گروه زيست شناسي
دانشكده علوم

عنوان پايان‌نامه:

مطالعه مولكولي آنزيم آميلاز حاصل از ايزوله‌هاي باسيلوس

استاد راهنما:
دكتر صابر زهري

اساتيد مشاور:
دكتر اسداله اسدي
دكتر سيد مهدي رضوي

توسط:
خوشه خياطي

پائيز 1389

نام خانوادگي دانشجو : خياطي
نام : خوشه

عنوان پايان نامه : مطالعه خواص مولكولي آنزيم آميلاز حاصل از ايزوله‌هاي باسيلوس

استاد راهنما : دكتر صابر زهري **اساتيد مشاور :** دكتر اسداله اسدي و دكتر سيد مهدي رضوي

مقطع تحصيلي : كارشناسي ارشد **رشته :** زيست شناسي
گرايش : علوم سلولي و مولكولي
دانشگاه : محقق اردبيلي **دانشكده :** علوم **تاريخ فارغ التحصيلي :** 89/7/14 **تعداد صفحه :** 118

كليد واژه ها : باسيلوس، α ـ آميلاز، آلژينات

چكيده :

α ـ آميلاز آنزيمي است كه داراي اهميت زيادي در مصارف صنعتي مي‌باشد. α ـ آميلازهاي گرمادوست داراى كاربردهاي تجاري زيادي در مراحل گدازش نشاسته، توليد قند، آهارزدايي در صنايع نساجي و در مراحل توليد شوينده هستند. آميلازها از منابع مختلفي به‌دست مي‌آيند. آن‌ها معمولا از باكتري‌هاي متعلق به جنس باسيلوس براي كاربردهاي صنعتي جدا مي‌گردند. در اين تحقيق ايزوله‌ي جداشده از خاك‌هاي اطراف چشمه‌هاي آبگرم دامنه‌هاي سبلان مورد بررسي‌هاي مولكولي قرار گرفت و به باسيلوس سرئوس نام‌گذاري شد. اين باكتري قادر به توليد آنزيم α ـ آميلاز KZ1 با خصوصيات قابل قبول بود كه توسط روش رسوب با آلژينات برابر SDS-PAGE تخليص گرديد. وزن مولكولي اين آنزيم توسط روش با 35 كيلودالتون تخمين زده شد. اين آنزيم قادر به فعاليت در بهينه براي آن در دماي بهينه-pH از 6 تا 12 بود كه pH گستره‌ي 70 درجه‌ي سانتي‌گراد برابر 11 تعيين شد. فعاليت آنزيم توسط مهار شد و EDTA و H_2O_2 و مواد Ca^{2+} و Na^{+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ba^{2+} يون‌هاي و فعاليت ويژه‌ي k_m افزايش يافت. ميزان $Co^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}$ توسط يون‌هاي آنزيم در مقابل مصرف نشاسته‌ي محلول به‌عنوان سوبسترا، به‌ترتيب 992/2 اندازه‌گيري شد. به‌علت خصوصيات 10/4 U/mg و mg/ml بالا از pH بيوشيميايي خوب آنزيم مانند مقاومت به دماي بالا و اين آنزيم براي مصارف صنعتي مانند صنايع شويندگي و كاغذسازي وهمچنين در صنايع دارويي مي‌توان بهره برد.

۱ ـ مقدمه

۱ ـ 1 ـ معرفي آميلازها

آميلازها آنزيم‌هايي هستند كه مولكول‌هاي نشاسته را به محصولات مختلفي مانند گلوكز يا پليمرهاي كوچك تشكيل شده از واحدهاي گلوكز، تجزيه مي‌كنند. اين آنزيم‌ها داراي اهميت زيادي در بيوتكنولوژي امروز، با كاربردهاي مختلفي در صنايع غذايي، تخمير، نساجي و كاغذسازي هستند. آميلازها از منابع مختلفي شامل گياهان، جانوران و ميكروارگانيزم‌ها به‌دست مي‌آيند، آنزيم‌هاي ميكروبي معمولا در صنعت كاربرد زيادي دارند. امروزه تعداد زيادي از آميلازهاي ميكروبي به صورت تجاري در دسترس هستند و تقريبا به‌طور كامل توانسته‌اند جاي هيدروليز شيميايي نشاسته را در صنعت توليد نشاسته بگيرند (1).

تاريخچه‌ي استفاده از آميلازها به‌سال ۱۸۱۱ برمي‌گردد، زماني‌كه اولين آنزيم تجريه كننده‌ي نشاسته توسط كيرچهف[1] كشف شد. سپس چندين گزارش ديگر از آميلازهاي گوارشي و آميلازهاي تخمير جو به‌دست آمد. بعد از مدت زيادي در سال ۱۹۳۰، اهلسن[2] طبقه‌بندي آنزيم‌هاي تجزيه كننده‌ي نشاسته را در آبجوسازي به‌صورت آميلازهاي α و β بر اساس نوع آنومري قند توليد شده توسط واكنش آنزيمي، پيشنهاد كرد. α ـ آميلاز (۱ و ٤ ـ α ـ D ـ گلوكان ـ گلوكانو هيدرولاز، EC. 3.2.1.1) يك آنزيم با توزيع گسترده است. α ـ آميلازها با منابع متفاوت به‌طور گسترده مطالعه شده‌اند (1).

α ـ آميلاز، پيوندهاي α ـ ۱ ، ٤ ـ گليكوزيدي را در ميان زنجيره‌هاي پلي‌گلوزيدي نشاسته، آميلوپكتين و دكسترين هيدروليز مي‌كند. درون لوله گوارشي جانوران، α ـ آميلاز در دپليمريزاسيون α ـ گلوكان‌هاي درون غذا و تبديل آن‌ها به‌دكسترين و نهايتا به‌اليگوگلوسيدهاي

[1] kirchhoff
[2] ohlsson

محلول شرکت‌می‌کند. درگیاهان α_ آمیلاز هیدرولیزگرانول‌های نشاسته را شروع می‌کند (2).

مسیر گلیکولایتیك و چرخه‌ي تري‌کربوکسیلیک‌اسید، نمونه‌هایي از مسیرهاي تولید انرژي در سلول هستند. تفاوت‌هاي زیادي در مورد این مسیر در بین موجودات مختلف وجود دارد ولي آنزیم‌هاي اصلي هر دو مسیر گلیکولیز و چرخه اسید سیتریك در بین تعداد زیادي از موجودات که ژنوم آن‌ها تعیین توالي شده حفاظت شده است. مسیرگلیکولیز مسئول شکستن قندها به‌خصوص گلوکز است و با توجه به حفظ شدن این مسیر می‌توان نتیجه گرفت که گلوکز منبع اصلي انرژي براي بسیاري از موجودات است. گلوکز در طبیعت به‌مقدار فراوان و به شکل‌هاي پلیمري سلولز (با پیوند ٤ و ١ β) و به صورت نشاسته و گلیکوژن (هر دو با پیوند ٤ → ١ α) یافت می‌شود. سلولز و نشاسته به طور غالب در گیاهان پیشرفته‌تر تولید می‌شوند و گلیکوژن اصلي‌ترین قند ذخیره شده پلیمري در حیوانات است. مقدار زیادي از گلوکز در موجوداتي یافت می‌شود که قادرند پلیمرهاي گلوکز را به طور موثري هیدرولیز کنند. تنوع آنزیم‌هاي هیدرولیز کننده‌ي پلیمرهاي گلوکزي در طي تکامل، نشان دهنده اهمیت پلیمرهاي گلوکزي در زندگي است (3).

