فصل اول:

مقدمه و کلیات

آنزیم :

آنزیم ها دسته بزرگی از پروتئین ها را شامل می شوند که امروزه جایگاه ویژه ای را در بیوشیمی و بیوتکنولوژی به خود اختصاص داده اند . وجود آنزیم ها برای نخستین بار در سده نوزدهم آشکارگردید . کشف آنزیم ها در واقع به پژوهش های وسیع پاین [1] و پرسوز [2] وابسته بود . آنان در سال ۱۸۳۳ موفق شدند از جو سبز شده ترکیبی را به نام مالت کشف کنند که نشاسته را به قند مبدل می ساخت و این ترکیب را دیاستاز [3] نامیدند که امروزه به نام آمیلاز معروف است . کونه [4] نخستین کسی بود که نام آنزیم را به جای دیاستاز به کار برد. آنزیم ها ترکیباتی هستند که توانایی سرعت بخشیدن به واکنشهای زیستی را دارند . انجام سریع یک واکنش ساده در موقعیت آزمایشگاهی به شرایط ویژه ای مانند دما و فشار بالا نیاز دارد . در سیستم زنده ای مانند یاخته که شرایط محیطی در آن کاملاً ثابت است . انجام چنین واکنشهایی بسیار کند پیش می رود . لذا باید دریافت مکانیسمی دقیق وجود داشته باشد که بتواند سریعاً واکنشها را در جهت ایجاد فراورده به پیش ببرد . این عمل به وسیله آنزیم ها انجام می گیرد که می توانند سرعت واکنش را تا حدود 10^7 برابر افزایش دهند به همین دلیل آنزیم ها به عنوان کاتالیزگر های یاخته ای معرفی گردیدند.(۱۰۳)

۱-۱) آمیلازها

۱-۱-۱) دسته بندی انواع آنزیمهای تجزیه کننده ی نشاسته

نشاسته و سلولز از فراوان ترین پلیمرهای کوبرهیدراتی روی زمین هستند . هر دو شامل واحدهای منومری گلوکز می باشند که به صورتهای مختلفی به هم متصل شده اند و زنجیره پلیمری را ایجاد کرده اند . در نشاسته واحدهای گلوکز از طریق پیوند های α - گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده اند، در صورتی که در سلولز منومرهای گلوکز توسط پیوندهای β - گلیکوزیدی به یکدیگر پیوند داشته اند . این دو پلیمر ، منبع مهم انرژی برای حیوانات ، گیاهان ، میکروارگانیسمها می باشند و توسط دو گروه مختلف از آنزیم ها هیدرولیز می شوند . نشاسته توسط α - گلیکوزید هیدرولازها و سلولز توسط β - گلیکوزید هیدرولازها تجزیه می گردد . از هیدرولیز کامل نشاسته گلوکز آزاد می شود به همین دلیل آن را گلوکوزان و یا گلوکان نیز می نامند و از هیدرولیز ناقص آن آمیلوپکتین و دکسترین حاصل می شود . نشاسته دارای دو بخش مجزا می باشد :

---

[1] A.payen
[2] J.F.Persoz
[3] Diastase
[4] Kuhne

آمیلوز : گلوکانها که به صورت خطی و توسط پیوند (٤-١) α به یکدیگر متصل شده انـد و ١٥ تا ٢٠ درصد از نشاسته را تشکیل می دهد .

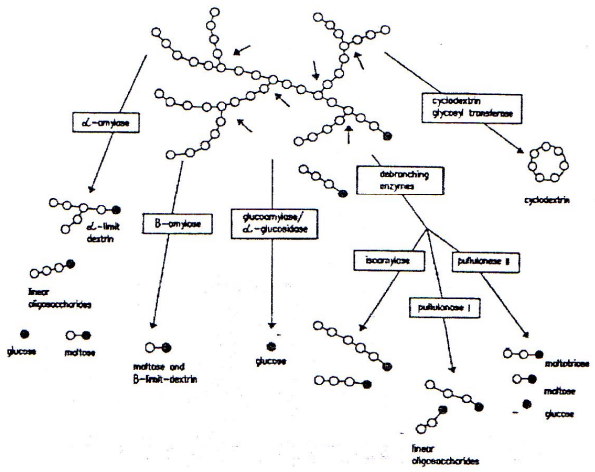
آمیلوپکتین : (٨٠ تا ٨٥ درصد) از نشاسته که زنجیره ای شاخه دار و متـشکل از ٢٤ تـا ٣٠ ریـشه گلوکزی است که توسط اتصال های (٤-١)α در داخل زنجیره و (٦-١)α در نقاط انشعاب شـاخه هـا بـه یکدیگر پیوند یافته اند . آنزیمهای هیدرولیز کننده نشاسته را آنزیمهای آمیلولیتیک و یـا بـه صـورت سـاده آمیلاز می نامند (٣٢). این آنزیمها حدود ٣٠ درصد از کل آنزیمهای موجود در جهان را تشکیل مـی دهنـد (٩٤) . یکی از مهمترین آنزیمهای تجزیه کننده نشاسته ، α- آمیلاز می باشد که با هیدرولیز اتـصالات (٤-١) α نشاسته را به الیگوساکاریدهای کوچکتر تبدیل می کند (٧٠) (شکل ١-١)

تاریخچه آمیلاز به سال ١٨١١ بر می گردد ، زمانی که اولـین آنـزیم تجزیـه کننـده نـشاسته توسـط Krichhoff کشف شد . در سال ١٩٣٠ ، ohlsson اولین دسته بندی آنزیمهای تجزیه کننـده نـشاسته را بر اساس نوع آنومر قندهای تولید شده ارائه داد و توانست آمیلازها را دو دسته α - آمیلاز و β - آمـیلاز تقسیم کند (٢٨) .

(EC) Enzyme commission آنزیمها را بر اساس نوع واکنش کاتالیز کننده دسته بنـدی مـی کند . و به هر آنزیم شماره EC خاصی داده می شود . بنابراین شماره EC مربوط بـه α-آمیلازهـا (EC 3.2.1.1) بوده و واکنش کاتالیز شده عبارت است از " اندوهیدرولیز[1] " اتصالات گلیکوزیـدی (٤-١) α . در این دسته بندی آنزیمهایی که واکنشهای بسیار مشابهی را کاتـالیز مـی کننـد ، دارای EC متفـاوتی مـی باشند . به عنوان مثال سیکلودکسترین گلوکانوترانسفواز[2] (CGases) که از لحاظ ساختاری و آنزیمی بسیار مشابه α - آمیلاز می باشـد ، EC متفـاوتی از α- آمـیلاز یعنـی (EC2.4.1.19) دارد (٦٩) . بـر ایـن اساس آنزیمها در ٤ گروه قرار می دهند .

١-آندوامیلازها[3]: پیوندهای داخلی (٤-١) α را می شکنند و محصولات α- آنومری را ایجاد می کنند (٨٢) . شناخته شده ترین آنـدوآمیلاز ، α - آمـیلاز[4] (EC3.2.1.1) اسـت (٧٠) . محـصول نهـایی عمل α- آمیلازها الیگوسـاکاریدهایی بـا طولهـای مختلـف و سـاختار α و α- دکـسترینهای محـدود بـا الیگوساکاریدهای شاخه دار می باشد (٩٤) .

[1] Endohydrolyse
[2] Cycoldextrio glucotransferase(CGT ases
[3] Endoamylaases
[4] α -Amylase



شکل ۱-۱: عملکرد آنزیمهای تجزیه نشاسته؛ (•) α-D-گلوکز احیایی؛ (○) α-D-گلوکزغیر احیایی .فلش نشان دهنده شاخه (۶-۱)α در مولکول نشاسته می باشد

۲- اگزوآمیلازها[1]: پیوندهای (٤-۱) α و یا (٦-۱) α را از سر احیاء زنجیره نشاسته هیدرولیز می کنند (۸۲) و تنها گلوکز ، مالتوز و β دکسترین با طول محدود ایجاد می کنند . β- آمیلازها [2] (EC3.2.1.2) تنها پیوندهای (٤-۱) هیدرولیز می کنند .

