
۲-۲۷-۱- بررسی کمی تولید پروتئاز ٦٠
۲-۲۷-۲- پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز در حضور (SDS-PAGE) ٦١
۲-۲۷-۲-۱- تهیه پروتئین آنزیمی برای الکتروفورز عمودی ٦١
۲-۲۷-۲-۲- محلولهای مورد نیاز برای پلی‌آکریلامید ژل الکتروفورز: ٦٢
۲-۲۷-۲-۳- روش تهیه ژل SDS-PAGE ٦٣
۲-۲۷-۲-۴- آماده‌سازی سیستم پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز: ٦٤
۲-۲۷-۲-۵- رنگ‌آمیزی ژل پلی آکریل آمید با کوماسی بلو ٦٦
۲-۲۷-۳- بررسی فعالیت آنزیمی داخل ژل حاوی سوبسترا ٦٧
فصل سوم ٦٨
نتایج ٦٨
۳-۱- استخراج DNA ژنومی از باکتری *Bacillus clausii* ٦٩

۳-۲- تکثیر ژن الکالین سرین پروتئاز خارج سلولی از ژنوم باکتری *Bacillus clausii* ۶۹
۳-۳-کلونینگ ژن آلکالین پروتئاز در پلاسمید pBluescript II KS(+/-) ۷۰
۳-۳-۱- هضم وکتور pBluescript II KS(+/-) توسط آنزیم *EcoR*V ۷۰
۳-۳-۲- ترنسفورم کردن سلولهای مستعد *E. coli* با محصول اتصال(Ligation) ۷۱
۳-۳-۳- جداسازی ژن *aprE* از پلاسمید نوترکیب pBlue-*aprE* ۷۳
۳-۴- بیان ژن آلکالین پروتئاز خارج سلولی *B. subtilis* ۷۵
۳-۴-۱- هضم وکتور بیانی pWB980 با دو آنزیم *Sal*I و *Hind*III ۷۵
۳- ۴-۲- نتایج ترنسفورمیشن طبیعی *Bacillus subtilis* با محصول Ligation ۷۶
۳-۴-۳- غربالسازی کلنی های تو لید کننده پروتئاز قلیایی ۷۷
۳-۴-۴- نتایج شناسایی و تائید حضور ژن *aprE* در وکتور نوترکیب pWB980-*aprE* ۷۸
۳-۵- تعیین توالی DNA ژن رمز کننده پروتئاز قلیایی ۸۰
۳-۶- بررسی و مقایسه میزان کمی تولید پروتئاز در سویه وحشی و نوترکیب ۸۰
۳-۷- بررسی جرم مولکولی و فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی توسط روش SDS-PAGE و Zymogram ۸۱

فصل اول

مقدمه

مقدمه و تاریخچه

از زمان شناسایی آنزیم ها، پروتئاز ها در میان سایر آنزیم های هیدرولیک نه تنها به دلیل اهمیت در فرآیند های متابولیک سلولی، بلکه نقش آشکارشان در صنایع گوناگون بیشترین اهمیت را داشته اند. در از سال ۱۹۱۳ پروتئاز بدست آمده از پانکرآس به عنوان افزودنی به پودر های شوینده وارد بازار تجاری شدند. اما به دلیل میزان کم تولید پروتئاز پانکرآسی مقرون به صرفه نبود. در سال۱۹۴۷ اولیل پروتئاز میکروبی بدست آمده از ***Bacillus licheniformis*** بنام سابتیلیزین کارلسبرگ[1] به عنوان افزودنی وارد بازار تجاری شدند و به دلیل توانایی تولید انبوه و ویژگی های مناسب، پروتئازهای میکروبی بیشترین کاربرد را در صنعت داشته اند.

