دانشگاه پیام نور

دانشکده کشاورزی

گروه علمی بیوتکنولوژی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوتکنولوژی

عنوان پایان نامه :

بهبود تولید پروتئاز قلیایی توسط تثبیت سلول‌های *باسیلوس کلوزی*

استاد راهنمای اول :خانم دکتر تابنده

استادراهنمای همکار: آقای دکتر بخشی

استاد مشاور :آقای دکتر یخچالی

نگارش: فاطمه سادات امجد زنجانی

اسفند 89

چکیده

پروتئازها آنزیم‌هایی هستند که هیدرولیز کلیه پروتئین‌ها را بر عهده دارند و از مهمترین و پرکاربردترین آنزیم‌ها به شمار می‌روند. هدف از این تحقیق تثبیت باکتری باسیلوس کلوزی EHY_L2 به منظور افزایش تولید پروتئاز قلیایی بود. بهینه سازی شرایط تثبیت با استفاده از نرم افزار آماری انجام شد. سپس تغلیظ و خالص سازی آنزیم جهت تعیین برخی ویژگی‌های آن صورت گرفت.

روش بهینه سازی پاسخ سطحی RSM با استفاده از روش CCD برای تعیین شرایط بهینه تولید پروتئاز و کاهش رها شدن سلول از دانه‌های کلسیم آلجینات صورت گرفت. در این روش سه فاکتور غلظت سدیم آلجینات، کلسیم کلراید و میزان تلقیح بهینه سازی شدند و میزان پروتئاز تولیدی و رها شدن سلول از دانه‌های آلجینات نیز مورد سنجش قرار گرفت. مدل ارائه شده دارای R^2 برابر 0/9965 و F-value برابر 1492/18 بود، لذا برای تعیین شرایط آزمایش در محدوده مورد نظر قابل استفاده می‌باشد. شرایط بهینه پیش‌گویی شده توسط نرم‌افزار شامل مقادیر 3٪ (w/v) و 3/44٪ (w/v) به ترتیب برای سدیم آلجینات و کلسیم کلراید بود و میزان بهینه تلقیح نیز برابر 15ml بود که در این شرایط میزان پروتئاز مورد انتظار 928U/ml و جذب نوری سلول‌های رها شده از آن در 600nm 2/13 بود. نتایج حاصل از آزمایش در شرایط بهینه مقادیر 956U/ml و 2/2 را برای پروتئاز و رها شدن سلول را به دست داد که به مقدار پیشگویی شده نزدیک بود. تثبیت بر روی حامل‌های اسفنج پلی‌یورتان و باگاس نیز صورت گرفت که بیشترین میزان تولید پروتئاز در آنها به ترتیب 420U/ml و 710U/ml به دست آمد و جذب نوری سلول‌های رها شده از آنها به ترتیب 3/4 و 3/1 بود. این نتایج نشان داد که آلجینات برای تولید آنزیم و حفظ سلول‌ها مناسب‌تر از سایر حامل‌های به‌کار رفته است. کشت‌های غیر مداوم تکراری با استفاده از سلول‌های تثبیت شده در حامل آلجینات در مقیاس فرمانتور 2 لیتری صورت گرفت. شرایط بهینه بدست آمده در برنامه RSM، جهت راه اندازی فرمانتور مورد استفاده قرار گرفت، سه بار کشت‌های غیر مداوم درون فرمانتور تکرار شدند و میزان پروتئاز بدست آمده و مقدار سلول‌های رها شده از دانه‌های آلجینات در تکرار اول 1400U/ml و 4 و در تکرار دوم 1250U/ml و 3/3 و در تکرار آخر نیز برابر 1110U/ml و 3 بود که مجموعاً در این سه تکرار 3760U/ml پروتئاز به‌دست آمد. سلول‌های تثبیت شده بر روی باگاس با سایز بزرگ نیز به فرمانتور منتقل شدند که بیشترین میزان تولید پروتئاز 1780U/ml و میزان سلول‌های رها شده برابر 12 بود.

