دانشکده علوم‌زیستی

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته بیوشیمی

عنوان:

بهینه سازی تاخوردگی مجدد پروتئین آلفا آمیلاز حاصل از باکتری باسیلوس مگاتریوم و بررسی ویژگی آنزیم

نام دانشجو:

پریسا نصراللهی

استاد راهنما:

دکتر خسرو خواجه

استاد مشاور:

دکتر ندا اکبری

بهمن ۱۳۹۰

نام بعضی نفرات رزق روحم شده است، جرأتم می بخشد، روشنم میدارد.....

تقدیم به آنان

تقدیم به او که آموخت مرا تا بیاموزم

استاد گرامی جناب آقای دکتر خواجه

تقدیم به آنان که وجودم جز هدیه وجودشان نیست

پدر و مادر عزیزم

تقدیم به همسر مهربانم

که مسیح وار با صبرش در تمامی لحظات رفیق راهم بود

تقدیم به خواهر و برادر بهتر از جانم

و تقدیم به گل نازم

تشکر و قدردانی

منت خدای را، عز و جل، که طاعتش موجب قربت است، و به شکر اندرش مزید نعمت.
به یاری پروردگار و لطف بزرگانی که یادشان همواره در خاطرم جاودان است، فصلی دیگر از دفتر زندگی‌ام را نگاشتم؛ به این امید که تلاش‌هایم مورد قبول ذات خطاپوش حق تعالی قرار گیرد.

تهیه و نگارش این مجموعه را مرهون زحمات استاد ارجمندم جناب آقای دکتر خسرو خواجه می‌دانم که مرا در افزایش توان علمی و تعالی ارزش‌های اخلاقی حمایت و راهنمایی نمودند. جا دارد که مراتب سپاس و امتنان قلبی خویش را نسبت به ایشان ابراز نمایم. امیدوارم بهروز و نیک فرجام باشند. همچنین تشکر می‌کنم از استاد مشاورم سرکار خانم دکتر ندا اکبری، باشد که در پناه الطاف ایزدی موید باشند.

از اساتید محترم گروه‌های بیوشیمی، بیوفیزیک و ژنتیک که افتخار شاگردیشان را دارم و از اساتید بزرگوار سرکار خانم دکتر مریم نیکخواه و جناب آقای دکتر قائمی که این پایان‌نامه را مطالعه نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از دوستانم در آزمایشگاه های بیوشیمی، بیوفیزیک که مرا مورد لطف و محبت خود قرار دادند، بی‌نهایت سپاسگزارم.

و در پایان سپاس فراوان از خانواده عزیزم که همواره مایه دلگرمی و آرامش خاطرم هستند.

پریسا نصراللهی

چکیده:

دراین تحقیق مطالعاتی در مورد تاخوردگی مجدد پروتئین آلفا آمیلازBMW بدون سیگنال انجام شد و در نهایت شرایط تاخوردن پروتئین و فاکتورهای موثر بدست آمده از آزمایشات، توسط نرم افزار Expreimental Design نوع ۸ بهینه سازی شد. بهترین بازده تاخوردگی مجدد آنزیم با بافر تریس حاوی گلیسرول ۲۰٪، کلسیم ۲۵ میلی مولار و غلظت آنزیم ۰/۳ mg/ml بدست آمد. دراین تحقیق نوع آلفا آمیلازBMW و ویژگی سوبسترایی و محصولات تولید شده توسط آن با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[1]مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که این آنزیم دارای ویژگی سوبسترایی گسترده می باشد. درصد هیدرولیز سوبستراهای مختلف در مقایسه با هیدرولیز نشاسته در مورد سوبستراهای نشاسته، آمیلوز، آمیلوپکتین و پلولان به ترتیب ۱۰۰، ۱۳۰، ۶۹، ۲۶ است علاوه بر این، فعالیت هیدرولازی بر روی آلفا سیکلودکسترین ویژگی سوبسترایی دیگر این آنزیم منحصر به فرد است. به دلیل توانایی در شکستن هر دو پیوند آلفا ۴ و۱ و آلفا ۶ و۱ ، اصلی ترین محصول واکنش آنزیمی در مورد تمامی سوبستراها گلوکز می باشد. در ادامه به منظور بررسی در ویژگی سوبسترایی آنزیم مطالعات جهش زایی در ناحیه حفظ شده پنجم انجام شد.. آلفا آمیلازBMW در این ناحیه حفظ شده دارای توالی MPDLN می‌باشد. آنزیم‌هایی که دارای این توالی هستند دارای ویژگی سوبسترایی گسترده می باشد. علاوه بر این آنزیم‌های گروه نئوپلولانازی که قادر به هیدرولیز پلولان و آلفا سیکلودکسترین هستند در این ناحیه حفظ شده دارای توالی MPKLN می‌باشند. همچنین آنزیم‌های گروه الیگو-۱و۶-گلوگوزیداز در این ناحیه دارای توالی QPDLN می‌باشند. این آنزیم‌ها توانا به هیدرولیز نشاسته و اولیگوساکاریدهای کوچک وتولید گلوکز هستند. بدین ترتیب جهش های M201Q وD203K طراحی شدند و به انجام رسیدند. در مورد هر دو جهش یافته پارامترهای سینتیکی آنزیم هم تحت تأثیر قرار گرفت و ویژگی سوبسترایی آنزیم تغییر کرد.