گلوکوآمیلازها[3] (EC3.2.1.3) و α- گلیکوزیدازها[4] (EC 3.2.1.20) به پیوندهای (٦-۱) α حمله می کنند . β - آمیلازها و گلوکوآمیلازها ساختمان کربن آنومری مالتوز آزاد شده را از α به β تبدیل می کنند .

گلوکوآمیلازها و α - گلیگوزیلازها در اولویت دادن به سوبسترای خود تفاوت دارند . α- گیلکوزیلازها روی مالتو الیگوساکاریدهای کوتاه عمل می کنند و گلوکز با کنفوراسیون α آزاد می کنند ، در صورتی که گلوکوآمیلازها پلی ساکاریدهای بلند زنجیره را بهتر هیدرولیز می کنند (۹٤).

۳- آنزیمهای شاخه زدا[5] : تنها پیوندهای (٦-۱) α را هیدرولیز می کنند و پلی ساکاریدهای بلند خطی ایجاد می نمایند (۸۲) . پلولانازها[6] (EC 3.2.1.41) و ایزوآمیلازها [7](EC 3.2.1.68) نمونه ای از آنزیمهای شاخه ز دا هستند . تفاوت اصلی بین پلولانازها وایزوآمیلازها در توانایی هیدرولیز پلولان[8] (

---

[1] Exoamylases
[2] β- Amylase
[3] α-Glucoamylase
[4] α-Glicusidase
[5] Debranching enzymes
[6] Pullulanase
[7] Isoamylase
[8] Pullulan

پلی ساکاریدی با واحدهای تکراری مالتوتریوز با اتصالات (٦-١) α می باشد (٧و٣٧). پلولانازها پیوند (٦-١) α گلیکوزیدی در پلولان و آمیلوپکتن را هیدرولیز می کنند ، در صورتی که ایزوآمیلازها تنها پیوند (٤-١) α در آمیلوپکتین را می شکنند (٩٤). پلولانازها را بر اساس توانایی هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی (٤-١) α به دو گروه تقسیم می کنند (٩٩) .

پلولاناز I و پلولاناز II ، پلولاناز I تنها پیوند گلیکوزیدی (٦-١) α را هیدرولیز می کند، در صورتی که پلولاناز II می تواند پیوندهای گلیکوزیدی (٤-١) α و (٦-١) α را هیدرولیز نماید (٩٤) . این آنزیم α- آمیلاز – پلولاناز[1] یا آمیلوپلولاناز[2] نامیده می شود . محصول اصلی عمل این آنزیم ، مالتوز و مالتوتریوز می باشد . یکی از آنزیم های خاص متعلق به این گروه نئوپلولاناز[3] می باشد که ترانس گلیکوزیلاسیون همراه با ایجاد باند گیلکوزیدی جدید (٤-١) α و (٦-١) α را انجام می هد . (٨٨)

٤- ترانسفرازها[4]: ابتدا باند گلیکوزیدی (٤-١) α را هیدرولیز و سپس مولکول گلیکوزید حاصل را به یک گیرنده گلیکوزید متصل می کنند و یا باند گلیکوزیدی دیگری حاصل می شود . آمیلومالتازها[5] (EC 2.4.1.25) و سیکلو دکسترین گلیکوزیل ترانسفرازها (EC 2.4.1.19) پیوند گلیکوزیدی (٤-١) α جدید ایجاد می کنند در صورتی که آنزیم شاخه ساز[6] (EC 2.4.1.18) پیوند گیکوزیدی (٦-١) α جدید می سازد. سیکلودکسترین گلیکوزیل ترانسفرازها فعالیت هیدرولیزی کمی دارند و الیگوساکاریدهای حلقوی با ٦و٧و٨ گلوکز و دکسترین پرشاخه با وزن مولکولی بالا تولید می کنند . سیکلودکسترین[7] توسط واکنش ترانس گلیکوزیلاسیون درون مولکولی ایجاد می شود و باند گلیکوزیدی (٤-١) α را می شکنند و انتهای احیایی را به غیر احیایی متصل می کند (١٢و١٣) . آمیلومالتازها با توجه به نوع واکنش آنزیمی مشابه گلیکوزیل ترانسفرازها هستند . تفاوت اصلی آنها در این است که آمیلومالتازها با انجام واکنش ترانس گیلکوزیلاسیون محصول خطی ایجاد می کنند در صورتی که سیکلودکسترین گیلکوزیل ترانسفرازها[8] محصول حلقوی می دهند . آمیلومالتازها در میکروارگانیزمهای مختلفی پیدا شده اند (٩٠) . آنزیمهای شاخه ساز گلوکان پیوند گلیکوزیدی (٦-١) α در زنجیره جانبی گلیکوژن را ایجاد می کنند . گرچه گلیکوژن در تعدادی از میکروارگانیزمها وجود دارد (٧٢) ، تنها در تعداد محدودی آنزیم شاخه ساز میکروبی شناسایی شده است (٤٦و٨٩ و ٦) .

گرچه سیستم EC برای دسته بندی بسیار مناسب است ، ولی به نظر می رسد که زمانی که یک گروه آنزیمی خاص را مطالعه می کنیم حاوی چندین کلاس EC می باشد (٦٩). بنابراین از سیستم دسته

---

[1] α- Amylase-Pulluanase
[2] Amylopullulanse
[3] Neopullulanase
[4] Transferas
[5] Amylomaltase
[6] Branching enzyme
[7] Cyclodextrin
[8] Glycosyltransferase

بندی دیگری استفاده شد و با توجه به شباهتها و تفاوتها در ساختار اولیه آنزیمهای هیدرولیز کننده نشاسته این آنزیمها در سیستم طبقه بندی گلیکوزید هیدرولازها در سه خانواده قرار می گیرند (۳۰) .

خانواده ۱۳: α – آمیلازها خانواده ۱٤ : β – آمیلازها خانواده ۱۵: گلوکوآمیلازها

این دسته بندی همچنین نشان دهنده تفاوتهایی در مکانیسم این سه خانواده می باشد.(۱۷) با توجه به شناسایی توالیهای جدید در سالهای اخیر ، خانواده ۱۳ گسترش یافته است و تقریبا شامل ۳۰ آنزیم و پروتئین مختلف می باشد (ایزوآمیلاز ، نئوپلاناز) که توالی مشابه α – آمیلازها دارند(۳۷) . امروزه همه آنها در خانواده ۱۳و۷۰و۷۷ قرار می گیرند و جزء گلیکوزید هیدرولازها می باشند (١٤) . علاوه بر این خانواده ۵۷ نیز وجود دارد (۳۱) که آنزیمهای کمی در این خانواده هستند و شباهت توالی چندانی با خانواده ۱۳ ندارند (۳۹) . تمامی اطلاعات در مورد بسته بندی گلیکوزیل هیدرولازها با توجه به توالی آنها در پایگاه اطلاعاتی (Carbohydrate Active Enzyme) جمع آوری شده است (۱۳). این آنزیم ها از منابع مختلفی مثل گیاهان ، حیوانات و میکرو ارگانیزمها مشتق می شوند . در اساس اثر ساکاروژنیک و یا میزان مایع سازی نشاسته خود ، pH اپتیمم ، محدوده دمایی و میزان پایداری طبقه بندی می شوند . آمیلازهای ساکاروژنیک قندهای آزاد تولید می کنند در حالی که آمیلازهای مایع کننده اگر چه پلیمر نشاسته را می شکنند اما قندهای آزاد تولید نمی کنند . اکثر ارگانیسمها چندین نوع α آمیلاز تولید می کنند .