میکرواورگانیسم ها مقدار بسیار زیادی پروتئاز ها را به اشکال داخل و خارج سلولی تولید می نمایند. پروتئاز های داخل سلولی در بسیاری از فرآیندهای متابولیک سلولی از جمله اسپور سازی، تمایز، بقای پروتئین های سلولی و بلوغ آنزیمی و هورمونی نقش دارند. پروتئازهای خارج سلولی نیز با هیدرولیز نمودن پروتئین های موجود در محیط کشت میکروارگانیسم ها باعث تامین پپتیدها و اسیدهای آمینه های ضروری برای رشد میکروارگانیسم ها می شوند (۹).

از لحاظ کاربرد در صنعت نیز پروتئازهای خارج سلولی میکروبی بیشترین استفاده را در صنایع گوناگون دارند. به طوریکه امروزه پروتئازهای میکروبی تقریبا ۴۰ درصد فروش سالیانه آنزیمی در صنایع گوناگون از قبیل شوینده ها، صنایع غذایی، دارویی، چرم، تولید پروتئین های هیدرولیز شده، صنایع فیلم و مدیریت بازیافت را به خود اختصاص داده اند. بررسی های اخیر در مورد میزان مصرف آنزیم های صنعتی نشان داده که سالانه ۱/۶ بیلیون دلار صرف خرید آنزیم ها می شود که ۷۵ درصد آنها نقش هیدرولیکی دارند و از آنجائیکه پروتئاز ها مهمترین آنزیم های هیدرولیک می باشند، ۶۰ درصد کل فروش آنزیمی را در سال به خود اختصاص می دهند (۲۴و ۳۰).

با توجه به مصارف پروتئاز قلیایی، نیاز کشور و وارداتی بودن آن تلاش در جهت تولید داخلی آن ضروری است. تحقیق حاضر در راستای این تلاش با هدف کلون سازی ژن پروتئاز قلیایی در *B. subtilis* و بیان پروتئاز قلیایی انجام شد.

[1] subtilisin Carlsberg

۱-۱- منابع تولید کنندهٔ پروتئاز

۱-۱-۱- گیاهان

گیاهان پروتئازهای متعددی با خواص فیزیکوشیمیایی متفاوت تولید می‌کنند. از میان پروتئازهایی که توسط گیاهان تولید می‌شوند و بیشترین اهمیت را دارند می‌توان به پروتئازهای پاپائین، بروملین و کراتیناز اشاره نمود. مشکل اصلی در تولید پروتئازهای گیاهی احتیاج به زمان طولانی در روند تولید می‌باشد که کاربرد آنها را محدود نموده است.

پاپائین: این پروتئاز گیاهی به محدودهٔ pH بین ۵ تا ۹ مقاوم است و در صنایع غذایی کاربردی وسیع برای تهیهٔ پروتئین هیدرولیز شده دارد.

بروملین: نوعی سیتئین پروتئاز می‌باشد که در محدودهٔ pH بین ۵ تا ۹ فعال می‌باشد و در دماهای پائین‌تر از ۷۰°C فعالیت دارد.

کرتیناز: پروتئاز گیاهی است که در نتیجه هضم آنزیمی پشم و مو اسیدآمینهٔ ضروری لیزین را تولید می کند و در سیستم هضم فاضلاب کاربرد دارد.

۱-۱-۲- جانوران

پروتئازهای تولید شده توسط سلولهای حیوانی کاربردهای وسیعی در صنعت دارند. از جمله مهمترین آنزیم‌های کاربردی در صنعت می‌توان به تریپسین، کیموتریپسین پپسین و رنین اشاره نمود.

تریپسین: نوعی سرین پروتئاز با وزن مولکولی ۳۳ کیلو دالتون می‌باشد که در کنترل بیولوژیک آفات حشرات، تولید هیدرولیزات پروتئینی و تهیهٔ محیط کشت میکروبی کاربرد دارد.

کیموتریپسین: آنزیمی با وزن مولکولی ۲۳ کیلو دالتون می‌باشد که در تشخیص پزشکی استفاده دارد.