تغلیظ آنزیم پروتئاز با استفاده از سولفات آمونیوم ٪70 و تخلیص آن با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE-52 صورت گرفت. پروتئاز قلیایی در مرحله شستشوی ستون توسط بافر خارج شد و به رزین‌های درون ستون متصل نگردید. درصد بازیافت آنزیم بعد از کروماتوگرافی نسبت به نمونه اولیه به ٪64 رسید و فاکتور تخلیص بعد از کروماتوگرافی 3/02 بود. همچنین فعالیت ویژه حاصل از تخلیص آنزیم برابر 935U/ml بود که میزان پروتئین آن 0/7mg و با فعالیت 655U/ml گزارش شد. با استفاده از ژل الکتروفورز جرم ملکولی آنزیم حدود 30 کیلودالتون تعیین شد. Km و V_{max} آنزیم پروتئاز خالص شده با استفاده از کازئین به عنوان سوبسترا تعیین شد و به ترتیب برابر 370µM و 360U/ml بود. همچنین اثر بازدارنده‌های PMSF و EDTA بر آن باعث کاهش فعالیت آن شد و K_i در حضور این بازدارنده‌ها به ترتیب 250 µM و 252 µM بود و همچنین میزان V_{max} این دو مهارکننده به ترتیب 64 U/ml و 92 U/ml به دست آمد. همچنین اثر بازدارنده‌ها بر آنزیم بر روی ژل زایموگرام باعث محو شدن باندهای مربوطه گردید که نشان دهنده وجود متالو و سرین پروتئازها در نمونه بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پروتئاز – باسیلوس کلوزی – خالص سازی – تثبیت سلولی - کلسیم آلجینات

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

فصل اول 1

مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده 1

1-1-مقدمه 2

1-2- پروتئازها 4

1-2-1- منابع پروتئاز 5

1-2-2- طبقه بندی پروتئازها 9

1-2-2-1- اگزوپپتیدازها 10

1-2-2-2- اندوپپتیدازها 12

1-2-3- عوامل مؤثر بر تولید پروتئازهای قلیایی 16

1-2-4- فرایندهای تخمیری جهت افزایش تولید پروتئاز 17

1-3- تثبیت 18

1-3-1- مزایای تثبیت 19

1-3-2- محدودیت های روش تثبیت 19

1-3-3- فنون تثبیت 20

1-3-3-1- به دام انداختن 23

1-3-3-2- اتصال کوالانتی 24

1-3-3-2-1- تکنیک های اتصال کووالانتی 25

1-3-3-3- اتصال عرضی 26

1-3-3-4- جذب سطحی 26
1-3-4- انواع بسترهای تثبیت 29
1-3-4-1- آلجینات 30
1-3-5- روش‌هایی دیگر در تثبیت سلولی 32
1-3-5-1- پوشش مجدد شبکه‌های حاصله با پلیمر دیگر 33
1-3-5-2- تثبیت مرکب 33
1-4- روش‌های طراحی آزمایشها با اهداف غربال‌گری و بهینه سازی 34
1-4-1- روش بهینه سازی سطح پاسخ 35
1-4-2- طراحی CCD 37
1-5- جداسازی و تخلیص پروتئین 38
1-5-1- جداسازی پروتئین‌ها 38
1-5-2- رسوب دهی و تغلیظ پروتئین‌ها 39
1-5-3- تخلیص پروتئین‌ها 39
1-5-4- کروماتوگرافی تعویض یون 41
1-6- کینتیک آنزیمی 42
1-6-1-معادله میکائیلیس منتون 42
1-6-2- معادله لینوربرگ 43
1-6-3- مهارکننده‌های آنزیمی 43
1-7- هدف 45
فصل دوم 46
مواد و روش‌ها 46

2-1- مواد 47
2-1-1- سویه باکتری مولد پروتئاز قلیایی 47
2-1-2-2- محیط کشت جامد LB agar 48
2-1-2-3- محیط های کشت مایع جهت بررسی میزان تولید پروتئاز 49
2-1-3- بهینه سازی فرآیند تثبیت با استفاده از روش بهینه سازی سطح پاسخ 53
2-1-4- محلول‌ها 55
2-1-4-1- محلول‌های مورد استفاده در سنجش کمی فعالیت پروتئاز 55
2-1-4-2- محلولها و بافرهای لازم جهت سنجش آنزیمی آمیلاز با استفاده از DNS 55
2-1-4-3- محلول آلجینات جهت تثبیت سلول‌ها 56
2-1-4-4- محلولها و بافرهای لازم جهت تهیه ورنگ آمیزی ژل SDS-PAGE 57
2-1-4-5- محلول‌های لازم جهت سنجش پروتئین 59
2-1-4-6- محلول استاندارد پروتئین(Bovine Serum Albumin (BSA 59
2-1-5- معرف اصلی روش بردفورد 59
2-1-6- بافرهای لاز مجهت ژل زایموگرام 60
2-1-7- بافرکروماتوگرافی 60
2-2- دستگاه ها 61
2-3- روش‌ها 62
2-3-1- کشت باکتری تولید کننده پروتئازقلیایی 62
2-3-2- ذخیره سازی طولانی مدت باکتریها 62
2-3-3- تثبیت سلول‌ها در حامل‌های متفاوت 62
2-3-3-1- تثبیت سلول‌ها درون دانه‌های ژل کلسیم آلجینات 62