۲-۱-۱) α- آمیلاز باکتریایی

آنزیم هایی که از منابع میکروبی حاصل می شوند برای تقاضاهای صنعتی مورد استفاده قرار می گیرند از جمله صنایعی که آمیلاز آنزیم مهمی در آن می باشد می توان به صنعت داروسازی ، شیمی تجزیه ، قندسازی ، پارچه بافی ، کاغذ سازی ، ساخت دترجنت ها ، آبجوسازی اشاره کرد . این آنزیم به تنهایی ۲۵٪ آنزیم های صنعتی را تشکیل می دهد .

امروزه دریافته اند که آنزیم آمیلاز میکروبی با موفقیت می تواند جایگزین واکنش های شیمیایی می شود . به همین دلیل توجه زیادی در جداسازی سویه های جدید باکتری تولید کننده آنزیم آمیلاز می شود و سعی بر این می گردد تا باکتری های جدا شده علاوه بر تولید زیاد آنزیم آمیلاز دارای خصوصیاتی باشند که بتوان آنها را در صنعت مورد استفاده قرار داد و به مقدار فراوان از آن تولید کرد.

تولید آمیلاز باکتریایی ، به فعالیت ماشین پروتئین ساز سلول نیاز دارد . این موضوع با آزمایشاتی که در آنها به کشت سلولی آنتی بیوتیک اضافه شده به اثبات رسیده است . اگر جهت جلوگیری از سنتز پروتئین در حین تولید α – آمیلاز ها به وسیله باسیلوس از آنتی بیوتیک های اختصاصی استفاده شود هم رشد و هم تولید آمیلاز متوقف می گردد .

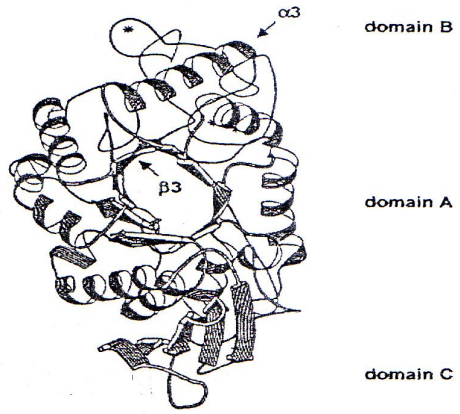
جهت تولید آمیلاز از روش تخمیر غیر مداوم استفاده می شود زیرا هنگامی که باکتری در فاز رشید لگاریتمی قرار گیرد میزان تولید پایین است اما قبل از اینکه سرعت رشد کاهش یابد اسپورزایی آغاز می گردد تولید آمیلاز افزایش می یابد .

با توجه به اینکه نشاسته یک ماکرو مولکول است ، نمی تواند توسط سلولها جذب شود و در نتیجه قادر نیست سنتز α- آمیلاز را القا نماید . لذا فرض بر این است که همیشه مقدار اندکی آنزیم ، تولید شده و به محیط ترشح می گردد و در اثر عمل آن ، بر روی نشاسته ترکیباتی با وزن مولکولی پایین ایجاد می شوند ، که می توانند تولید آنزیم را القا نمایند .

۳-۱-۱) ساختار آنزیم های خانواده α - آمیلاز

اولین ساختار سه بعدی α- آمیلاز مربوط به Taka-amylase A α - آمیلاز متعلق به *Aspergillus oryzae* بوده (۲۵) . مطالعه ساختاری α- آمیلاز باکتریها و پستانداران با استفاده از اشعه x نشان داده است که همه α - آمیلازها دارای سه دمین به نام A,B,C هستند(٦٩).(شکل ۲-۱) . دمین A: حفاظت شده ترین دمین که در همه آنزیم های خانواده α - آمیلاز مشاهده می شود ، دمین A است . این دمین شامل ۸ رشته بتا موازی می باشد که به صورت barrel قرار گرفته اند و توسط ۸ آلفا هلیکس احاطه شده اند و به صورت barrel $_{۸}$ (α /β) نشان می دهند (٩٤).barrel $_{۸}$ (α /β) اولین بار در آنزیم تریوز فسفات ایزومراز ماهیچه جوجه مشاهده شد (۵) و TIM barrel نامیده شد . این ساختار نه تنها در آنزیم های این خانواده وجود داد ، بلکه در آنزیمهای دیگری که از لحاظ عملکردی متنوع هستند مشاهده می شود (۸۵).

معمولا لوپهایی که رشته بتا را به هلیکس مجاور متصل می کنند دارای اسید آمینه های جایگاه فعال هستند .(۵۹). این اسید امینه های حفاظت شده در لوپهای C ترمینال رشته های بتای این دمین قرار گرفته اند (٩٤) .



شکل۲-۱:ساختار آنزیمهای α-آمیلاز

دمین B,C در دو سمت TIM barrel قرار گرفته اند (٦٩) .

دمین B: یک لوپ بزرگ بین سومین رشته بتا و سومین هلیکس قرار گرفته است و آن را به عنوان یک دمین جداگانه در نظر می گیرند و دمین B نامیده می شود . دمین B ساختار غیر عادی دارد و از لحاظ اندازه و ساختار در آلفا آمیلازهای مختلف ، متفاوت است(٦٩) . این دمین بین ٤٤ تا ١٣٣ اسید آمینه متغیر است و دمین B در اتصال سوبسترا و یا کلسیم نقش دارد (٣٢) .

دمین C: در انتهای C ترمینال توالی و به دنبال TIM barrel قرار گرفته است. این دمین ساختار β-Sandwich دارد و شامل موتیف کلید یونانی است (٦٩) . به نظر می رسد دمین C با ممانعت از اینترکشنن اسید آمینه های هیدروفوب دمین A با حلال ، سبب پایداری این دمین می شود. ممکن است این دمین در اتصال سوبسترا نقش داشته باشد (٥٢و٧١) . برخی از آمیلومالتازها این دمین را ندارند . بنابراین این دمین نمی تواند در همه شرایط در پایداری و یا فعالیت آنزیم نقش داشته باشد (٧٣) .

سایر دمین ها

دمین N : دمین F نیز نامیده می شود . در اکثر α – آمیلازها و نه در همه آنها ، دمین A در انتها N ترمینال قرار گرفته است ، ولی تعدادی از اعضای این خانواده دارای دمین جداگانه ای به نام دمین N در انتهای N ترمینال هستند که قبل از barrel $_{\beta/\alpha}$) و دمین کاتالیتیک قرار گرفته است . هنوز نقش این دمین مشخص نشده است ولی احتمالاً در همه آنزیم ها یکسان نمی باشد و در آنزیم های مختلف نقشهای متفاوتی دارد (٥٩) .

دمین D,E : برخی از آنزیمهای این خانواده مانند سیکلو دکسترین گلوکان ترانسفرازها دارای دمینهای اضافی به صورت صفحات بتا می باشند . که بعد از دمین C قرار گرفته اند و دمین D,E نامیده می شوند (٣٢و٣٣) . گرچه هنوز نقشی برای دمین D در نظر گرفته نشده است . دمین E در اکثر آنزیم های هیدرولیز کننده نشاسته وجود دارد و به نظر می رسد برای اتصال گرانولهای نشاسته مهم می باشد ، به عنوان Substrate Binding Domain (SBD) است (٨٦) . علاوه بر این سبب گستردگی جایگاه فعال در سیکلو دکسترین گلوکان ترانسفرازها می شود. (٣٣و٤٣) .