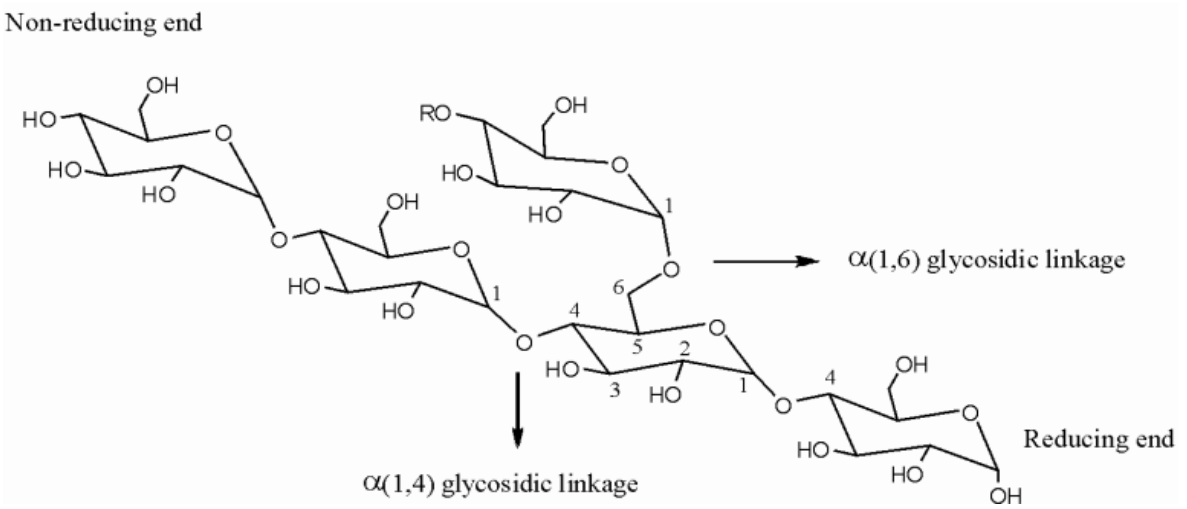
انسان قادر به تولید آنزیم‌هایي که پیوندهاي (٤ → ١) β بین واحدهاي گلوکز را هیدرولیز می‌کنند، نمي‌باشد و درختان و دیگر گیاهان حاوي سلولز قسمتي از رژیم غذایي استاندارد انسان نیستند. از طرف دیگر، گیاهاني که حاوي نشاسته هستند مانند برنج و سیب‌زمیني به‌خوبي توسط انسان هضم می‌شوند که این امر به علت حضور آنزیم‌هاي تجزیه کننده نشاسته در بزاق دهان و لوله گوارشي انسان است. در میان آنزیم‌هاي تجزیه کننده نشاسته، α _ آمیلازها به‌دلیل هضم نشاسته، داراي اهمیت زیادي هستند (3).

نشاسته شامل دو پلیمر گلوکزي است:

١- آمیلوز که داراي پیوندهاي ٤→ ١ α است.

2- آمیلوپکتین که علاوه بر پیوندهاي ٤ → ١ α ، داراي انشعابات ٦ → ١ α بسیاري نیز می‌باشد (شکل 1_1).

α ـ آميلازها هيدروليز پيوندهاي گليكوزيدي داخلي ١ → ٤ α را كاتاليزمي‌كنند بنابراين براي قطعه‌قطعه‌كردن پليمرهاي نشاسته به قطعات كوچك‌تر مناسب هستند. اين آنزيم‌ها هم در يوباكترها وهم در يوكاريوت‌ها يافت مي‌شوند و داراي خصوصيات متفاوت مانند تفاوت در دما و pH بهينه مي‌باشند. α ـ آميلازهاي باكتريايي و قارچي و به‌خصوص آنزيم‌هايي كه از گونه‌هاي مختلف باسيلوس‌ها به‌دست مي‌آيد به‌علت مقاومت بالاي آنها به گرما به‌صورت گسترده‌اي در فرآيندهاي صنعتي به‌كار مي‌روند، هم‌چنين سيستم بياني كارآمدشان باعث جذابيت بيشتر آن‌ها براي اهداف بعدي شده است (3).



شكل 1-1- ساختار پلي‌آميلوپكتين و گليكوژن كه نشان‌دهنده‌ي چهار پيوند α – (1 و 4) بين واحدهاي گلوكزي است و يک پيوند α – (1 و 6) كه يک واحد گلوكزي را به‌صورت انشعاب متصل كرده است.

α ـ آميلازهاي باكتريايي نسبت به آنزيم‌هاي يوكاريوتي كه از نظر توالي به α ـ آميلازهاي پانكراسي خوك[3] (PPA) تا حدود ١٥ ـ ٢٠ % شباهت دارند بسيار متفاوت هستند. يك استثنا در اين مورد α ـ آميلاز آلتروموناس هالوپلنكتيس[4] (AHA) مي باشد كه ٥٠ % به توالي PPA شباهت دارد. بيشتر آنزيم‌هاي استرپتومايسس[5] داراي ٤٠ ـ ٥٠ % شباهت توالي به PPA هستند. در ميان α ـ آميلازها، آميلازهاي باكتريايي متنوع‌ترين هستند و خصوصيات فيزيكو ـ شيميايي آن‌ها به‌طور وسيعي بررسي شده است. بيشترين توجه به دماي بهينه‌ي فعاليت آن‌ها بوده كه از ٢٥ درجه‌ي

[3] Pig pancreatic α - amylases
[4] Alteromonas haloplanctis
[5] streptomyces

سانتي‌گراد در مورد (AHA) تا حدود ۹۰ درجه‌ي سانتي‌گراد در مورد α ـ آميلاز باسيلوس ليكني‌فرميس[6](BLA) مي‌باشد. α ـ آميلازهاي باكتريايي داراي فعاليت در محدوده pH از ۱ تا تقريبا ۱۱/۵ در مورد α ـ آميلاز حاصل از باسيلوس شماره A - 40 - 2 هستند و تفاوت در تمايل به سوبسترا به طول زنجيره و توانايي برش نزديك انشعاب ۶ ← ۱ α در آميلوپكتين و ديگر پليمرهاي گلوكزي شاخه‌دار بستگي دارد (3).

آنزيم‌هاي تجزيه‌كننده‌ي نشاسته سهم بزرگي را در بازار به‌عنوان آنزيم‌هاي عمل‌آورنده‌ي غذا بازي مي‌كنند. هيدروليز اوليه‌ي نشاسته توسط α ـ آميلاز، مالتودكسترين‌ها را ايجاد مي كند (دكستريني‌زاسيون[7]). ساكاريفيكاسيون[8] شامل هيدروليز بيشتر مالتودكسترين است كه مي‌تواند به‌كمك گلوكوآميلاز اضافي، هر دو باندهاي گليكوزيدي (α(1,4 و α (1,6) را هيدروليز كند، اگرچه سرعت هيدروليز باندهاي α (1,6) بسيار كمتر از باندهاي α (1,4) است ولي با افزودن يك آنزيم دوم به نام پلولاناز، كه قادر است باندهاي گليكوزيدي α (1,6) را به طور اختصاصي هيدروليز كند اين فرآيند تسريع مي‌گردد (4).

مزيت بيوتكنولوژيكي α ـ آميلازها در تجزيه‌ي نشاسته به‌خوبي مشخص شده است. نشاسته فراوان‌ترين فرم ذخيره اي پلي ساكاريدها (بعد از سلولز) در گياهان است و بنابراين به مقدار زيادي در دانه ها و غده‌هاي گياهي مانند ذرت، گندم، برنج و سيب‌زميني وجود دارد (5).

