دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب شناسی صنعتی (بیوتکنولوژی میکروبی)

تهیه آنزیم آمیلاز

دکتر سهیلا عباسی

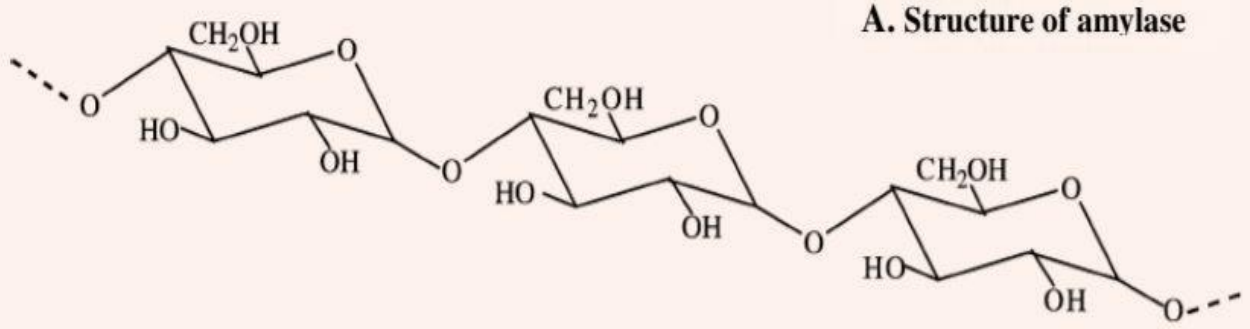
آمیلاز

آمیلازها گروهی از آنزیم های هیدرولیزکننده نشاسته بشمار میروند که نشاسته را به واحدهای کوچکتر گلوکز، دکسترول با بازده های مختلف تبدیل می کنند. حتی اگر سایر آنزیم های آمیلاتیک که در روند تجزیه نشاسته حضور داشته باشند، سهم آمیلاز یک پیش نیاز برای شروع فرایند می باشد.

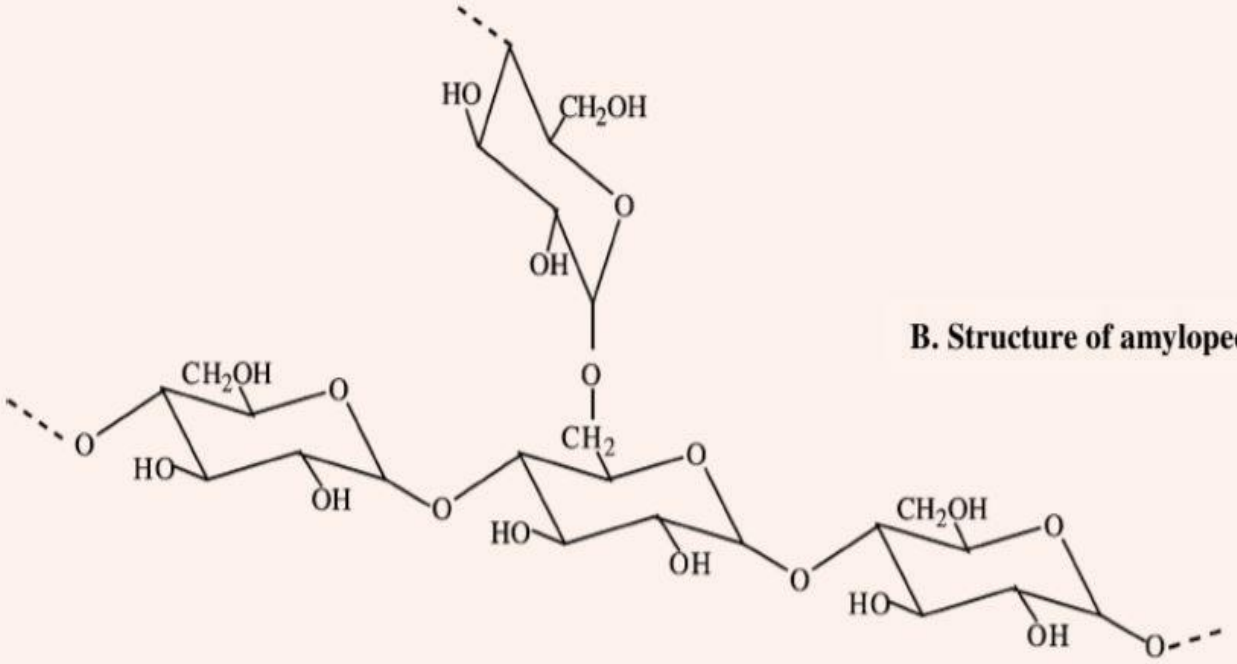
این آنزیم کاربرد فراوانی در صنایع داروئی، صنایع غذایی و نساجی دارد. منابع مختلفی برای تولید این آنزیم وجود دارد. از جمله منابع حیوانی، منابع گیاهی و منابع میکروبی; با این حال تهیه آنزیم از منابع میکروبی با توجه به مزایای زیادی که وجود دارد از جمله سرعت رشد بالا میکروب ها و در نتیجه تولید مقادیر زیاد آنزیم در مدت زمان کوتاه و نیز بهره وری بالای تولید آنزیم توسط این منابع، مورد توجه زیادی قرار گرفته است.