[1] high-performance liquid chromatograpy

کلمات کلیدی: آلفاآمیلاز، کلسیم، تاخوردگی مجدد، روش بهینه سازی سطح پاسخ، ویژگی سوبسترایی، جهش زایی هدفمند

فهرست مطالب

۱-۱ طبقه بندی آنزیم های آلفا آمیلاز ۲
۱-۲ طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولاز ها؛ موقعیت آلفا آمیلاز ۴
۱-۳ رابطه آلفا آمیلازهای خانواده GH13 باGH57 ..... ۴
۱-۴ پلولان(PULLULAN) ۵
۱-۴-۱ انواع آنزیم های تجزیه کننده پلولان (Pullulanases) ۶
۱-۵ ویژگی سوبسترایی آنزیمها ۱۰
۱-۶ ساختار مولکولی آلفا آمیلازها ۱۱
۱-۶-۱ دمین های آلفا آمیلاز ۱۱
۱-۶-۲ جایگاه فعال آلفا آمیلازها ۱۲
۱-۶-۳ یون کلسیم ۱۵
۱-۷ توالی اسید آمینه ای و نواحی حفظ شده آلفا آمیلازها ۱۵
۱-۸ تاخوردگی مجدد پروتئین و چالش های فرآوری آن ۱۹
۱-۸-۱ روش های مختلف جهت تاخوردگی مجدد پروتئین ها ۲۳
۱-۸-۱-۱ روش رقیق سازی مستقیم ۲۳
۱-۸-۱-۲ برداشت واسرشت کننده با کمک غشاء ۲۴
۱-۸-۱-۳ انواع کروماتوگرافی ۲۵
۱-کروماتوگرافی غربال مولکولی ۲۵
۲-تاخوردگی به کمک ماتریکس ۲۶
۳-تاخوردگی با استفاده از کروماتوگرافی براساس نیروهای آب گریز ۲۷
۱-۸-۳ عوامل فیزیکی و شیمیایی موثر در افزایش بازده تاخوردگی مجدد ۲۸
۱-۸-۴ استفاده از چپرونهای طبیعی در بهبود بازده تاخوردگی ۲۹
۱-۸-۵ ضرورت توجه به تشکیل پیوندهای دی سولفیدی به هنگام تا خوردگی مجدد ۳۰
۱-۹ روش طراحی آزمایش ها (DOE) ۳۱
۱-۹-۱ اصول طراحی آزمایش ها : ۳۲
۱-۹-۲ مراحل انجام طراحی آزمایش ها ۳۲
۱-۹-۳ روش های مختلف طراحی آزمایش ها ۳۵
۱-۱۰ هدف از انجام تحقیق ۳۹
۲-۱ مواد شیمیایی ۴۱
۲-۲ میکروارگانیسم ها و محیط های کشت مورد استفاده ۴۲
۲-۲-۱ میکروارگانیسم ها و پلاسمیدها ۴۲
۲-۲-۲ محیط های کشت میکروبی (gr/lit) ۴۳
۲-۳ روش های الکتروفورزی ۴۳
۲-۳-۱ الکتروفوزر DNA بر روی ژل آگاروز(۵۰) ۴۳

۲-۳-۲ *الکتروفورز پروتئین ها به روش SDS-PAGE* ۴۴
۲-۴ تاخوردگی مجدد پروتئین ۴۷
۲-۴-۱ *بافرهای مورد استفاده* ۴۷
۲-۴-۲ *استخراج تودههای تجمعی* ۴۷
۲-۴-۳ *تاخوردگی مجدد تودههای تجمعی* ۴۷
۲-۴-۴ *بررسی تاثیر افزودنیها در تاخوردگی مجدد تودههای تجمعی* ۴۸
۲-۴-۵ *بهینه سازی تاخوردگی مجدد* ۴۸
۲-۴-۶ *مطالعات اسپکتروسکوپی تاخوردگی مجدد* ۵۱
۲-۴-۷ *اندازگیری اندازه پروتئینهای موجود در حلال توسط DLS* ۵۱
۲-۵ آنالیز محصولات تولید شده توسط آنزیم آلفا آمیلاز BMW با کمک روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) ۵۲
۲-۶ روش انجام کروماتوگرافی لایه نازک (TLC; THIN LAYER CHROMATOGRAPHY) ۵۳
۲-۷ دستورزی مولکول DNA (روش جهشزایی هدفدار) ۵۴
۲-۷-۱ *اصول روش Quik Change* ۵۴
۲-۷-۲ *طراحی پرایمر* ۵۶
۲-۷-۳ *واکنش PCR برای تولید پلاسمید حاوی جهش* ۵۷
۲-۷-۴ *هضم DNA الگو حامل ژن وحشی با DpnI* ۵۷
۲-۷-۵ *ترانسفورماسیون محصول الحاق به باکتری اشریشیا کولی (XL1-blue) (۵۴)* ۵۸
۲-۷-۶ *تأیید ایجاد جهش مورد نظر در پلاسمید* ۶۱
۲-۷-۷ *ترانسفورماسیون پلاسمید حاوی جهش به درون باکتری BL-21* ۶۱
۲-۸ اصول روش SOE-PCR ۶۲
۲-۸-۱ *طراحی پرایمر* ۶۲
۲-۸-۲ *واکنش PCR و SOE-PCR* ۶۴
۲-۹ کلونینگ محصولات PCR حاوی جهش ۶۷
۲-۹-۱ *مشخصات و نقشه ناقل pET-21a* ۶۷
۲-۸-۲ *تهیه پلاسمید در مقیاس کم (Miniprep)* ۶۸
۲-۹-۳ *هضم محصولات SOE-PCR و ناقل pET-21a با آنزیم های محدود اثر HindIII و NdeI* ۶۸
۲-۹-۴ *انجام واکنش الحاق (Ligation) محصول PCR با پلاسمید pET-21a* ۶۹
۲-۱۰ بیان آنزیم آمیلاز نوع وحشی و انواع جهش یافته های ایجاد شده ۷۰
۲-۱۰-۱ *القاء باکتری و بیان پروتئین نوترکیب* ۷۰
۲-۱۰-۲ *بررسی بیان پروتئین نوترکیب مربوطه زمانهای مختلف با استفاده از روش الکتروفورز و خالص سازی پروتئین* .. ۷۱
۲-۱۱ تخلیص پروتئین های نوترکیب ۷۱
۲-۱۱-۱ *بافر های مورد نیاز تخلیص پروتئین نوترکیب* ۷۱
۲-۱۱-۲ *روش تخلیص پروتئین نوترکیب* ۷۲
۲-۱۱-۳ *بررسی میزان خلوص هر یک از خروجی ها* ۷۳
۲-۱۲ تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد (۵۶) ۷۳
۲-۱۳ مطالعات آنزیمشناسی ۷۵