١-٣-١-١)یونهای موجود در ساختار آنزیم

١- یونهای کلسیم و سدیم : همه α – آمیلازهای شناخته شده دارای یون کلسیم حفاظت شده هستند که بین دمین های A,B قرار گرفته است (٨و٣٦ و٦١و٦٢) که برای پایداری و فعالیت آنزیم ضروری می باشد (٣٩) . نشان داده شده است که یون کلسیم بسیار محکم متصل می شود. به نظر می رسد نقش یون کلسیم بیشتر ساختاری می باشد (١٠و٥٣و٦٢) زیرا فاصله آن تا جایگاه فعال آنزیم بسیار زیادتر از

آن است که بتواند مستقیم در کاتالیز شرکت کنند . در ساختار چندین آنزیم بیش از یک یون کلسیم آرایش خاصی دارد و به فرم خطی Ca-Na-Ca می باشد(٦٢و١١) . به نظر می رسد زمانی که ca^{+2} به آنزیم فاقد ca^{+2}متصل می شود سبب تغییر ساختار از فرم نامنظم به منظم (order --- disorder) می گردد (٦١) .

٢- یونهای کلرید : چندین α - آمیلاز در جایگاه فعال خود دارای یون کلرید هستند که نشان داده شده که این یون با افزایش pka اسید آمینه های دهنده هیدروژن در جایگاه کاتالیتیکی کارایی آنزیم را افزایش می دهد (٥٦و٢٣) . اکثر یونهای کلرید در α - آمیلازهای پستانداران مشاهده شده است (٩و٥٣و٧٤)ولی حضور یونهای کلرید در α - آمیلازهای سرما دوست مربوط Altermonas haloplantis (HAH) گزارش شده است (١) . تمایل آنزیم برای اتصال به کلسیم کلرید افزایش می یابد (٤٥) . بنابراین می توان گفت که اتصال کلرید القا کننده تغییرات کنفورماسیونی در اطراف جایگاه فعال می باشد . α- آمیلازهای دارای کلرید دارای تریاد Glu,Ser , His در بین دمین C,A می باشند که این آرایش در سرین پروتئازها وجود دارد (٦٩).

٢-٣-١-١) باندهای دی سولفید موجود در ساختار

α- آمیلازهای پستانداران دارای چندین پل دی سولفید می باشند که آنزیمهای باکتریایی فاقد آن هستند . Altermonas haloplantis α -amylase (HAH) دارای ٤ پل دی سولفید می باشد که از این نظر مشابه آنزیمهای پستانداران می باشد.(١٠).

٣-٣-١-١)جایگاه فعال آنزیم

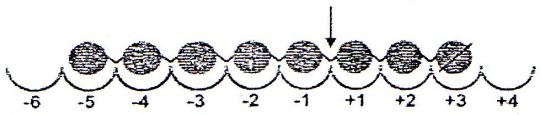
جایگاه فعال آنزیم بین A,B قرار گرفته است و در انتهای C ترمینال رشته های بتا موجود در TIM barrel می باشد (٦٩) . در Taka amylase A مرکز شکاف کاتالیتیک از سه آمینو اسید Asp297 , Glu230 , Asp 206 به ترتیب در رشته های $\beta_{٧},\beta_{٥},\beta_{٤}$ تشکیل شده است . علاوه بر این بسته به فعالیت ویژه آنزیم دارای تعدادی آمینو اسید اضافی است (٣٩و٧٣) . هر جایگاه فعال از تعدادی زیر جایگاه[1] تشکیل شده است (شکل ٣-١) که هر زیر جایگاه می تواند با یک گلوکز سوبسترا واکنش دهد . زیر جایگاهها شامل زنجیره های جانبی اسید آمینه هایی هستند که این اسید آمینه ها در لوپی قرار گرفته اند که انتهای C ترمینال رشته های بتا را به انتهای N ترمینال هلیکس مجاور درTIM barrel متصل می کند (٥٩) . نام گذاری زیر جایگاهها توسط Davis و همکارانش صورت گرفته است (١٩) . شماره گذاری زیر جایگاهها با توجه به موقعیت پیوند Scissile صورت گرفته است که زیر واحدهای با

[1] Subsite

شماره منفی در سمت غیر احیایی پیوند Scissile قرار گرفته اند. در α – آمیلاز ها ۲ یا ۳ زیر جایگاه در انتهای احیایی پیوند Scissile وجود دارد .

با توجه به تفاوت ساختاری لوپهای $\beta-\alpha$ در آنزیمهای خانواده α – آمیلاز تعداد و طبیعت زیر جایگاه در جایگاه فعال تیز متغیر است . آنزیمهای مختلف خانواده α – آمیلاز ها، برر وی

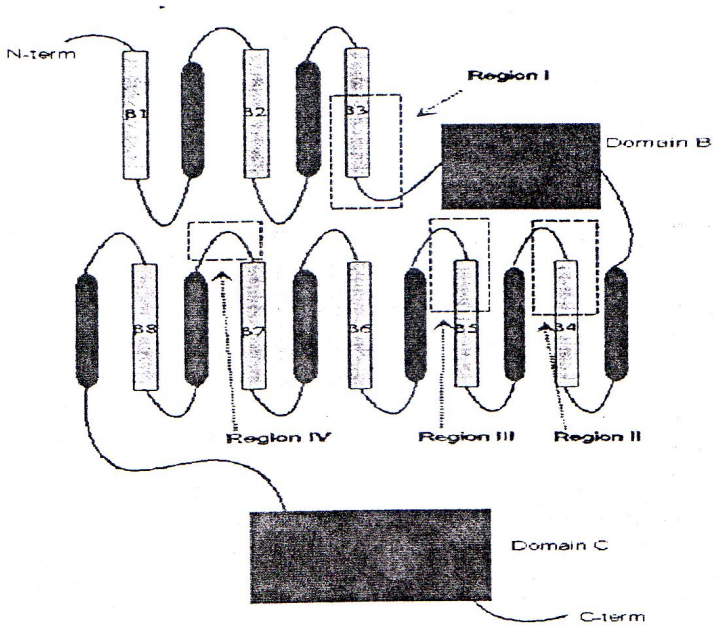
سوبستراهای مختلفی عمل می کنند و تنها وجه مشترک سوبستراهای آنزیمهای مختلف در پیوند گلوکز با زیر واحد ۱– می باشد . بنابراین باید شباهت زیادی بین اسید آمینه های این زیر واحدها وجود داشته باشد (۵۹) .



شکل۳-۱: آرایش شماتیک زیر جایگاهها که از زیر جایگاه ۵- تا ۳+ توسط الیگوساکاریدها اشغال شده است. شکست بین زیر جایگاه ۱-و۱+ که با فلش نشان داده صورت می گیرد. آخرین گروه احیایی در زیر جایگاه۳+ قرار گرفته است.

٤-۳-۱-۱) مناطق حفاظت شده در ساختار آنزیم

در توالی α – آمیلاز ها حداقل ٤ منطقه حفاظت شده وجود دارد (I-IV) که این مناطق در رشته های $\beta_{۲},\beta_{۴},\beta_{۵}$ لوپ متصل کننده رشته $\beta_{۷}$ هلیکس $\alpha_{۷}$ قرار گرفته اند (شکل ٤-۱)



شکل۴-۱: دیاگرام توپولوژی α آمیلازها-موقعیت چهار منطقه حفاظت شده توسط مستطیل با خط تیره نشان داده شده است.

منطقه I : در انتهای C ترمینال سومین رشته بتا در TIM barrel قرار گرفتـه اسـت . ایـن منطقـه حاوی سه اسید آمینه حفاظت شده Asp100 , Asn104 , His105 می باشد . Asp100 برای پایداری جایگاه فعال مهم می باشد و با Arg229 پیوند هیدروژنی می دهد(٦٩) . Asn104 بـه طـور مـستقیم در پایداری ساختار جایگاه فعال نقشی ندارد ولی در قرار گیری یون کلـسیم بـین دمینهـای B,A نقـش دارد (٨و٦٢) His105 اینتراکشن بین c ترمینال β_2 و بقیهTIM barrel را از طریق پیوندهای هیـدروژنی بـا Asn104 , Tyr56 که در لوپ متصل کننده β_2 به α_2 قرار گرفته است ، پایدار می کند . این اسید آمینه با زیر واحدهای گلوکز در سوبسترا اینتراکشن می دهد .(٦٩) .