2-3-3-2- تثبیت سلول‌ها در باگاس 63
2-3-3-3- تثبیت سلول‌ها درانواعی از فوم پلی یورتان 64
2-3-4- تولید پروتئاز توسط سلول‌های تثبیت شده در فرمانتور 64
2-3-4-1- کشت‌های غیر مداوم تکراری در فرمانتور 65
2-3-5- تولید همزمان دو آنزیم پروتئاز و آمیلاز توسط دو سویه باسیلوس کلوزی و باسیلوس سابتیلیس 65
2-3-6- تخلیص آنزیم 66
2-3-6-1- رسوب دهی پروتئین‌ها با استفاده از سولفات آمونیوم 66
2-3-6-2- دیالیز 66
2-3-6-3- کروماتوگرافی 67
2-3-6-3-1- پرکردن ستون 67
2-3-6-3-2- کروماتوگرافی تعویض آنیونی 67
2-3-7- تعیین کینتیک آنزیم پروتئاز 68
2-3-7-1- تعیین K_m و V_{max} آنزیم پروتئاز 68
2-3-7-2- تعیین اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم و سنجش K_i 68
2-3-8- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) 69
2-3-9- ژل زایموگرام 70
2-3-9-1- تأثیر مهارکننده‌ها بر ژل زایموگرام 71
2-3-10- نرم افزارآماری 71
2-3-11- سنجش کمی فعالیت پروتئاز 71
2-3-11-1- تهیه منحنی استاندارد تیروزین 72
2-3-12- روش اندازه گیری رشد باکتری 72

2-3-13- روش استفاده از معرف DNS جهت سنجش فعالیت آمیلازی 73
2-3-13-1- روش تهیه منحنی استاندارد 73
2-3-14- سنجش پروتئین 73
2-3-14-1- سنجش کمی پروتئین به روش بردفورد 74
فصل سوم 75
نتایج و بحث 75
3-1- رشد باکتری در محیط‌های کشت مایع جهت تولید پروتئاز 76
3-2- بهینه سازی شرایط تثبیت سلول‌ها در دانه‌های کلسیم آلجینات 79
3-2-1- تحلیل داده‌های مؤثر بر تولید پروتئاز 81
3-2-2- تحلیل داده‌های مؤثر بر نشت سلولی 90
3-2-3- شرایط بهینه تثبیت 95
3-3- بررسی تولید دو آنزیم پروتئاز وآمیلاز توسط دوسویه باسیلوس کلوزی و باسیلوس سوبتیلیس توسط 96
3-4- بررسی تثبیت سلول‌ها در باگاس 99
3-5- بررسی تثبیت سلول‌ها در حامل پلی یورتان (PUF) 100
3-6- تولید پروتئاز توسط سلول‌های تثبیت شده در فرمانتور 102
3-6-1- فرمانتور سلول‌های تثبیت شده در باگاس 102
3-6-2- کشت‌های غیرمداوم تکراری آلجینات در فرمانتور 103
3-7- تخلیص آنزیم 105
3-7-1- رسوب دهی با سولفات آمونیوم 105
3-7-2- خالص سازی پروتئاز با استفاده ازکروماتوگرافی تعویض یونی 105
3-8- بررسی میزان تخلیص آنزیم 107

3-9- نتایج SDS-PAGE مربوط به کروماتوگرافی 108
3-10- ژل زایموگرام 109
3-11- تعیین K_m و V_{max} آنزیم پروتئاز 110
3-12- اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت پروتئاز و تعیین نوع مهار 112
فصل چهارم 114
نتیجه گیری 114
4-1- نتیجه گیری و پیشنهادات 115
4-2- پیشنهادات 118
فهرست مراجع 119
ضمائم 129
منحنی استاندارد تیروزین 129
نتایج مربوط به منحنی استاندارد گلوکز: 130

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده

1-1-مقدمه

پروتئازها از مهمترین و پرکاربردترین آنزیم‌های موجود به شمار می روند. این آنزیم ها درون سلولی یا برون سلولی می‌باشند. پروتئازها باعث تبدیل پروتئین ها به پپتیدها و اسیدهای آمینه می‌شوند [Sookkeo, B. et al.,2000]. پروتئازها حدود 80٪ بازار جهانی آنزیم را به خود اختصاص داده اند [Godfrey, T. and West, S.,1996] و دارای ارزش تجاری می‌باشند و کاربردهای متفاوتی نیز در بخش‌های مختلف صنعت بویژه صنایعشوینده، صنایع دارویی و صنایع غذایی دارند [Gupta, R. et al. 2002, Adinarayana, K. et al.2002, Jonvesly, B. et al., 2001, Beg, Q. K. 2002].

