بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

رساله دوره دکتری بیوشیمی

مقایسه فعالیت-پایداری گلیکوزیل هیدرولازهای بومی ایران و بررسی افزایش کارایی به روش جهش زایی هدفدار

نگارنده:

مرضیه قلاسی

استاد راهنما:

دکتر خسرو خواجه

استاد مشاور:

دکتر حسین نادری منش

دی ۸۸

تقدیم به دریای معرفت و بزرگی، پدرم.

تقدیم به شمع فروزان زندگی، مادرم.

تقدیم به همسر دلسوز و مهربانم.

و تقدیم به خانواده خوبم.

طاق محبتشان بر فراز خانه‌ام جاودانه باد...

با نهایت سپاس از درگاه پروردگاری که هرچه دارم از اوست، پروردگار پاک و منزهی که داناست و نعمت آموختن و یادگرفتن را به بندگانش ارزانی داشت. خدای بزرگ را سپاسگزارم که آرامشی به من عطا فرمود تا بتوانم در راه او گامی دیگر بردارم و توفیق اتمام مرحله علمی دیگری را داشته باشم.

بر خود لازم می‌دانم که از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر خسرو خواجه سپاسگزاری نمایم. راهنمایی‌های دلسوزانه ایشان در دوره کارشناسی ارشد راهگشای اینجانب بوده است و درس های علمی و اخلاقی فراوانی از ایشان فرا گرفتم.

از جناب آقای دکتر حسین نادری منش، استاد مشاور محترم، کمال تشکر و سپاس را دارم.

از دیگر اساتید و دوستانی که هرکدام به نحوی طی انجام این تحقیق متحمل زحمت شده‌اند به ویژه خانم ها، نسرین ملانیا، شکوفه زارعیان و مریم قنبری و آقایان علی سلیمی، محمد پاژنگ و ارسطو بدویی دلفارد، تشکر می‌نمایم.

در پایان از خانواده عزیزم که در تمام مراحل زندگی، مشوق و همراه واقعی اینجانب بوده اند و نیز از همسر بزرگوارم که با صبر و فداکاری خود تحمل سختی های این راه را بر من آسان نمود، بی نهایت سپاسگزارم.

چکیده

در این پروژه، مطالعاتی جهت بررسی فعالیت و پایداری حرارتی بر روی دو نوع آنزیم گلیکوزیل هیدرولاز به انجام رسید. ابتدا ژن کد کننده آنزیم آلفا-آمیلاز حاصل از باکتری بومی باسیلوس مگاتریوم WHO جداسازی شد. سپس به منظور تبیین نقش اسیدهای آمینه متصل شونده به کلسیم در پایداری حرارتی این آنزیم پنج جهش نقطه ای طراحی شد و به انجام رسید. آنزیم های جهش یافته، فعالیت هیدرولازی خود را حفظ کردند. از طرفی در حضور یون کلسیم تمایل آنزیم (انواع وحشی و جهش یافته) نسبت به سوبسترای نشاسته افزایش یافت. در مقایسه با آنزیم وحشی، یون کلسیم اثر مثبتی بر روی بازده کاتالیتیک بیشتر آنزیم های جهش یافته داشت. در جهش یافته های A53S، N75D، S76P و H77E وابستگی نیمه عمر آنزیم به غلظت یون کلسیم نشان داد که بهبود پایداری حرارتی آنها به علت اتصال افزایش یافته یون کلسیم می باشد. در مقابل، جهش یافته H58I، بدون وابستگی به کلسیم در مقابل حرارت پایدار شده است. در پایدارترین جهش یافته، تبدیل His-77 به گلوتامات منجر به افزایش ۴ برابری نیمه عمر در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و نیز افزایش دمای گذار ظاهری (T_{50}) و دمای بهینه عملکرد آن به مقدار ۹ و ۴ درجه سانتیگراد به ترتیب، در مقایسه با آنزیم وحشی شد. بعلاوه پارامترهای ترمودینامیکی واکنش آمیلولیتیک و واکنش غیر فعال سازی حرارتی، افزایش انرژی فعال سازی سیستم را به میزان ۴/۱ برابر نشان داد. در این مطالعه نشان داده شد که یک جهش نقطه ای می تواند آلفا-آمیلازی مزوفیل را به آنزیمی پایدار، بدون از دست دادن قدرت کاتالیتیک آن در دماهای ملایم تبدیل کند.

