

## دست‌ورزی بیوسنتز نشاسته و تولید بیوپلیمر در گیاهان (مقاله مروری)

فرهاد نظریان فیروزآبادی\*

دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۵)

### چکیده

نشاسته پلی‌ساکاریدی مرکب از واحدهای گلوکز است که از دو جزء آمیلوز و آمیلوپکتین تشکیل شده است. آمیلوز ترکیبی خطی از واحدهای گلوکز  $\alpha(1-4)$  است، اما آمیلوپکتین نسبتاً دارای شاخه‌های  $\alpha(1-6)$  فراوانی است. بسته به نوع گونه گیاهی و محل ساخت و ساز نشاسته، نسبت این دو جز متغیر است، اما به‌طور کلی در بیشتر گونه‌ها میزان آمیلوز در حدود ۲۰ درصد است. اگرچه این پلی‌ساکارید مهم به همان شکلی که در گیاه تولید می‌شود دارای کاربردهای متعددی در صنایع غذایی، دارویی و ... است، اما استفاده از آن به همین شکل و بدون اعمال تیمارهای فیزیکو-شیمیایی با محدودیت‌های فراوانی مواجهه است و لذا چندان مناسب کاربردهای صنعتی نمی‌باشد. درست به همین دلیل و برای تولید نشاسته‌هایی با خصوصیات مطلوبی چون حداقل پس‌رفت (Retrogradation) و پایداری در چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد مجدد (Freez-thaw stability)، در نهایت نسبت به تیمار نشاسته با مواد شیمیایی اقدام می‌شود. صرف‌نظر از هزینه‌بر بودن چنین تیمارهایی در صنعت، نگرانی در مورد سلامت بشر و آلودگی محیط‌زیست را می‌توان از مضرات دیگر این روش‌ها برشمرد. دست‌ورزی در سطح آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز نشاسته امکان اصلاح کیفیت نشاسته تولیدی در گیاهانی مانند سیب‌زمینی، کاساوا، ذرت، گندم، برنج و ... را فراهم آورده است. به‌منظور تغییر در خصوصیات فیزیکو-شیمیایی نشاسته به کمک راهکارهای مهندسی ژنتیک، از آنزیم‌های جالب‌توجهی از منابع میکروبی متعددی استفاده می‌شود تا در جریان بیوسنتز نشاسته، بتواند تغییرات مورد نظر را در داخل آمیلوپلاست اعمال کنند. خاموش‌سازی ژن‌های درگیر در بیوسنتز نشاسته و یا افزایش بیان آن‌ها، منجر به تولید نشاسته‌هایی با خصوصیات فیزیکو-شیمیایی متفاوت شده است. همچنین تولید بیوپلیمرهای که واحدهای سازنده‌ی آن‌ها به‌غیر از  $\alpha(1-4)$  و  $\alpha(1-6)$  به‌صورت پیوندهای  $\alpha(1-3,6)$  و  $\alpha(1-4,6)$  و یا ترکیبی از این‌ها به هم متصل شده باشند، به دلیل اهمیت این بیوپلیمرها در صنعت، در حال حاضر از جمله زمینه‌های تحقیقاتی مهم امروزی است.

واژگان کلیدی: بیوپلیمر، دست‌ورزی، گلوکان سوکراز، نشاسته

\* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: nazarian.f@lu.ac.ir

## مقدمه

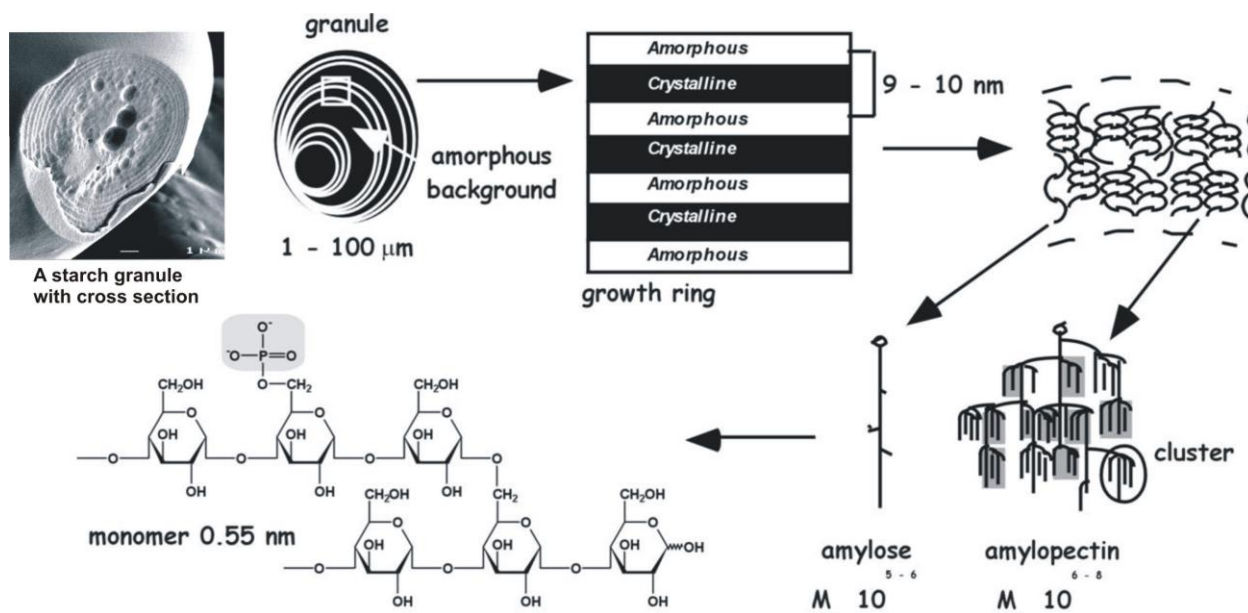
از منظر شیمیایی، کربوهیدرات‌ها پلیمرهایی حیاتی هستند که از نظر فراوانی از بقیه ماکرومولکول‌های روی زمین مهم‌ترند. بر اساس شواهد و قرائن علمی، سالانه بیش از یکصد میلیارد تن مکعب گازکربنیک ( $\text{CO}_2$ ) و آب، توسط گیاهان به کربوهیدرات‌ها و سایر ترکیبات گیاهی تبدیل می‌شود (Nelson and Cox, 2004). بیشتر پلی-ساکاریدهای موجود در طبیعت، پلی‌ساکاریدهایی هستند که از حداقل بیست منوساکارید تا بیش از هزاران واحد مونوساکارید ساخته شده‌اند. پلی‌ساکاریدها از نظر نوع و ماهیت پیوندهای شیمیایی بین واحدهای منوساکارید تشکیل دهنده آن‌ها، طول زنجیره، نوع و ماهیت پیوندهای شیمیایی بین واحدهای منوساکارید، تعداد و ماهیت شاخه‌های جانبی با یکدیگر فرق دارند (Ramesh and Tharanathan, 2003). پلی‌ساکاریدها از نظر ذخیره‌ی انرژی (نشاسته و گلیکوژن) شرکت در تشکیل اجزاء ساختمانی (سلولز، همی‌سلولز، پکتین و ...) و ارتجاع-پذیری بافت‌ها، از اهمیت حیاتی بالایی برای موجودات زنده برخوردارند. به همین دلیل، امروزه پلی‌ساکاریدها اهمیت بالای در صنایع دیگری همچون کاغذسازی و نساجی پیدا کرده‌اند.

برخلاف انسان و سایر جانوران که انرژی را به شکل واحدهای گلوکز در ساختاری به نام گلیکوژن ذخیره می‌کنند، بیشتر گیاهان گلوکز را به شکل دانه‌های نشاسته در اندام‌های خود ذخیره می‌کنند. نحوه‌ی ذخیره‌سازی نشاسته به شکل دانه، مصارف غذایی و صنعتی آن در صنایع چسب‌سازی، نساجی، کاغذسازی و غیره سبب شده است تا این کربوهیدرات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. نشاسته در دانه‌های غلات (گندم، برنج، ذرت، یولاف، جو و ...) ریشه‌ی سیب‌زمینی شیرین و

کاساوا، غده‌ی سیب‌زمینی، میوه‌ی موز، ساقه، برگ و حتی دانه‌ی گرده گیاهان ذخیره می‌شود.