پپسین: پروتئازی اسیدی از نوع آسپارتیل می‌باشد و وزن مولکولی ۳۴ کیلو دالتون دارد.

رنین: آنزیمی با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون می‌باشد که در صنایع لبنی برای تهیهٔ ماست و پنیر مورد استفاده قرار می‌گیرد(۵۰).

۱-۱-۳- میکروارگانیسم‌ها

میکروارکانیسم‌های تولید کننده پروتئاز شامل باکتریها قارچ‌ها، مخمر، آکتینومیست و ویروس‌ها می‌باشند. میکروارگانیسم‌های تولید کنندهٔ پروتئاز به دلایلی همچون قابلیت کشت در سطحی وسیع تولید آنزیم در مقیاس بالا و داشتن نیمه عمری بیشتر نسبت به سایر پروتئازها اهمیت خاص دارند. اغلب این آنزیم‌ها را می‌توان هفته‌ها بدون تغییر آشکار در فعالیت آنزیمی نگهداری نمود. در ضمن بر خلاف پروتئازهای حیوانی و گیاهی ترشح آنزیم به خارج سلول توسط میکروارکانیسم باعث سهولت روند مراحل عملیات جداسازی و خالص سازی آنزیم می‌شود. این آنزیم ها کاربرد مهمی در صنعت دارند. با وجود آنکه تعداد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها تولید کنندهٔ پروتئاز می‌باشند، تنها تعداد اندکی از آنها به دلیل غیر بیماریزا بودن به شکل تجاری کاربرد دارند که به آنها Generally Regarded as Safe می‌گویند (۳۳).

۱-۱-۳-۱- باکتریها

باکتریها از میان میکروارگانیسم‌های تولید کننده پروتئاز نقشی غالب در تولید پروتئاز دارند. اما با توجه به تعداد وسیع پروتئازهای میکروبی فقط تعداد اندکی از آنها که توسط میکروارگانیسم‌های غیربیماریزا و غیر سمی تولید می‌شوند در کاربرد صنعتی دارند در میان باکتریها نیز جنس *Bacillus* به عنوان منبع برجستهٔ تولید کنندهٔ پروتئاز شناخته شده است. اکثر گونه های *Bacillus* تولید کنندهٔ پروتئاز می‌باشند و پروتئازهای خنثی و قلیایی ایجاد می‌کنند. این آنزیم ها دارای محدودهٔ عملکردی سویسترایی و خصوصیات فیزیکو شیمیایی متنوعی هستند برخی از مهمترین آنها به قرار زیر می‌باشند(۸و۴۵و۴۸).

B. subtitis (Subtilisin) *B. subtilis natto* (subtilisin NAT)

B. lichenformis (subtilisin Carlsberg)

B. subtilis Var amy losachariticus (Subtilisin amy losachariticus)

علاوه بر باسیلوس برخی باکتریهای گرم منفی نیز تولید کنندهٔ پروتئازهای قلیایی می‌باشند که شامل:

Psudomonas maitophila, Psudomonas aeruginosa

Xanthomonas maitophila, Psudomonas s.p Strain B45

Vibrio metschnikovii, Vibrio alginolyticus

می‌باشند از سایر باکتریها نیز که پروتئازهای قلیایی تولید می‌نمایند می‌توان به باکتری مارپیچ گرم مثبت *Kurthia spiroforme* و باکتری *Psilotteredo healdi* اشاره نمود. از میان *Actinomycetes* نیز *Streptomyces* بهترین منبع تولید کنندهٔ پروتئاز می‌باشد (۲۶و۵۶).