کپکها و باکتریها منابع اصلی تولید آنزیم به صورت میکروبی به شمار می آیند.

A. Structure of amylase



B. Structure of amylopectin



مقدمه

آمیلازها آنزیم‌هایی هستند که نشاسته را هیدرولیز می‌کنند. دانه‌های نشاسته در آب سرد نا محلول بوده و بیشتر به آنزیم‌ها و مواد شیمیایی مقاوم هستند. در واقع نشاسته پلیمری از گلوکز است که به واسطه پیوندهای گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده‌اند.

آمیلازها از مهم‌ترین آنزیم‌ها در زیست فناوری محسوب می‌شوند و اهمیت آن‌ها به علت کاربرد گسترده این آنزیم‌هاست. آمیلازها کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف نظیر نساجی، کاغذسازی، شوینده‌ها، نانوایی و صنایع غذایی اعم از تهیه شربت‌های فروکتوز و گلوکز، آب میوه‌ها، شیرین کننده‌ها و نوشیدنی‌های الکلی دارند. کاربرد این آنزیم‌ها امروزه در زمینه پزشکی و شیمی تجزیه نیز گسترده شده است.

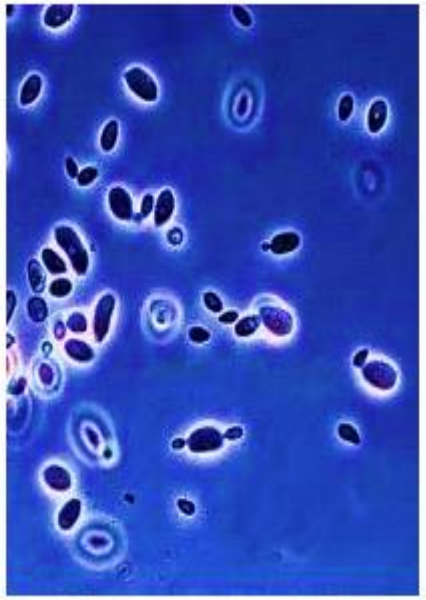
مقدمه

اگر چه بسیاری از گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید آنزیم آمیلاز را دارند ولی این آنزیم با منشاء میکروبی دارای مصارف صنعتی است. در این بین، جنس **باسیلوس** طیف وسیعی از آنزیم‌های خارج سلولی از قبیل آمیلاز را تولید می‌کند که کاربرد مهمی در صنعت دارد. از باسیلوس‌های مولد آنزیم آمیلاز می‌توان به باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس لیکنی فورمیس، باسیلوس سرئوس و باسیلوس پلی میکسا اشاره کرد.