## ساختمان نشاسته

نشاسته مهم‌ترین و فراوان‌ترین کربوهیدرات موجود در پیکره‌ی گیاهان است که به شکل دانه‌هایی گرد تا تخم‌مرغی شکل در آمیلوپلاست‌ها (ذخیره‌ی) و در کلروپلاست برگ‌های سبز (نشاسته موقتی) از واحدهای گلوکز ساخته می‌شود (Nazarian-Firouzabadi et al., 2007b). نشاسته موقتی در طول روز در برگ‌ها سنتز شده و در طول شب مصرف می‌شود. در مقابل، نشاسته موجود در آمیلوپلاست‌ها به‌عنوان تأمین‌کننده‌ی انرژی در اندام‌ها ذخیره شده تا بعداً مورد استفاده‌ی گیاه قرار گیرد. هر دانه‌ی نشاسته از مناطق آمورف (Amorphous) و نواحی کریستالی تشکیل شده است (شکل ۱). هر دانه‌ی نشاسته از دو نوع پلی‌ساکارید به نام‌های آمیلوز (۲۰ تا ۳۰ درصد) و آمیلوپکتین (۷۰ تا ۸۰ درصد) تشکیل شده است. آمیلوز پلیمری خطی متشکل از واحدهای گلوکز است که توسط پیوندهای ( $\alpha$ -۱-۴) به هم متصل شده‌اند. آمیلوز در مناطق آمورف دانه قرار دارد. آمیلوپکتین پلیمری شاخه‌دار است به گونه‌ی که زنجیره‌های خطی واحدهای گلوکزی که همانند آمیلوز توسط پیوندهای ( $\alpha$ -۱-۴) به هم وصل شده‌اند در محل گلوکزهای متعددی با پیوندهای ( $\alpha$ -۱-۶) منشعب شده است (شکل ۱). انشعاب‌های جانبی در مولکول‌های بزرگ آمیلوپکتین، دارای نظم خاصی هستند، به همین دلیل این پلیمر فوق سنگین قادر است به شکل خوشه‌هایی در دل دانه‌های نشاسته قرار بگیرد. تشکیل مارپیچ‌های مضاعف، یکی از خصوصیات جالب توجه آمیلوپکتین است که علی‌رغم وزن مولکولی بالای آن، این ماکرومولکول قادر است در بخش نیمه کریستال دانه جای بگیرد (Thompson, 2000).



شکل ۱- نمایش کلی ساختار یک دانه نشاسته متشکل از لایه‌های مختلف. آمیلوز و آمیلوپکتین دو جزء سازنده نشاسته هستند

Figure 1. Over view of various levels of a potato starch granule organization. Amylose and amylopectin are two components of starch granules

۱). برخی از این آنزیم‌ها خود دارای ایزوفرم‌های متعددی بوده که هر یک وظیفه‌ای خاص و گاه موازی با برخی دیگر از آنزیم‌ها را بر عهده دارند. اگرچه برخی از این آنزیم‌ها با اثرات پلائیوتروپی خود در برخی دیگر از فعالیت‌ها دخالت می‌کنند، اما گاهاً نبود یک آنزیم و یا خاموش‌سازی آن می‌تواند اثرات متفاوتی از تغییر در خصوصیات فیزیکی - شیمیایی نشاسته تا تغییرات اندک و قابل اغماض را سبب شوند. پیشرفت‌های ژنتیک مولکولی و استفاده از اصول مهندسی ژنتیک به ما کمک کرده است تا پرده از راز چگونگی سنتز نشاسته برداریم. جمع‌بندی نتایج حاصل از تحقیقات متعدد نشان می‌دهد که دانه‌ها در داخل آمیلوپلاست و یا کلروپلاست گیاهان و با مشارکت تعداد زیادی آنزیم منحصربه‌فرد ساخته می‌شوند. به‌طور کلی، بیوسنتز دانه‌های نشاسته طی سه مرحله صورت می‌گیرد:

(۱) انتقال گلوکز-۶- فسفات (GLC-6-P) به درون پلاست‌ها

یکی از موارد قابل توجه در مورد نشاسته این است که نسبت دو جزء تشکیل دهنده آن یعنی آمیلوز و آمیلوپکتین روی خصوصیات فیزیکی - شیمیایی آن و از این‌رو مصارف صنعتی آن تأثیر بسزایی دارد. برای مثال، نشاسته‌های که یا در اثر جهش (Van Der Leij *et al.*, 1991) و یا با روش‌های مهندسی ژنتیک در سنتز آمیلوز آن‌ها مشکل ایجاد شده است (Visser *et al.*, 1991) و یا به عبارت بهتر دانه کاملاً از آمیلوپکتین تشکیل شده است، دارای ویسکوزیته، حلالیت، درجه ژلاتینه شدن،... کاملاً متفاوتی هستند.

### چگونگی سنتز نشاسته در اندام‌های ذخیره‌ای (بیوسنتز نشاسته)

تجزیه و تحلیل جهش‌یافته‌های مختلف مربوط به آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز نشاسته، دانشمندان را قادر ساخته است تا اطلاعات ارزشمندی را در خصوص مسیر بیوسنتز نشاسته به دست آورند. با وجود آنکه نشاسته تنها از یک نوع مونومر به نام گلوکز ساخته شده است، اما آنزیم‌های متعددی در بیوسنتز آن دخالت دارند (جدول

ایزوفرم دیده می‌شود که یکی در سنتز نشاسته‌ی ذخیره‌ای (GBSSI) و دیگری در سنتز نشاسته‌ی موقتی در برگ‌ها (GBSSII) دخالت دارند. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های این آنزیم، فعالیت انحصاری در سنتز آمیلوز است (Kuipers *et al.*, 1994) هرچند که شواهدی از دخالت این آنزیم در بیوسنتز آمیلوپکتین نیز در دست است (Baba *et al.*, 1987; Denyer *et al.*, 1996; Denyer *et al.*, 2001; van de Wal *et al.*, 1998).

همان‌طوری که گفته شد، آمیلوز پلیمری خطی، اما آمیلوپکتین یک پلیمر شاخه‌دار است. برای ایجاد شاخه‌های جانبی  $\alpha(1-6)$  بر روی زنجیره‌های خطی  $\alpha(1-4)$ ، گروه دیگری از آنزیم‌ها در پلاست‌ها وجود دارند که به آنزیم‌های شاخه‌ساز نشاسته (SBES) معروف‌اند (جدول ۱). این آنزیم‌ها از زنجیره‌های ساخته شده‌ی  $\alpha(1-4)$  به‌عنوان پیش ماده استفاده کرده و با قطع این زنجیره‌ها و برداشتن زنجیره‌ی کوتاه از گلوکزهای به هم متصل شده، آن‌ها را با ایجاد پیوندهای  $\alpha(1-6)$  به شکل یک شاخه‌ی جانبی روی زنجیره‌های خطی  $\alpha(1-4)$  سوار می‌کنند (شکل ۱). آنزیم‌های شاخه‌زای نشاسته دارای ایزوفورم‌های متعددی هستند که از نظر تعداد واحدهای گلوکزی که در شاخه قرار می‌دهند، با هم فرق دارند (جدول ۱). در ادامه، آمیلوپکتین در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم‌های موسوم به شاخه‌زدای نشاسته (EC 2.4.1.4.1) و همچنین فعالیت برخی دیگر از آنزیم‌ها (EC 2.4.1.25; Dbe) به شکل کریستال در دانه‌های نشاسته نمود پیدا می‌کند.