آنزيم‌هاي تبديل‌كننده‌ي نشاسته درصنعت داراي كاربردهاي فراواني ازقبيل استفاده‌در ماشين‌هاي رختشويي و شوينده‌هاي porcelain يا عوامل anti-staling در نانوايي هستند. تعدادي از اين آنزيم‌هاي تبديل‌كننده‌ي نشاسته به يک خانواده به‌نام خانواده α - آميلاز يا خانواده‌ي 13 گليكوزيل هيدرولازها، تعلق دارند. اين دسته از آنزيم‌ها داراي خصوصيات مشتركي هستند كه مي‌توان به ساختارهاي 8 لوله اي [9] (β/α)، هيدروليز يا توليد باندهاي گليكوزيدي به

[6] Bacillus Licheniformis
[7] dextrinization
[8] saccharification
[9] barrels

شکل α و وجود تعدادي باقي‌مانده اسيدآمينه‌اي حفاظت شده در ناحيه‌ي فعال آن‌ها اشاره کرد. اخيرا ساختارهاي سه بعدي (3D) تعدادي از اعضاي خانواده‌ي α - آميلاز با استفاده از کريستالوگرافي پروتئين و کريستالوگرافي اشعه‌ي X به‌دست آمده است. اين اطلاعت به‌همراه مطالعات جهش‌هاي site-directed باعث درک بهتر واکنش بين سوبسترا يا مولکول محصول با آمينواسيدهاي يافت شده درون يا اطراف ناحيه‌ي فعال آنزيم شده است (6).

۱ ـ ۲ ـ دسته‌بندي آميلازها

آميلازها به دو دسته تقسيم مي‌شوند، اندوآميلازها[10] و اگزوآميلازها[11]. اندو آميلازها هيدروليز را به‌صورت تصادفي در درون مولکول‌هاي نشاسته کاتاليز مي‌کنند. اين امر منجر به توليد اليگوساکاريدهاي خطي و منشعب با طول متفاوت مي‌شود ولي اگزوآميلازها انتهاي غيراحياکننده[12] ايجاد مي‌کنند. امروزه تعداد زيادي از آنزيم‌ها شناخته شده‌اند که مولکول‌هاي نشاسته را به محصولات مختلف هيدروليز مي‌کنند و عملکرد چندين آنزيم متفاوت مورد نياز است تا هيدروليز نشاسته به‌طور کامل انجام گيرد (1).

کميته‌ي دسته‌بندي آنزيم‌ها (EC) اين کار را بر اساس نام واکنشي که آنزيم کاتاليز مي‌کند انجام مي‌دهند. هر واکنش داراي يک شماره‌ي EC است که مشخص کننده‌ي نوع واکنش است. براي α ـ آميلازها اين‌شماره EC 3.2.1.1 مي‌باشد و واکنش مربوطه هيدروليز داخلي پيوندهاي(1,4) α - گليکوزيدي در اليگوساکاريدها و پلي‌ساکاريدها است (3).

آنزيم‌هايي که واکنش‌هاي بسيار مشابه را کاتاليز مي‌کنند داراي شماره‌هاي EC متفاوتي هستند. براي مثال، سايکلودکسترين‌گلوکانوترنسفرازها (CGTases) داراي شماره‌ي EC ي مجزايي هستند (EC 2.4.1.19) اگرچه از نظر ساختاري و آنزيمي بسيار شبيه α ـ آميلازها مي‌باشند. α ـ گلوکوسيدازها، α ـ آميلازهاي مالتوژنيک (گلوکان

[10] endoamylases
[11] exoamylases
[12] Non reducing end

α(1,4) – مالتوهیدرولازها (EC 3.2.1.133) و آمیلازهاي تشکیل دهنده مالتوتترائوز (گلوکان α(1,4) ـ مالتوتتراهیدرولاز EC 3.2.1.60) که همگي داراي ساختار و خصوصیات آنزیمي بسیار مشابه α ـ آمیلازها هستند، ولي با آنها دسته‌بندي نمي-شوند زیرا اگزوآنزیم[13] هستند (3). اگرچه سیستم EC براي اهداف دسته‌بندي بسیار مفید هستند ولي هنگامي‌که مي-خواهیم اطلاعات در مورد α ـ آمیلازها به‌دست آوریم نیاز داریم که خصوصیات آنزیمي و ساختاري آن‌ها را نیز بدانیم. این موضوع توسط هنري‌ست[14]مورد بررسي قرار گرفت و شروع به ساخت بانك اطلاعاتي بنام آنزیم‌هاي فعال کربوهیدراتي (CAZy[15]) کرد. این بانك اطلاعاتي، گلیکوزیل-هیدرولازها را بر اساس توالي آن‌ها دسته‌بندي مي‌کند. آنزیم‌هایي با فعالیت α ـ آمیلازي در دو خانواده گلیکوزیل‌هیدرولاز با ساختارهاي متفاوت به نام‌هاي خانواده‌هاي ۱۳ و ۵۷ قرار گرفته‌اند. خانواده ۱۳ شامل ۵۱٤ توالي و ۱۹ فعالیت آنزیمي متفاوت است. در میان این‌ها CGTase ها، گلوکوسیدازها و آمیلازهاي تشکیل‌دهنده مالتوتتروز هستند. خانواده ۵۷ فقط از ۱۳ توالي و دو فعالیت آنزیمي متفاوت و به‌نام‌هاي α ـ آمیلازها (EC 3.2.1.1) و ٤ ـ α ـ گلوکانوترنسفرازها (EC 2.4.1.-) تشکیل شده است. آمیلازهاي متعلق به خانواده ۵۷ داراي ساختار و خصوصیات آنزیمي متفاوتي نسبت به آنزیم‌هاي خانواده ۱۳ هستند (3).

۱ ـ ۳ ـ پراکنش α ـ آمیلازها در بین میکروارگانیزم‌ها

α ـ آمیلازها در جهان در بین سلسله‌ي جانوران، گیاهان و میکروب‌ها داراي پراکنش هستند. در طي چند دهه‌ي اخیر، تحقیقات زیادي روي α ـ آمیلازهاي خارج سلولي که توسط انواع زیادي از میکروارگانیزم‌ها تولید مي‌شوند، انجام شده است. مزیت اصلي استفاده از میکروارگانیزم‌ها براي تولید آمیلازها، ظرفیت تولیدي زیاد آن‌ها از نظر اقتصادي است و دستکاري میکروب‌ها به‌منظور ایجاد آنزیم‌ها با خصوصیات مورد نظر آسان است. α ـ آمیلازها از چندین نوع

[13] Exo-enzymes
[14] Henrissat
[15] CAZy.org

قارچها، مخمرها، باكتريها و اكتينوميستها به‌دست مي‌آيند، ولي آنزيم‌هايي با منبع قارچي و باكتريايي داراي كاربرد بيشتري در صنعت هستند (1).

۱ ـ ٤ ـ شناسايي فعاليت α ـ آميلازها

α ـ آميلازها با استفاده از نشاسته‌ي محلول يا نشاسته‌ي تغيير يافته به‌عنوان سوبسترا مورد سنجش قرار مي‌گيرند. α ـ آميلازها هيدروليز پيوند گليكوزيدي(1,4) α را در نشاسته كاتاليز مي‌كنند و گلوكز، دكسترين و دكسترين‌هاي محدود شده توليد مي‌كنند. اين واكنش توسط افزايش ميزان قندهاي احياشده يا كاهش رنگ يد در سوبستراي تيمار شده مشاهده مي‌شود. متدهاي زيادي براي شناسايي فعاليت α ـ آميلاز در دسترس است. اين روش‌ها بر اساس كاهش در شدت رنگ يد ـ نشاسته، افزايش در ميزان قندهاي احياكننده، تجزيه‌ي رنگ متصل شده به سوبسترا و كاهش در گران‌روي محلول نشاسته مي‌باشند (1و7).