تولید آنزیم آمیلاز به مواردی از قبیل سویه‌ها، ترکیب محیط کشت، روش کشت، رشد سلول و زمان گرماگذاری بستگی دارد. برای تولید آنزیم‌های صنعتی نیاز به سویه مناسب و سپس، فناوری مربوط است.

Cane molasses, Wheat Bran,

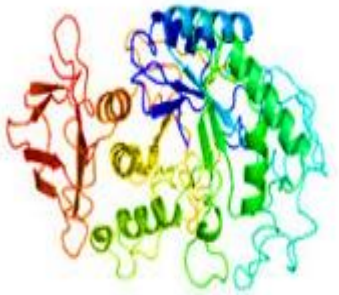
Rice Bran and Orange peel



Bacillus polymyxa

Screening → Optimization → Fermentation → Supplementation

Amylase Production



مواد و روش ها جهت انجام آزمایش

- محیط کشت نوترینت آگار
- محیط کشت نشاسته آگار
- محیط تریپتیکیس سوی براث
- نوترینت براث
- لوگول
- نشاسته سیب زمینی
- دانه سویا

- عصاره گوشت
- کلسیم کلراید
- سولفات منیزیم
- فسفات پتاسیم و عصاره مخمر
- دی‌نیتروسالیسیلیک اسید
- بافر سدیم فسفات
- نشاسته محلول و مالتوز

نمونه‌گیری از منابع مختلف:

- **نمونه‌گیری از خاک:** نمونه‌های خاک کشاورزی در ظروف تمیز و استریل جمع‌آوری شد. با رعایت شرایط استریل پس از خشک شدن، نمونه‌ها به خوبی ساییده و نرم شده و از صافی یا الک‌های ریز عبور داده شود.
- **نمونه‌گیری از آب:** نمونه‌های آب از تالاب و منابع دیگر در ظروف استریل یک لیتری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شود. انتخاب عمق، بر اساس همجواری زمین‌های کشاورزی زیر کشت غلات با تالاب است.
- **نمونه‌گیری از پساب:** نمونه‌های پساب از کارخانه‌های بستنی‌سازی، کیک و نوشابه‌سازی که حاوی نشاسته و ترکیبات الیگوساکاریدی است، در ظروف تمیز و استریل جمع‌آوری شد.

