بسم الله الرحمن الرحيم

خدایا از من بگیر هر آنچه مرا از تو می گیرد.

یادم باشد کسی هست که مرا می بیند، صدایم را می شنود و حسابم را دارد.

یادم باشد حرفی نزنم که به کسی بر بخورد،

نگاهی نکنم که دل کسی را بلرزاند،

خطی ننویسم که آزار دهد کسی را ،

راهی نروم که بی راهه باشد.

یادم باشد که همیشه آدم باشم.

امان از لحظه ی غفلت که تو ناظرم هستی.

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیوشیمی

عنوان:

کلونینگ، ترادف، بیان و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آلفا آمیلاز حاصل از باسیلوس KRA2

نگارش:

علی سلیمی

استاد راهنما :

دکتر خسرو خواجه

استاد مشاور :

دکتر سیروس قبادی

شهریور ۸۸

تقدیم به ساحت مقدس آقا امام زمان (عج)

تقدیم به دریای معرفت و بزرگی، پدرم.

تقدیم به شمع فروزان زندگی، مادرم.

تقدیم به همسر دلسوز و مهربانم.

و تقدیم به خانواده خوبم.

طاق محبتشان بر فراز خانه‌ام جاودانه باد...

با نهایت سپاس از درگاه پروردگاری که هرچه دارم از اوست، پروردگار پاک و منزهی که داناست و نعمت آموختن و یادگرفتن را به بندگانش ارزانی داشت. خدای بزرگ را سپاسگزارم که آرامشی به من عطا فرمود تا بتوانم در راه او گامی دیگر بردارم و توفیق اتمام مرحله علمی دیگری را داشته باشم.

بر خود لازم می‌دانم که از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر خسرو خواجه سپاسگزاری نمایم. درس های علمی و اخلاقی فراوانی از ایشان فرا گرفتم.

از جناب آقای دکتر سیروس قبادی، استاد مشاور محترم، کمال تشکر و سپاس را دارم. راهنمایی‌های دلسوزانه ایشان در دوره کارشناسی و کارشناسی ارشد راهگشای اینجانب بوده است.

از دیگر اساتید و دوستانی که هرکدام به نحوی طی انجام این تحقیق متحمل زحمت شده‌اند به ویژه سرکار خانم مرضیه قلاسی، آقایان محمد پاژنگ و ارسطو بدویی دلفارد، تشکر می‌نمایم.

در پایان از خانواده عزیزم که در تمام مراحل زندگی، مشوق و همراه واقعی اینجانب بوده اند و نیز از همسر بزرگوارم که با صبر و فداکاری خود و تحمل سختی های بسیار زیاد، موفقیت های پی در پی اینجانب را باعث شدند، بی نهایت سپاسگزارم.

چکیده

در مطالعات قبلی، آنزیمی به نام KRA2-آمیلاز مستقل از کلسیم، از سویه *Bacillus* sp. KRA2 جداسازی شد. توالی نوکلئوتیدی ژن آنزیم KRA2-آمیلاز و توالی اسید آمینه ای آن نشان داد که این آنزیم، به صورت پیش ساز آنزیمی سنتز می شود که دارای یک پپتید راهنما (۳۳ اسید آمینه) و یک پروپپتید ۱۱ اسید آمینه ای بعد از آن در قسمت N-ترمینال، آلفا آمیلازی بالغ در قسمت مرکزی (۴۲۲ اسید آمینه، ۴۸ kDa) و یک پروپپتید طویل در قسمت C– ترمینال (۱۹۳ اسید آمینه، kDa ۲۱) می باشد. براساس نتایج کریستالوگرافی که در مطالعه دیگر انجام شد، معلوم شد که آنزیم آمیلاز بدست آمده از منشأ باکتری KRA2، دو قطعه ابتدایی (۴۴ اسید آمینه) و قطعه انتهایی (۱۹۳ اسیدآمینه) ترادف اسید آمینه ای استنتاج شده از ترادف نوکلئوتیدی ژن کد کننده این آنزیم را ندارد. بنابراین فرض بر این شد که آنزیم فاقد هر دو ناحیه مذکور تحت عنوان آنزیم بالغ و آنزیم دارای ناحیه انتهای کربوکسیل و فاقد قطعه آمینو (۴۴ اسیدآمینه ابتدایی)، آنزیم نابالغ نامیده شود. جهت تعیین نقش قطعه C-ترمینال در عملکرد آنزیم، هر دو ژن کد کننده آنزیم بالغ و نابالغ، به طور جداگانه در ناقل بیانی pET28-a (+) و باکتری اشریشیاکولی BL-21، کلون و بیان شدند. پروتئین های نوترکیب، توسط ستون نیکل آگارز Ni-NTA، خالص سازی و خصوصیات بیوشیمیایی آن ها از قبیل پارامترهای سینتیکی، اثر یون کلسیم بر روی پایداری حرارتی آنزیم، اثر دما بر پایداری آنزیم، تعیین محصول نهایی عمل آنزیم با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، اثر pH و نیز مطالعات ساختاری CD و فلورسانس، بررسی شد. نتایج، pH بهینه و محصولات نهایی هیدرولیز نشاسته یکسانی را برای هردوی آنزیم های بالغ و نابالغ نشان داد، در حالیکه پارامترهای سینتیکی آنزیم های KRA2-آمیلاز با یکدیگر متفاوت بود. مقایسه پارامترهای سینتیکی نشان داد که آنزیم KRA2-آمیلاز نابالغ، دارای K_m کمتر و یا تمایل بیشتر برای هر دو سوبسترای نشاسته و سوبسترای کروموژن (EPS) است، در حالیکه بازده کاتالیتیکی هر دو شکل آنزیمی، مشابه است.