۱ ـ ٤ ـ ۱ ـ كاهش در شدت رنگ يد ـ نشاسته

نشاسته با يد يك كمپلكس آبي تيره ايجاد مي‌كند و با ادامه‌ي هيدروليز نشاسته، رنگ آن به قرمز قهوه‌اي تغيير مي‌كند.چندين مرحله براي شناسايي كمّي آميلاز بر پايه‌ي اين خصوصيت، تفسير شده‌اند. اين متد فعاليت دكسترينه كردن α ـ آميلاز را به‌صورت كاهش در واكنش رنگي يد نشان مي‌دهد (1).

۱ ـ ٤ ـ ۲ ـ شناسايي فعاليت دكسترينه شدن

در فعاليت دكسترينه شدن α ـ آميلازها از نشاسته‌ي محلول به‌عنوان سوبسترا استفاده مي‌كنند و بعد از پايان دادن به واكنش توسط اسيدكلريدريک رقيق شده، محلول يد اضافه مي‌شود. سپس كاهش در جذب در طول موج ٦٢٠ نانومتر در مقابل يك سوبستراي كنترل اندازه‌گيري مي‌شود. يك درصد كاهش در جذب به‌عنوان يك واحد آنزيمي در نظر گرفته مي‌شود (1).

محدوديت اصلي اين روش سنجش، مداخله‌ي اجزاي محيط كشت شامل محيط مايع لوريا[16]، تريپتون، پپتون، مايع داراي شيب ذرت[17] (CSL) و ... و تركيبات تيول با كمپلكس يد ـ نشاسته است. سولفات مس و پراكسيد هيدروژن، رنگ يد ـ نشاسته را به‌علت مداخله با اين اجزاي محيط حفاظت مي‌كند. به‌علاوه سولفات روي بهترين خنثي كننده‌ي مداخله‌ي انواع يون‌هاي فلزي است. افراد بسياري با موفقيت، مراحل سنجش اصلي را در تركيب با آناليز تزريق جريان[18] (FIA) انجام داده‌اند. سيستم جريان شامل يك بخش تزريقي، يك پمپ پريستالتيك[19]، يك فوتومتر با يك سلول جرياني و فيلتر ۵۷۰ نانومتري و يك قلم ضبطكننده است. نمونه‌ها، قبل از اضافه كردن يد، با نشاسته در يك مارپيچ واكنش مي‌دهند. سپس جذب در ۵۷۰ نانومتر خوانده مي‌شود. اين روش داراي چندين مزيت مانند توانايي استفاده از نمونه‌هاي زياد، پاسخ سريع، انعطاف‌پذيري و تجهيزات ساده است (1و8).

۱ ـ ٤ ـ ۳ ـ روش سندستدت كنين و بليش[20] (SKB)

روش SKB يكي از گسترده‌ترين روش‌هاي پذيرفته شده براي تعيين آميلازهاي مورد استفاده در صنعت نانوايي است. قدرت اكثر آميلازهاي تجاري، با عنوان واحدهاي SKB توضيح داده مي‌شود. از اين روش نه تنها براي بيان فعاليت α ـ آميلاز بلكه براي بيان قدرت دياستاتيك[21] جو نيز به‌كار مي‌رود (1).

۱ ـ ٤ ـ ٤ ـ روش دارونامه‌ي هندي

هم‌چنان‌كه در كتاب دارونامه‌ي هندي توضيح داده شده، اين روش براي محاسبه‌ي فعاليت α ـ آميلاز با عنوان مقدار گرم نشاسته‌ي تجزيه شده توسط مقدار مشخص آنزيم به‌كار مي‌رود. اين روش شامل انكوبه كردن آنزيم در حال آماده‌سازي در يك محدوده از رقت‌ها در بافر با سوبستراي

[16] luria
[17] Corn steep liquor
[18] Flow injection analysis
[19] Peristaltic pump
[20] Sandstedt Kneen and Blish
[21] Diastatic strenght

نشاسته در٤٠ درجه‌ي سانتي‌گراد براي يك ساعت است. سپس محلول‌ها با محلول يد تيمار داده مي‌شوند. لوله‌اي كه در آن هيچ رنگ آبي مشاهده نشود براي محاسبه‌ي فعاليت با عنوان مقدار گرم نشاسته‌ي تجزيه شده به‌كار مي‌رود. اين روش معمولا براي تخمين فعاليت α ـ آميلاز در غلات و حبوبات به‌كار مي‌رود (1).

١ ـ ٤ ـ ٥ ـ افزايش در قندهاي احياكننده يا روش دي-نيتروساليسيليك اسيد (DNSA)

اين روش، افزايش در قندهاي احياشده را به‌عنوان نتيجه‌ي فعاليت آميلاز روي نشاسته تعيين مي‌كند. نقصان اصلي اين روش سنجش، از بين رفتن تدريجي رنگ ايجاد شده و تخريب گلوكز توسط اجزاي اصلي معرف DNSA است. براي فائق آمدن بر اين محدوديت‌ها، يك روش تغيير يافته براي تخمين قندهاي احياكننده ابداع گرديده است. نمك‌هاي راشل[22] حذف گرديدند و ٠/٠٥ % سولفات سديم براي جلوگيري از اكسيداسيون معرف اضافه گرديد. از آن پس، روش تغيير يافته به‌طور گسترده‌اي براي اندازه‌گيري قندهاي احياشده به‌كار رفت بدون آن‌كه تغيير ديگري در مراحل آن رخ دهد (1و9).

١ ـ ٤ ـ ٦ ـ تجزيه شدن سوبستراي كمپلكس شده با رنگ

براي چندين سال گروه‌هاي زيادي روي توسعه‌ي روش شناسايي اختصاصي α ـ آميلاز بر پايه‌ي استفاده از انواع جديد سوبسترا كار كردند. در اين روش‌ها نشاسته به‌طور كووالانسي با رنگ آبي مانند آبي درخشنده‌ي رمازول R[23] يا آبي سيباكرون F3 G – A[24] به‌عنوان سوبستراي متغير كمپلكس مي‌دهد. سنتز اين سوبستراها شامل دو مرحله‌ي اصلي است. نشاسته‌ي محلول تحت شرايط آلكاليني با استفاده از رنگ، رنگ مي‌گيرد. اين امر نتيجه‌ي ايجاد پيوند كووالانسي بين نشاسته و مولكول‌هاي رنگ است. نشاسته‌ي رنگ شده به‌طور پيوسته توسط افزودن ١ و ٤ ـ بوتانديول ديگلايسيد اتر دچار اتصالات عرضي مي‌شود. اين امر منجر به ايجاد يك شبكه‌ي نامحلول مي‌شود كه در آب متورم مي‌گردد. هيدروليز