منطقه II : در β_4 قرار گرفته اسـت و حـاوی Asp231 , Arg229 مـی باشـد . Asp231 بـه عنوان نوکلئوفیل عمل می کنـد و ایـن دو اسـید آمینـه در تمـام α- آمیلازهـا وجـود دارنـد و در فعالیـت کاتالیتیک نقش دارند . (٨٧) .

His235 , Lys234 نیز در این منطقه هستند . ایـن دو اسـید آمینـه بخـشی از زیـر جایگـاه ٢+ هستند و تصور می شود که به انتهای احیایی زنجیره گلوکز متصل می شوند (٦٩) .

منطقه III : حاوی Glu261 به عنوان دهنده پروتون می باشد که در بخشهای C ترمینال رشته β_5 قرار گرفته است . Glu261 تنها اسید آمینه حفاظت شده در این منطقه است .

منطقه IV : در لوپ متصل کننده β_7 به α_7 قرار گرفته است و جایگاه فعال را از حلال دور نگـه می دارد . تنها اسید آمینه حفاظت شـده در ایـن منطقـه Asp328 مـی باشـد . , Val324 , Asn326 Phe328 نیز اغلب مشاهده می شوند . Asp328 در اتصال سوبـسترا تغییـر شـکل سوبـسترا و افـزایش pK_a گلوتامات ٢٦١ نقش دارد (٤٠و٤٨و٨٤) . Janeck (٤١و١٠٠) پیشنهاد کرده است که علاوه بر ایـن چهـــار منطقـــه حفاظـــت شـــده دو منطقـــه حفاظـــت شـــده دیگـــر در ســـاختار α- آمیلازها وجود دارد . یکی از آنها شامل Asn می باشد کـه در قـرار گیـری یـون کلـسیم نقـش دارد منطقه دیگر منطقه لولایی در دمین B می باشد (٦٩) .

٤-١-١) مکانیسم عمل آنزیم

پیوند α- گلیکوزیدی بسیار پایدار است و سرعت هیدرولیز خود به خودی این پیونـد در دمـای اتاق $2\times10^{-15}S^{-1}$ می باشد (٢٠) . اعضای خانواده α- آمیلازها سرعت واکنش را به حد زیادی افـزایش می دهند به گونه ای که این آنزیمها از موثرترین آنزیمها می باشند . مکانیسم کاتالکتیک خانواده α- آمیلاز جانشینی دوگانه با حفظ کنفیگوراسیون α می باشد (٩٤) . در نتیجه واکنش از شکـست سوبـسترا انتهـای

احیایی آزاد می شود که کنفگوراسیون[1](شکل) α دارد . همه گلیکوزیل هیدرولاز ها دارای این مکانیسم کاتالکتیک هستند و در طی اولین جانشینی گروه اسیدی در ساختار آنزیم ، اکسیژن پیوند گلیکوزیدی را پروتونه می کند و سبب شکست پیوند C—O می شود. ساختار گذاری اکسونیوم یون دوست ایجاد می شود (۲۰و۵۸و۹۳) گروه اسیدی نوکلئوفیل آنزیم به مرکز آنومری قند حمله می کند و حد واسط β- گلیکوزیل – آنزیم را شکل می دهد و درهمین زمان آگلوکان سوبسترا جایگاه فعال را ترک می کند . درهیدرولیز در طی دومین جانشینی مرحله بالا بر عکس می شود و بدین گونه مولکول فعال شده آب توسط فرم کربوکسیلات اسید آمینه پروتون دهنده قبلی به مرکز آنومر حمله می کند . دومین مرحله واکنش از طریق حالت گذاری یون دوست همانند قبل ادامه می یابد و محصولی با کنفیگوراسیون α ایجادمی شود و گروه اسیدی نیز دوباره پروتونه می شود . اگر در دومین واکنش جانشینی به جای آب گروه هیدروکسیل آزاد قند حمله کند واکنش ترانس گلیکوزیلاسیون صورت می گیرد (۹۲و۹۳) (شکل ۵-۱) در Glu230 Taka-amylase به عنوان دهنده پروتون Asp206 به عنوان نوکلئوفیل عمل می کند و دارای Asp207 حفاظت شده می باشدکه به نظر می رسد در پایداری حالت گذاری اکسوکربنیم یوندوست و همچنین حفظ Glu در وضعیت صحیح پروتون دهی برای فعالیت نقش دارد.His 122، His296 در جایگاه ۱- مهم می باشند و نقش آنها هنوز کاملاً مشخص نشده است.

۵-۱-۱) خصوصیات خانواده ۱۳ آمیلازها

همه آنزیمهای این گروه در خصوصیات زیر مشترک هستند

۱-روی پیوندهای α - گلیکوزیدی عمل می کنند .

۲- پیوندهای α - گلیکوزیدی را هیدرولیز می کنند و منو یا الیگوساکارید α - آنومری ایجاد می کند و یا با ترانس گلیکوزیلاسیون پیوند α - گلیکوزیدی ایجاد می کنند .

۳- همه آنها دارای (β/α) یا TIM barrel هستند .

٤- همه آنها دارای ٤ منطقه حفاظت شده در توالی اولیه خود هستند که شامل جایگاه های اتصال سوبسترا می باشند .

۵- در جایگاههای کاتالیتیک خود اسید آمینه Asp , Asp , Glu دارند . این سه اسید آمینه در جایگاه های کاتالیتیک بسیاری از آنزیمها مشاهده شده است . (۹٤) .

[1] Configuration

۱-۱-٦) خصوصیات بیوشیمایی α - آمیلازها

خصوصیات α - آمیلازها مانند پایداری حرارتی و pH آنها مطابق با کاربردشان می باشد . بنابراین تنوع کاربردها و مصارف ، نیاز به جستجوی α - آمیلازها ی جدید با خصوصیات بهتر را توجیح می کند . میزان هیدرولیز نشاسته توسط α - آمیلاز به بسیاری از شرایط pH دما ، سوبسترا ، غلظت سوبسترا ، غلظت آنزیم حضور یونهای ca^{2+} و سایر عوامل پایدار کننده بستگی دارد (۸۲) .

۱-۱-٦-۱) دمای مناسب برای پایداری و فعالیت آنزیم

دمای مناسب برای فعالیت α - آمیلازها متناسب با رشد میکروارگانیسم می باشد (۹۷) . کمترین دما برای فعالیت آنزیم 30^0c-25^0C برای آمیلاز *F.Oxysporum* (۱۲) و بیشترین دما 100^0C-130^0Cبرای آرکی باکتریهای *Pyrococcus Furiosus , Dyrococcus woesi* گزارش شده است (۲٤و۲٦و۷۷) .

در برخی از آمیلاز ها دمای بهینه به وجود ca^{2+} (٦۸) و در برخی دیگر به نمک NaCl وابسته می باشد (۷۰) . عوامل زیادی روی پایداری حرارتی آنزیم تاثیر می گذارد . این عوامل شامل حضور کلسیم سوبسترا و سایر پایدار کننده ها می باشد (۹۷) .

۲-۱-٦-۱) pH مناسب برای فعالیت و پایداری آنزیم

pH مناسب برای α - آمیلازها از ۲ تا ۱۲ متغیراست (۹۷) . pH بهینه آمیلازهای بیشتر باکتریها و قارچها در محدود اسیدی تا خنثی می باشد (۷۰) . α - آمیلاز اسیدی در pH اسیدی ۳ و α - آمیلاز قلیایی در محدوده pH ۹-۱۰/۵ فعالیت می کند . معمولاً α - آمیلازها در محدوده وسیعی از PH ٤ تا ۱۱ پایدار هستند ولی α - آمیلازها با پایداری در محدوده کم نیز گزارش شده است . (٦۸) .