بعلاوه، فعالیت آنزیم KRA2 به وسیله EDTA مهار نشد، که نشان دهنده عدم وابستگی آنزیم KRA2-آمیلاز به یون کلسیم است. مطالعات ساختاری طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی در ناحیه دور UV، درصد صفحات β ی بیشتر، و نیز مطالعات پایداری حرارتی آنزیم های بالغ و نابالغ، T_m بیشتر برای آنزیم نابالغ را نشان داد. همچنین نشر ذاتی آنزیم های بالغ و نابالغ، آب گریزی آن ها در حضور ANS و نیز پایداری حرارتی آن ها با استفاده از فلورسانس اندازه گیری و با یکدیگر مقایسه شدند.

کلید واژه: آلفا آمیلاز، کلون کردن، خالص سازی، C–ترمینال، ترشح، تعیین خصوصیات بیوشیمیایی، پایداری، طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (CD) و فلورسانس.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱
۱-۱ آنزیم ها ۲
۱-۲ منابع آنزیمی ۲
۱-۲-۱ میکروارگانیسم ها به عنوان عمده ترین منابع آنزیمی ۲
۱-۲-۲ موقعیت تاکسونومیک تولید کننده های شناخته شده آنزیمی ۳
۱-۳ بازار جهانی آنزیم ۴
۱-۴ نشاسته ۴
۱-۴-۱ استفاده های صنعتی نشاسته ۵
۱-۴-۱-۱ تولید اتانول ۵
۱-۴-۱-۲ شیرین کننده ها و شربت ها ۶
۱-۴-۱-۳ اسید لاکتیک ۶
۱-۴-۱-۴ بیومس میکروبی ۶
۱-۵ آنزیم های تبدیل کننده نشاسته ۷
۱-۵-۱ اندوآمیلازها ۷
۱-۵-۲ اگزوآمیلازها ۷
۱-۵-۳ آنزیم های شاخه شکن ۸
۱-۵-۴ ترانسفرازها ۹
۱-۶ طبقه بندی آنزیم هایی که فعالیت آلفا آمیلازی نشان می دهند ۹
۱-۷ طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولاز ها؛ موقعیت آلفا آمیلاز ۱۱
۱-۸ رابطه آلفا آمیلازهای خانواده GH13 با GH57 ..... ۱۲
۱-۹ ساختار مولکولی آلفا آمیلازها ۱۲
۱-۹-۱ دمین های آلفا آمیلاز ۱۲
۱-۹-۲ جایگاه فعال آلفا آمیلازها ۱۴
۱-۹-۳ یون کلسیم ۱۴
۱-۱۰ توالی اسید آمینه ای و نواحی حفظ شده آلفا آمیلازها ۱۴
۱-۱۱ اهمیت فنون DNA نوترکیب ۱۵
۱-۱۱-۱ انتخاب میزبان بیان ژن ۱۶
۱-۱۱-۲ راهبردهای نسخه برداری (انتخاب حاملین بیان ژن) ۱۶
۱-۱۱-۲-۱ Replicon ۱۷
۱-۱۱-۲-۲ مارکر مقاوم به آنتی بیوتیک ۱۷