#### نشاسته‌ی معمول و نشاسته‌ی تغییر شکل یافته

با وجود آن‌که نشاسته به‌صورت دست نخورده و خام دارای کاربردهای متعدد غذایی و صنعتی است، اما فقدان برخی مشخصات مورد نیاز بخش صنایع غذایی و سایر صنایع و یا وجود برخی خصوصیات ذاتی و نامطلوب مانند واگشتگی (Retrogradation) در نشاسته‌های خام و دست نخورده، سبب شده است تا محققان به دنبال روش‌های برای تغییر متناسب نشاسته باشند. هنگامی که نشاسته و یا ترکیبات حاوی نشاسته حرارت داده می‌شوند،

(۲) سنتز ADP - گلوکز (ADP-Glc) از گلوکز-۱- فسفات (Glc-1-P)

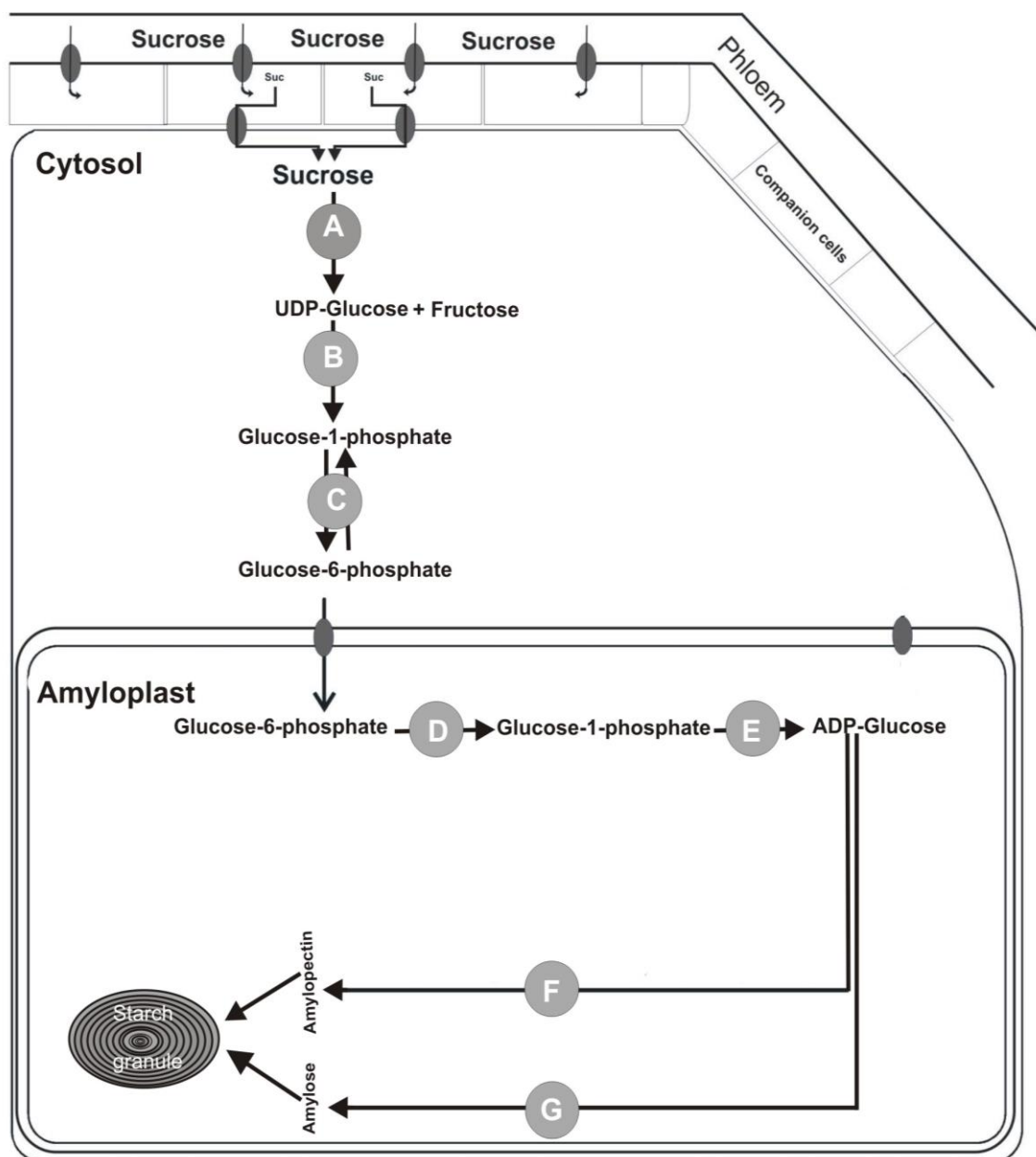
(۳) سنتز نشاسته از ADP - گلوکز به کمک آنزیم‌های سنتزکننده‌ی نشاسته

در آغاز، ساکارز از بافت فلوئم و به کمک ناقل‌های پروتئینی وارد سیتوپلاسم سلول می‌شود. ساکارز موجود در داخل سلول یا به واکوئل‌ها منتقل شده و یا توسط برخی از آنزیم‌ها به گلوکز و فروکتوز شکسته می‌شود. همان‌طوری که در شکل ۲ دیده می‌شود، این امکان وجود دارد که ساکارز توسط آنزیم ساکارز سنتاز (EC 2.4.1.13; SuSy) در سیتوسول به فروکتوز و UDP-گلوکز تبدیل شود. در مرحله بعد، UDP-گلوکز توسط آنزیم UGPase به گلوکز-۱- فسفات تبدیل می‌شود. در ادامه، این قند نوکلئوتیددار توسط آنزیم دو کاره‌ی فسفوگلوکوموتاز (EC 2.7.5.1 Pgm) سیتوپلاسمی به گلوکز-۶- فسفات تبدیل می‌گردد. تا این جای کار، این تغییر و تحولات در داخل سیتوپلاسم سلول رخ می‌دهد. گلوکز-۶- فسفات توسط ناقل‌های پروتئینی در دیواره‌ی پلاست‌ها به داخل کشیده می‌شود (Kammerer *et al.*, 1998) که بعداً توسط آنزیم فسفوگلوکوموتاز پلاستیدی به گلوکز-۱- فسفات تبدیل می‌شود. اولین قدم در شروع ساخت نشاسته، تبدیل گلوکز-۱- فسفات به قند نوکلئوتیددار ADP-گلوکز توسط ADP-گلوکز پیرو فسفوریلاز (EC 2.7.7.27; AGPase) است (Tauberger *et al.*, 2000).

در ادامه آنزیم‌های موسوم به سولوبل استارچ سنتاز (EC 2.4.1.21; SSs)، گلوکز موجود در ساختمان ADP - گلوکز را برداشته و آن را به انتهای کاهش نیافته‌ی یک زنجیره خطی  $\alpha(1-4)$  گلوکان متصل می‌کنند. انواع متعددی از این آنزیم‌ها شناسایی شده‌اند که از نظر توانایی انتقال تعداد واحدهای گلوکز، با هم دیگر فرق دارند (جدول ۱). این آنزیم‌ها که در فاز محلول یا استروما هستند، هم‌زمان در کار سنتز آمیلوز و آمیلوپکتین فعالیت دارند. یکی از آنزیم‌های مهم در بیوسنتز نشاسته، آنزیمی موسوم به آنزیم GBSS است. این آنزیم به دو شکل یا

روش‌های متعددی برای غلبه بر واگستگی نشاسته توسط دانشمندان پیشنهاد شده است. در بین این روش‌ها، تیمارهای نشاسته با مواد شیمیایی و یا به اصطلاح استیلاسیون و هیدروکسی پروپیلایسیون برای بهبود خصوصیات فیزیکی-شیمیایی آن از قدمتی چند ده ساله برخوردار هستند.