۱-۱-۳-۲- قارچها

از دیگر منابع اصلی تولید کنندهٔ پروتئازها می‌توان قارچ ها را نام برد قارچها نسبت به باکتری‌ها، پروتئازهای متنوعی را تولید می‌کنند که در محدودهٔ pH وسیع ۴ تا ۱۱ فعال هستند. در ضمن نسبت به پروتئازهای باکتریها دامنهٔ هضم سوسبترایی وسیع دارند. با وجود تمامی مزیت‌های مذکور، پروتئازهای قارچی به دلیل فعالیت پایین آنزیم و عدم پایداری در برابر حرارت کمتر از پروتئازهای باکتریایی در صنعت استفاده می‌شوند در میان قارچهای تولید کنندهٔ پروتئاز *Aspergillus*ها بالاترین میزان پروتئاز را تولید می‌کنند و از لحاظ تجاری جائز اهمیت هستند. در صنایع غذایی به منظور لخته نمودن شیر و تخمیر پنیر از پروتئازهای قارچی به دلیل فعالیت بهینه در pH اسیدی بین ۴ تا ۴/۵ و پایداری و فعالیت در pH بین ۲/۵ تا۶ استفاده می‌شود.

مخمرهای متعددی نیز تولید کنندهٔ پروتئازهای قلیایی می‌باشند که از بین آنها مخمرهای *Candida sp.* تولید کنندگان غالب پروتئازهای قلیایی می‌باشند از سایر مخمرهای تولید کنندهٔ پروتئازهای قلیایی نیز می‌توان به *Yarrowia liporlytica, Aureo basidium pulluans* اشاره نمود (۳۶).

۱-۱-۳-۳- ویروسها

ویروسها پروتئازهای متعددی را برای پردازش پروتئین‌های کپسیدی و آنزیم‌های پلیمرازی تولید می‌نمایند. دانشمندان توانسته‌اند از پروتئازهای ویروسی علیه پروتئین‌های ویروسی ایجاد کننده بیماریهای مهلک همچون سرطان و AIDS استفاده نمایند. ویروس‌ها انواع پروتئازهای تولید شده بوسیله ویروسها شامل سرین پروتئازها، آسپارتیک پروتئازها و سیستئین را تولید می‌نمایند ولی تا به حال هیچ متالوپروتئازی در بین پروتئازهای ویروسی مشاهده نشده است. از طرف دیگر بررسی نشان داده است که تمامی پروتئازهایی که شامل ویروس‌ها رمز می‌شوند از نوع اندوپپتیداز می‌باشند مقالات فروانی نیز در رابطه با خالص سازی و بررسی خصوصیات آنزیمی پروتئازها و موتاسیون زایی روی ژنهای رمز کنندهٔ آنها دارد (۴۱).

۱-۲- دسته بندی پروتئازها

راههای گوناگونی برای طبقه‌بندی پروتئازها وجود دارد اما به طور کلی پروتئازها را براساس سه اصل اساسی زیر طبقه‌بندی می-کنند (۸و۲۳).

الف) نوع واکنشی که کاتالیز می‌نمایند ب) طبیعت شیمیایی جایگاه فعال آنزیم ج) ارتباطات تکاملی براساس ساختار آنزیم.

در مجموع پروتئازها با توجه به محل اثرشان به دو گروه اگزوپپتیداز و آندوپپتیداز دسته‌بندی می‌شوند و هر کدام از دو گروه نیز با توجه به جایگاه فعالشان به زیر گروههایی تقسیم می‌شوند.

۱-۲-۱- اگزوپپتیدازها

این گروه از پروتئازها در یکی از دومین های کربوکسیل یا آمینی پروتئین عمل می‌نمایند و بر همین اساس نیز به دو گروه آمینو پپتیداز و کربوکسی پپتیداز دسته‌بندی می‌شوند.