۱-۱۱-۲-۳ پروموتر (تنظیم نسخه برداری) ۱۷
۱-۱۱-۳ سیستم بیان pET ۱۸
۱-۱۲ استراتژی خالص سازی محصول نوترکیب ۲۰
۱-۱۲-۱ سیستم های تمایلی: ۲۰
۱-۱۳ ترشح پروتئین در باکتری ها ۲۱
۱-۱۳-۱ مسیرهای ترشح پروتئین در باسیلوس سوبتیلیس ۲۱
۱-۱۳-۱-۱ مسیر Sec-SRP ۲۳
۱-۱۳-۱-۱-۱ ساختار سیگنال پپتیدهای ترشحی (نوع Sec) ۲۳
۱-۱۳-۱-۱-۲ فرآیند ترشح پروتئین های وابسته به مسیر Sec-SRP ۲۴
۱-۱۳-۱-۲ مسیر Twin-arginine (Tat) ۲۵
۱-۱۳-۱-۲-۱ ساختار سیگنال پپتیدهای ترشحی (نوع Tat یا RR/KR) ۲۵
۱-۱۳-۱-۲-۲ فرآیند ترشح پروتئین های وابسته به مسیر Tat ۲۶
۱-۱۳-۱-۳ مسیر ترشحی ABC ۲۷
۱-۱۳-۱-۳-۱ سیگنال پپتید های لنتی بیوتیک و فرومون ۲۷
۱-۱۴ ترشح پروتئین در باکتری های گرم منفی ۲۸

فصل دوم: مواد و روش ها ۳۱
۲-۱ مواد شیمیایی ۳۲
۲-۲ میکروارگانیسم ها و محیط های کشت ۳۲
۲-۲-۱ میکروارگانیسم ها و پلاسمیدها ۳۲
۲-۲-۲ محیط های کشت میکروبی (gr/lit) ۳۳
۲-۲-۲-۱ محیط های کشت مورد نیاز برای رشد باکتری *Bacillus* Sp. KRA2 ..... ۳۳
۲-۲-۲-۲ محیط کشت SOC برای رشد باکتری مستعد اشریشیاکولی XL1-blue ۳۴
۲-۳ دستورزی ملکول DNA ۳۴
۲-۳-۱ تکثیر ژن کد کننده آمیلاز (KRA2 gene) از DNA ژنومی باسیلوس KRA2 ..... ۳۵
۲-۳-۱-۱ استخراج DNA ژنومی ۳۵
۲-۳-۱-۲ طراحی پرایمر ۳۵
۲-۳-۱-۳ مراحل PCR ۳۶
۲-۳-۱-۴ کلون کردن محصول PCR در وکتور pTZ57R/T ۳۷
۲-۳-۱-۵ انجام واکنش الحاق محصول PCR با پلاسمید pTZ57R/T ۳۸
۲-۳-۱-۶ انتقال محصول الحاق به باکتری اشریشیا کولی (XL1-blue) ۳۹
۲-۳-۱-۶-۱ تهیه باکتری مستعد ۳۹

۲-۳-۱-۶-۲ انجام الکتروپوریشن ۴۰
۲-۳-۱-۷-۲. انتخاب کلون ۴۱
۲-۳-۱-۷-۱ تأیید کلونی های سفید نوترکیب صحیح ۴۲
۲-۳-۲ تعیین ترادف ژن آلفا آمیلاز مربوط به سویه باسیلوس KRA2 ..... ۴۲
۲-۳-۲-۱ تخلیص پلاسمید نوترکیب جهت تعیین ترادف ۴۲
۲-۳-۲-۲ بررسی ترادف حاصل از تعیین توالی و تأیید آن ۴۲
۲-۳-۳ کلون مجدد ژن KRA2-آمیلاز بالغ در ناقل بیانی pET28-a(+) ۴۲
۲-۳-۳-۱ طراحی پرایمر ۴۳
۲-۳-۳-۲ مراحل PCR ۴۳
۲-۳-۳-۳ مراحل کلون مجدد ۴۴
۲-۳-۴ کلون مجدد ژن KRA2-آمیلاز نابالغ در ناقل بیانی pET28-a (+) ۴۹
۲-۳-۴-۱ طراحی پرایمر ۴۹
۲-۳-۴-۲ مراحل PCR ۵۰
۲-۳-۴-۳ مراحل کلون کردن ۵۱
۲-۵ بیان ژن آلفا آمیلاز و تعیین خلوص آن توسط SDS-PAGE ۵۲
۲-۵-۱ القاء باکتری و بیان پروتئین های نوترکیب بالغ و نابالغ ۵۲
۲-۵-۲ بررسی بیان پروتئین های نوترکیب با استفاده از روش الکتروفورز ۵۳
۲-۵-۲-۱ الکتروفورز پروتئین ها به روش SDS-PAGE ۵۳
۲-۶ تخلیص پروتئین های نوترکیب ۵۶
۲-۶-۱ بافر های مورد نیاز تخلیص پروتئین نوترکیب ۵۶
۲-۶-۲ روش تخلیص پروتئین نوترکیب ۵۶
۲-۶-۲-۱ آماده سازی پروتئین جهت مطالعات آنزیمی ۵۸
۲-۶-۲-۲ تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد ۵۸
۲-۷ مطالعات اولیه آنزیم شناسی ۵۸
۲-۷-۱ تعیین فعالیت آنزیمی ۵۸
۲-۷-۱-۱ روش Bernfeld ۵۸
۲-۷-۱-۲ روش سنجش فعالیت آنزیمی به روش سینتیکی ۵۹
۲-۷-۱-۳ واحد آنزیمی ۵۹
۲-۷-۲ تعیین عوامل سینتیکی آنزیم بالغ و نابالغ ۶۰
۲-۷-۳ بررسی اثر کلسیم بر غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم بالغ ۶۰
۲-۷-۴ بررسی اثر EDTA بر روی فعالیت آنزیم بالغ ۶۰
۲-۷-۵ اثر دما بر پایداری آنزیم بالغ و نابالغ ۶۱