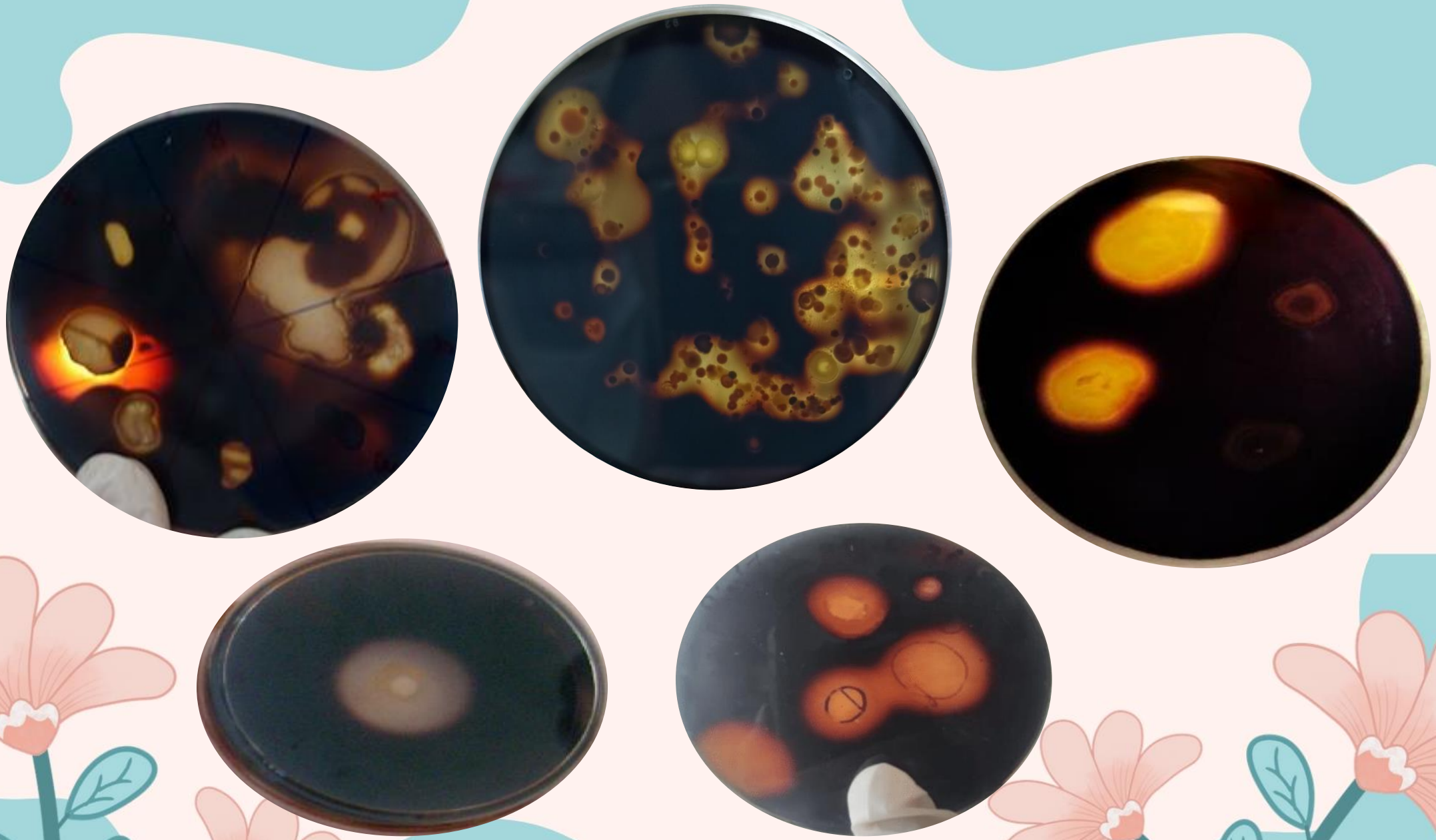
تهیه رقت از نمونه‌ها

- **رقیق‌سازی نمونه خاک:** از هر نمونه خاک با استفاده از کاغذ تمیز و ترازوی دقیق مقدار یک گرم وزن شده و در کنار شعله به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شود تا رقت ۰/۱ به دست آید. به علت این که مقدار باکتری‌ها و اسپورهای موجود درخاک بسیار زیاد است برای جداسازی دقیق آن‌ها از رقت ۱-۱۰ تا ۵-۱۰ استفاده شود.
- **رقیق‌سازی نمونه آب و پساب:** از نمونه‌های آب و پساب جمع‌آوری شده در شرایط استریل مقدار ۱ میلی‌لیتر در کنار شعله به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. پس از به دست آمدن رقت ۰/۱ از نمونه پساب، رقت‌های ۱-۱۰ تا ۵- ۱۰ تهیه شد. سپس، برای یکسان بودن شرایط آزمایش از نمونه آب نیز مشابه با دو نمونه خاک و پساب رقت‌های ۱-۱۰ تا ۵-۱۰ تهیه شد.
- **کشت نمونه‌ها:** نمونه‌های خاک، آب و پساب بر روی محیط نوترینت آگار به شکل خطی کشت و خالص‌سازی شد. سپس، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی تعیین هویت مقدماتی شود.