[22] Rochelle salts
[23] Remazol brilliant Blue R
[24] Cibacron Blue F3 G - A

آنزيمي اين نشاسته‌ي غير محلول از هيدروليز نشاسته‌ي محلول حاوي ماركر رنگ، مشتق مي‌شود. اين روش ساده است و براي شناسايي α ـ آميلاز حساس مي‌باشد، ولي حتي مقادير بسيار كم گلوكز ممكن است منجر به ايجاد نتايج نادرست به‌علت آلودگي نشاسته توسط سوبستراي دكسترين شود. اخيرا يك سنجش ميكروي حساس و سريع بر پايه‌ي نشاسته‌ي اتصال عرضي يافته[25] با رنگ براي شناسايي α ـ آميلاز گزارش شده است. اين روش قادر به شناسايي آنزيم با مقدار بسيار كم (۰ ـ ۵۰ نانوگرم) مي‌باشد (1). سوبستراهاي جديد ديگري مانند مشتقات نيتروفنيل از مالتوساكاريدها به‌كار گرفته شده‌اند. اين روش سنجش، آزاد شدن گروه‌هاي p ـ نيتروفنيل آزاد را اندازه مي گيرد. استفاده از نيتروفنيل مالتو ساكاريدها در اتصال به يک α – گلوكوسيداز مخمري اختصاصي مي تواند مورد استفاده قرار گيرد ولي اين سوبستراها به‌سرعت توسط گلوكوآميلازهايي كه معمولا در محيط‌هاي كشت مايع وجود دارند بريده مي‌شوند. استفاده از انتهاي غير احياكننده‌ي p ـ نيتروفنيل مالتوهپتوزيد[26] (BPNPG7) بلاك شده نيز توضيح داده شده است. گروه بلاك‌كننده (٤ و ٦ ـ O ـ بنزيليدن[27]) از هيدروليز سوبسترا توسط آنزيم‌هاي عمل-كننده‌ي خارجي[28] جلوگيري مي‌كند و بنابراين براي α ـ آميلازها اختصاصي عمل مي‌كند. اين روش سنجش، ساده، قابل قبول و دقيق است ولي روشي گران مي‌باشد زيرا از يك سوبستراي سنتتيك و آنزيم‌هاي اختصاصي استفاده مي‌كند. بنابراين استفاده از اين روش محدود به آزمايش‌هاي بسيار اختصاصي مي‌باشد و براي آناليزهاي معمولي بكار نمي‌رود. يك مقايسه براي استفاده از پارانيتروفنيل-مالتوهپتوز (BPNPG7) با انتهاي بلاك شده در تعدادي از مراحل پذيرفته شده، كه از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده مي‌كنند انجام شد. نتيجه‌ي واكنش بوسيله‌ي استفاده از رنگ يد ـ نشاسته قابل مشاهده مي‌شود. يك ارتباط عالي بين هر يك از مراحل سنجش وجود داشت. اين

[25] Cross-linked
[26] P- nitrophenyl maltoheptoside
[27] 4,6-o- benzylidene
[28] Exo – acting enzymes

موضوع نشان‌دهنده‌ي اينست كه همه‌ي روش‌ها يك اندازه‌گيري دقيق و قابل قبول از فعاليت α ـ آميلاز رانشان مي‌دهد و بسته به تجهيزات در دسترس مي‌تواند مورد استفاده قرار گيرد. هر دو روش از لحاظ تجاري به‌صورت كيت‌هاي تجاري در دسترس هستند، اگرچه مشخص شده كه α ـ آميلازها تمايل كمتري براي سوبستراها با وزن مولكولي كم از خود نشان مي‌دهند (1).

۱ ـ ٤ ـ ۷ ـ كاهش در گران‌روي محلول نشاسته

اين روش‌ها معمولا در صنعت نانوايي به‌منظور تشخيص كيفيت آرد و نه براي تخمين فعاليت α ـ آميلاز استفاده مي‌شوند كه بر پايه‌ي شناسايي خصوصيات تغييرشكل ماده خمير است.

روش‌هايي كه در اين دسته‌بندي قرار مي‌گيرند، آزمايش‌هاي اعداد ريزان[29] و آزمايش‌هاي آميلوگراف[30] و فارينوگراف[31] هستند (1).

۱ ـ ٤ ـ ۷ ـ ۱ ـ روش اعداد ريزان (FN)

روش اعداد ريزان (FN)، به‌طور بين‌المللي، استاندارد شده است و براي تشخيص فعاليت α ـ آميلاز در غلات براي آماده‌سازي آنزيم ـ آرد در ۱۰۰درجه‌ي سانتي‌گراد به‌كار مي‌رود. هر دو α ـ آميلاز با منشا غلات و قارچ به‌منظور بهبود نقص در تخمير آرد در فعاليت آميلازها به‌كار مي‌رود. به‌علت اينكه α ـ آميلازهاي قارچي استقامت كمي نسبت به گرما دارند، قابل شناسايي با استاندارد روش FN در ۱۰۰ درجه‌ي سانتي‌گراد نيستند. اين روش براي اندازه‌گيري فعاليت α ـ آميلازها با منشا غلات و قارچ در۳۰۰ درجه‌ي سانتي‌گراد، توسط جايگزين كردن مقداري از آرد با نشاسته‌اي كه از قبل ژلاتيني شده، كمي تغيير يافته و استاندارد شده است. عدد ريزان در حدود ٤۰۰، يك آرد به حالت مالت درآمده‌ي نرمال را نشان مي‌دهد (1).

---

[29] Falling number
[30] amylograph
[31] farinograph

۱ ـ ٤ ـ ۷ ـ ۲ ـ تست آميلوگراف ـ فارينوگراف

در صنعت نانوايي و آردسازي، كيفيت آرد را با واژه‌ي آميلوگراف مشخص مي‌كنند. اين روش بر پايه‌ي ارتباط پيك گران‌روي محلول آبكي نشاسته و سطح فعاليت آنزيم مي‌باشد. هر چه آنزيم فعال‌تر باشد گران‌روي خمير داغ كمتر است. هنگامي‌كه از آميلوگراف استفاده مي‌شود مقادير ٤٠٠ ـ ٦٠٠ واحد برابندر[32] از فارينوگراف براي آرد نانوايي بسيار عالي در نظر گرفته مي‌شود (مقادير بالاتر نشان‌دهنده‌ي كمبود و مقادير پائين‌تر نشان‌دهنده‌ي زياده‌ازحد بودن فعاليت است) (1).

۱ ـ ٥ ـ ساختار آنزيم

مطالعات پراش اشعه‌ي X روي α ـ آميلاز پستانداران و باكتري‌ها نشان داده كه همه‌ي α ـ آميلازها شامل سه ناحيه به‌نام‌هاي A، B و C هستند. يك شبكه TIM[33] مركزي، $(\alpha/\beta)_8$ در ناحيه‌ي A مركز مولكول را تشكيل مي‌دهد و شامل سه ناحيه‌ي Asp231, Glu261 و Asp328 است (در α ـ آميلاز باكتري باسيلوس ليكنيفرميس (BLA)). نواحي B وC در نقاط مقابل اين شبكه TIM واقع شده‌اند. ناحيه‌ي B توسط يك برآمدگي بين رشته‌ي سوم و هليكس سوم اين شبكه‌ي TIM به‌وجود آمده است. ناحيه‌ي B داراي يك ساختار نامنظم غني از β-sheet است و از نظر اندازه و ساختار در بين α ـ آميلازها متنوع مي‌باشد. ناحيه‌ي صفحه‌ي بتا يك ناحيه‌ي بزرگ از شكاف اتصال سوبسترا را تشكيل مي‌دهد و دليل تفاوت در اتصال سوبسترا بين α ـ آميلازها مي‌باشد. ناحيه‌ي C، بخش انتهايي C[34] توالي را مي‌سازد و يك ناحيه‌ي ساندويچي β[35] است كه شامل يك موتيف كليد يوناني[36] است. α ـ آميلازهاي پستانداران شامل چندين باند دي‌سولفيدي است و اين در مورد آنزيم‌هاي باكتريايي صدق نمي‌كند. α ـ آميلاز آلتروموناس هالوپلنكتيس[37] (AHA) كه داراي چهار باند دي-

---

[32] brabender
[33] TIM _ barrel
[34] C - terminal
[35] B - sandwich
[36] Greek key
[37] Alteromonas haloplanctis α - amylases

سولفيدي است از اين جهت مشابه آنزيم‌هاي پستانداران است (3).