۲-۱۳-۱ *مطالعه اثر جهش‌ها بر میزان فعالیت آنزیم* ۷۵
۲-۱۳-۲ *روش Bernfeld (57)* ۷۵
۲-۱۳-۳ *واحد آنزیمی* ۷۶
۲-۱۳-۴ *تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم* ۷۶
۲-۱۴ مطالعات فلورسانس ذاتی ۷۶
۲-۱۵ پیشگویی ساختار دوم و سوم پروتئین ۷۷
۳-۱ تاخوردگی مجدد آمیلاز نوترکیب ۷۹
۳-۱-۱ *مرحله محلول سازی و تاخوردگی مجدد تودههای تجمعی* ۸۰
۳-۲ بهینه سازی تاخوردگی مجدد و فعالیت آنزیم آمیلاز با استفاده از روش طراحی آزمایشات ۸۲
۳-۲-۱ *مطالعات اسپکتروسکوپی تاخوردگی مجدد* ۸۹
۳-۲-۲ *آنالیز اندازه پروتئین* ۸۹
۳-۲-۳ *محاسبه پارامترهای سینتیکی آنزیم تاخورده شده و بازده تاخوردگی مجدد آنزیم* ۹۰
۳-۳ مطالعات آنزیم شناسی برای آنزیم وحشی ۹۲
۳-۳-۱ *پارامترهای سینتیکی آنزیم وحشی* ۹۲
۳-۴ آنالیز محصولات واکنش آنزیمی بر روی سوبستراهای مختلف توسط HPLC ۹۴
۳-۵ مطالعات جهشزایی ۱۰۳
۳-۵-۱ *انتخاب نقاط جهش* ۱۰۳
۳-۵-۲ *ایجاد جهش M201Q توسط روش Quik change* ۱۰۶
۳-۵-۳ *ایجاد جهش D203K توسط روش SOE-PCR* ۱۰۸
۳-۶ تایید خلوص آنزیم وحشی و موتان توسط ژل SDS-PAGE ۱۱۲
۳-۷ مطالعات فلورسانس ذاتی ۱۱۳
۳-۸ مطالعات آنزیم شناسی برای آنزیم جهش یافته ۱۱۴
۳-۸-۱ *تعیین فعالیت آنزیمی و محاسبهی پارامترهای سینتیکی آنزیم های جهش یافته* ۱۱۴
۴-۱ بهینه سازی تاخوردگی مجدد آلفا آمیلاز BMW ۱۱۹
۴-۲ فعالیت آنزیمی و پارامترهای سینتیکی آنزیم وحشی ۱۲۲
۴-۳ محصولات تولید شده از تأثیر آنزیم وحشی بر سوبستراهای مختلف ۱۲۳
۴-۴ ناحیه حفظ شده پنجم آنزیم آلفا آمیلاز BMW ۱۲۴
۴-۴-۱ *جهش ناحیه حفظ شده پنجم* ۱۲۶
۴-۵ نتیجه گیری ۱۳۱

منابع ۱۳۳

فهرست شکل‌ها و جداول:

شکل۱- ۱ : ساختار پلیمری پلولان؛ متشکل از واحدهای مالتوتریوز، متصل بوسیله پیوند های ۶و۱-α.....۶
شکل۱- ۲ : ساختار ایزوپنوز؛ (glu (α-1,4) glu (α-1,6) glu) محصول نهایی عمل Isopullulanase..... ۷
شکل۱- ۳ : ساختار پنوز؛ (glu (α-1,4) glu (α-1,6) glu)، محصول نهایی عمل neopullulanase ۷
شکل۱- ۴ : نحوه عمل آنزیم های تجزیه کننده پلولان برروی سوبسترای پلولان ۸
شکل۱- ۵: آلفا آمیلاز بدست آمده از باسیلوس سوبتیلیس که سوبسترای مالتوپنتوز به جایگاه فعال آن متصل شده است..... ۱۲
شکل۱- ۶: شکل شماتیک زیر جایگاههای جایگاه فعال ۱۳
شکل۱- ۷: تطبیق ناحیه حفظ شده بین اعضای خانواده الفا آمیلازها ۱۶
شکل۱- ۸ : چهار ناحیه حفظ شده در خانواده آلفا آمیلازها. ۱۷
شکل۱- ۹ : ناحیه حفظ شده پنجم در خانواده آمیلازها ۱۹
شکل۱- ۱۰ آرایش اسید آمینه های در گیر در اتصال یون کلسیم در آلفا آمیلاز..... ۱۹
شکل۱- ۱۲ : روش رقیق سازی مستقیم برای تاخوردگی مجدد پروتئین..... ۲۴
شکل۱- ۱۳ : روش دیالیز تک مرحله ای و مرحله به مرحله برای تاخوردگی مجدد پروتئین ۲۵
شکل۱- ۱۴ تاخوردگی مجدد پروتئین به کمک ماتریکس..... ۲۷
شکل۱- ۱۵ : نمودار سه بعدی سطح پاسخ. ۳۷

شکل ۲- ۱: نقشه وکتور بیانی pET-21a و ناحیه کلونینگ/ بیان در آن. ۴۲
شکل ۲- ۲ : نوع محصولات ایجاد شده توسط آلفا گلوکوزیداز ساکارزمایسز سروزیه.....۵۳
شکل ۲- ۳ : شمایی کلی از تکنیک جهش زایی هدفدار با روش Quik-change ۵۵
شکل ۲- ۴ : ایجاد جهش در قطعه DNA با استفاده از روشSOE-PCR ۶۲

شکل ۳- ۱: : ژل SDS-PAGE آنزیم BMW-آمیلاز نوترکیب ۸۰
شکل ۳- ۲: مطالعه تأثیر یونهای منیزیم و باریم وکلسیم.....۸۱
شکل ۳- ۳: مطالعه تأثیر چند افزودنی با وزن مولکولی پایین به بافر رقیق سازی.....۸۲
شکل ۳- ۴: اثر متقابل غلظت آنزیم وغلظت گلیسرول روی میزان تاخوردگی مجدد به روش رقیق سازی ۸۶
شکل ۳- ۵: اثر متقابل غلظت آنزیم وغلظت کلسیم روی میزان تاخوردگی مجدد به روش رقیق سازی.....۸۷
شکل ۳- ۶ : مطالعات اسپکتروسکوپی در زمانهای مختلف پس از تاخوردگی مجدد آمیلاز ۸۹
شکل ۳- ۷: آنالیز سایز جمعیتهای پروتئینی در بافر بهینه شده و بافر B ۹۰
شکل ۳- ۸: مقایسه نمودارهای میکائیلیس- منتن آنزیم تاخورده شده در شرایط قبل و بعد از بهینه شدن شرایط ۹۱
شکل ۳- ۹: منحنی Michaelis-Menten آنزیم وحشی نسبت به نشاسته، آمیلوز، آمیلوپکتین و پلولان.....۹۳
شکل ۳- ۱۰ : تعیین زمان خروج استانداردهای قندی ۱٪. ۹۶
شکل ۳- ۱۱: آنالیز محصولات واکنش آنزیم وحشی بر روی سوبسترای نشاسته ۹۷
شکل ۳- ۱۲: آنالیز محصولات واکنش آنزیم وحشی بر روی سوبسترای آمیلوز ۹۸
شکل ۳- ۱۳: : آنالیز محصولات واکنش آنزیم وحشی بر روی سوبسترای آمیلوپکتین.....۹۹

شکل ۳- ۱۴: آنالیز محصولات واکنش آنزیم وحشی بر روی سوبسترای آلفا سیکلودکسترین ۱۰۰
شکل ۳- ۱۵: آنالیز محصولات واکنش آنزیم وحشی بر روی سوبسترای پلولان ۱۰۱
شکل ۳- ۱۶: آنالیز محصولات واکنش آنزیم آلفا گلوکزیداز بر روی محصول تولید شده از تجزیه پلولان ۱۰۱
شکل ۳- ۱۷: آنالیز محصولات واکنش آنزیم وحشی بر روی سوبسترای پنوز.....۱۰۲
شکل ۳- ۱۸: ناحیه حفظ شده پنجم در آنزیمهای خانواده آمیلازها ۱۰۵
شکل ۳- ۱۹: شکل نشانگر محصول Quik change PCR برای جهش M201Q است. ۱۰۷
شکل ۳- ۲۰: تایید ایجاد جهش ها توسط عیین توالی.....۱۰۷
شکل ۳- ۲۱: بهینه سازی شرایط PCR در حضور پرایمرهای پیشرو و معکوس.....۱۰۸
شکل ۳- ۲۲: انجام دو PCR جداگانه توسط پرایمرهای شماره ۱ و ۲ و همچنین پرایمرهای ۳ و ۴ .....۱۱۰
شکل ۳- ۲۳: انجام PCR سوم در حضور پرایمرهای پیشرو و معکوس دو سر ژن ۱۱۰
شکل ۳- ۲۴: تایید ایجاد جهش ها توسط توالی یابی ۱۱۱
شکل ۳- ۲۵: ژل SDS-PAGE آنزیم BMW-آمیلاز نوترکیب ۱۱۲
شکل ۳- ۲۶: مقایسه فلورسانس ذاتی جهش یافته‌ها و آنزیم وحشی ۱۱۴
شکل ۳- ۲۷: مقایسه نمودارهای میکائیلیس- منتن جهش های M201Q و D203K نسبت به نشاسته، آمیلوز و آمیلوپکتین ۱۱۵
شکل ۳- ۲۸: : کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) از محصول نهایی عمل آنزیم بروی سوبسترای پلولان. ۱۱۷
شکل ۳- ۲۹ : کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) از محصول نهایی عمل آنزیم بروی سوبسترای آلفا سیکلودکسترین ۱۱۷