نشاسته در جریان خنک‌سازی تیره می‌شود. این پدیده به این دلیل رخ می‌دهد که حرارت دادن سبب شکستن ساختار کریستالی نشاسته شده و در جریان خنک‌سازی بار دیگر کریستال‌ها به کمک ماکرومولکول آمیلوز تشکیل می‌شوند. پیامد چنین پدیده‌ای، آب انداختن مواد غذایی حاوی نشاسته، تشکیل بلورهای یخ در مواد غذایی و در نهایت فساد و تغییر مزه آن‌هاست (Singh *et al.*, 2004).



شکل ۲- شماتیک مسیر بیوسنتز نشاسته در غده‌ی سیب‌زمینی. برای اطلاع از نام هر یک از آنزیم‌های مشخص شده با حروف بزرگ لاتین (A-G) به جدول ۱ مراجعه کنید

Figure 2. Starch biosynthetic pathway in potato tuber. For more information about enzymes (A-G) involved in the pathway, see table 1

جدول ۱- خلاصه‌ای از ژن‌ها و آنزیم‌های شناخته شده در بیوسنتز نشاسته در غده‌ی سیب‌زمینی

Table 1. Summary of different genes involved in biosynthesis of potato tuber starch

آنزیم Enzyme	محل فعالیت Location	نام ژن Gene Name	عمل Function
Sucrose Synthase	سیتوسول Cytosol	<i>Susy</i>	تبدیل ساکارز به UDP گلوکز و فروکتوز The conversion of sucrose to UDP glucose and fructose
Phosphoglucomutases (EC 2.7.5.1)	سیتوسول و آمیلوپلاست Cytosol and Amyloplast	<i>Pgm</i>	سنتز UDP-Glc از Glc-1-P Catalyzes Glc-6P ↔ Glc-1P
ADP-glucose Pyrophosphorylase (EC. 2.7.7.27)	سیتوسول و آمیلوپلاست Cytosol and Amyloplast	<i>Agp</i>	سنتز ADP-Glc از Glc-1-P و ATP Catalyzes formation of ADP-Glc from Glc-1P and ATP
Granule-Bound Starch synthase I (EC. 2.4.1.21)	آمیلوپلاست (متصل به دانه) Amyloplast (attached to the grain)	<i>GbsI</i>	سنتز آمیلوز Synthesises amylose
Granule-Bound Starch synthase II (EC. 2.4.21)	آمیلوپلاست (متصل به دانه) Amyloplast (attached to the grain)	<i>GbsII</i>	سنتز آمیلوپکتین Synthesises amylopectin
Soluble Starch Synthase I (E.C. 2.4.1.21)	آمیلوپلاست (در فاز محلول) Amyloplast (attached to the grain)	<i>SssI</i>	سنتز آمیلوپکتین Synthesises amylopectin
Soluble Starch Synthase II (E.C. 2.4.1.21)	سیتوسول (در فاز محلول) Cytosol-solution	<i>SssII</i>	سنتز آمیلوپکتین Synthesises amylopectin
Soluble Starch Synthase III (E.C. 2.4.1.21)	آمیلوپلاست (در فاز محلول) Amyloplast (Solution)	<i>SssIII</i>	سنتز آمیلوپکتین Synthesises amylopectin
Starch-Branching Enzyme I (EC. 2.4.1.18)	آمیلوپلاست (تا حدودی متصل به دانه) Amyloplast (Partially attached to the grain)	<i>SbeI</i>	انتقال قطعات (1-4)α به محل گروه OH زنجیره‌ی دیگر در حال ساخت Transfers a segment of a α(1-4) glucan chain to a primary hydroxyl group in a similar glucan chain
Starch-Branching Enzyme II (EC. 2.4.1.18)	آمیلوپلاست Amyloplast	<i>SbeII</i>	انتقال قطعات (1-4)α به محل گروه OH زنجیره‌ی دیگر در حال ساخت Transfers a segment of a α(1-4) glucan chain to a primary hydroxyl group in a similar glucan chain
Disproportionating Enzyme (E.C. 2.4.1.25)	آمیلوپلاست Amyloplast	<i>Dpe-P</i>	انتقال قطعات (1-4)α به موقعیت جدیدی از یک پذیرنده (گلوکز یا یک زنجیره (1-4)α) Transfers a segment of a α(1-4) glucan chain to a new position in an acceptor, which may be glucose or another α(1-4) glucan
De-Branching Enzyme (EC. 3.2.1.41)	آمیلوپلاست Amyloplast	<i>Dbc</i>	هیدرولیز پیوندهای (1-6)α ساختار آمیلوپکتین Hydrolyses the α(1-6)-glucosidic linkages in amylopectin
α-Glucan Water dikinase (EC. 2.7.9.4)	آمیلوپلاست Amyloplast	<i>Wdk</i>	اتصال فسفات β مولکول ATP به موقعیت C3 یا C6 گلوکزها در ساختمان آمیلوپکتین Adds the β-phosphate group of ATP to either the C-3 or the C-6 of a glucosyl residue of amylopectin.

هم استیلاسیون و هم هیدروکسی پروپیلایسیون در کاهش واگشتگی و افزایش ظرفیت نگهداری آب و همچنین بالا بردن توانایی نشاسته در تحمل چرخه‌های متعددی از یخ بستن و ذوب شدن (Freeze-Thaw) مؤثر واقع شده‌اند (Perera and Hoover, 1999).

### روش‌های DNAی نو ترکیب در تولید نشاسته‌های

#### مطلوب

در صنعت برای استیلاسیون نشاسته از مواد شیمیایی چون انیدرید استیک و ونیل استات استفاده می‌شود. در جریان تیمار نشاسته با چنین موادی، گروه‌های آب‌دوست OH روی کربن‌های C2، C3 و C6 واحدهای گلوگز، جای خود را به گروه‌های آب‌گریزی مانند استیل (-CH<sub>3</sub>CO)، متیل (-CH<sub>3</sub>) و فسفات (PO<sub>4</sub>) می‌دهند (Lawal, 2004; Perera and Hoover, 1999). گروه‌های استیل مانع تشکیل پیوند بین زنجیره‌های بلند آلفا گلوکان‌های مانند آمیلوز شده و از این‌رو به کاهش درجه‌ی ژلانی شدن نشاسته، افزایش پیک گرانروی، کاهش واگشتگی در جریان خنک‌سازی و بهبود فرآیند یخ بستن - ذوب شدن می‌شوند (Xu et al., 2004). این روش تیمار شیمیایی چندین دهه است که شروع شده است و هم‌اکنون نیز ادامه دارد. با افزایش روزافزون نگرانی‌های زیست‌محیطی و گرایش مردم به استفاده از مواد و ترکیبات طبیعی عاری از مواد شیمیایی، صنایع غذایی و کشاورزی به دنبال جایگزینی برای تیمار مواد شیمیایی هستند. هزینه‌های اضافی جداسازی بقایای مواد شیمیایی از نشاسته‌های تیمار شده نیز یکی از علل تمایل بخش صنعت در جایگزینی روش‌های شیمیایی تیمار نشاسته است. امروزه با پیشرفت و ابداع راه‌کارهای مولکولی، محققان سعی کرده‌اند نشاسته‌هایی را با خصوصیات مطلوب مورد نیاز صنایع غذایی و دیگر صنایع توسط خود گیاه تولید کنند، به گونه‌ای که نشاسته پس از تولید دیگر نیازی به تیمار با مواد شیمیایی یا آنزیمی خاصی نداشته باشد و بلافاصله قابل مصرف باشد. برای مثال، امروزه گیاهان تراریخت چندی مانند سیب‌زمینی (Nazarian-Firouzabadi et al., 2007; Nazarian-Firouzabadi et al., 2007a; Nazarian-Firouzabadi et al., 2012; Nazarian-Firouzabadi et al., 2007b; Nazarian Firouzabadi et al., 2007) گندم (Regina et al., 2006)، جو (Regina et al., 2007)

### تغییر در ساختار نشاسته به کمک اخلاص در ژن‌های

#### مسیر بیوسنتز نشاسته

تاکنون محققان از راهکارهای متعدد مهندسی ژنتیک برای تولید نشاسته‌هایی با خصوصیات مطلوب مورد نظر استفاده کرده‌اند. در ذیل به برخی از این روش‌ها و پیشرفت‌های مربوطه اشاره خواهد شد.