۱ ـ ۵ ـ ۱ ـ يون‌هاي كلسيم و سديم

α ـ آميلازهاي شناخته شده شامل يك يون كلسيم حفاظت شده هستند، كه بين نواحي A و B قرار گرفته است و براي فعال بودن و پايدار بودن آنزيم ضروري است. يون كلسيم به‌قدري محكم اتصال پيدا كرده است كه به‌عنوان جزء جدانشدني پايدار براي α ـ آميلازهاي پانكراسي خوك[38] (PPA) و AHA در نظر گرفته مي‌شود. به‌نظر مي‌رسد كه نقش يون كلسيم حفاظت شده، ساختاري است زيرا محل قرار گرفتن آن از جايگاه فعال آنزيم به‌قدري دور است كه نمي‌تواند به‌طور مستقيم در كاتاليز شركت كند (3). يك يا دو يون كلسيم علاوه بر آن در بسياري از ساختارها ديده شده است و يك ساختار خطي Ca-Na-Ca در α ـ آميلازباسيلوس ليكني‌فرميس[39](BLA) يافت شده است (3).

1 ـ ۵ ـ ۲ ـ يون‌هاي كلريد

بسياري از α ـ آميلازها داراي يك يون كلر در جايگاه فعال خود هستند كه كارايي كاتاليتيكي آنزيم را افزايش مي‌دهند. يون‌هاي كلريدي در α ـ آميلازهاي پستانداران يافت مي‌شود، هرچند يك يون كلر در يك α ـ آميلاز سرمادوست (AHA) از باكتري آلترموناس هالوپلنكتيس نيز ديده شده است. مشاهده شده است كه تمايل براي يون كلسيم حفاظت شده در مقابل اتصال كلر افزايش مي‌يابد و مي‌توان استنباط كرد كه اتصال يون كلر باعث القاي تغييرات در اطراف ناحيه فعال مي‌شود (3).

يك سوال در مورد α ـ آميلازهاي حاوي كلر، وجود سه اسيدآمينه Glu - His - Ser است كه در بين نواحي A وC قرار دارد. دانشمندان عقيده بر اين دارند كه اين سه اسيد-آمينه قادر هستند كه يك شكاف پروتئولايتيكي خودبه‌خودي را انجام دهند ولي هنوز اين فرضيه تاييد نشده است (3).

---

[38] Pig pancreatic α - amylases

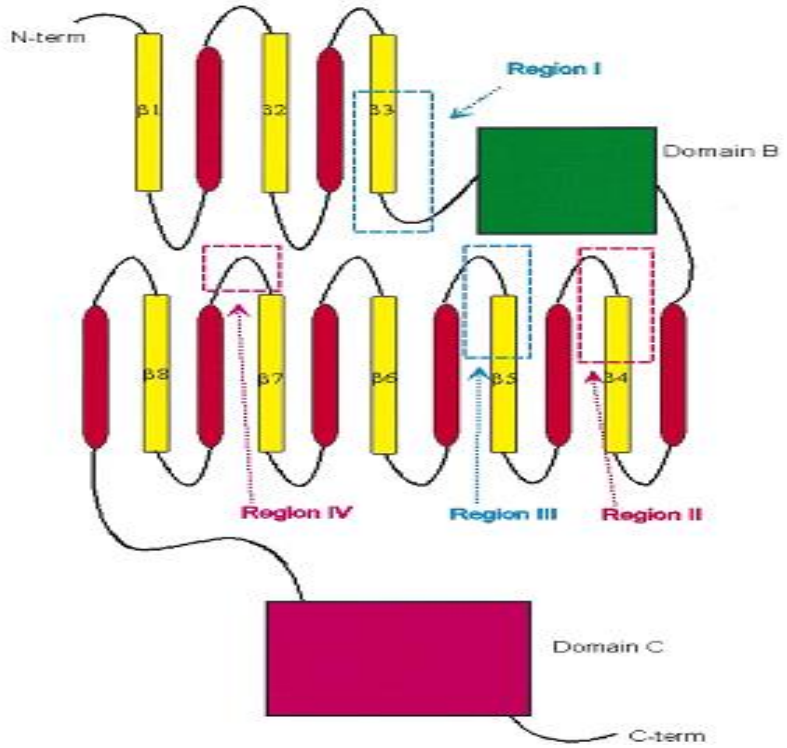
[39] Bacillus Licheniformis α - amylases

۱ ـ ۵ ـ ۳ ـ شکاف جایگاه فعال

شکاف جایگاه فعال در بین نواحي A و B و در ناحیه انتهاي C ي رشته β در شبکه TIM قرار گرفته است. مطالعات اشعهي X نشان داده است که شکاف اتصال سوبسترا میتواند چهار تا ده واحد گلوکز را (بر اساس گونه-هاي مختلف) در خود جاي دهد. هر واحد گلوکز توسط باقي-مانده‌هاي اسیدآمینه‌اي خاصي در شکاف جایگاه فعال، به جایگاه خود متصل میشود (3).

۱ ـ ٦ ـ توالي آنزیم

در بانك اطلاعاتي CAZy، α ـ آمیلازها با دیگر انواع گلیکوزیل هیدرولازها در خانواده‌ي ۱۳ دسته‌بندي شده‌اند. به‌منظور شناسایي یك سکانس در این گروه بسیار بزرگ، به-عنوان مثال سکانس α ـ آمیلاز، نیاز به نتایج آزمایشگاهي است. یك روش قابل قبول، مقایسه کردن توالي آمینواسیدي با یك α ـ آمیلاز شناخته شده و جستجو براي الگوهاي سکانسي حفظ شده است. سکانس‌هاي α ـ آمیلازها حداقل داراي چهار الگوي حفاظت شده (I – IV) میباشند که در شبکه‌ي TIM روي رشته‌هاي β ي ۳ ، ٤ و ٥ و در لوپ اتصال دهنده‌ي رشته-ي β ي ۷ به α ـ هلیکس ۷ یافت میشوند (شکل1-2) (3).



شکل 1-2- دیاگرام توپولوژیکي α – آمیلاز که در آن چهار ناحیه از توالي حفاظت شده، نشان داده شده است.

باقیمانده هاي اسیدآمینه اي که ناحیه‌ي I را تشکیل مي-دهند در انتهاي C ي سومین رشته‌ي β از شبکه‌ي TIM (β_3) یافت مي‌شوند. این ناحیه شامل سه اسیدآمینه‌ي حفاظت شده‌ي Asp100, , Asn104 وHis105 مي‌باشد. یك Val در ناحیه‌ي ۱۰۲ نیز وجود دارد. ناحیه‌ي II در β_4 واقع شده و شامل هسته‌ي کاتالیتیکي Asp231 و باقیمانده‌ي غیر متغیر Arg229 است. این دو در تمام α ـ آمیلازها یافت مي‌شوند و براي فعالیت کاتالیتیکي ضروري هستند. ناحیه‌ي III شامل یك دهنده‌ي پروتون کاتالیتیك (Glu261)است و در انتهاي Cي پنجمین رشته‌ي β در شبکه‌ي TIM قرار گرفته است. Glu261 تنها باقي‌مانده‌ي اسیدآمینه اي حفاظت شده در این ناحیه است. اسیدآمینه هاي تشکیل دهنده‌ي ناحیهي IV در لوپ اتصال دهنده‌ي β_7 به α_7 قرار دارند و ناحیه‌ي فعال را در برابر حلال‌ها حفاظت مي‌کنند. در توالي α ـ آمیلازها دو ناحیه‌ي حفاظت شده‌ي دیگر هم وجود دارد. یکي از آنها شامل اسیدآسپارتیك است که به هماهنگ کردن یون کلسیم حفاظت شده کمك مي‌کند و دیگري یك ناحیه‌ي لولایي شکل در ناحیه‌ي B است (3).