۲-۷-۶ کروماتوگرافی لایه نازک (TLC; Thin Layer Chromatography) ۶۱
۲-۷-۷ اثر pH ۶۱
۲-۷-۸ آنالیز قطعه های پروتئینی ترشح شده به محیط کشت در سویه وحشی *Bacillus* sp. KRA2 ۶۲
۲-۸ مطالعات ساختاری آنزیم های KRA2-آمیلاز بالغ و نابالغ ۶۲
۲-۸-۱ مطالعات طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی ناحیه دور UV آنزیم های آمیلاز بالغ و نابالغ نوترکیب ۶۲
۲-۸-۲ مطالعات حرارتی آنزیم توسط CD ۶۲
۲-۸-۳ مطالعات فلورسانس ۶۳
۲-۸-۳-۱ مطالعات فلورسانس ذاتی ۶۳
۲-۸-۳-۲ مطالعات فلورسانس در حضور ANS ۶۳
۲-۸-۳-۳ مطالعات فلورسانس دمایی ۶۳

فصل سوم: نتایج ۶۴
۳-۱ استخراج DNA ژنومی از سویه باسیلوس KRA2 ۶۵
۳-۲ جداسازی ژن کد کننده آلفا آمیلاز ۶۵
۳-۳ کلون کردن ژن کد کننده آلفا آمیلاز در حامل pTZ57R/T ۶۶
۳-۴ تعیین ترادف ژن آلفا آمیلاز کلون شده ۶۷
۳-۵ کلون کردن ژن آلفا آمیلاز ۷۰
۳-۵-۱ کلون کردن ژن آلفا آمیلاز بالغ در حامل بیانی pET28-a (+) ۷۰
۳-۵-۲ کلون کردن ژن آلفا آمیلاز نابالغ در حامل بیانی pET28-a (+) ۷۲
۳-۶ بیان و تخلیص ژن آلفا آمیلاز نوترکیب سویه *Bacillus* sp. KRA2 ۷۴
۳-۶-۱ بیان و تخلیص ژن آلفا آمیلاز بالغ نوترکیب ۷۴
۳-۶-۲ بیان و تخلیص ژن آلفا آمیلاز نابالغ نوترکیب ۷۵
۳-۷ تعیین ویژگی های آنزیم ۷۶
۳-۷-۱ بررسی خصوصیات کاتالیتیک آنزیم KRA2-آمیلاز نوترکیب ۷۶
۳-۷-۲ بررسی اثر EDTA و یون Ca^{2+} روی پایداری حرارتی آنزیم آمیلاز بالغ نوترکیب ۷۸
۳-۷-۳ بررسی غیر فعال شدن برگشت ناپذیر آنزیم های آمیلاز بالغ و نابالغ نوترکیب در اثر حرارت ۷۹
۳-۷-۴ بررسی ساکاریدهای حاصل از هیدرولیز پلولان و نشاسته توسط آنزیم های آمیلاز بالغ و نابالغ نوترکیب ۸۰
۳-۷-۵ اثر pH روی فعالیت آنزیم های آمیلاز بالغ و نابالغ نوترکیب ۸۱

۳-۷-۶ بررسی ترشح قطعات پروتئینی به محیط کشت سویه وحشی ۸۲
۳-۸ مطالعات ساختاری توسط طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (CD) و فلورسانس ۸۳
۳-۸-۱ مطالعات طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی ناحیه دور UV آنزیم های آمیلاز بالغ و نابالغ نوترکیب ۸۳
۳-۸-۲ مطالعات حرارتی آنزیم توسط CD ۸۴
۳-۸-۳ مطالعات فلورسانس ۸۴
۳-۸-۳-۱ مطالعات فلورسانس ذاتی ۸۴
۳-۸-۳-۲ مطالعات فلورسانس در حضور ANS ۸۵
۳-۸-۳-۳ مطالعات فلورسانس دمایی ۸۶