تغییر در ساختار نشاسته به کمک اخلاص در ژن‌های مسیر بیوسنتز نشاسته طی دو دهه‌ی گذشته، محققان سعی کرده‌اند تا ضمن شناسایی ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز نشاسته، به روش‌های DNAی نو ترکیب در کار آن‌ها اخلاص ایجاد کنند. در همین راستا، محققان برای اولین بار موفق شدند تا به کمک فن‌آوری خاموش‌سازی ژن، مانع ترجمه‌ی mRNAهای کدکننده‌ی آنزیم GBSSI در غده‌ی سیب‌زمینی شوند (Visser et al., 1991). نتیجه‌ی این تحقیق تولید سیب‌زمینی‌های تراریختی است که نشاسته‌هایی را تولید می‌کنند که به‌کلی فاقد آمیلوز هستند، این نشاسته که به نشاسته‌ی فاقد آمیلوز (Amylose free; *amf*) مشهور شد، از خصوصیات فیزیکی-شیمیایی منحصر به فردی برخوردار است.

اگرچه کاهش درصد آمیلوز سبب تولید نشاسته‌های با خصوصیات مطلوب مورد نظر صنعت گردیده است، ولی با توجه به خصوصیات خاص آمیلوز، صنعت به دنبال نشاسته‌های بود که درصد یا نسبت آمیلوز آن‌ها در مقایسه با آمیلوپکتین بالاتر باشد. چنین نشاسته‌های دارای خواص بسیار مفیدی از جمله مقاومت در مقابل گرما هستند و در صنعت غذا و دارو دارای کاربردهای فراوانی می‌باشند. برای نیل به این هدف، شال و همکاران (۲۰۰۰)، توانستند با کاهش میزان بیان آنزیم‌های شاخه‌ساز A و B (SBEA, SBEB) در سیب‌زمینی، نشاسته‌های را

که اکثر این آنزیم‌ها از چندین دَمین تشکیل شده‌اند (شکل ۳). همان‌طوری که گفته شد در ساختمان آنزیم‌ها، حداقل یک دَمین برای اتصال به سویسترا به نام CBM وجود دارد. در صورتی که این آنزیم‌ها در عمل خرد شدن نشاسته دخالت داشته باشند به این دَمین (Starch SBD Binding Domain) اطلاق می‌شود (Janeček *et al.*, 2003). همان‌طوری که در شکل ۳ ملاحظه می‌کنید، دَمین SBD در این آنزیم‌ها یا در پایانه‌ی C و یا در پایانه N قرار دارد، از طرف دیگر تعداد این دَمین‌ها ممکن است بیش از یک عدد بوده که توسط یک توالی لینکر به هم متصل شده باشند. نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین؛ یکی از پارامترهای مهم تعیین‌کننده‌ی خصوصیات فیزیکی-شیمیایی نشاسته است (Schwall *et al.*, 2000).

تولید کنند که در مقایسه با شاهد مقادیر آمیلوز نسبتاً بالاتری (بیش از ۶۰ درصد) داشتند (Schwall *et al.*, 2000).

### تغییر در خصوصیات نشاسته به کمک بیان پروتئین‌های باکتریایی

تحقیقات نشان می‌دهد که حداقل ۱۰ درصد آنزیم‌های آمیلولیتیک قادرند به کمک دَمینی موسوم به دَمین اتصال به کربوهیدرات‌ها (Carbohydrate Binding Domain; CBD) به پیش‌ماده‌ی خود متصل شوند (Janeček *et al.*, 2003)، این آنزیم‌ها غالباً توسط باکتری‌ها سنتز می‌شوند. عمده وظیفه‌ی ذاتی این آنزیم‌ها، بیوسنتز بیوپلیمرهای مهم است. تعداد زیادی از این آنزیم‌های باکتریایی به صورت دقیق مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان می‌دهد

#### 1) *Aspergillus niger* glucoamylase



#### 2) *Rhizopus oryzae* glucoamylase



#### 3) *Paenibacillus polymyxa* $\alpha, \beta$ -amylase



#### 4) *Lactobacillus manihotivorans* $\alpha$ -amylase



#### 5) *Thermoactinomyces vulgaris* $\alpha$ -amylase



#### 6) *Thermotoga maritima* pullulanase



شکل ۳- نمایش شماتیک تعدادی از انواع SBD (Starch Binding Domain). SBDها بر اساس هم‌ردیفی اسیدهای آمینه به گروه‌های متعددی در پایگاه داده‌ی Cazy تقسیم‌بندی می‌شوند. این شکل بر اساس پیش‌بینی پایگاه CDD (Conserved Domain Database) به آدرس <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> ایجاد شده است

Figure 3. An illustration of various starch-binding domains architecture. Various SBDs are classified in different groups according to their amino acid sequence similarities deposited in Cazy database. Conserved Domain Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) was use to draw the figure



نشاسته در سیب‌زمینی به کمک روش‌های مهندسی ژنتیک، سبب کاهش طول شاخه‌های جانبی (۶-۱) $\alpha$  آمیلوپکتین گردید. نشاسته‌ی حاصل از چنین گیاهان تراریختی قادرند تا ۵ چرخه بیشتر از گیاهان غیر تراریخت یخ بستن و ذوب شدن را تحمل کنند، بدون آنکه روی کیفیت نشاسته تأثیری مشاهده شود (Jobling, 2004; Jobling et al., 2002).

گلیکوژن یک پلی‌ساکارید سنگین است که شباهت‌های زیادی با آمیلوپکتین نشاسته‌ی گیاهان دارد. این پلی‌ساکاریدها به‌عنوان منبع انرژی توسط جانوران و برخی باکتری‌ها سنتز می‌شوند. گلیکوژن در مقایسه با آمیلوپکتین از زنجیره‌های کوتاه‌تری برخوردار است، محلول در آب بوده و شاخه‌های جانبی آن همانند آمیلوپکتین از نظم خاصی برخوردار نیستند (Myers et al., 2000). تشکیل شاخه‌های (۶-۱) $\alpha$  در گلیکوژن توسط آنزیم *glgB* صورت می‌گیرد. معرفی آنزیم *glgB* باکتری *E. coli* به دو لاین سیب‌زمینی، منجر به تولید سیب‌زمینی‌های با درجه‌ی بالای از آمیلوپکتین بیشتر منشعب شده انجامید (Kortstee et al., 1996). معرفی آنزیم گلیکوژن سنتاز (*glgA*) باکتری *E. coli* به گیاه سیب‌زمینی منجر به تغییر درجه شاخه‌ای شدن آمیلوپکتین و افزایش میزان آمیلوز گردید (Shewmaker et al., 1994). هوانگ و همکاران (۲۰۱۳) با ساخت سامانه‌های ژنی متشکل از *glgB* و SBD، ضمن فراهم آوردن امکان تماس حداکثری بین آنزیم *glgB* و نشاسته‌ی در حال ساخت، دانه‌های نشاسته‌ی متخلخلی تولید کردند (شکل ۴) که در صنعت غذا و دارو می‌تواند از مزیت‌های فراوانی برخوردار شود. این دانه‌ها قادرند در نقش پوشش پلاستیکی کپسول‌های دارویی، مواد مؤثره داروها را در خود نگه‌داشته و آرام‌آرام آن‌ها را در بدن آزاد کنند (Huang et al., 2013).