میکروارگانیسم های بسیاری برای تولید پروتئاز قلیایی وجود دارند اما فقط تعداد کمی از آنها به عنوان تولید کننده از نظر تجاری مطرح هستند [Cachon, R. et al.1995]. برخی از سویه‌های باسیلوس به عنوان میکرو ارگانیسم های کاربردی از نظر تولید پروتئاز قلیایی در صنعت مطرح می‌باشند[Adinarayana, K. et al.2004].تثبیتیکی از روش‌های کاربردی برای بدست آوردن غلظت بالای مواد تولیدیاز سلول‌هایباکتری است. با تثبیت سلول‌های باکتری، میزان تولید فرآورده‌های آن نسبت به سلول‌های آزاد بالاتر می‌رود مانند آنزیم‌های خارج سلولی [Beshay, U. et al., 2004]. به‌علاوه امکان استفاده چندین باره ازسلول‌های تثبیت شده برای تولید انواعی از فرآورده‌های زیستی وجود دارد. سلول‌های تثبیت شده نسبت به سلول‌های آزاد مقاومت بالاتری دارند و از طرف دیگر کار با آنها راحت تر است [Ban, K. et al., 2002]. برای انجام تثبیت و تولید آنزیم از پایه هایی به عنوان حامل(carrier) برای تودهسلولی استفاده می شود[Junter, G.A.,2002]. حامل باید به گونه ای باشد که سلول به خوبی در آنجا رشد کند و خلل و فرج آن به حد کافی باشد تا آنزیم خارج سلولی به راحتی وارد محیط شود [Cachon, R. et al.1995]. حامل‌هاشامل دو دسته؛حامل‌های آلی و غیر آلی می‌باشند.

حامل‌های آلی شامل سه گروه؛ پلی ساکاریدها مانند آگار، آلجینات و کاراگینان، پروتئین ها مانند ژلاتین، آلبومین و کلاژن و حامل‌های مصنوعی مانند پلی آکریل آمید، پلی یورتان و پلی استر هستند.

از جمله حامل‌های غیر آلی سرامیک، شیشه و سیلیکارا می‌توان نام برد[Rehm, H.J. and Reed, G.E., 1981]

هدف از انجام این تحقیق تثبیت یک سویه باکتری بومی*باسیلوس کلوزی* به منظور افزایش تولید پروتئاز قلیایی بود. تثبیت باکتری بر روی چند حامل صورت گرفت. همچنین با استفاده از نرم افزار آماری شرایط تثبیت بهینه شد. در نهایت با خالص سازی آنزیم با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی برخی ویژگی‌های آنزیم مانند Km و V_{max} و اثر بازدارنده‌ها بر K_i مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تولید پروتئاز توسط سلول‌های تثبیت شده بر روی حامل در فرمانتور مورد بررسی قرار گرفت و کشت‌های غیر مداوم تکراری نیز درون فرمانتور انجام شد.

این تحقیق بخشی از طرح شماره 226پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری است که در گروه زیست فن‌آوری صنعت و محیط زیست انجام شده است.

1-2- پروتئازها

امروزه استفاده از آنزیم‌ها در صنعت بعنوان کاتالیزورهای طبیعی جهت تسریع و بهبود فرایندهای صنعتی بسیار مورد توجه می‌باشد و سهم عمده‌ای در مطالعات و تحقیقات بیوتکنولوژی را به خود اختصاص داده است[Aehle, W. and Misset, O., 1999] . مهمترین مزیت آنزیم‌ها در صنعت، مربوط به عملکرد اختصاصی آنها می‌باشد که منجر به کاهش ایجاد محصولات جانبی و مواد سمی و در نتیجه افزایش بازدهی تولید خواهد شد[صفری، اعظم، 1388] . تاریخچه تولید صنعتی آنزیم به زمانی مربوط می‌شود که TakamineDr.Jhokichi با استفاده از سبوس گندم و با کشت*آسپرژیلوس اوریزای*[1]بر روی آن در سال 1894تولید آنزیم‌های گوارشی را آغاز نمود. تولید آنزیم در صنعت بسیار متنوع بوده و طیف وسیعی از آنزیم‌ها را شامل می‌شود[Aiyer P.V.,2005].پروتئازها، آنزیم‌های هضمی[2] هستند که هیدرولیز کلیه پروتئین ها را بر عهده دارد. آنها یک رده مجزا از آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند که با توجه به کاربرد هایشان در هر دو زمینه فیزیولوژی وصنعت، جایگاه مهم و اساسی دارا می‌باشند.