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۸۷

۴-۱ کلون کردن و تعیین ترادف ژن پیش ساز آلفا آمیلاز از سویه *Bacillus* sp. KRA2 ..... ۸۸
۴-۲ کلون کردن و تعیین ترادف ژن کد کننده KRA2-آمیلاز بالغ ۹۰
۴-۳ مقایسه توالی پروتئینی KRA2-آمیلاز با دیگر آلفا آمیلازهای باکتریایی ۹۰
۴-۴ بیان و خالص سازی آنزیم KRA2-آمیلاز در سویه *E. coli* Bl-21(DE3) ۹۱
۴-۵ سینتیک دو فرم آنزیم KRA2-آمیلاز ۹۱
۴-۶ اثر یون کلسیم بر پایداری حرارتی آنزیم KRA2-آمیلاز بالغ ۹۲
۴-۷ بررسی پایداری حرارتی آنزیم KRA2-آمیلاز بالغ و نابالغ ۹۳
۴-۸ بررسی محصولات هیدرولیز سوبستراهای نشاسته و پلولان توسط آنزیم های بالغ و نابالغ ۹۳
۴-۹ اثر pH بر روی فعالیت آنزیم KRA2-آمیلاز ۹۴
۴-۱۰ بررسی نقش قطعه انتهای کربوکسیل در ترشح آنزیم آمیلاز در سویه وحشی باسیلوس KRA2 ..... ۹۴
۴-۱۱ مطالعات ساختاری توسط طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی(CD) و فلورسانس ۹۶
۴-۱۱-۱ مطالعات طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی ناحیه دور UV آنزیم های بالغ و نابالغ ۹۶
۴-۱۱-۲ مطالعات حرارتی آنزیم توسط CD و فلورسانس ۹۷
۴-۱۱-۳ مطالعات فلورسانس ذاتی ۹۸
۴-۱۱-۴ مطالعات فلورسانس در حضور ANS ۹۸
منابع ۹۹

فصل اول:

مقدمه

۱-۱ آنزیم ها

موجودات زنده به لحاظ دارا بودن کاتالیزور های زیستی که اصطلاحا" آنزیم نامیده می شوند، قادر به کسب انرژی از محیط و مصرف سریع آن می باشند. آنزیم ها قادر به تسریع واکنش شیمیایی بوده ولیکن در تعادل نهایی شرکت نمی کنند و همچنین به منظور تغییر و تبدیل مقادیر زیادی از مولکولها، مقدار بسیار جزئی از آنزیم مورد نیاز می باشد. برخلاف کاتالیزورهای معدنی، آنزیم ها دامنه عمل بسیار ظریفی دارا بوده و در مقایسه، دامنه بسیار محدودی از مواد را کاتالیز می کنند و یا اینکه در بعضی موارد تنها یک واکنش را کاتالیز می کنند. آنزیم ها بنا به تعریف در شرایط خاصی که در برگیرنده pH، درجه حرارت، غلظت سوبسترا، و کوفاکتور خاصی بوده عمل می کنند.آنزیم ها بر حسب نوع واکنشی که انجام می دهند به ۶ گروه اصلی تقسیم بندی شده اند که به شرح زیر می باشند (۱):

۱- اکسیدوردوکتازها ۲- ترانسفرازها ۳- هیدرولازها

۴- لیازها ۵- ایزومرازها ۶-لیگازها

۱-۲ منابع آنزیمی

۱-۲-۱ میکروارگانیسم ها به عنوان عمده ترین منابع آنزیمی

منابع تولید آنزیمها بسیار متنوع است. به عنوان مثال اگرچه آلفا آمیلازها از منابع مختلفی مانند گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم ها بدست می آیند اما آنزیم های میکروبی بیشترین کاربرد صنعتی

را دارند (۲). بنا به دلایل زیر میکروارگانیسم ها به عنوان منابع آنزیمی نسبت به گیاهان و جانوران ترجیح داده می شوند:۱- برای تولید عموماً ارزانند، ۲- آنزیمهای موجود در آنها بیشتر قابل پیش بینی و کنترل هستند، ۳- بافتهای گیاهی و جانوری مواد مضر بیشتری دارند (مانند ترکیبات فنلی در گیاهان، مهارکننده های داخل سلولی و پروتئازها)، ۴- نسبت به گیاهان و جانوران راحت تر می توان میکروب ها را از نظر ژنتیکی دستکاری نمود، ۵- میکروارگانیزم ها را می توان در مقادیر بالا و در یک مدت زمان نسبتاً کم از طریق روشهای تخمیر کشت داد. ۶- پروتئین های میکروبی اغلب نسبت به همتاهای جانوری و گیاهی خود پایدارترند (۳).