شکل ۴- ۲ : انجام Docking توسط سرور Swiss Dock ۱۲۶
شکل ۴- ۱ : نمایش روبانی ملکول AmyA ۱۲۵
شکل ۴- ۳ : ساختار جزئی آمیلاز طبیعی و شکل جهش یافته آن بعد از جایگزینی در موقعیت ۲۰۱ .....۱۲۸
شکل ۴- ۴ : ساختار جزئی آمیلاز طبیعی و شکل جهش یافته آن بعد از جایگزینی در موقعیت ۲۰۳. .....۱۳۰

جدول ۱- ۱: اسیدهای آمینه حفظ شده تشکیل دهنده زیر جایگاه ۱- (عدد گذاری بر اساس TAA)..... ۱۴

جدول ۲- ۱: خصوصیات انواع سویه ها و پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش ۴۳
جدول ۲- ۲ : سطوح کد شده و بازه متغیرهای وابسته جهت انجام طراحی آزمایش..... ۴۹
جدول ۲- ۳ : تهیه استانداردهای پروتئینی برای تعیین غلظت نمونه های مجهول به روش برادفورد..... ۷۴

جدول ۳- ۱: نتیجه تجربی و پیش بینی شده آزمونهای CCD و FFD (ستاره دار) ۸۳
جدول ۳- ۲: جدول آنالیز و واریانس (ANOVA) برای آنالیز مدل 2FI فعالیت آمیلاز..... ۸۵
جدول ۳- ۳: آزمایش های تأئیدی برای نتایج بهینه سازی..... ۸۸
جدول ۳- ۴ : مقایسه پارامترهای سینتیکی آنزیم تاخورده شده در شرایط مختلف با آنزیم محلول..... ۹۱

جدول ۳- ۵ : پارامترهای سینتیکی آنزیم وحشی که از نمودار میکائیلیس-منتن محاسبه شدند ۹۳
جدول ۳- ۶ : ناحیه های حفظ شده در آلفا آمیلاز BMW.....۱۰۶
جدول ۳- ۷ : مقایسه پارامترهای سینتیکی آنزیم اصلی و جهش‌یافته‌ها نسبت به نشاسته، آمیلوز، آمیلوپکتین و پلولان ۱۱۶

جدول ۴- ۱ : نسبت محصولات از هیدرولیز پلولان(%) در آنزیم نئوپلولانازی از Bacillus stearothermophilus ۱۲٤

فصل اول

مقدمه

۱-۱ طبقه بندی آنزیم های آلفا آمیلاز

آلفا-آمیلازها (Endo-1,4-α-glucohydrolase, EC3,2,1,1) آنزیم هایی هستند که هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی(1,4)α درونی را درآمیلوپکتین, آمیلوز و گلیکوژن کاتالیزکرده و مالتوز, مالتو تریوز و دکسترین تولید می کنند. آنزیم هایی وجود دارند که واکنش های مشابه را کاتالیز می نمایند اما عدد EC آنها متفاوت می باشد. به عنوان مثال CGTase ها دارای عدد EC برابر ۲.۴.۱.۱۹ می باشند. اما از لحاظ ساختاری و آنزیمی بسیار شبیه به آلفا آمیلاز می باشند. برعکس آنزیم هایی نیز وجود دارند که عدد EC آنها به آلفا آمیلازها نزدیک است اما جزء آلفا آمیلازها طبقه بندی نمی شوند زیرا اگزوآنزیم هستند مانند آلفا-گلوکوزیداز (EC3.2.1.20)، مالتوژنیک آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.133)، آمیلاز تولید کننده مالتوتتروز (EC 3.2.1.60) و بتا-آمیلاز (EC 3.2.1.2) (۱).