پیشرفت‌هایی که در زمینه روش‌های تحلیلی صورت گرفته است، نشان می‌دهد که درون بدن موجودات زنده، پروتئازها تغییرات بسیار ویژه و انتخابی را بر روی پروتئین ها انجام می‌دهند که شامل فعال سازی اشکال زیموژنی آنزیم‌ها از طریق پروتئولیز محدود، لخته شدن خون و تجزیه شدن لخته‌های فیبرینی، آماده سازی و انتقال پروتئین های ترشحی از میان غشاءها می‌باشد. از طرف دیگر، میزان تخمینی فروش جهانی آنزیم‌های صنعتی بیش از 3 میلیارد دلار است که 75٪ آن، آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشند. پروتئازها یکی از 3 گروه عمده آنزیم‌های صنعتی بوده و حدود 60٪ کل فروش جهانی آنزیم را به خود اختصاص می‌دهند[Godfrey, T. and West, S.,1996].

پروتئازها اعمال بسیار گوناگونی را در سطح سلول انجام می‌دهند. آنها مسئول فرایندهای پیچیده‌ای در فیزیولوژی طبیعی و حتی در شرایط بیماری در سلول می‌باشند. نقش بسیار مهم این آنزیم‌ها در چرخه حیات موجودات بیماری زا منجر به استفاده از آنها به عنوان یک هدف در ساخت مواد دارویی شده است.

1Aspergillus oryzae
2Digestive Enzym

پروتئازها دارای تاریخچه طولانی در صنایع غذایی و شوینده‌ها نیز هستند. همچنین کاربردشان در صنایع چرم برای مو زدایی و جایگزینی مواد شیمیایی سمی از کاربرد های نسبتا جدید این آنزیم‌ها به حساب می آید. تنوع بالای پروتئازها و ویژگی های عملکردی آنها سبب شده است که جامعه علمی توجه ویژه‌ای برای تحقیق در مورد کاربردهای فیزیولوژیک و بیوتکنولوژیک آنها به خرج دهد [Polderman, B. 1990].

1-2-1- منابع پروتئاز

از آنجائی که پروتئازها برای حیات فیزیولوژیک ارگانیسم‌ها حیاتی هستند،به میزان فراوان و در انواع بسیار زیادی از منابع گیاهی، حیوانی و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شوند.

- پروتئازهای گیاهی

به دلیل عواملی چون در دسترس بودن زمین جهت کشت و هوای مساعد برای رشد گیاه، از گیاهان جهت تولید این آنزیم استفاده می‌شود، که البته بسیار زمانبر است. پاپائین[1]، بروملین[2]، کراتیناز[3] و فیسین[4] برخی از پروتئازهای معروف با منبع گیاهی می‌باشند.

1Papain
2Bromelain
3Keratinase
4Ficin

- پروتئازهای حیوانی

از معروفترین پروتئازهای حیوانی تریپسین پانکراسی[1]، کیمو تریپسین[2]، پپسین[3] و رنینز[4]میباشند که به صورت خالص و انبوه تهیه میشوند [Boyer, P. D., 1971, Hoffman, T., 1974].

- پروتئازهای میکروبی

ناتوانی پروتئازهای گیاهی و جانوری در تأمین مطالبات جهانی استفاده از آنزیم‌ها، باعث توجه ویژه به پروتئازهای میکروبی شده است. میکروارگانیسم‌ها یک منبع مناسب از آنزیم‌ها با تنوع زیاد در خصوصیات بیوشیمیایی و نیز قابلیت بهتر در دستکاری‌های ژنتیکی هستند. پروتئازهای میکروبی بخش قابل توجهی از کل فروش جهانی آنزیم را شامل می‌شوند.