۳-۱-٦-۱) اثر یونهای فلزی

بیشتر آمیلاز ها آنزیمهای وابسته به یون فلزی می باشند و به فلزهای دوظرفیتی مانند $ca^{2+},Mg^{2+},Mn^{2+},Zn^{2+},Fe^{2+}$ نیازمند می باشند (۷۰) تمایل ca^{2+} به α- آمیلاز ها بیشتر از سایر یونها می باشد .

مقدار کلسیم متصل شده از ۱ تا ۱۰ متغیر می باشد در برخی سیستمها معمولاً یک یون ca^{2+} کافی است تا آنزیم را پایدار کند . می توان با دیالیز کردن آمیلازها علیه EDTA و یا الکترولیز ca^{2+} را جدا کرد . آنزیم فاقد ca^{2+} می تواند با اضافه کردن یونهای ca^{2+} فعال شود . علاوه بر این حضور ca^{2+} پایداری حرارتی آمیلاز را افزایش می دهد (٦۸) .

٤-٦-١-١) مهار کننده ها

بسیاری از کاتیونهای فلزی به خصوص یونهای فلزات سنگین مواد موثر روی گروه سولفیدرل n- برمو سوکسینامید و p- هیدروکسیل مرکور بنزوئیک اسید ،یداستات EGTA , EDTA , BSA مهارکننده α- آمیلاز ها هستند . (٦٨)

٥-٦-١-١) وزن مولکولی

وزن موکلولی α- آمیلاز ها از ١٠-٢١٠ کیلو دالتون متغیر است . کمترین مقدار ١٠ کیلو دالتون برای *bacillus caldolyticus* (٧٥) و بیشترین ٢١٠ کیلو دالتون برای *Chloroflexus aurantiacus* گزارش شده است . (٩٨) با آنالیز ژنهای کلون شده α- آمیلاز ها و توالی اسید آمینه ها نشان داده شده است که وزن مولکولی آمیلازهای میکروبی حدود ٥٠-٦٠ کیلو دالتون می باشد (٩٧) وزن گلیکوپروتئین در ساختار آمیلازها وزن مولکولی آنزیم را افزایش می دهد ولی آنزیمهای باکتریایی بندرت گلیکوزیل می باشند (٦٨) .

٧-١-١) منابع α- آمیلاز ها

α- آمیلاز ها تنها آنزیمهایی هستند که توسط گیاهان حیوانات ، میکروارگانیزمها تولید می شوند و نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدراتها دارند . آمیلازها با منشا گیاهی و میکروبی چندین قرن به عنوان افزودنی مواد غذایی استفاده می شوند . در چند دهه اخیر تحقیقات قابل توجهی روی α- آمیلاز های خارج سلولی که توسط انواع میکروارگانیزمها تولید می شوند صورت گرفته است . مزیت اصلی استفاده از میکروارگانیزمها برای تولید آمیلازها توانایی تولید بالای این آنزیم توسط میکروارگانیزمها می باشد . علاوه بر این می توان به راحتی تغییراتی در میکروبها به وجود آورد که بتوانند آنزمیهایی با خصوصیت مورد نظر را تولید کنند (٦٨) .

از میان جنس *bacillus sp* به دلیل تولید α- آمیلاز مقاوم به حرارت به صورت وسیعی در صنعت استفاده می شود . *B.amyloliquefaciens* , *B.Stearothermophlius* , *B.licheniformis* از تولید کننده های خوب α- آمیلاز ها هستند و به طور وسیعی از این باکتریها برای تولید تجاری این آنزیم بری مصارف مختلف استفاده می شود. از قارچها نیز به عنوان تولید کننده α- آمیلاز استفاده می شود . (٣٧) .

١-٧-١-١) تولید انواع آمیلازها در میکروارگانیزمهای مختلف

خصوصیات آنزیمهای هیدرولیز کننده نشاسته و سایر پلی ساکاریدها متغیر است و به محیط ارگانیزم تولید کننده آنزیم بستگی دارد (٩٨) . این موضوع به خصوص در مورد آمیلازهای میکروبی صادق

است و بر اساس این کـه توسـط باکتریهـای مزوفیـل[1] و اکتـسرموفیل[2] دسـته بنـدی مـی شـوند آنزیمهـای اکسترموفیل آنهایی هستند که توسط میکروارگانیزمهای گرمادوست[3] ، سرمادوست[4]، قلیـا[5] ، اسـید[6] و نمـک دوست [7]تولید می شوند . فشار هیدروستاتیک بالا نیز عامل محیطی دیگری می باشد و میکروارگانیـسمهایی که می توانند . در این شرایط زندگی کنند را فشار دوست[8] می نامند . علاوه بر این مقاومت آنزیم نسبت بـه حلالهای آلی از خصوصیات جالب فیزیکوشـیمیایی آنـزیم اسـت (۳۲) . برخـی از آنزیمهـای اکتـسرموفیل ممکن است ترکیبی از خصوصیات مانند پایداری در حرارت بالا و اسید دوسـتی را نـشان دهنـد (۷٦) کـع عمدتا این دسته از آنزیمها توسط آرکی ها تولید می شوند . (۷۵) در کل آنزیمهای قارچها پایداری بیـشتری در برابر اسیدها دارند در صورتی که آمیلازهای باکتریایی حرارتی بیشتری دارنـد . میکروارگانیـسمهای پیـدا شده است که بهترین منبع آمیلازها هستند و آنزیمهای آنها در شرایط اکستریم خصوصیات نرمـال خـود را دارند (۹۸) . این میکروارگانیزمها عبارتند از :

۱- میکروارگانیزمهای گرمادوست : این میکروارگانیزمها در دمای بالاتر از ^{C} ٦۰۰ رشد می کننـد و نوع بسیار گرمادوست آنها در دمای بالای ^{C} ۸۰۰ رشد می کنند و آنزیمهـایی تولیـد مـی کننـد کـه در برابـر حرارت مقاوم هستند . آنزیمهای آمیلاز با مقاومت حرارتی بالا افقهای جدیدی در میکروبیولوژی ، بیوشیمی ، بیوتکنولوژی باز می کنند (۹٦) . اهمیت این آنزیمهای در این است کـه در دماهـای بـالا پایـدار و فعـال هستند . در دمای بالا حلالیت بسیاری از ترکیبات واکنش به خصوص سوبستراهای پلیمری افزایش می یابد . همچنین در دمای بالا خطر آلودگی با ترکیبات ناخواسته کاهش می یابد(۹٦) . نکته قابل توجـه اسـت کـه برخی ارگانیزمهای بسیار گرمادوست دارای آنزیمهای α- آمیلاز ی هستند که از لحاظ مولکـولی بـا سـایر آمیلازها تفاوت دارند . نمونه آن آنزیم گرمادوست از باکتری *Dictioglomus thermophilus* (۲۵) و آرکی بسیار گرمادوسـت *Pyrococcus furiosus* (٥٤) مـی باشـد کـه تـوالی ایـن آنزیمهـا همولـوژی واضحی با آمیلازهای خانواده جدید ۵۷ از دسته گلیکوزید هیدرولازها دارد .

۲- میکروارگانیزمهای سرمادوست : این میکروارگانیزمها در دمای کمتر از^{C}۱۵۰ رشد می کنند ایـن میکروارگانیزمها از لحاظ دمایی سازگاری زیادی دارند و میتوانند در دماهای نسبتاً پـایین و یـا دماهـایی کـه مناسب میکروارگانیزمهای مزوفیل می باشد رشد کنند (۳٤) آنزیمهای این میکروارگانیزمهـا بـه دلیـل انـرژی مصرفی کم در صنایع دارای اهمیـت هـستند . بـه عنـوان مثـال تمایـل زیـادی بـرای اسـتفاده از آنزیمهـای

---

[1] Mesophiles
[2] Extermophiles
[3] Thermophiles
[4] Psychrophiles
[5] Alkaliphiles
[6] Acidophiles
[7] Halophiles
[8] Barophile

سرمادوست در مواد شوینده وجود دارد . آمیلازهای سرمادوست دارای اهمیت تجاری هستند و در صنایع کاغذ سازی آمیلازهای با دمای پائین دارای اهمیت هستند (۹٦) یک نمونه آمیلاز سرمادوست متعلق به *Altermonus haloplancis* می باشد که دمای بهینه فعالیت آن بین ^{C}۲۰۰-^{C}۳۰۰ می باشد گرچه از لحاظ ساختار سه بعدی مشابه α- آمیلاز با ساختار TIM barrel می باشد (۲) .