۱-۲-۱-۱- آمینو پپتیدازها

این دسته از پروتئازها اسیدهای آمینه را به شکل تک‌تک، دوتایی و یا سه تایی از انتهای آمینی پروتئین آزاد می‌سازند. آمینو پپتیدازها توسط گسترهٔ وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتریها و قارچها تولید می‌شوند. به طور کلی آمینوپپتیدازها آنزیم‌های داخل سلولی می‌باشد و در *Aspergillus oryzae* نوع خارج سلولی آن نیز گزارش شده است (۳۶). آمینوپپتیداز I باکتری *E. coli* با وزن مولکولی ۴۰ KD و محدوده pH عملکردی بین ۷/۵ تا ۱۰، برای فعالیت وابسته به یون Mg یا Mn است. فعالیت آنزیم آمینو پپتیداز باکتری *B. licheniformis* با وزن مولکولی ۳۴KD نیز در حضور کلسیم افزایش می‌یابد.

۱-۲-۱-۲- کربوکسی پپتیدازها

این دسته از پروتئازها اسیدهای آمینه را به صورت تک تک یا دوتایی از انتهای کربوکسیل پروتئین آزاد می‌نمایند و براساس جایگاه فعال آنزیمی به سه گروه سرین کربوکسی پپتیداز، متالوکربوکسی پپتیداز و سیستئین کربوکسی پپتیداز تقسیم می‌شوند.

آنزیم‌های سرین کربوکسی پپتیداز را از گونه‌های *Penicillium*، *Saccharomyce* و *Aspergillus* جداسازی نموده‌اند متالوکربوکسی پپتیدازها را نیز از گونه‌های *Saccharomyce* و *Pseudomonas* جداسازی و نشان داده‌اند که برای فعالیت به یون Zn یا Ca احتیاج دارند.

۱-۲-۲- اندوپپتیدازها

این دسته از پروتئازها در جایگاه‌های داخلی پلی پپتید عمل می‌نمایند و براساس اسیدآمینه موجود در جایگاه فعالشان به چهار دسته تقسیم می‌شوند.

۱-۲-۲-۱- سرین پروتئازها

این گروه از پروتئازها در تعداد کثیری از ارگانیسم‌ها از قبیل ویروس‌ها، باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها مشاهده شده است و جزء آنزیم-های حیاتی برای ارگانیسم می‌باشند. سرین پروتئاز به اشکال گوناگون اگزوپپتیداز، اندوپپتیداز و الیگوپپتیداز در ارگانیسم های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در این دسته از اندوپپتیدازها گروه سرین در جایگاه فعال آنزیمی قرار دارد و به طور کلی به چند گروه اصلی تقسیم می‌شوند که شامل کیموتریپس، سابتیلزین، کربوکسی پپتیداز C D-Ala-D-Ala(SC) پپتیداز A در *E. coli* (SE) و مهار کنندهٔ LexA (SF) می‌باشند (S=Subtilisin) در سه گروه اول یعنی SC,SB,SA توالی همسان سه تایی (Triad) شامل اسیدهای آمینهٔ سرین (نوکلئوفیل)، آسپارتیک اسید (الکتروفیل) و هیستیدین در جایگاه فعال قرار می‌گیرد (۵۵). نکته دیگر حائز اهمیت حضور مناطق کاملاً محافظت شدهٔ اسیدآمینه گلایسین (GLY) در کنار توالی همسان سه تایی می-باشد که تشکیل موتیف (GLY-Xaa-Ser-Yaa-Gly) را داده است. از دیگر خصوصیات سرین پروتئازها فعالیت و پایداریشان در pH قلیایی بالا است که باعث کاربرد وسیع آنها در صنایع شده است. سرین پروتئازها معمولاً در محدوده pH خنثی و قلیایی بین ۷ تا ۱۱ فعال است اگر چه حتی محدودهٔ pH بین ۱۰ تا۱۲/۵ نیز در مورد پروتئاز باکتری باسیلوس سویه YAB گزارش شده است (۵۴). سرین پروتئازها وزن مولکولی بین ۱۸ تا ۳۵ کیلو دالتون دارند (به استثنای سرین پروتئاز باکتری *B. subtilis* که وزن مولکولی آن ۹۰ کیلودالتون می‌باشد) و دارای نقطه ایزوالکتریک بین ۴ تا۶ می‌باشند. این دسته از پروتئازها توسط مهار کننده‌های DFP: Diisopropyl Fluoro, PMSF: Phenyl Methyl Sulfanyle Fluride phosphate و بوتان و ۳-۴ دی‌کلر ایزوکومارین به شکل برگشت پذیر مهار می‌شوند (۵۰و۵۴).