غربال‌گری گونه مناسب مولد آنزیم آمیلاز

برای غربال‌گری گونه مناسب مولد آنزیم آمیلاز در ابتدا از محیط کشت نشاسته آگار استفاده می شود و محیط‌های کشت برای مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری می شوند. رنگ محیط کشت نشاسته آگار به علت وجود نشاسته کدر است و گونه‌ای که بتواند نشاسته را هیدرولیز کند باعث شفاف شدن محیط می‌شود. بنابراین، پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت گونه‌هایی که در اطراف کلونی تک خود هاله شفاف ایجاد کرده بودند مولد آنزیم آمیلاز بوده و برای مراحل بعد انتخاب می شوند.

برای تایید عمل هیدرولیز نشاسته از معرف لوگول استفاده شد که رنگ آبی تیره معرف لوگول در محیط کشت نشاسته آگار، در جایی که هاله حاصل از هیدرولیز نشاسته وجود دارد به رنگ آبی کم رنگ تا بی رنگ متمایل می‌شود.



تولید آمیلاز

- مقدار ۳۰ میلی‌لیتر محیط تریپتیکیس سوی براث در یک ارلن تمیز تهیه شود.
- پس از استریل شدن با نمونه تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در شیکر با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه گرماخانه گذاری شود.
- پس از فعال شدن نمونه در محیط تریپتیکیس سوی براث، سوسپانسیون باکتریایی با رقت $۵/۱ \times ۱۰^{۸}$ به میزان ۲ میلی‌لیتر در شرایط استریل و در کنار شعله به محیط تولید آنزیم تلقیح شود.
- گرماگذاری محیط تولید به مدت ۱۴۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه انجام می شود.

ترکیبات محیط تولید آنزیم بر حسب گرم بر لیتر شامل:

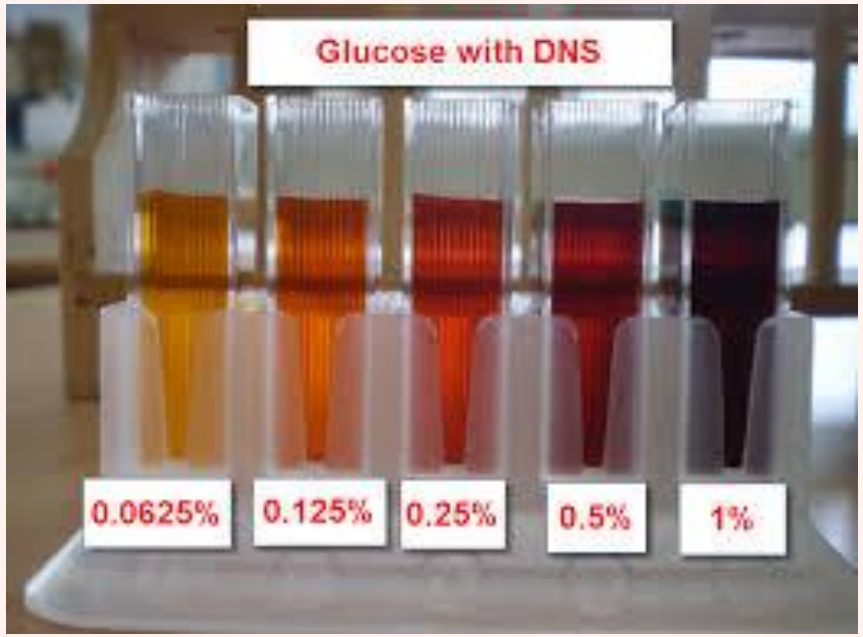
- **نشاسته سیب زمینی**
- **دانه سویا**
- **عصاره گوشت**
- **کلسیم کلراید (۰/۵)**
- **سولفات منیزیم (۰/۳)**
- **فسفات پتاسیم (۱)**