با اینکه سیستم EC برای طبقه بندی آنزیم ها بسیار مفید است، زمانی یک کلاس آنزیمی ویژه مورد مطالعه قابل درک است که آنزیمهایی از کلاس های EC مختلف مد نظر قرار گیرند. این موضوع به ویژه برای آنزیم های هیدرولیز کننده نشاسته صادق است، واضح است که مشخص کردن مرزها بین ویژگی های مختلف سوبسترایی و محصول برای آنزیمها مشکل است. برای روشن تر شدن این موضوع آنزیم هایی که هیدرولیز یا سنتز اتصالات

گلیکوزیدی نشاسته را کاتالیز می کنند (از لحاظ نوع واکنشی که انجام می دهند) را بیشتر مورد توجه قرار می دهیم. از این نظر این آنزیم ها به چهار گروه تقسیم می شوند: ۱- آلفا آمیلازها (هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی α،۱-۴)، ۲- پلولاناز و ایزوآمیلازها (هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی α ،۱-۶)، ۳- CGTase (ترانس گلیکوزیلاسیون و تشکیل اتصالات گلیکوزیدی α ،۱-۴) ۴- آنزیم شاخه ساز (ترانس گلیکوزیلاسیون و تشکیل اتصالات گلیکوزیدی α،۱-۶). هرکدام از چهار واکنش فوق توسط آنزیم های مجزا کاتالیز می شوند اما استثناهایی نیز گزارش شده است: آلفا آمیلاز ها علاوه بر واکنش اصلی خود یعنی فعالیت هیدرولازی α ،۱-۴، فعالیت ضعیف ترانس گلیکوزیلاسیون α ،۱-۴ را نیز دارند. CGTase ها علاوه بر واکنش اصلی خود، یعنی فعالیت ترانس گلیکوزیلاسیون α ،۱-۴، به صورت ضعیف وکم، فعالیت هیدرولیزی α ،۱-۴ را نیز انجام می دهند. بنابراین مرز بین فعالیت های گلوکانوهیدرولازی و گلوکانوترانسفرازی همیشه روشن نیست. از طرفی مرز فعالیت روی پیوند های گلیکوزیدی α ،۱-۴ وα ،۱-۶ نیز خیلی واضح نمی باشد. بعضی از آلفا آمیلازها فعالیت هیدرولیزی α ،۱-۶ را نیز بروز می دهند. همچنین برخی پلولانازهای جدا شده از ارگانیسم های ترموفیل علاوه بر هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی α ،۱-۶ قادرند نوع α ،۱-۴ را نیز هیدرولیز نمایند. بنابراین، وجود آنزیم هایی در مرز بین آلفا آمیلاز و پلولاناز/ ایزوآمیلاز قابل درک است. با توجه به مطالب فوق چهار فعالیت مذکور یعنی hydrolysis α ،۱-۶، α ،۱-۴ و transglycosylation α ،۱-۶، α ،۱-۴ می توانند از طریق مکانیسم های مشابه کاتالیز گردند. بر اساس نتایج تجربی از نئوپلولاناز که هر چهار فعالیت فوق را یکجا داراست به نظر میر سد که برای واکنش فوق یک جایگاه فعال شرکت دارد (۳،۲). در مورد آلفا آمیلاز داده های مربوط به این آنزیم و هم تعریف دقیق EC باید لحاظ شود. اطلاعات موجود در مورد آنزیم هایی که خصوصیات ساختاری و آنزیمی مشابهی بروز می دهند باید مورد استفاده قرار گیرد. چنین امری در سال ۱۹۹۱ و توسط Henrissat واقعیت یافت که بانک اطلاعاتی CAZY (Carbohydrate Active enzyme) را تهیه کرد (۴). این بانک شامل اطلاعات طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولازها (glycosyl hydrolase(GH)) با توجه به توالی آنها می باشد.

۱-۲ طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولاز ها؛ موقعیت آلفا آمیلاز

در سال ۱۹۹۱ Henrissat طرحی را به منظور طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولازها براساس توالی به جای ویژگی فعالیت ارائه داد. اعضای یک خانواه ساختار سه بعدی و مکانیسم مشترکی را نشان می دهند وتشابه توالی در آنها می تواند کم تا بسیار بالا باشد. تاکنون ۱۳۰ خانواده شناخته شده است که در ۱۴ دودمان (Clan) جای می گیرند. یک دودمان شامل خانواده های نزدیک و مرتبط از نظر ساختار سه بعدی و مکانیسم کاتالیتیک می باشد. اطلاعات مربوط به تقسیم بندی گلیکوزیل هیدرولازها در بانک اطلاعاتی CAZY موجود می باشد. بعضی از آنزیمهای مؤثر بر نشاسته که در بخش های قبلی بر اساس فعالیت و عدد EC طبقه بندی شده بودند در این دسته بندی در موقعیت های متفاوتی قرار می گیرند. به عنوان مثال بتا-آمیلاز در خانواده ۱۴ گلیکوزیل هیدرولازها GH14، گلوکوآمیلاز در GH15، آلفا-گلوکوزیداز در GH13 و GH31، آمیلومالتاز در GH77، آمیلوپلولاناز و تعداد کمی از آلفا آمیلازها در GH57 قرار می گیرند و اغلب آنزیم های مؤثر بر نشاسته از جمله اکثر آلفا آمیلازها، CGTase، نئوپلولاناز و ایزوآمیلاز متعلق به GH13 می باشند (۵).