با توجه به تمامی خصوصیات مذکور سرین پروتئازها به پنج زیر گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند.

۱-۲-۲-۱-۱- پروتنازهای شبه کیمو تریپسین

پستانداران و *Streptomyces*ها تولیدکنندگان اصلی آنزیم پروتئاز شبه کیموتریپسینی می‌باشد. از جمله *Streptomyces* مولد این آنزیم *S. fradia*, *S. ertyheus*, *S. grises* را می‌توان نام برد. پروتئازهای شبه کیموتریپسین با آنزیم تریپسن الاستاز و ترومبین شباهت ساختاری دارند این دسته از آنزیم‌ها نسبت به اسیدهای آمینهٔ بازی به صورت اختصاص در pH= ۸ عمل می-

نمایند وزن مولکولی آنها معمولاً ۲۰ کیلو دالتون می‌باشد و نسبت به مهارکنندگان DFP و مهار کنندهٔ تریپسین لوبیای سویا وحساس می‌باشند (۴۷).

۱-۲-۲-۱-۲- پروتئازهای قلیایی

این دسته از سرین پروتئازها توسط انواع گوناگونی از باکتریها، قارچها، مخمرها و کپک‌ها به صورت خارج سلولی تولید می‌شوند و نقش آنها تجزیه مواد پروتئینی محیط غذایی خارج سلول می‌باشد (۴۳). سرین پروتئازهای قلیایی توسط سویه‌های مختلف آرتروباکتر، استرپتومیسس فلاوباکتر و برخی مخرها مانند *Saccharomyces cerevisiae* و قارچهای رشته‌ای *Aspergillus*، *Neurospora* و *Conidiobolus* تولید می‌شوند سرین پروتئازهای قلیایی نسبت به شاخه‌های جانبی اسیدآمینه‌های حلقوی و آب گریز همچون فنیل آلانین، تیروزین و لوسین به صورت اختصاصی عمل می‌نمایند. pH بهینهٔ فعالیت این دسته از پروتئازها ۱۰ و نقطه ایزوالکتریک حدود ۹ دارند. وزن مولکولی سرین پروتئازهای قلیایی بین ۱۵ تا ۳۰ کیلودالتون می‌باشد و نسبت به حضور مهارکنندگان PMSF,DFP و مهار کنندهٔ پروتئاز سیب‌زمینی حساس می‌باشند.

در میان تمامی میکروارگانیسم‌های تولید کنندهٔ سرین پروتئازهای قلیایی جنس *Bacillus* بالاترین تولید آنزیمی را دارند و بیشترین کاربرد تجاری پروتئازها مربوط به همین جنس می‌باشد به این جهت این دسته از سرین پروتئازهای قلیایی را در دسته‌ای جداگانه قرار داده و به آنها SUBTILISIN می‌گویند. دو نوع سابتیلیزین نسبت به سایر سابتیلیزین‌ها قدمت و کاربرد تجاری گسترده‌تری دارند که سابتلیزین کارلزبرگ، سابتیلیزین نوو[۲] و پروتئاز باکتریایی Nagase (BPN) می‌باشد. دو دانشمند به نامهای Lindderstrom , Ottesenlong در سال ۱۹۴۷ برای اولین بار در آزمایشگاه Carslberg سرین پروتئاز قلیایی را از باکتری *B. licheniformis* جدا نموده که بعدها آنرا سابتیلیزین کارلزبرگ نامیدند بیشترین کاربرد این پروتئاز در افزودنی شوینده‌ها می‌باشد و تولید سالانهٔ آن معادل ۵۰۰ تن است. سابتیلیزین نوو نیز توسط باکتری *B. licheniformis* تولید می‌شود ولی از لحاظ تجاری اهمیت کمتری دارد این آنزیم دارای خصوصیات مشترکی از قبیل وزن مولکولی ۲۷/۵ کیلو دالتون pH بهینهٔ ۱۰ دمای بهینهٔ ۶۰°C دامنه وسیع سوبسترایی و جایگاه کاتالیتیک با توالی سه‌گانه می‌باشد. تفاوت آن‌ها فقط در ۵۸ اسیدآمینه می‌باشد که باعث تفاوتهایی همچون عدم احتیاج به یون کلیسم برای فعالیت در سابتیلیزین کارلزبرگ نسیت به سابتیلزین نو وسیع الطیف بودن دامنهٔ سوبسترایی آنزیم سابتیلیزین کارلزبرگ شده است (۸و۲۲و۵۰).