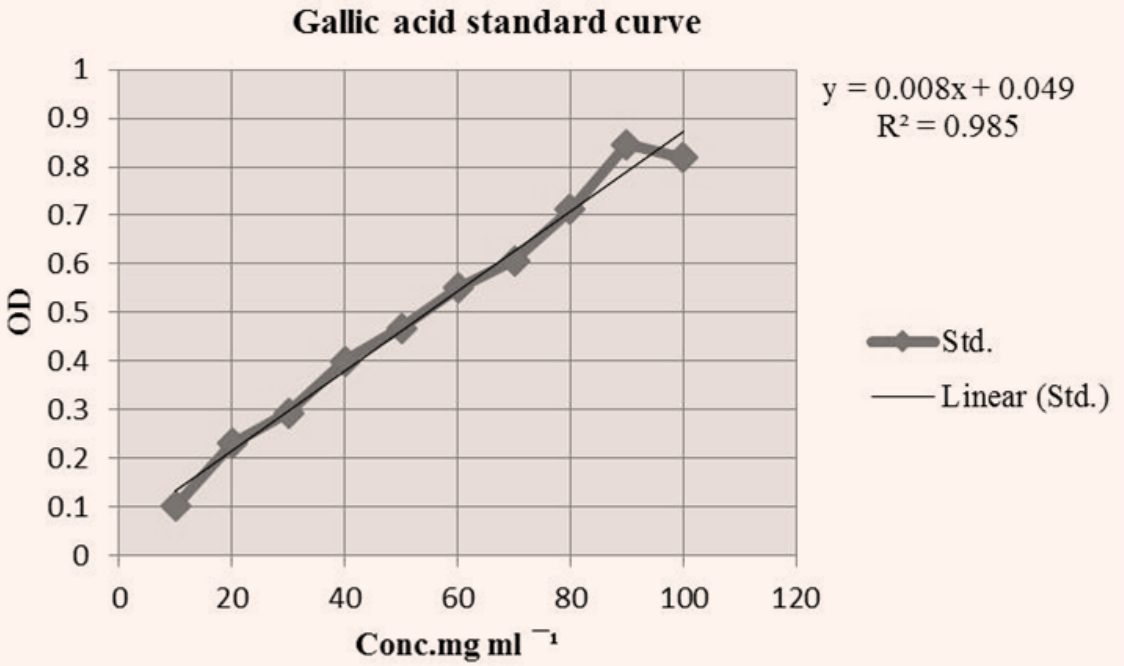
Bacillus sp.

Thermo alkali stable Amylase

سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز

- برای بررسی میزان فعالیت آنزیم آمیلاز تولید شده از روش DNS استفاده می شود. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آمیلاز در ابتدا از ۰/۵ میلی‌لیتر آنزیم خام، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نشاسته ۱ درصد و بافرسدیم فسفات با اسیدیته ۶/۹ استفاده شد. سپس، از ۰/۵ میلی‌لیتر معرف رنگی دی‌نیتروسالیسیلیک اسید DNS برای توقف واکنش استفاده می شود. جذب نوری محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده می شود. بنا بر روش استفاده شده یک واحد فعالیت آنزیم آمیلاز برابر با مقدار آنزیمی است که بتواند یک میکرومول قند احیا کننده را در مدت یک دقیقه در شرایط واکنش آزاد کند. بدین ترتیب نمونه‌های منتخب بر اساس این روش مقایسه و برترین سویه انتخاب می شود.
- **رسم منحنی استاندارد مالتوز:** برای محاسبه میزان فعالیت آمیلاز نمونه‌های جدا شده، از منحنی استاندارد مالتوز استفاده می شود. برای ترسیم منحنی استاندارد، از مالتوز با رقت‌های ۰/۱، ۰/۴، ۰/۸ ، ۱/۲، ۱/۶، ۲ و ۴ درصد آب دو بار تقطیر و معرف رنگی دی‌نیتروسالیسیلیک اسید استفاده شود.


Glucose with DNS
0.0625%
0.125%
0.25%
0.5%
1%


Gallic acid standard curve
OD
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
120
Conc.mg ml ⁻¹
y = 0.008x + 0.049
R² = 0.985
Std.
Linear (Std.)