در دو مطالعه جداگانه نشان داده شده است (۲۲و٤۲) که این آنزیم توالی بسیار مشابه به α- آمیلاز های جانوری دارد و این آنزیم ارتباط نزدیکی با α- آمیلاز بزاق و پانکراس انسانی دارد .

۳- میکروارگانیسمهای اسید دوست : میکروارگانیزمهای اسید دوست می توانند با شرایط اسیدی و رشدر در pH های ۱-٤ سازگاری پیدا کنند و pH سیتوپلاسمی خود را در حد خنثی نگه دارند (٦٦) بنابراین آنزیمهای درون سلولی این میکروارگانیزمها نیازی ندارد با شرایط اکستریم سازگاری پیدا کنند ولی این امر در مورد آنزیمهای خارج سلولی صادق نمی باشد و باید در محیط با pH پائین فعالیت کنند (۹٦) . برخی از این میکروارگانیزمها دارای آنزیمهای آمیلاز پایدار در محیط اسیدی هستند. گرچه بیشترین α- آمیلاز اسید دوست احتمالا آمیلاز جدا شده از باکتری گرمادوست و سرمادوست *Bacillus sp.11-15* با pH بهینه ۲ می باشد (۹۱) α- آمیلاز ی که مطالعات بیشتری روی آن صورت گرفته است متعلق به *Aricyclobacillus acidocaldarius* با pH بهینه ۳ می باشد (۸۰ و ٥) .

٤- میکروارگانیزمهای قلیا دوست : این میکروارگانیزمها در pH های بالا رشد می کنند به عنوان مثال آمیلو پلولاناز قلیایی از باکتری قلیا دوست *bacillus sp.Ksm – 1378* گزارش شده است (۳) که شامل ۲ دمین عملکردی می باشد . یک دمین در فعالیت آمیلاز و هیدرولیز پیوند (٤-۱) α و دیگری در فعالیت پلولاناز و هیدرولیز پیوند (٦-۱) α نقش دارد .

٥- میکروارگانیزمهای فشار دوست : این میکروارگانیزمها در عمق دریا که فشاری بیش از ۱۲۰Mpa می باشد زندگی می کنند (۳۲) پروتئینهای مقاوم به فشار در صنایع غذایی که فرآیندهای استریل کردن مواد غذایی نیازمند فشار بالایی است قابل توجه هستند (۹٦) تاکنون هیچ گزارشی در موردآمیلازهای فشار دوست باکتریایی وجود ندارد ولی فعالیت و پایداری α- آمیلاز های فشار دوست قارچها و حیوانات بررسی شده است (٦۳ و ٦۷) .

٦- میکروارگانیزمهای نمک دوست : این دسته از میکروارگانیزمها برای رشد خود نیازمند نمک هستند. با توجه به دسته بندی Kushner (۱۹۷۸) به ٤ دسته تقسیم می شوند .

۱- نمک دوست کم[1] : در محیط حاوی W/V ۳٪ نمک رشد می کنند بسیاری از موجودات دریایی از این دسته هستند .

۲- نمک دوست متوسط[1] : شرایط مطلوب برای رشد انها غلظت ۳٪ - ۱٥٪ نمک است .

[1] Slight halophiles

۳- نمک دوست افراطی[۲] : در غلظت ۲۵٪ نمک رشد می کنند .

٤- نمک دوست افراطی اجباری[۳] : حداقل به ۱۲٪ نمک نیاز دارند (٦٥) .

آنزیمهای این میکروارگانیزمها دارای تعداد زیادی اسید آمینه با بار منفی روی سطح خود هستند که مانع رسوب آنها می گردد و در محیطهای با غلظت نمک پائین حلالیت آنزیمهای هالوفیل بسیار پائین است که کاربرد آنها را محدود می کند (٦٤) . باکتری نمک دوست *Halomonas meridian* دارای آنزیم α- آمیلاز می باشد که این آنزیم در غلظت ۳٪ نمک فعالیت دارد و از لحاظ توالی مشابه α- آمیلاز های جانوری می باشد (١٦) همچنین باکتری *Natronococcus sp Ah-36* دارای انزیم α- آمیلاز می باشد (٥١) که این آنزیم در غلظت ۲/۵ مولار فعالیت دارد .

۸-۱-۱) کاربرد آلفا آمیلازها

آمیلازها از مهمترین آنزیمهای هیدرولیز کننده در صنایع می باشد و استفاده تجاری از آمیلازها اولین بار در سال ١٩٨٤ به عنوان دارو برای درمان ناراحتیهای گوارشی صورت گرفته است . امروزه از آمیلازها برای هیدرولیز نشاسته در فرآیندهای صنعتی مانند صنایع غذایی ، مواد شوینده ، نساجی و کاغذ سازی استفاده می شود . در این زمینه آمیلازهای میکروبی کاملا جایگزین هیدرولیز کننده های شیمیایی شده اند . علاوه بر این دارای پتانسیل استفاده در داروسازی و صنایع تصفیه شیمیایی هستند این آنزیمها بخش بزرگی از بازار آنزیمها را به خود اختصاص داده اند .

۱-۸-۱-۱) صنعت تهیه نان

در تولید نان دو گروه از آنزیم ها هستند که نقش مهمی را ایفا می کنند . ۱- آنزیمهای که نشاسته را می شکنند ۲- پنتوسانازها

آنزیمهایی که نشاسته را می شکنند شامل الفا و بتا آمیلازها ، دیاستاز و گلوکوآمیلازی می باشند که در نتیجه فعالیت آنها هیدرولیز بهتر صورت گرفته ودر نهایت خمیر شدن و کیفیت نان کنترل می گردد . (٤٤)

در صنعت تهیه نان برای تولید محصولات متنوع با کیفیت مناسب از آنزیمها استفاده می کنند . حضور آنزیمها در نان باعث می شود که محصولاتی با حجم بیشتر رنگ بهتر و نرمتر تولید شود. اضافه کردن آلفا آمیلازها به آرد نه تنها سرعت تخمیر را افزایش می دهد بلکه ویسکوزیته خمیر را کاهش می دهد که علاه بر بهبود حجم و بافت محصول قندهای اضافی در محصول ایجاد می کند که رنگ طعم و

---

[1] Moderate halophiles
[2] Extreme halophiles
[3] Borderline extreme halophiles

کیفیت نان را بهتر می کند . یکی از کاربردهای جدید امیلازها کاهش بیات شدن محصولات پخته شده می باشد که سبب کاهش مدت نگهداری نان می شود . تغییرات نامطلوب در نان مانند خشک و سفت شدن نان و تغییر در طعم نان را بیات شدن می نامند . افزودنی های متعددی استفاده می شود تا مانع این امر گردد و سبب بهبود طعم و مزه شود (٦٨) .