از آنجا که پروتئازهای موجود در منابع میکروبی دارای بودن تمام خصوصیات مورد نیاز در کاربردهای بیوتکنولوژیک هستند این آنزیم‌ها به منابع گیاهی و جانوری ترجیح داده می‌شوند. همچنین به دلیل رشد سریع، فضای مورد نیاز محدود برای کشت و آسانی تولید آنزیم های جدید با خصوصیات تغییر یافته و مناسب برای کاربردهای متنوع، بسیار مورد توجه هستند. در میان پرتئازهای میکروبی که شامل انواع باکتریایی،قارچی و ویروسی می‌باشند، پروتئازهای باکتریایی از لحاظ صنعتی بیشتر مورد توجه هستند.

اغلب پروتئاز های صنعتی توسط باکتری‌هایی از جنس باسیلوس[5]تولید می‌شوند. پروتئازهای خنثی[6] باکتریایی در محدوده‌ای از pH بین 5 تا 8 فعال هستند و تحمل پذیری نسبتا کمیبه حرارت دارند. همچنین به دلیل سرعت متوسط واکنش، پروتئازهای خنثی نسبت به پروتئازها جانوری تولید تلخی

1Panceratic Trypsin
2Chimotrypsin
3Pepsin
4Renins
5*Bacillus*

6Neutral Proteases

کمتری در پروتئین های غذایی هیدرولیز شده می‌کنند و از این رو برای استفاده در صنایع غذایی نیز ارزشمند هستند [Rao, M. B. et al.,1998].

آنزیم Neutras، یک پروتئاز خنثی است که به مهار کننده‌های طبیعی گیاهی غیر حساس بوده در صنعت آبجو سازی بسیار مفید است. پروتئاز های خنثی باکتریایی تمایل بالایی در شکستن جفت‌های آمینواسیدی هیدروفوب داشته که از آن به عنوان فاکتوری جهت شناسایی پروتئازها استفاده می‌شود.همچنین پایداری دمایی پایین این آنزیم‌ها مزیتی در کنترل فعالیتشان طی تولید هیدرولیزهای غذایی با درجه کم هیدرولیز می‌باشد.برخی از این پروتئازهای خنثی در خانواده متالوپروتئازها قرار می‌گیرند وبرای فعالیتشان نیاز به یون های فلزی دو ظرفیتی دارند، در حالی که برخی دیگر سرین پروتئاز بوده و توسط عوامل کلات کننده‌ی[1] فلزات غیرفعال نمی‌شوند.

پروتئازهای قلیایی باکتریایی با فعالیت بهینه در pH قلیایی حدود 10 شناسایی می‌شوند و همچنین بر روی دامنه وسیعی از سوبستراها نیز موثر هستند[Ibrahim, A.S.S. et al. 2007]. دمای بهینه این گروه از پروتئازها در حدود 60 درجه سانتیگراد است، این نوع پروتئازها با وجود شرایط سخت و عوامل اکسید کننده در محیط می‌توانند پایدار باشند این خصوصیات پروتئازهای قلیایی باکتریایی، آنها را برای استفاده در صنایع شویندهمناسب کرده است[Chen, T.L. et al. 2006].

منبع اصلی پروتئازهای میکروبی، باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند:

- باکتری

با وجود منابع میکروبی زیاد برای تولید پروتئازها، فقط تعداد کمی از آنها به عنوان تولید کننده‌های تجاری شناخته شده‌اند[Gupta, R. et al. 2002]. اغلب پروتئازهای تجاری که عموما خنثی یا قلیایی هستند، توسط میکروارگانیسم‌های متعلق به جنس باسیلوستولید می شوند [فقیهی م. 1377]. در بین باکتری ها، گونه‌های باسیلوس، تولید کننده‌های اصلی پروتئازهای خارج سلولی هستند. بیشتر گونه‌های

1Chelating agents

باسیلوس ساپروفیت های بدون زیان و غیر سمی هستند که در محدوده pH 7 تا 11به آسانی و بدون نیاز به محیط های کشت گران با کارایی بالا رشد کرده و پروتئازهای قلیایی خارج سلولی تولید می‌کنند [Adinarayana, K. et al.2002].

پروتئازهای میکروبی را می‌توان با استفاده از سویه‌های میکروبی پر بازده و طی فرایندهای تخمیری کنترل شده و کشت میکروبی به صورت سطحی یا غوطه‌ور تولید نمود [Mao, W. et al. 1992].

پروتئازهای مقاوم به حرارات در جنس *باسیلوس*، مهمترین آنزیم‌های تجاری تولید شده در صنعت هستند که بیشترین کاربرد را در صنایع شوینده دارند [Beg, Q. K. 2002].