روش های تولید

به صورت کلی دو روش برای **تولید آلفا آمیلاز** در مقیاس تجاری وجود دارند :

- تخمیر غوطه وری (Submerged fermentation)
- تخمیر حالت جامد (Solid State fermentation)

روش دوم روش نسبتا جدیدی است، درحالیکه روش اول روشی قدیمی و شناخته شده برای تولید آنزیم ها از میکروب هاست.

❖ روش SmF

تخمیر غرقابی یا غوطه وری (SmF) از بسترهای مایع با جریان آزاد ملاس و یا مایع حاوی پروتئین و سایر مواد مورد نیاز برای کشت میکروب استفاده می کند. در این حالت محصولات حاصل از تخمیر در مایع تخمیر ترشح می شوند. بسترها سریعا استفاده می شوند، از این رو باید سریعا جایگزین شوند. این روش تخمیر برای میکروارگانیسم هایی و میکروب هایی است که برای رشد به رطوبت زیادی نیاز دارند.

❖ روش SSF

تخمیر حالت جامد (SSF) برای میکروب هایی مورد استفاده قرار می گیرد که برای رشد آنها به رطوبت کمتری نیاز است. بسترهای جامدی که برای این روش استفاده می شوند عبارتند از سبوس، تفاله نیشکر و خمیر کاغذ. مزیت اصلی این روش امکان جداسازی راحت مواد زائد از مواد مغذی است.

COCONUT
WATER

DIOSCOREA
ALATA

RICE SOUP
(ORYZA SATIVA)

TAPIOCA WATER
(CASSAVA)

قارچ ها و مخمر ها به عنوان میکروارگانیسم های مناسب برای برای این فرآیند هستند درحالیکه باکتری ها نامناسب به شمار می آیند.

بر خلاف روش SmF در این روش بسترها به صورت کاملا آهسته مورد استفاده قرار می گیرند. از همین رو می توان این بسترهای جامد را به مدت زمان طولانی تری استفاده کرد. از دیگر مزایایSSF نسبت به SmF می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- تجهیزات ساده تر
- حجم تولید بالاتر
- غلظت بالاتر محصولات و تولید پساب کمتر

با توجه به موراد ذکر شده این امیدواری وجود دارد که روش SSF جایگزین مناسبی برای SmF باشد.