تکنولوژی DNA نوترکیب[1] با توسعه محصولات مهم صنعتی از جمله آنزیم های ارزشمند، پروتئین ها، مواد دارویی و سایر متابولیتهای مسیرهای زیستی مورد توجه ویژه قرار گرفته است و در این حیطه، باکتری ها ارجحیت ویژه ای دارند (۴).

۱-۲-۲ موقعیت تاکسونومیک تولید کننده های شناخته شده آنزیمی

اغلب آنزیمهای میکروبی قابل تجاری شدن، در تعداد معدودی از جنس های قارچی و باکتریایی یافت می شوند و در نقاط خاصی از موقعیت های تاکسونومیک تجمع یافته اند. شناخته شده ترین آنها عمدتاً متعلق به گونه های باکتریایی *Bacillus* و *Pseudomonas* و قارچ های *Ascomycete* شامل جنس های *Tricoderma*، *Fusarium* و *Aspergillus* هستند. بعلاوه گونه های متعلق به *Rhizomucor*، *Mucor* و*Homicola* تولید کننده برخی از آنزیم های صنعتی می باشند.

تولید کننده های عمده قارچی متعلق به یک phylum (Ascomycota) و دو گونه باکتریایی تولید کننده آنزیمهای تجاری متعلق به دو phylum بسیار متفاوت و دور از هم می باشند (۷-۵).

[1] Recombinant DNA Technology

۱-۳ بازار جهانی آنزیم

بازار آنزیم موقعیتی مرکزی در اقتصاد جهانی پیدا کرده است بطوریکه تولید تجاری آنزیم یکی از پرسود ترین بازارها ست. در سال ۱۹۸۷، بازار جهانی آنزیم، ۴۵۰ میلیون دلار آمریکا و در سال ۱۹۸۹، ۶۰۰ میلیون دلار آمریکا و در سال ۲۰۰۵، ۲ بیلیون دلار را به خود اختصاص داده است. در این میان سه دسته آنزیم شناسایی شده است:

۱. آنزیم های صنعتی (آمیلازها، پروتئازها، کاتالازها، ایزومرازها، لیپازها، سلولازها و غیره)
۲. آنزیم های مورد استفاده در اهداف تجزیه ای[۲] (گلوکز اکسیداز، گالاکتوز اکسیداز، الکل دهیدروژناز، هگزوکیناز، کلسترول آمیداز و غیره)
۳. آنزیم های مورد استفاده در داروسازی (آسپاراژیناز، پروتئاز، لیپاز، استرپتوکیناز و غیره).

بازار آنزیم های صنعتی نیز شامل صنعت نشاسته، شوینده ها، نساجی، آبمیوه، آبجو و نانوایی می شود. صنعت نشاسته، بیشترین کاربردها را در میان بازارهای صنعتی دارد و بخاطر این است که نشاسته یکی از متنوع ترین مواد خام در صنایع شیمیایی و غذایی است (۸).

۱-۴ نشاسته

نشاسته پلیمری است که در آن واحد های گلوکز از طریق اکسیژن کربن شماره ۱ خود و از طریق پیوند گلیکوزیدی به یکدیگر متصلند. در انتهای زنجیره های پلیمری یک گروه آلدهیدی انتهایی وجود دارد که به سر احیایی موسوم است.

نشاسته دارای دو نوع پلیمر گلوکزی می باشد: آمیلوز و آمیلوپکتین. آمیلوز منحصراً دارای پیوند گلیکوزیدی ۴-۱، α می باشد و بنابراین پلیمری خطی است. آمیلو پکتین علاوه بر دارا بودن پیوندهای ۴-۱، α دارای تعداد زیادی شاخه های جانبی است. پیوند گلیکوزیدی در محل انشعاب از

[2] Analytical

نوع ۶-۱، α می باشد. در هر ۱۵ تا ۴۵ واحد گلوکزی یک انشعاب وجود دارد. به طور متوسط یک مولکول آمیلوپکتین از حدود دو میلیون واحد گلوکزی تشکیل شده است و می تواند وزن مولکولی بیش از $۱۰^{۸}$ دالتون داشته باشد. بدین ترتیب آمیلوپکتین، بزرگترین مولکول در طبیعت به شمار می آید. نشاسته در گیاهان به صورت گرانول ذخیره می شود. آمیلوپکتین در آب محلول است در حالیکه آمیلوز و گرانول نشاسته در آب سرد نامحلولند (۱۱-۹).