نشاسته‌های استیله شده در صنعت موارد کاربرد فراوانی چون صنایع غذایی دارد. نشاسته‌های استیله شده

در طی یکی دو دهه اخیر، محققان راهکارهای را به‌بوته-ی آزمایش گذاشته‌اند تا به کمک آن‌ها بتوانند این نسبت را تغییر دهند. بسته به نوع گیاه و یا به عبارتی نشاسته‌ی تولیدی، نسبت مورد نظر ثابت و مقداری مشخص است. در حالت کلی میزان آمیلوز دانه‌ی نشاسته کمتر از میزان آمیلوپکتین آن است. در برخی از موارد مانند گیاه جهش‌یافته‌ی فاقد آمیلوز (*amf*) در سیب‌زمینی، گیاه قادر به تولید آنزیم GBSSI نیست و از این‌رو نمی‌تواند آمیلوز تولید کند، لذا دانه‌های نشاسته فقط از آمیلوپکتین ساخته شده‌اند. در سیب‌زمینی، میزان آمیلوز در حالت طبیعی در حدود ۲۰ درصد است. تحقیقات نشان می‌دهد که هر چقدر میزان آمیلوز در نشاسته بیشتر باشد، میزان واگشتگی نشاسته و در نتیجه فساد غذاهای حاوی نشاسته بیشتر است. همچنین در صورت استفاده از این نوع از نشاسته‌ها به‌عنوان قوام دهنده یا نگه‌دارنده در مواد غذایی، در صورت قرار دادن آن‌ها در فریزر و یخ زدن و ذوب شدن متوالی (Freeze-Thaw)، مواد غذایی در اصطلاح آب انداخته، دانه‌های یخ در آن‌ها تشکیل شده و در نهایت تغییر مزه داده و فاسد می‌شوند. نشاسته‌های فاقد آمیلوز مانند *amf* از این نظر بهتر هستند. به‌طور کلی برای تولید نشاسته‌هایی مقاوم در مقابل چرخه‌های متعددی از یخ بستن - ذوب شدن، سه راه‌کار وجود دارد: الف) کاهش طول ماکرومولکول آمیلوز ب) کاهش طول شاخه‌های جانبی (۶-۱) $\alpha$  آمیلوپکتین و ج) افزایش تعداد شاخه‌های جانبی (۶-۱) $\alpha$  با تعداد کمتری از گلوکز.

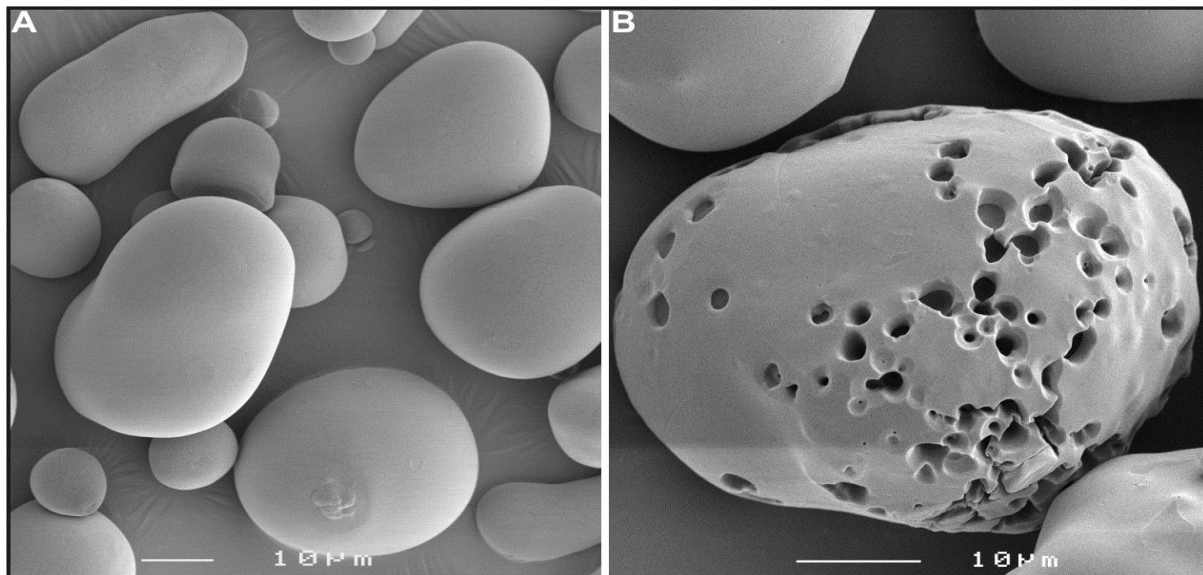
همانند سایر موارد، دست‌ورزی و عمدتاً خاموش‌سازی تک‌تک و یا همزمان آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز نشاسته، منجر به تولید گیاهان تراریختی شده است که نشاسته‌های آن‌ها از خصوصیات مورد تقاضای صنایع غذایی برخوردارند. برای مثال، جلوگیری از بیان همزمان سه آنزیم مهم SSII، SSIII و GBSSI (جدول ۱) در بیوسنتز

آنزیم فعال مالتوز استیل ترانسفراز (MAT) در دانه‌های نشاسته به صورت فعال بود.

### تولید پلی‌ساکاریدهای جدید در گیاهان

تولید پلی‌ساکاریدهای متنوع و مهم در گیاهان، سال‌هاست که توجه محققان را به خود جلب کرده است. هدف از این‌گونه مطالعات استفاده از گیاهان به‌عنوان کارخانه‌هایی در جهت تولید ترکیبات به‌خصوص پلی‌ساکاریدهایی است که عمدتاً در جانوران و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. صرف‌نظر از برخی اثرات جانبی روی رشد و نمو گیاهان تراریخت، غالباً میزان تولید چنین پلی‌ساکاریدهایی در گیاهان تراریخت چندان زیاد نیست بنابراین، محققان معتقدند برای تولید انبوه این قبیل پلی‌ساکاریدهای خارجی و مهم صنعتی در گیاهان، باید تحقیقات بیشتری به‌عمل آورند. تغییر در ساختار پلی‌ساکاریدهای موجود در گیاه همانند نشاسته و تنوع‌بخشی به نوع پیوند بین گلوکزها، یکی از اهداف بلندپروازانه‌ی معرفی ژن‌های بیگانه به سیب‌زمینی است (Kok-Jacon *et al.*, 2005a; Kok-Jacon *et al.*, 2005b; Kok-Jacon *et al.*, 2007; Nazarian-Firouzabadi *et al.*, 2007a).