۱ ـ ۷ ـ مکانیزم کاتالیتیکي

α ـ آمیلازها پیوندهاي گلیکوزیدي α(1,4) را با یك چرخش کانفیگوراسیوني به دور اتم کربن آنومري قند، مي‌برند، براي مثال با برش سوبسترا انتهاي کاهنده‌ي آن به‌صورت کانفیگوراسیون α آزاد مي‌شود. این رفتار در تمامي هیدرولازهاي گلیکوزیدي دیده مي‌شود و این مکانیزم کاتالیتیکي شامل سه مرحله است:

مرحله‌ي اول، پروتونه شدن اکسیژن گلیکوزیدي توسط دهنده‌ي پروتون (Glu 261) است. این واکنش توسط یك حمله‌ي نوکلئوفیلي روي C1 از باقیمانده‌ي قند در ناحیه‌ي ۱- توسط نوکلئوفیل کاتالیتیك (Asp 231) صورت مي‌گیرد. وقتي بخش آگلیکون[40] از سوبسترا جدا شد، یك مولکول آب توسط

[40] aglycon

Glu 261 دپروتونه[41] فعال مي‌شود. اين مولكول آب، باند كووالانسي بين اكسيژن مولكول نوكلئوفيل و C1 از باقيمانده‌ي قندي را هيدروليز مي‌كند و به اين ترتيب چرخه‌ي كاتاليتيك كامل مي‌شود. سومين اسيدآمينه‌ي حفاظت شده در جايگاه فعال (Asp 328) هيچ نقش مستقيمي در مكانيزم كاتاليتيك بازي نمي‌كند ولي به‌هرحال داراي نقش مهمي در اين فرآيند است. گفته شده كه Asp 328 توسط واكنش‌هاي الكترواستاتيكي باعث بالا رفتن pK_a در E 261 مي‌شود. هم-چنين مشاهده شده است كه Asp 328 در اتصال و انحراف سوبسترا نقش دارد. با انجام جهش‌هاي نقطه‌اي[42] روي اين سه اسيدآمينه‌ي كاتاليتيك، به اهميت آن‌ها در مكانيزم‌هاي كاتاليتيكي
پي بردند. ايجاد جهش روي يكي از اين اسيدها و تبديل آن‌ها به آميد مربوطه، منجر به ايجاد آنزيمي مي‌شود
كه داراي فعاليت بسيار كمتر است يا به‌طور كل فاقد فعاليت است (3).

۱ ـ ۸ ـ فيزيولوژي توليد α ـ آميلاز

توليد α ـ آميلاز توسط تخمير غوطه‌ور در آب[43] (SmF) و تخمير به‌حالت جامد[44] (SSF) به‌طور كامل بررسي شده و نشان داده شده است كه اين فرآيندها توسط بسياري از فاكتورهاي فيزيكو ـ شيميايي تحت تاثير قرار مي‌گيرد. قابل‌توجه‌ترين آن‌ها، تركيب محيط‌كشت، pH محيط، غلظت فسفات، سن مايع‌تلقيح، دما، ميزان هوادهي به مايع، منبع كربن و منبع نيتروژن مي‌باشند. بيشترين گزارش‌ها به تعداد كمي از گونه‌هاي قارچ‌هاي مزوفيل محدود شده‌اند و تلاش‌ها بر اين بوده كه شرايط كشت اختصاصي شده و از سويه‌هاي برتر قارچي براي توليد در مقادير تجاري استفاده شود (1).

[41] deprotonated
[42] Point mutations
[43] Submerged fermentation
[44] Solid state fermentation

۱ ـ ۸ ـ ۱ ـ پارامترهاي فيزيكو ـ شيميايي

نقش بسياري از پارامترهاي فيزيكو ـ شيميايي، شامل منابع كربن و نيتروژن، عوامل فعال سطحي، فسفات، يون‌هاي فلزي، دما و pH در توليد اين آنزيم‌ها مورد مطالعه قرار گرفته اند (1).

۱ ـ ۸ ـ ۱ ـ ۱ ـ منبع سوبسترا: القاي α ـ آميلاز

α ـ آميلاز يك آنزيم القايي است و معمولا در حضور نشاسته يا محصول هيدرولايتيك آن يعني مالتوز القا مي‌شود. اكثر گزارش‌ها مبني بر القاي α ـ آميلاز در سويه‌هاي مختلف آسپرژيلوس اريزا[45] نشان داده است كه القاگر عمومي، مولكول مالتوز است. گزارش شده است كه وقتي مالتوز و نشاسته به‌عنوان القاگر در آسپرژيلوس اريزا (NRC401013) به‌كار مي‌روند باعث ۲۰برابر افزايش در فعاليت آنزيم مي‌شوند. القاي شديد α ـ آميلاز توسط نشاسته و مالتوز در مورد آسپرژيلوس اريزا (DSM 63303) نيز گزارش شده است. به‌غير از مالتوز، در بعضي از سويه‌هاي ديگر، منابع كربني مانند لاكتوز، تري‌هالوز، α ـ متيل ـ D ـ گليكوزيد هم به‌عنوان القاگر α ـ آميلاز عمل مي‌كنند. نه تنها منبع كربن، بلكه شرايط ميسلي يا سن توليد آن بر روي سنتز α ـ آميلاز توسط آسپرژيلوس اريزا M-13 اثر مي‌گذارد. گزارشات نشان داده است كه ميسل‌هاي رشدنيافته كه پنج روز گرسنگي كشيده‌اند مناسبترين مورد براي القاي بهينه با مالتوز هستند. توليد α ـ آميلاز همانند اكثر ديگر آنزيم‌هاي القاشدني توسط مهاركننده‌هاي كاتابوليتي مانند گلوكز و ديگر قندها مورد بررسي قرار گرفته است. اگرچه نقش گلوكز در توليد α ـ آميلاز در بعضي از موارد جدالبرانگيز بوده است ولي يافته‌ها نشان داده كه توليد α ـ آميلاز توسط آسپرژيلوس اريزا DSM 63303 با گلوكز نسبتا مهار نشد، و مقدار بسيار كمي از آنزيم در حضور آن القا مي‌گردد. اگرچه گزيلوز يا فروكتوز به‌شدت

[45] Aspergillus oryzae

مهارکننده هستند ولي باعث رشد خوبي در آسپرژيلوس نيدولانس[46] مي‌شوند (1).

منابع کربني مانند گلوکز و مالتوز به‌منظور توليد α ـ آميلاز به‌کار مي‌روند. ولي استفاده از نشاسته نيز مورد توجه مي‌باشد. تعدادي از ديگر سوبستراهاي غير مرسوم مانند لاکتوز، کاسيتون، فروکتوز، کيك‌هايي از دانه‌هاي روغني و آب باقي‌مانده از مراحل توليد نشاسته، براي توليد α ـ آميلاز به‌کار مي‌روند در صورتي‌که محصولات جانبي مراحل کشاورزي و سبوس گندم براي توليد اقتصادي α ـ آميلاز از طريق SSF به‌کار مي‌روند. استفاده از سبوس گندم در تخمير سطح مايع (LSF) براي توليد α ـ آميلاز آسپرژيلوس فوميگاتوس[47] و از کلاواتيا جيگانته‌آ[48] نيز گزارش شده است. فعاليت زياد α ـ آميلاز از آسپرژيلوس فوميگاتوس با استفاده از α ـ متيل ـ D ـ گليکوزيد (يك مشابه سنتتيکي براي مالتوز) به‌عنوان سوبسترا گزارش شده است (1).