آمیلاز باکتریایی

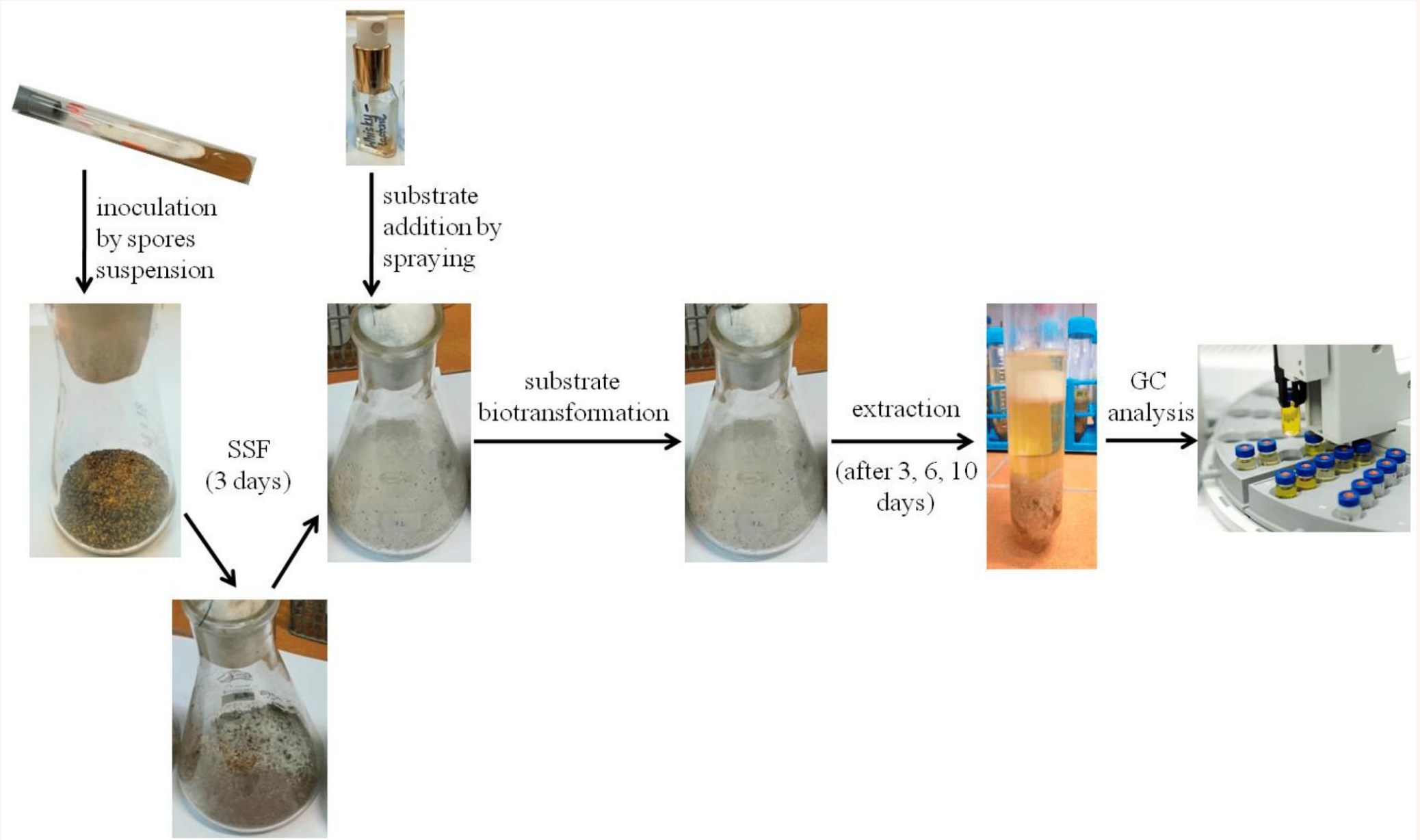
آلفا آمیلاز را می توان با استفاده از میکروارگانیسم های متفاوتی تولید کرد، اما برای کاربردهای تجاری این آنزیم عموماً از genus *Bacillus* تولید می شود. آلفا-آمیلاز تولید شده از باسیلوس های *licheniformis*، *stearothermophilus* و *amyloliquefaciens* در صنایع غذایی ، نساجی و کاغذ کاربرد دارند.

آمیلازهای قارچی

قارچ هایی که برای این کار می توان استفاده کرد محدود هستند و و غالباً مربوط به قارچ های مزوفیلیک هستند. منابع قارچی معمولا به دو نوع *Aspergillus* و *Penicillium* محدود می شوند.

پارامترهای موثر در هیدرولیز نشاسته

ترکیبات بدست آمده از هیدرولیز نشاسته شدیداً تحت تاثیر دما، شرایط هیدرولیز و منشا آنزیم هستند. pH بهینه ای که برای این کار بدست آمده ۷ است.
آلفا آمیلاز به دلیل توانایی در هیدرولیز نشاسته و انجام فعالیت هایی که می تواند منجر به هیدرولیز شود، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. یکی از کارهایی که این آنزیم قادر به انجام آن است، تولید شربت گلوکز و فروکتوز از نشاسته است. این ماده اولین مرحله این فرآیند را کاتالیز می کند.
در گذشته نشاسته با استفاده از اسید هیدرولیز می شد، اما این روش به دلیل ماهیت اسیدی و دمای بالای مورد نیاز مشکلات و محدودیت های زیادی داشت. این محدودیت ها با استفاده از آنزیم کاتالیستی مرتفع شدند.


inoculation
by spores
suspension
substrate
addition by
spraying
SSF
(3 days)
substrate
biotransformation
extraction
(after 3, 6, 10
days)
GC
analysis

با تشکر از توجه شما
با آرزوی سلامتی و موفقیت