٢-٨-١-١) استفاده از آمیلازها به عنوان هضم کننده نشاسته و شیرین کننده

کاربرد اصلی آلفا آمیلازها در تولید هیدرولیز محصولاتی مانند گلوکز و فروکتوز از نشاسته می باشد . نشاسته به شربتهایی با میزان فروکتوز بالا [1](HFCS) تبدیل می شود. به دلیل خصوصیت شیرین کنندگی بالا به میزان زیادی در صنایع تولید نوشیدنی استفاده می شود. برای فرایند هضم نشاسته نیاز به آلفا آمیلاز با پایداری حرارتی بالا می باشد.(٦٨)

٣-٨-١-١) صنایع نساجی

در فرایند های جدید در صنعت نساجی فشار قابل توجهی بر تار و پود پارچه در طی بافتن وارد می شود. بنابراین باید به نحوی مانع پاره شدن نخ شد. بدین منظور یک لایه محافظ و قابل برداشتن روی نخ قرار داده می شود این مواد محافظ آهار نامیده میشود و از نشاسته به عنوان آهار استفاده می شود. دلیل استفاده از نشاسته ،ارزان بودن ،در دسترس بودن و برداشتن راحت نشاسته از روی پارچه می باشد. برای حذف نشاسته از روی پارچه از الفا آمیلاز ها استفاده می کنند که به صورت انتخابی آهار را حذف می کنند و به فیبرها آسیب وارد نمی کند. آلفا آمیلاز نشاسته را به صورت تصادفی به دکسترین می شکنند که دکسترین محلول در آب می باشد و با شستشو می توان آن را برداشت.(٦٨)

٤-٨-١-١) صنایع کاغذ سازی

همانند صنایع نساجی در کاغذ سازی برای محافظت کاغذ از آسیبهای مکانیکی در طی مراحل مختلف از اهار استفاده می شود آهار کیفیت نهایی کاغذ را بهبود می بخشد ،استحکام کاغذ و قابلیت پاک کردن را افزایش می دهد، پوشش مناسبی برای کاغذ است . نشاسته به عنوان یک اهار خوب برای کاغذ نهایی می باشد در طی مراحل تولید کاغذ، کاغذ از درون محلول نشاسته با ویسکوزیته مشخص در دمای ٤٥-٦٠ عبور داده می شود .ویسکوزیته نشاسته برای اهار بسیار بالا است و در یک فرایند پیوسته توسط آلفا آمیلاز تا حدودی هیدرولیز می شود. شرایط هیدرولیز به منبع نشاسته و آلفا آمیلاز مورد استفاده بستگی دارد.(٦٨)

[1] High fructose corn syrup

۵-۸-۱-۱) صنایع شوینده

امروزه یکی از اجزای شوینده های جدید ،آنزیمها می باشد آنزیمها سبب بهبود شرایط استفاده از شوینده ها و کاهش دمای شست و شو می شوند. از سال ۱۹۷۵ از آلفا آمیلاز ها در پودر های شوینده استفاده شده است . امروزه ۰/۹۰ مواد شوینده مایع ، حاوی آلفا آمیلاز می باشد. یکی از محدودیتهای استفاده از آمیلاز ها در شوینده ها حساسیت آمیلازها به کلسیم و کاهش پایداری آنزیم در محیط با کلسیم کم می باشد همچنین آمیلاز ها به اکسیدانتهایی که در تهیه مواد شوینده مصرف می شود حساس هستند. اخیراً محققین دو شرکت بین المللی تهیه آنزیم های مواد شوینده با استفاده از مهندسی پروتئین پایداری آمیلاز ها را افزایش داده اند .آنها اسید آمینه های حساس به اکسیداسیون را با سایر اسیدآمینه جایگزین کردند در آمیلاز *B.licheniformis* لوسین را جایگزین متیونین در موقعیت ۱۹۷ کرده اند که این امر سبب پایداری بهتر آنزیم در هنگام نگهداری می شود و می توان از این آنزیم جهش یافته در شوینده های حاوی مواد اکسیداتیو استفاده کرد.(٦٨)

۲-۱) استراتژیهای تخلیص

برای اینکه بتوانیم یک پروتئین را به خوبی تخلیص کنیم باید موارد زیر را در نظر بگیریم:

۱- تعیین هدف: باید دانست پروتئین تخلیص شده ،چه استفاده و کاربردی دارد وبا چه درجه خلوصی مورد نیاز است.

۲- بدست آوردن اطلاعاتی در مورد پروتئین و ناخالصیهای پروتئین : می توان اطلاعات درستی در مورد خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین از کتابها ، مقالات سایر منابع در دسترس بدست آورد .با مشخص نمودن ناخالصیهای پروتئین میتوان مراحل تلخیص را به گونه ای طراحی کرد که بتوان به طور موثری آلودگی ها را از پروتئین مورد نظر جدا کرد.

۳- انتخاب روشی مناسب برای ارزیابی فعالیت زیستی پروتئین : باید یک روش سریع و قابل اطمینان برای تعیین کیفیت و فعالیت زیستی پروتئین انتخاب کرد.

٤- انتخاب منبع پروتئین : باید منبعی انتخاب کرد که دارای غلظت بالایی از پروتئین مورد نظر در یک محیط پایدار باشد .

۵- استخراج پروتئین: باید روشهای مناسب برای استخراج پروتئین انتخاب کرد.

٦-تعیین مراحل تخلیص: باید روشهای مناسب تخلیص اولیه (Capture) ، تخلیص متوسط (Intermediate) و تخلیص نهایی (Polishing) را مشخص کرد.

۱-۲-۱) اهداف تخلیص

تخلیص پروتئین فرایندی است که نیاز به زمان ، هزینه، تلاش ، دستگاهها و تجهیزات مناسب دارد . بنابراین بهتر است که همیشه قبل از شروع کار ، ابتدا دلایل تخلیص را در نظر گرفت . در هر تخلیصی باید این قانون طلایی را مد نظر داشت . هیچ وقت بیش از حد نیاز نهایی نباید تخلیص کرد.دلایل عمده تخلیص پروتئین ممکن است:

۱- تعیین عملکرد پروتئین (به عنوان مثال آنزیم)

۲- تعیین ساختار پروتئین

۳- استفاده از انزیم برای تولید محصول مورد نظر به عنوان بخشی از پروژهای تحقیقاتی

٤- تهیه یک محصول تجاری مانند دارو (۵۱)

۲-۲-۱) تعیین خصوصیات پروتئین هدف

اطلاعاتی در مورد خصوصیات و عملکرد پروتئینی که باید خالص شود از جمله وزن مولکولی ، نقطه ایزوالکتریک ،هیدروفوبیسیته ، حضور کربوهیدراتها ، تمایل به سوبستراها ، حساسیت به یونهای فلزی می تواند در طی مراحل تخلیص به ما کمک شایانی کند.(۵۱)

در مرحله بعد باید اطلاعاتی در مورد پایداری پروتئین در pH ها و دماهای مختلف ، در حضور حلالهای آلی و یونهای فلزی سنگین و پروتئازها به دست آورد. اگر شرایط پایداری پروتئین مشخص باشد انتخاب تکنیکهای تخلیص راحت تر خواهد بود و می توان در طی مرحله خالص سازی مانع از غیر فعال شدن پروتئین شد.(۸۱)

۳-۲-۱) انتخاب روشهایی برای اندازه گیری فعالیت پروتئین

ضروری است بعد از هر مرحله تخلیص میزان خلوص نمونه ، میزان پروتئین کل و پروتئین هدف، فعالیت زیستی پروتئین را مشخص کرد.

میزان کل پروتئین با استفاده از جذب در ۲۸۰ nm (جذب فوتونهای نور توسط الکترونهای اسید امینه آروماتیک مانند فنیل آلانین ، تیروزین ، تریپتوفان) و یا جذب باندهای پپتیدی پروتئینها در ۲۱۰ nm مشخص می شود ولی از طول موج ۲۱۰nm کمتر استفاده می شود. با استفاده از روش برادفورد و لوری که برای تعیین غلظت پروتئین است میتوان میزان پروتئین کل را تعیین نمود.(۸۱ و۸۵) تعیین فعالیت در فرایند تخلیص آنزیم کار معمولی میباشد و شامل اضافه نمودن آنزیم به سوبسترا در محلول بافری با pH و دمای استاندارد می باشد.