۱-۴-۱ استفاده های صنعتی نشاسته

نشاسته پلی ساکارید عمده ذخیره ای گیاهان است. فراوانی، قیمت ارزان و توانایی تخریب زیستی، نشاسته را به پرمصرفترین ماده صنعتی تبدیل کرده است. کاربردهای غذایی نشاسته شامل انواع نشاسته طبیعی، تغییر یافته و هیدرولیز شده، ایزو گلوکز و مشتقات دیگر آن ها است. کاربردهای دیرینه غیر غذایی نشاسته شامل صنعت کاغذ، صنایع دارویی، مواد ساختمانی، تخمیر، کشاورزی و نساجی می باشد. علاوه بر موارد ذکر شده، نشاسته در تیمار آب [۳]، شوینده ها، چسب ها، صنعت ذغال سنگ و ریخته گری مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳،۱۲). در ادامه بعضی از مهمترین استفاده های صنعتی نشاسته به تفصیل آورده شده است (۱۵).

۱-۴-۱-۱ تولید اتانول

تولید صنعتی اتانول با استفاده ار ترکیبات نشاسته ای مختلف از ذرت، گندم، سیب زمینی و غیره گزارش شده است. اغلب مخمرها قادر به تخمیر مستقیم نشاسته گیاهان نمی باشند. برای تبدیل نشاسته به اتانول ابتدا باید نشاسته به قند های ساده هیدرولیز گردد. این عمل با خیساندن، پختن و ژلاتینه نمودن نشاسته و سپس هضم آنزیمی آن صورت می گیرد.

[3] Water Treatment

۱-۴-۱-۲ شیرین کننده ها و شربت ها

بازار اصلی نشاسته هیدرولیز شده به منظور تبدیل آنها به شربت های با فروکتوز بالا HFCS (High Fructose Corn Syrups) می باشد. از این شربت ها به دلیل مزایا به جای شربت ساکارز در غذاها و نوشیدنی ها می توان استفاده نمود. تبدیل نشاسته به قند های شیرین ابتدا توسط یک شیمی دان روسی در حدود ۱۸۵۰ سال پیش آغاز شد و تاکنون رشد و توسعه بسیار چشمگیری داشته است. اولین پیشرفت عمده در این تکنولوژی که به تکنولوژی نشاسته معروف است در سال ۱۹۴۶ زمانیکه Date و Langois استفاده از آنزیم های تجاری جهت هیدرولیز نشاسته و تولید شربت های ذرت را پتنت نمودند حاصل شد.

کشف، جداسازی و کاربرد آنزیمهای کربوهیدراتی مختلف موجب توسعه و بهبود شربت های ذرت جدید شده است. با ترکیبی از این آنزیم ها می توان شربت های بسیار متنوعی تولید نمود که از لحاظ ترکیب شیرین کننده ها و در نتیجه خواص آنها بسیار متفاوتند. در خصوص تکنولوژی نشاسته و تولید این محصول در بخش های بعدی توضیحات بیشتری ارائه خواهد شد.

۱-۴-۱-۳ اسید لاکتیک

مالتوز و دکستروز حاصل از هیدرولیز نشاسته ذرت به منظور تولید اسید لاکتیک و از طریق تخمیر در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار می گیرند. تخمیر اسید لاکتیکی مواد نشاسته ای به کمک *L. Amylophillus* و *Thermophillus Lactobacillus* گزارش شده است.

۱-۴-۱-۴ بیومس میکروبی

مواد و ضایعات نشاسته ای به عنوان یک منبع قابل بازیافت در تولید بیومس به شمار می آیند. گرچه بعضی از باکتری ها قادر به استفاده از نشاسته می باشند اما در بیشتر موارد ترکیبات حاوی نشاسته ابتدا از طریق آنزیمی یا ترکیبی از آنزیم ها و اسید، هیدرولیز شده و سپس مورد استفاده قرار می گیرند.

۱-۵ آنزیم های تبدیل کننده نشاسته

از آنجا که نشاسته فراوانترین ذخیره پلی ساکاریدی در طبیعت می باشد، بیشتر موجودات آنزیم های ضروری برای هیدرولیز آن را دارند. هیدرولیز نشاسته منبعی از انرژی را برای موجودات فراهم می آورد. بخاطر پیچیدگی ساختار نشاسته آنزیم های متعددی از جمله آمیلازها برای تجزیه آن لازم هستند. سری آنزیم های مورد نیاز برای تجزیه نشاسته و ویژگی های آن ها بسته به نوع ارگانیسم متفاوت است. چهار گروه آنزیمی مؤثر بر نشاسته وجود دارد: ۱- اندوآمیلازها، ۲- اگزوآمیلازها، ۳- آنزیم های شاخه شکن و ۴- ترانسفرازها.