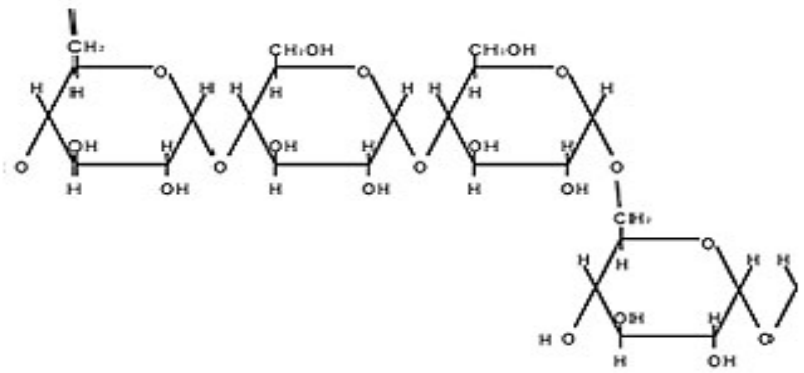
۱-۳ رابطه آلفا آمیلازهای خانواده GH13 با GH57

تمام آلفا آمیلازهایی که از ارگانیسم های یوکاریوتی و پروکاریوتی جدا شده اند متعلق به خانواده ۱۳ از گلیکوزیل هیدرولازها می باشند. اما وجود آلفا آمیلازها در یک خانواده واحد از گلیکوزیل هیدرولازها پس از گزارش توالی آمینواسیدی غیر عادی دو آلفا آمیلاز، یکی از *Dictyoglomus thermophilum* (۶) و دیگری از *Pyrococcus furiosus* (۹،۸،۷) که نمی توانستند در خانواده ۱۳ جای بگیرند با مشکل مواجه گردید. وجود این دو آلفا آمیلاز و همچنین بعضی از آنزیمهای آمیلولیتیک از ارگانیسم های بحرانی که فاقد نواحی حفظ شده (که مشخصه آلفا آمیلازها می باشد) هستند، منجر به ایجاد یک خانواده جدید از گلیکوزیل هیدرولازها یعنی

GH57 گردید (۱۱،۱۰). با تعیین ساختار سه بعدی α-4-glucanotransferase و مطالعات موتاسیون جهت یابی شده، مشخص شد که از نظر آمینو اسیدهای کاتالیتیک، رابطه نزدیکی بین GH57 و خانواده آلفا آمیلاز وجود ندارد (۱۲، ۱۳). علی رغم این موضوع، هر دو گروه دارای یک مکانیسم مشترک (حفظ کانفیگوراسیون آنومری) و یک الگوی تاخوردگی مشترک ((β/α)8 barrel) می باشند (۳۵). خانواده GH57 دارای چهار فعالیت آنزیمی می باشد (تاکنون): آلفا آمیلاز، آمیلوپلولاناز، آلفا-گالاکتوزیداز (EC 3.2.1.22) و آلفا-گلوکانوترانسفراز (EC 2.4.1.25). منشأ اغلب آنزیمهای این خانواده از میکروارگانیسمهای بحرانی به ویژه از آرکئوباکتریا می باشد (۱۴).

۱-۴ پلولان (Pullulan)

پلولان یک گلوکان طبیعی،صنعتی، مهم و غیرمعمول (همانند آمیلوز، دکستران و سلولز) می باشد. با ساختار شیمیایی که تا حدودی به منبع کربنی، ارگانیسم تولید کننده (گونه های مختلف قارچ Aureobasidium pullulans) و شرایط تخمیر بستگی دارد. ساختار پایه پلولان یک گلوکان خطی است که متشکل از واحد های مالتوتریوز است که بوسیله پیوند های ۶و۱-α به هم متصل شده اند (شکل ۱-۱). ۱۰٪ ساختار متشکل از واحد های مالتوتریوز متصل بوسیله پیوند های ۳ و۱-α و همینطور ۷٪-۵ متشکل از واحدهای مالتوتتروز می باشد. در اکوسیستم های طبیعی ساکارید های دیگری مثل نشاسته، آمیلوز، آمیلوپکتین، دکسترین ها و گلیکوژن نیز توسط پلولاناز قابل تجزیه هستند.



شکل۱- ۱ : ساختار پلیمری پلولان؛ متشکل از واحدهای مالتوتریوز، متصل بوسیله پیوند های ۶و۱-α

۱-۴-۱ انواع آنزیم های تجزیه کننده پلولان (Pullulanases)

۱- glucoamylases EC 3.2.1.3: پلولان را از سمت غیر احیایی هیدرولیز می کند و گلوکز تولید می کند

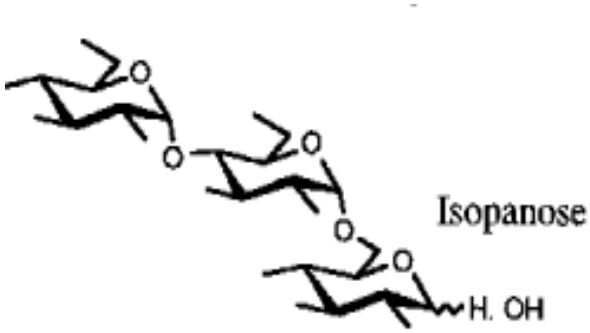
۲- پلولاناز یا آلفا- دکسترین ۶-گلوکانوهیدرولاز α-dextrin 6-glucanohydrolase EC 3.2.1.41 : هیدرولیز پیوندهای ۶و۱-α در پلولان و تولید مالتوتریوز

۳- آمیلوپلولاناز amylopullulanase EC 3.2.1.41/1 : هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی ۶ و۱-α در پلولان و ۴و۱-α در نشاسته. که منجر به آزاد شدن قندهایی مثل گلوکز، مالتوز و مالتوتریوز می شود.