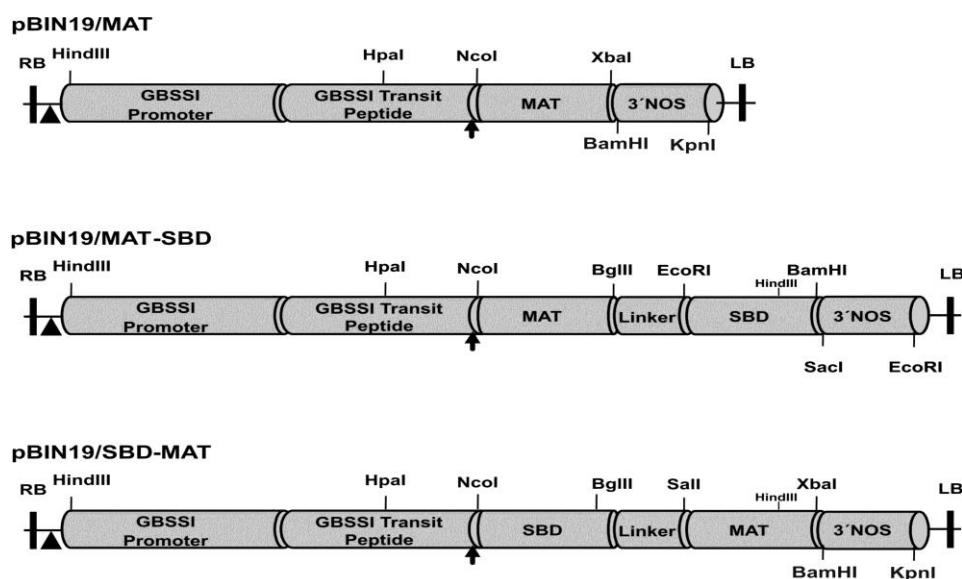
واگشتگی کمتر، توانایی نگه‌داری آب بیشتر و متحمل‌تر در مقابل چرخه‌های ذوب شدن - یخ بستن هستند (Perera and Hoover, 1999). باکتری اش‌ریشیاکولی دارای ژنی به نام *maa* است که آنزیمی به نام مالتوز استیل ترانسفراز (MAT) را کد می‌کند. این آنزیم قادر است تا گروه استیل را از روی سویسترای استیل کو آ برداشته و آن را جایگزین گروه‌های OH الیگو ساکاریدها و از آن جمله مالتوز نماید (Lo Leggio *et al.*, 2003). سؤال اساسی برای محققان در بدو امر این بود که آیا می‌توان با معرفی این آنزیم گیاه تراریختی تولید کرد که قادر به تولید نشاسته‌ی استیله شده باشد؟ از آن‌جایی که نشاسته در آمیلوپلاست‌های سیب‌زمینی تولید می‌شود، نظریان و همکاران (۲۰۰۷) ژن *maa* را به گونه‌ای در سه سامانه‌ی ژنی جداگانه همسانه سازی کردند (شکل ۵) تا ضمن بیان در غده و ورود به آمیلوپلاست، روی نشاسته‌ی در حال سنتز متمرکز شود. این محققان برای نیل به مورد آخر از SBD استفاده کردند (Nazarian Firouzabadi *et al.*, 2007). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گیاهان تراریخت سیب‌زمینی، قادر به تولید نشاسته‌های استیله بودند. نکته جالب توجه در مورد این نشاسته‌ها، وجود



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) دانه‌های نشاسته. (A) دانه‌ی نشاسته از گیاه غیر تراریخت (شاهد)؛ (B) دانه‌ی

نشاسته از گیاه تراریختی که ژن شاخه‌ساز نشاسته‌ی باکتری *E. coli* را بیان می‌کند

Figure 4. Scanning electron microscopy (SEM) analysis of starch granules. A) A non-transgenic starch granule; B) A transgenic starch granule expressing *E. coli* glycogen branching enzyme (*glgB*)



شکل ۵- نمایش شماتیک سه سامانه‌ی ژنی برای بیان ژن *maa* در آمیلاپلاست‌های غده‌ی سیب‌زمینی. از پروموتور و پپتید نشانه‌ی GBSSI برای بیان ژن در غده استفاده شد. ژن به ترتیب از بالا به پایین، به‌تنهایی، متصل به پایانه N ژن SBD و متصل به پایانه C ژن SBD همسانه‌سازی شده‌اند

Figure 5. Schematic representation of three *maa* constructs used for potato tuber amyloplast targeting. GBSSI promoter and transit peptide were used to insure potato tuber expression. *Maa* was fused to both C and N terminal of SBD

(EC 2.4.1.5) و روتران سوکراز نام‌گذاری شده‌اند. بیشتر گلوکان سوکرازها به‌جز آمیلوز سوکراز (EC 2.4.1.4)، در خانواده‌ی بزرگ گلیکولیزه‌یدرولازهای ۷۰ (GH70) قرار دارند و آمیلوسوکروز در خانواده‌ی گلیکولیزه‌یدرولازهای ۱۳ (GH13) قرار می‌گیرد.

#### سایر کربوهیدرات‌ها؟

محققان پلی‌ساکاریدهای دیگری با استعداد کاربردی در صنعت شناسایی کرده‌اند. تاکنون پلی‌ساکاریدهای چون پنتوز (Plantinose)، تری‌هالوز (Trihalose) سیکلودکسترین‌ها (Cyclodextrins) در غده سیب‌زمینی بیان شده‌اند. در تمام این موارد ژن‌های باکتریایی مانند سوکروز ایزومراز (PaiI). سیکلودکسترین‌های متعدد (CGT) مربوط به باکتری *Klebsiella* تری‌هالوز (otsB)، *otsA* باکتری *E. coli* با سامانه‌های ژنی به گیاه سیب‌زمینی منتقل شده‌اند. میزان تولید در تمام موارد چندان قابل توجه نیست تا در مقیاس صنعتی قابل بهره‌برداری باشد.

#### تولید گلوکان‌های جدید در گیاهان

گلوکان‌ها در واقع پلی‌ساکاریدهایی هستند که واحد سازنده‌ی آن‌ها منومرهای D-گلوکز است که توسط پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند. برای مثال، سلولز (بتا-۱-۴-گلوکان)، نشاسته (آلفا-۱-۴ و آلفا-۱-۶-گلوکان)، گلیکوژن (آلفا-۱-۴ و آلفا-۱-۶-گلوکان)، دکستران (آلفا-۱-۶-گلوکان)، آلترنان (آلفا-۱-۴، آلفا-۱-۶)، همگی پلی‌ساکاریدهای هستند که توسط موجودات مختلف تولید می‌شوند و عمده تفاوت آن‌ها در نوع پیوندهای گلیکوزیدی تناوب پیوندها، نوع شاخه‌های جانبی، طول شاخه‌های جانبی و ... است. گلوکان سوکرازها (EC 2.2.1.5) قادرند منومرهای گلوکز را به طرق مختلفی به همدیگر وصل کرده و پلیمرهایی را سنتز کنند که از نظر نوع پیوند گلیکوزیدی، تعداد و ساختمان با هم متفاوت هستند. تعداد آنزیم‌های این گروه بسیار زیاد است و برحسب نوع بیوپلیمر تولیدی به اسامی چون دکستران کراز (EC 2.4.1.5; DSR)، آلترنان سوکراز (EC 2.4.1.140; ASR)، موتان سوکراز (EC 2.4.1.6; GTFA)،