---

[2] Novo

۱-۴-۲-۱-۳- پروتئازهای شبه سرین کربوکسی پپتیداز II گندم

در این دسته از پروتئازها ساختار چهارم پروتئین در هر خانواده کاملاً متفاوت می‌باشد و اکثراً در pH بین ۴/۵ تا۵/۵ فعال می‌باشند. Pka در این دسته پروتئازها به دلیل حضور مناطق کاتالیتیک هیستیدینی پایین می‌باشد (۳۸).

۱-۲-۲-۱-۴- پروتئازهای a-lytic میکسو باکتر

این دسته از آنزیم ها فعالیت باکتریولیتیک قوی بر علیه باکتریهای موجود در خاک دارند و توسط گونه‌های *Sporangium* ترشح می‌شوند. pH بهینه فعالیت در این گروه از آنزیم‌ها ۹ می‌باشد و در حضور DFP فعالیتشان مهار می‌شود (۴۲).

۱-۲-۲-۱-۵- پروتئاز استافیلوکوک‌ها

این دسته از پروتئازها توسط باکتری *S. aureus* تولید می‌شوند و دارای ورن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون است، محدودهٔ pH فعالیت آنها ۴ تا ۷/۸ می‌باشد و نسبت به مهار کنندهٔ DFP حساس هستند (۴۲).

۱-۲-۲-۲- آسپارتیک پروتئازها

این دسته از پروتئازها را به دلیل داشتن حاکثر فعالیت آنزیمی در pH بین ۳ تا۴ و نقطهٔ ایزوالکتریک ۳ تا۴/۵ پروتئازهای اسیدی نیز می‌نامند. این دسته از پروتئازها اسید های آمینه حلقوی و بزرگ را در هر دو سوی باند پپتیدی برش اختصاصی می‌دهند.

آسپارتیک پروتئازها به سه گروه اصلی پپسین رتروپپسین (A2) آنزیم‌های پاراتروویروس (A3) تقسیم می‌شوند. گروه‌های A1,A2 ارتباط نزدیکی با یکدیگر دارند در حالیکه با گروه A3 ارتباط آشکاری وجود ندارد (۵۰).

جایگاه فعال در آسپارتیک پروتئازها به شکل موتیف (ASP-Xaa-Gly) می‌باشد که به جای Xaa اسید های آمینه سرین و ترئونین می‌توانند جایگزین شوند. آسپارتیک پروتئاز در مقابل ترکیبات Diazoketone از قبیل DAN(Diaza acetyl D-norlevein mthylester حساس بوده و توسط Pepstatin مهار می‌شوند.