مطالعات کینتیکی و ارتباط بین تولید پروتئاز و اسپورزایی در *باسیلوس لاروا*[1]، *باسیلوس لیکنی فرمیس*[2]، *باسیلوس سابتیلیس*[3]، *باسیلوس سرئوس*[4] نشان داد که فعالیت پروتئولیتیکی سریعاً در پایان فاز رشد، افزایش می یابد. بیشترین فعالیت پروتئازی در طی اسپورزایی ناشی از ساخت[5] آنزیم پروتئاز است و به دلیل تاخیر در ترشح یا فعالیت آنزیم نیست [Joo, H. et al. 2004, Pnar çalik, p.et al. 2003, Uyar, F. et al. 2004].

ابتدا تصور می‌شد که فعالیت مشاهده شده تنها به علت یک آنزیم است، ولی بعداً مشخص شد که پروتئازهای متعددی ممکن است توسط باکتری‌های تولیدکننده اسپور تولید شوند. این مسئله در کلستریدیوم‌ها هم مورد تأیید قرار گرفت [Gupta, R. et al. 2002]. تولید پروتئازهای خارج سلولی با اسپورزایی مطابقت دارد [قائمی اسکوئی، 1384]. آنزیم‌های پروتئاز تولید شده از باسیلوس در آغاز اسپورزایی در پاسخ به کاهش مواد غذایی یا شرایط نامساعد محیطی به وجود می‌آیند [Carlk, P. et al. 1998]. پروتئازها اکثراً در پایان فاز لگاریتمی و در طی فاز سکون تولید می‌شوند.[Atalo, K. et al. 1993].

[1] B. larvae
[2] B. licheniformis
[3] B. subtilis
[4] B. cereus
[5] De Novo

- قارچ

قارچ ها دامنه وسیع تری از آنزیم‌ها را نسبت به باکتری‌ها تولید می‌کنند. برای مثال آسپرژیلوس سه نوع پروتئاز اسیدی و خنثی و قلیایی را تولید می‌کند. پروتئازهای با منبع قارچی، در دامنه وسیعی از pH (4-11) فعال هستند و با دامنه وسیعی از سوبستراها نیز فعالیت دارند. با این وجود آنها سرعت واکنش کمتر و نیز پایداری دمایی پایین‌تری نسبت به انواع باکتری‌ها دارند. این آنزیم‌ها را می‌توان به راحتی در یک تخمیر در فاز جامد تولید کرد. پروتئازهای قارچی اسیدی دارای pH اپتیمم 4-4/5 می‌باشند و در pH 6-2/5 پایدار هستند. پروتئازهای قارچیخنثی از نوع متالو پروتئازها می‌باشند که در pH 7 فعالند و با عوامل کلات کننده مهار می‌شوند. پروتئازهای قارچی خنثی در مورد هیدرولیز باندهای پپتیدی اسیدهای آمینه آبگریز نقش مکمل را برای انواع حیوانی، گیاهی و باکتریایی بازی می‌کنند.

بنابراین اگرچه منابع تولید پروتئازها در طبیعت زیاد می‌باشند، اما میکروب ها یک منبع ارجح جهت تولید این آنزیم محسوب می‌شوند که به دلیل سرعت رشد بسیار سریع، فضای محدود مورد نیاز جهت کشت و امکان آسان ایجاد تغییرات ژنتیکی در آنها برای تولید آنزیم‌هایی با خصوصیات جدید مورد نظر، جهت کاربردهای متفاوت مناسب می‌باشند.

1-2-2- طبقه بندی پروتئازها

برطبق نام گذاری اتحادیه بین المللی بیوشیمی و بیولوژی ملکولی پروتئازها در زیر گروه 4 از گروه 3 (هیدرولازها) طبقه بندی می‌شوند[Inoue, H. et al. 1991].

ولی پروتئازها همیشه طبق این نام گذاری دسته بندی نمی‌شوند، زیرا پروتئازها دارای تنوع بسیار زیادی در عملکرد و ساختار می‌باشد. در حال حاضر پروتئازها بر اساس سه معیار اصلی طبقه بندی می‌شوند:

1. نوع واکنش کاتالیز شده
2. طبیعت شیمیایی جایگاه فعال آنزیم
3. ارتباطات تکاملی با ارجاع به سوبسترا[Barett. A.J. 1994]