## References

- Baba, T., Yoshii, M. and Kainuma, K. (1987) Acceptor molecule of granular-bound starch synthase from sweet-potato roots. *Starch-Stärke*, **39**: 52-56.
- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H. and Smith, A.M. (1996). The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *The Plant Journal*, **10**: 1135-1143.
- Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S., Smith, A.M. (2001). The control of amylose synthesis. *Journal of Plant Physiology*, **158**: 479-487.
- Huang, X.F., Nazarian-Firouzabadi, F., Vincken, J-P., Ji, Q., Suurs, L.C., Visser, R.G. and Trindade, L.M. (2013). Expression of an engineered granule-bound *Escherichia coli* glycogen branching enzyme in potato results in severe morphological changes in starch granules. *Plant Biotechnology Journal*, **11**: 470-479.
- Janeček, Š., Svensson, B. and MacGregor, E. (2003). Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the  $\alpha$ -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *European Journal of Biochemistry*, **270**: 635-645.
- Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 210-218.
- Jobling, S.A., Westcott, R.J., Tayal, A., Jeffcoat, R. and Schwall, G.P. (2002). Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. *Nature Biotechnology*, **20**: 295-299.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A. and Flügge, U-I. (1998). Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *The Plant Cell Online*, **10**: 105-117.
- Kok-Jacon, G.A., Vincken, J-P., Suurs, L.C.J.M. and Visser, R.G.F. (2005a). Mutant produced in potato amyloplasts adheres to starch granules. *Plant Biotechnology Journal*, **3**: 341-351.
- Kok-Jacon, G.A., Vincken, J.P., Suurs, L.C.J.M., Wang, D., Liu, S. and Visser, R.G.F. (2005b). Production of dextran in transgenic potato plants. *Transgenic Research*, **14**: 385-395.
- Kok-Jacon, G.A., Vincken, J.P., Suurs, L.C.J.M., Wang, D., Liu, S. and Visser, R.G.F. (2007). Expression of alternansucrase in potato plants. *Biotechnology Letters*, **29**: 1135-1142.
- Kortstee, A.J., Vermeesch, A., Vries, B.J., Jacobsen, E. and Visser, R.G. (1996). Expression of *Escherichia coli* branching enzyme in tubers of amylose-free transgenic potato leads to an increased branching degree of the amylopectin. *The Plant Journal*, **10**: 83-90.
- Kuipers, A.G., Jacobsen, E. and Visser, R.G. (1994). Formation and deposition of amylose in the potato tuber starch granule are affected by the reduction of granule-bound starch synthase gene expression. *The Plant Cell Online*, **6**: 43-52.
- Lawal, O.S. (2004). Succinyl and acetyl starch derivatives of a hybrid maize: physicochemical characteristics and retrogradation properties monitored by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Research*, **339**: 2673-2682.
- Lo Leggio, L., Dal Degan, F., Poulsen, P., Andersen, S.M. and Larsen, S. (2003). The structure and specificity of *Escherichia coli* maltose acetyltransferase give new insight into the LacA family of acyltransferases. *Biochemistry*, **42**: 5225-5235.
- Myers, A.M., Morell, M.K., James, M.G. and Ball, S.G. (2000). Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology*, **122**(4): 989-998.
- Nazarian-Firouzabadi, F., Vincken, J-P. and Visser, R.G.F. (2007). Methods and Means for Producing Starch Having at Least One Altered Characteristic. US 20100064391 A1.
- Nazarian-Firouzabadi, F., Kok-Jacon, G.A., Vincken, J.P., Ji, Q., Suurs, L.C.J.M. and Visser, R.G.F. (2007a). Fusion proteins comprising the catalytic domain of mutansucrase and a starch-binding domain can alter the morphology of amylose-free potato starch granules during biosynthesis. *Transgenic Research*, **16**: 645-656.
- Nazarian-Firouzabadi, F., Trindade, L.M. and Visser, R.G.F. (2012). Production of small starch granules by expression of a tandem-repeat of a family 20 starch-binding domain (SBD3-SBD5) in an amylose-free potato genetic background. *Functional Plant Biology*, **39**: 146-155.
- Nazarian-Firouzabadi, F., Vincken, J-P., Ji, Q., Luurs, L.C.J.M., Buleon, A. and Visser, R.G.F. (2007b). Accumulation of multiple-repeat starch-binding domains (SBD2-SBD5) does not reduce amylose content of potato starch granules. *Planta*, **225**: 919-933.

- Nazarian Firouzabadi, F., Vincken, J.P., Ji, Q., Suurs, L.C.J.M. and Visser, R.G.F.** (2007). Expression of an engineered granule-bound Escherichia coli maltose acetyltransferase in wild type and amf potato plants. *Plant Biotechnology Journal*, **5**: 134-145.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M.** (2004). Carbohydrates and Glycobiology, New York, USA. In *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. F (ed), 7, pp 238-272.
- Perera, C. and Hoover, R.** (1999). Influence of hydroxypropylation on retrogradation properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. *Food Chemistry*, **64**: 361-375.
- Ramesh, H.P. and Tharanathan, R.N.** (2003). Carbohydrates-the renewable raw materials of high biotechnological value. *Critical Reviews in Biotechnology*, **23**: 149-173.
- Regina, A., Bird, A., Topping, D., Bowden, S., Freeman, J., Barsby, T., Kosar-Hashemi, B., Li, Z., Rahman, S. and Morell, M.** (2006). High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 3546-3551.
- Regina, A., Kosar-Hashemi, B., Ling, S., Li, Z., Rahman, S. and Morell, M.** (2010). Control of starch branching in barley defined through differential RNAi suppression of starch branching enzyme IIa and IIb. *Journal of Experimental Botany*, **61**: 1469-1482.
- Schwall, G.P., Safford, R., Westcott, R.J., Jeffcoat, R., Tayal, A., Shi, Y.C., Gidley, M.J. and Jobling, S.A.** (2000). Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nature Biotechnology* **18**: 551-554.
- Shewmaker, C.K., Boyer, C.D., Wiesenborn, D.P., Thompson, D.B., Boersig, M.R., Oakes, J.V. and Stalker, D.M.** (1994). Expression of Escherichia coli glycogen synthase in the tubers of transgenic potatoes (*Solanum tuberosum*) results in a highly branched starch. *Plant physiology*, **104**: 1159-1166.
- Singh, J., Kaur, L. and Singh, N.** (2004). Effect of acetylation on some properties of corn and potato starches. *Starch-Stärke*, **56**: 586-601.
- Tauberger, E., Fernie, A.R., Emmermann, M., Renz, A., Kossmann, J., Willmitzer, L. and Trethewey, R.N.** (2000). Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate. *The Plant Journal*, **23**: 43-53.
- Terada, R., Nakajima, M., Isshiki, M., Okagaki, R.J., Wessler, S.R. and Shimamoto, K.** (2000). Antisense waxy genes with highly active promoters effectively suppress waxy gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*, **41**: 881-888.
- Thompson, D.** (2000) On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydrate Polymers* **43**: 223-239.
- Torney, F., Moeller, L., Scarpa, A. and Wang, K.** (2007) Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Current opinion in Biotechnology*, **18**: 193-199.
- Van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.P., Buleon, A., Visser, R. and Ball, S.** (1998). Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *Journal of biological chemistry* **273**: 22232-22240.
- Van Der Leij, F.R., Visser, R.G.F., Ponstein, A.S., Jacobsen, E. and Feenstra, W.J.** (1991). Sequence of the structural gene for granule-bound starch synthase of potato (*Solanum tuberosum* L.) and evidence for a single point deletion in the amf allele. *Molecular and General Genetics MGG*, **228**: 240-248.
- Visser, R., Somhorst, I., Kuipers, G., Ruys, N., Feenstra, W. and Jacobsen, E.** (1991). Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Molecular and General Genetics MGG*, **225**: 289-296.
- Xu, Y., Miladinov, V. and Hanna, M.A.** (2004). Synthesis and characterization of starch acetates with high substitution 1. *Cereal Chemistry*, **81**: 735-740.

## Manipulation of Starch Biosynthesis and *In Planta* Biopolymer Production (Review Article)

Farhad Nazarian-Firouzabadi\*

Associate Professor, Departemnet of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture,  
Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received: April 12, 2014 – Accepted: June 26, 2014)

### Abstract

Starch, a complex carbohydrate, is a polymer of glucose residues. It occurs in two main forms: amylose, consisting of predominantly linear chains of glucose units linked by  $\alpha(1-4)$  glycosidic bonds, and amylopectin, in which the chains are highly branched by the addition of  $\alpha(1-6)$  glycosidic bonds. Depending upon the plant species and the site of storage, the proportion between these two components varies. In most plant species, amylose comprises about 20% of the starch and the rest is amylopectin. Although in its native form it has some applications in food and non-food industries, the properties of currently available starches (native starch) do not comply with most industrial standard and enhanced commercial applications. To obtain starches with particular properties such as starches with lower retrogradation and more freeze-thaw stability, starch is often chemically modified. Manipulation of the starch structure with chemical reactions or additives will eventually impart certain properties which are desired for industrial uses. Techniques including cross-linking (to strengthen against shear) or acetylation (to reduce the retrogradation) are the most common starch modifications. The use of chemicals, however, may not only cause concern over health and safety, but there is also a cost involved with the chemical modification. Knocking out/ over expression of genes involved in starch biosynthesis, has resulted to alteration of starch physic-chemical properties. Production of biopolymers consisting of glucose residues linked by  $\alpha(1-3)$  and  $\alpha(1-6)$  or an alternatives [ $\alpha(1-3,6)$ ,  $\alpha(1-4,6)$ ] of these linkages, are among hot topics in polysaccharides research fields.

**Keywords:** Biopolymers, Glucan sucrose, Manipulation, Starch

---

\* Corresponding Author, E-mail: nazarian.f@lu.ac.ir