۱-۲-۲-۳- سیستئین پروتئازها

این دسته از پروتئازها در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها تولید می‌شوند و فعالیت پروتئولیتیک آنها به جایگاه دوگانه حاوی سیستئین و هیستیدین بستگی دارد. عامل اصلی تمایز در این دسته آنزیم‌ها ترتیب His-cys- his می‌باشد که باعث تفاوت در عملکرد آنها می‌شود. این دسته از پروتئازها فقط در حضور عوامل احیا کننده مانند HCN و یا سیستئین فعال هستند. سیستئین پروتئازها را

براساس محل اثر اختصاصی آنها بر روی زنجیره جانبی اسیدهای آمینه به گروههای شبه پاپائین، شبه تریپسین (محل اثر بر روی آرژنین) و گروهی که بر روی اسیدآمینه گلوتامیک اسید اثر دارند تقسیم می‌کنند.

اکثر سیستئین پروتئازها در pH خنثی بالاترین فعالیت را دارند البته استثناهایی نیز در سیستئین پروتئازهای لیزوزومی گزارش شده است که در pH اسیدی فعال هستند. این گروه از پروتئازها نسبت به عوامل سولفیدریل PCMB حساس می‌باشند ولی DFP و عوامل Chelate کنندهٔ فلزات اثری بر روی آنها ندارند (۴۷).

۱-۲-۲-۴- متالو پروتئازها

شاخص اصلی این گروه از پروتئازها احتیاج به یونهای فلزی با ظرفیت دوگانه برای عمل می‌باشد. این دسته از پروتئازها در گسترهٔ وسیعی از موجودات یافت می‌شوند به طوری که کلاژنازهای موجودات عالی، سموم هموراژ یک مارها و ترمبولیزین باکتریها در این گروه قرار می‌گیرند. پروتئازهای این گروه متشکل از ۳۰ خانواده می‌باشند که ۱۷ خانواده پپتیداز، ۱۲ خانواده اگزوپپتیداز و یک خانواده به نام M3 هر دو خاصیت را دارد متالو پروتئازها براساس فعالیت ویژه‌ای که دارند به چهار گروه دسته‌بندی می‌شوند (۳۳).

۱- متالوپروتئازهای خنثی که تمایل به اسیدهای آمینه آب گریز دارند.

۲- متالوپروتئازها که نسبت به دستهٔ وسیعی از اسیدهای آمینه اختصاصی می‌باشند.

۳- متالوپروتئازهای میکسوباکتر I که pH بهینهٔ فعالیت آنها ۹ و وزن مولکولی ۱۴ کیلو دالتون دارند این دسته از متالوپروتئازها به شکل اختصاصی بر روی پیوندهای اسیدهای آمینه کوچک عمل می‌نمایند و لیزکنندهٔ دیوارهٔ سلولی باکتریها می‌باشند (۳۳).

۴- متالوپروتئازهای میکسو باکتر II که نسبت به اسیدآمینهٔ لیزین به شکل اختصاصی عمل می‌نمایند ولی روی دیوارهٔ باکتری‌ها اثری ندارند. تمامی متالوپروتئازها به دلیل وابستگی به یونهای فلزی دو ظرفیتی در مقابل عوامل chelate کننده‌ای همچون EDTA مهار می‌شوند ولی عوامل سولفیدریل و مهارکننده DFP بر روی آنها اثری ندارد. از متالوپروتئازهای مهم می‌توان به ترمولیزین اشاره نمود که توسط باکتری تولید می‌شود. ترمولیزین پروتئینی تک زنجیره و بدون باند دی‌سولفیدی با وزن مولکولی ۳۴ کیلودالتون می‌باشد. آرایش فضایی آن به شکل دولوب می‌باشد که در چنگال این لوب‌ها اتم Zn قرار دارد که برای فعالیت آنزیم ضروری می‌باشد و اتم روی به اسیدآمینهٔ هیستیدین متصل می‌باشد این آنزیم در حضور چهار اتم کلسیم می‌تواند به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد پایدا باشد. pH بهینه فعالیت ترمولیزین نیز قلیایی می‌باشد. از سایر متالوپروتئازهای می‌توان به آنزیم‌های باکتریهای هوازی مثل *Achromobacter iophageus* و باکتریهای بی‌هوازی همچون کلستریدیوم