پروتئازها به طور عمده در دو گروه اصلی زیر طبقه بندی[1]می‌شوند. اگزوپپتیدازها[2] و اندوپپتیدازها[3] که وابسته به جایگاه عملکرد می‌باشند. اگزوپپتیدازها باند پپتیدی را در نزدیک انتهای آمینو یا کربوکسی سوبسترا می شکنند. همچنین بر اساس گروه های عملکردی که در جایگاه فعال در معرض واکنش قرار می‌گیرند، پروتئازها در چهار گروه اصلی طبقه بندی می‌شوند: سرین پروتئازها، آسپارتیک پروتئازها، سیستئین پروتئازها و متالو پروتئازها [Hartley, B.S. 1960]. تعداد کمی پروتئازهای متفرقه نیز وجود دارند که به طور دقیق جزو دسته بندی های استاندارد قرار نمی‌گیرند، مثلا پروتئازهای وابسته به ATP که برای فعالیت خود نیازمند به ATP هستند [Menon, A.S. et al. 1987].

بر اساس توالی‌های اسید آمینه‌ای، پروتئازها در خانواده‌های مختلفی طبقه بندی شده[Argos, P. 1987] و سپس آنها را به دسته‌های (کلون‌های) مختلفی تقسیم کرده‌اند تا پروتئین‌هایی را که از یک جد مشترک منشعب شده‌اند را در خانواده‌های یکسانی قرار دهند [Rawling, N.D. et al. 1993]. هر خانواده از پپتیدازها یک کد یا حرف مخصوص دارند که به نوع کاتالیز آنها بر می‌گردد که عبارت است ازS، C، A، M، U به ترتیب برای سرین، سیستئین، آسپارتیک، متالوپروتئاز و یک نوع ناشناخته استفاده می‌شود.

1-2-2-1- اگزوپپتیدازها

فقط در نزدیکی انتهای زنجیره پلی پپتیدی عمل می‌کنند و به دو زیر گروه آمینو پپتیداز[4] و کربوکسی‌پپتیداز[5] تقسیم می‌شوند.

1Subdivided
2Exopeptidase
3Endopeptidase
4Aminopeptidase
5Carboxypeptidase

- آمینو پپتیدازها

اگزوپپتیدازها فقط در انتهای زنجیره عمل می‌کنند و یک زیر واحد اسیدآمینه تنها یا دی پپتید یا تری پپتید را آزاد می‌کنند، عملکرد این گروه را بیشتر در حذف یک گروه Met از انتهای N ترمینال پروتئین دیده‌اند که ممکن است در پروتئین هایی که بطور هترولوگ[1] بیان شده‌اند، وجود داشته باشد، ولی در اکثر پروتئیین‌هایی که به طور طبیعی بالغ شده‌اند، دیده نمی‌شود. آمینو پپتیدازها در گروه وسیعی از سویه‌های[2] میکروبی شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها یافت می‌شوند. عموما آمینوپپتیدازها آنزیم‌های درون سلولی هستند، ولی یک آمینوپپتیدازخارج سلولی که توسط گونه *آسپرژیلوس اریزا*[3]ترشح می‌شود، گزارش شده است[Watson, R.R. 1976].

عملکرد اختصاصی نسبت به سوبسترا در آنزیم‌های با منشاء قارچی و باکتریایی، به طور شاخصی متفاوت است. آمینوپپتیداز I از*E.coli* پروتئازی بزرگ با وزن ملکولی 400 KDa است، که در pH وسیعی (10–7/5) فعال است و نیاز مند یون Mg^{2+} یا Mn^{2+} برای فعالیت بهینه خود می‌باشند[De Marco, A.C. et al. 1978]. آمینو پپتیداز مترشحه از *باسیلوس لیکنی فرمیس*وزن ملکولی 34کیلودالتون دارد. از طرف دیگر آمینوپپتیدازII*جئوباسیلوس استئاروترموفیلوس*[4] یک دایمر با وزن ملکولی 80 تا 100 کیلودالتونی می‌باشد و توسط یون‌هایZn^{2+}، Mn^{2+} یا Co^{2+} فعال می‌شود [Strausberg, S.L. et al. 1995].

- کربوکسی پپتیدازها

کربوکسی پپتیدازها در انتهایC ترمینال زنجیره پپتیدی عمل می‌کنند و یک یا دو اسید آمینه را آزاد می‌کنند. آنها را می‌توان بر اساساسیدآمینه های موجود در جایگاه فعالشان به سه گروه اصلی سرین کربوکسی پپتیداز، متالوکربوکسی پپتیداز و سیستئین کربوکسی پپتیداز تقسیم کرد.

1Heterologously expressed
2species
[3]*Aspergillus oryzae*
[4]*Geobacillus stearothermophilus*