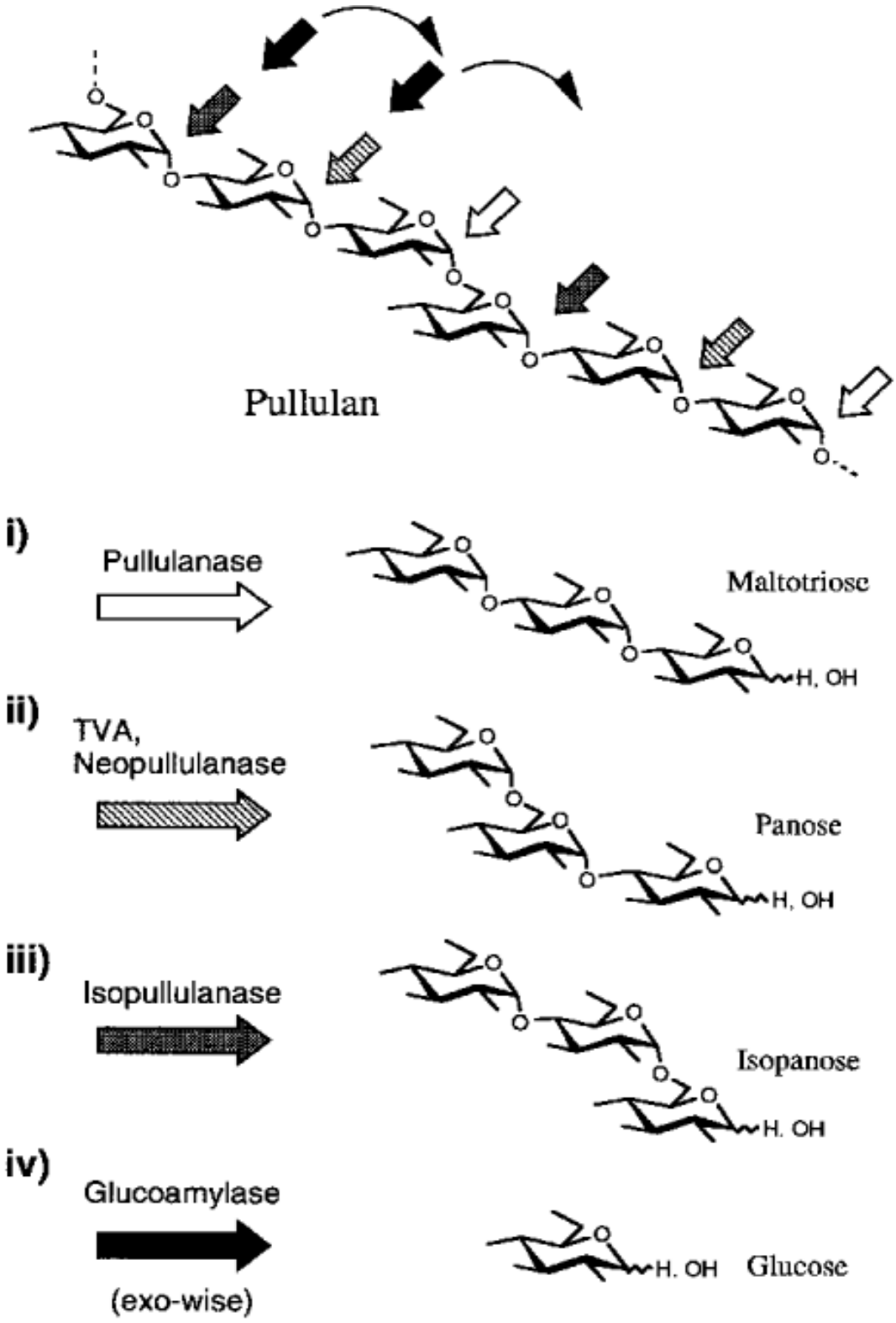
۴- ایزوپلولاناز Isopullulanse EC 3.2.1.57 : هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی ۴ و۱-α در پلولان و تولید ایزوپنوز (glu (α-1,4) glu (α-1,6) glu)

۵- نئوپلولاناز neopullulanase EC 3.2.1.135 : هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی ۴ و۱-α در پلولان و تولید پنوز (glu (α-1,6) glu (α-1,4) glu)

شکل۱- ۳ : ساختار پنوز؛ (glu (α-1,6) glu (α-1,4) glu)، محصول نهایی عمل neopullulanase



شکل۱- ۲ : ساختار ایزوپنوز؛ **(**glu (α-1,4) glu (α-1,6) glu**)** محصول نهایی عمل Isopullulanase.



شکل۱- ۴ : نحوه عمل آنزیم های تجزیه کننده پلولان برروی سوبسترای پلولان