۱-۵-۱ اندوآمیلازها[4]

اندوآمیلازها قادرند پیوند های گلیکوزیدی ۴-۱، α موجود در بخش درونی آمیلوز یا آمیلوپکتین را تجزیه نمایند. آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.1) معروفترین اندوآمیلاز ها به شمار می آید. این آنزیم، هیدرولیز پیوندهای داخلی ۴-۱، α رادر پلیمر نشاسته کاتالیز می کند و محصول نهایی عمل آلفا آمیلاز الیگو ساکارید هایی با اندازه های مختلف و کانفیگوراسیون آلفا و همچنین α-limit dextrin ها می باشد که از الیگو ساکاریدهای شاخه دار تشکیل شده است (۱۱،۹).

۱-۵-۲ اگزوآمیلازها[5]

بتا آمیلازها: این آنزیم ها به گلیکوزید هیدرولازهای خانواده ۱۴ تعلق دارند و واحدهای مالتوز را از انتهای غیر احیا کننده پلی ساکارید از طریق هیدرولیز پیوندهای ۴-۱، α جدا می کنند.

گلوکوآمیلازها (amyloglucosidase EC 3.2.1.3، glucoamylase) که به گلوکوزید هیدرولازهای خانواده ۱۵ تعلق دارند و هر دو نوع پیوند گلیکوزیدی ۴-۱، α و ۶-۱، α را از انتهای غیر احیا کننده آلفا گلوکان هیدرولیز می کند.این آنزیم پلی ساکارید را به صورت کامل به گلوکز تبدیل می کند. در

[4] Endo Amylases
[5] Exo Amylases

فرآیندهای صنعتی، این آنزیم همراه با آلفا آمیلاز استفاده می شود. گلوکوآمیلاز برای کاهش محتـوای کربوهیدراتی آبجو به منظور تولید انواع سبک یا کم الکل استفاده می شود.

آلفا گلوکوزیداز (EC 3.2.1.20، glucosidase) بـه گلیکوزیـد هیـدرولازهای خـانواده ۱۳ تعلـق دارد. اگزوآمیلازها بر روی واحد های خارجی گلوکز در آمیلوز و آمیلوپکتین عمل می کنند و بنـابراین تنهـا گلوکز تولید می کنند.

از سایر آنزیم های exo-acting می توان به سیکلودکسترین گلیکوزیل ترانسـفراز یـا سیکلودکسـترین گلوکانوترانسفراز (Cyclodextrin glycosyl trasferase (CGTase); EC 2.4.1.19)، آنزیمی که دارای فعالیت ترانس گلیکوزیلاسیون نیز می باشد، مالتوژنیک آلفا آمیلاز (EC 2.1.133) کـه آمـیلازی از *B. Stearothermophilus* اسـت کـه موجـب آزاد شـدن مـالتوز مـی شـود و آمیلازهـای تولیـد کننـده مالتوالیگوساکارید نظیر آنزیم تولید کننده مالتوتتروز (EC 3.2.1.60) و آمیلاز تولید کننده مالتوهگزوز (EC 3.2.1.98) اشاره نمود (۱۲-۹).

۱-۵-۳ آنزیم های شاخه شکن[6]

این دسـته منحصـراً پیونـد هـای گلیکوزیـدی ۶-۱، α را هیـدرولیز مـی نماینـد و شـامل ایـزوآمیلاز isoamylase، (EC 3.2.1.68) و پلولاناز نوع I، (EC 3.2.1.41) می باشند. تفاوت عمده پلولاناز ها بـا ایزوآمیلازها در توانایی هیدرولیز پلولان است که پلی ساکاریدی با واحدهای تکراری از مالتوتریوز است و پیوند ۶-۱، α دارد.

پلولانازها پیوند گلیکوزیـدی ۶-۱، α را در پلـولان و آمیلـوپکتین هیـدرولیز مـی نماینـد. در حالیکـه ایزوآمیلاز تنها قادر است پیوند ۶-۱، α را در آمیلوپکتین هیدرولیز نماید. همچنـین تعـدادی آنـزیم از نوع پلولاناز وجود دارد که هر دو نوع پیوند گلیکوزیدی ۶-۱، α و ۴-۱، α را هیدرولیز می نمایند. ایـن

[6] Debranching Enzyme