استفاده از دکستران با وزن مولکولي کم در ترکيب با توئين ۸۰[49] يا تريتون X – 100[50] براي توليد α ـ آميلاز در قارچ ترمومايسس لانوگينوسوس[51] (ATCC 200065) گزارش شده است. تريتون X – 100 هيچ اثري نداشت، در صورتيکه توين ۸۰ فعاليت α ـ آميلاز را تا ۲۷ برابر افزايش داد (1).

۱ ـ ۸ ـ ۱ ـ ۲ ـ منابع نيتروژن

براي توليد α ـ آميلاز، ترجيحا منابع آلي نيتروژن به‌کار مي‌رود. عمدتاً در توليد α ـ آميلاز از استرپتومايسس[52]، باسيلوس IMD 435[53] و هالوموناس مريديانا[54] از عصاره‌ي‌مخمر به‌عنوان منبع نيتروژن استفاده شده است.

---

[46] Aspergillus nidulans
[47] Aspergillus fumigatus
[48] Clavatia gigantea
[49] Tween 80
[50] Triton x - 100
[51] Thermomyces lanuginosus
[52] Streptomyces sp.
[53] Bacillus sp. IMD 435
[54] Halomonas meridiana

عصاره‌ي مخمر همچنين به‌صورت هماهنگ با ديگر منابع نيتروژن مانند باكتوپپتون در مورد باسيلوس IMD 434، آمونيوم سولفات در مورد باسيلوس سوبتيليس، آمونيوم سولفات و كازئين براي كلاواتيا جيگانته‌آ و آرد سويا و عصاره‌ي گوشت براي آسپرژيلوس اريزا به‌كار رفته است. هنگاميكه از عصاره‌ي مخمر به‌عنوان منبع نيتروژن اضافي استفاده مي‌شود، نسبت به زمانيكه بخار آمونياك به‌عنوان تنها منبع مورد استفاده قرار مي‌گيرد، توليد α ـ آميلاز، ۱۱۰ ـ ۱۵۶ % در آسپرژيلوس اريزا افزايش مي‌يابد. انواع ديگر منابع آلي نيتروژن نيز مي‌توانند باعث توليد ماكزيمم α ـ آميلاز در انواع باكتري‌ها و قارچ‌ها شوند. CSL براي توليد اقتصادي و كاراي α ـ آميلاز از يك جهش-يافته‌ي باسيلوس سوبتيليس[55] به‌كار مي‌رفته است. علاوه‌برآن، انواع مختلف نمك‌هاي آلي مانند آمونيوم سولفات براي آسپرژيلوس اريزا و آسپرژيلوس نيدولانس، آمونيوم نيترات براي آسپرژيلوس اريزا و نمك‌هاي وگل[56] براي آسپرژيلوس فوميگاتوس، براي توليد بهتر α ـ آميلاز در قارچ‌ها به‌كار رفته‌اند (1و10و11و12).

آمينواسيدها به‌همراه ويتامين‌ها نيز در توليد α ـ آميلاز اثر دارند. اگرچه باتوجه‌به تفاوت زياد در گزارشات موجود، هيچ دليلي براي نقش آمينواسيدها و ويتامين‌ها در افزايش توليد α ـ آميلاز در ميكروارگانيزم-هاي مختلف، به‌دست نيامده است. توليد α ـ آميلاز توسط باسيلوس آميلوليكوئي‌فشنز[57] ATCC 23350 در حضور گلايسين به ۳۰۰ افزايش يافت. گلايسين تنها به‌عنوان منبع نيتروژن اثرگذار نيست بلكه مي‌تواند روي توليد α ـ آميلاز با كنترل pH هم اثر گذارد و مكررا توليد آميلاز را افزايش دهد. β ـ آلانين، والين و D ـ متيونين هم براي توليد آميلاز قليايي توسط باسيلوس A - 40 - 2 اثرگذار هستند. اگرچه نقش تركيبات آميني نه به اندازه‌ي منابع نيتروژني مهم هستند و نه به اندازه‌ي منابع كربني ولي به‌عنوان محركي براي سنتز آميلاز و ترشح آن مي‌باشند. گزارش شده است كه تنها آسپاراژين مي‌تواند به‌خوبي اين آنزيم را

[55] Bacillus subtilis
[56] Vogel salts
[57] Bacillus amyloliquefaciens

توليد كند درصورتيكه اهميت آرژينين نيز براي توليد α ـ آميلاز از باسيلوس سوبتيليس بهخوبي ثبت شده است (1).

۱ ـ ۸ ـ ۱ ـ ۳ ـ نقش فسفات

فسفات يك نقش تنظيمي مهم در سنتز متابوليتهاي اوليه و ثانويه در ميكروارگانيزمها بازي ميكند و بههمين دليل روي رشد ارگانيزم و توليد α ـ آميلاز اثر ميگذارد. يك افزايش قابل توجه در توليد آنزيم در آسپرژيلوس اريزا هنگاميكه ميزان فسفات بيش از ۰/۲ مولار است ديده شده است. يافتههاي مشابهي در مورد باسيلوس آميلوليكوئيفشنز بهدست آمده است بهاينصورتكه ميزان كم فسفات منجر به كاهش بسيار در چگالي سلول و توليد نشدن α ـ آميلاز ميشود. برخلافآن غلظت زياد فسفات نقش بازدارنده براي توليد آنزيم توسط باسيلوس آميلوليكوئي-فشنز دارد (1).

Surname : Khayati	**Name :** Khoosheh
Title of thesis : molecular study of amylase from bacillus isolates	
Supervisor : Dr. Zahri, Saber **Advisors :** Dr. Asadi, Asadollah – Dr. Razavi, Seyed mahdi	
Graduate degree : MSc **Major :** Biology **Specialty :** cell and molecular science **University of Mohaghegh Ardabili** **Faculty :** sience **Graduation date :** 2010/oct/6 **Number of pages :** 118	
Key words : Bacillus, α-amylase, alginate	

Abstract:

α-Amylase is an important enzyme used in the industry.Thermostable α-amylases have extensive commercial applications in starch processing, sugar production, desizing in textile industries and in detergent manufacturing processes. Amylases can be obtained from several sources. They are usually produced by bacteria belonging to the genus *Bacillus* for industrial applications. In this study an alkaliphilic amylase producing bacterium, Bacillus sp. KZ1, was selected from Sabalan spring isolates. This bacterium was able to produce α-amylase in the culture broth and it was purified from the culture supernatant by alginate. The molecular weight of that was determined to be 35 kDa by SDS gel electrophoresis. The enzyme was stable in the pH range 6-12 and The pH optimum for activity at optimum temperature (70˚C) was 11. The enzyme was inhibited by Ba^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}, EDTA, Fe^{2+}, H_2O_2, Na^{+}, Ca^{2+}, but the presence of Co^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}enhanced enzymatic activity. The k_m and specific activity of that on soluble starch were 10.4 mg/ml and 992.2 U/mg, respectively.The enzyme had good biochemical characteristics such as stability in high temperatures and pH, so it could be used in industrial processes like detergents and paper industries and in medical industries.

Department of Biology
Faculty of science

Title of thesis:

molecular study of amylase from bacillus isolates

Supervisor:

Dr. Saber Zahri

Advisor:

Dr. Asadollah Asadi

Dr. seyed Mehdi Razavi

By:

Khoosheh Khayati

University of Mohaghegh Ardabili

2010, fall