در مطالعه دیگری، آمیلوپلولاناز L_{14}-APU از منشأ یک باکتری گرمادوست بومی ایران خالص سازی شده و اثر اکاربوز، به عنوان بازدارنده عمومی آلفا-آمیلازها، بر روی هیدرولیز نشاسته و پلولان توسط آنزیم مذکور مورد بررسی قرار گرفت. این بازدارندگی از نوع رقابتی بوده و ثابت بازدارندگی آن برای سوبسترای

پلولان و نشاسته به ترتیب، ۹۹ و ۷۲ میکرومولار اندازه گیری شد. بررسی سرعت واکنش در سیستمی شامل انواع سوبستراهای رقابتی و الگوی بازدارندگی رقابتی اکاربوز در حضور سوبستراهای متفاوت، وجود یک جایگاه فعال برای دو فعالیت کاتالیتیک را پیشنهاد می کند. آنالیز اثر یونهای فلزی و سایر واکنشگرها نشان می دهد که یونهای Ca^{2+}، Mg^{2+}، Mn^{2+} و Co^{2+}، هر دو فعالیت آنزیم را افزایش داد در حالیکه N-بروموسوکسینامید منجر به غیرفعال شدن آنزیم شد. همچنین فعالیت آنزیم در حضور غلظت های اندک SDS نیز افزایش یافت.

کلید واژه ها: آلفا-آمیلاز، باسیلوس مگاتریوم، کلسیم، پایداری حرارتی، جهش زایی، آمیلوپلولاناز، اکاربوز، تک جایگاه فعال، یونهای فلزی، بازدارنده.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱ آنزیم ها، کاتالیزورهای حیاتی ۲

۱-۲ منابع تولید کننده آنزیم ها ۳

۱-۳ آمیلازهای میکروبی ۴

۱-۴ طبقه بندی آنزیم های دارای فعالیت آلفا-آمیلازی ۵

۱-۵ ساختار آلفا-آمیلاز ۶

۱-۶ یون های کلسیم، سدیم و کلر در ساختار آلفا-آمیلاز ۷

۱-۷ شکاف جایگاه فعال آلفا-آمیلاز ۸

۱-۸ ترادف آلفا-آمیلاز ۹

۱-۹ مکانیسم کاتالیتیک آلفا-آمیلاز ۱۰

۱-۱۰ کاربردهای صنعتی آلفا-آمیلاز ۱۱

۱-۱۱ تسریع کننده های واکنشی زیستی مقاوم به حرارت ۱۲

۱-۱۱-۱ مکانیسم های غیرفعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر ۱۴

۱-۱۱-۲ چگونه پایداری طولانی مدت را تنظیم کنیم؟ ۱۵

۱-۱۲ مهندسی پایداری در آلفا-آمیلاز ۱۹

۱-۱۳ مهار کننده های آلفا-آمیلازها ۲۱

۱-۱۴ پلولاناز ۲۴

۱-۱۵ پلولان ۲۵

۱-۱۶ آنزیم های تجزیه کننده پلولان ۲۶

۱-۱۷ کاربردهای آنزیم های تجزیه کننده پلولان ۲۹

۱-۱۸ هدف از انجام پژوهش ۳۰

فصل دوم: مواد و روش ها ۳۳

۲-۱ مواد شیمیایی ۳۴

۲-۲ میکروارگانیسم ها و محیط های کشت..... ۳۵

۲-۲-۱ میکروارگانیسم ها و پلاسمیدها..... ۳۵

۲-۲-۲ محیط های کشت میکروبی (gr/lit) ۳۵

۲-۲-۲-۱ محیط های کشت مورد نیاز برای رشد باکتری*Bacillus megaterium* WHO ۳۵

۲-۲-۲-۲ محیط های کشت مورد نیاز برای رشد باکتری *Bacillus* L_{14} ۳۶

۲-۳ دستورزی ملکول DNA ۳۷

۲-۳-۱ کلون مجدد BMW-amylase بدون ترادف نشانه ای در حامل بیانی pET-21a..... ۳۷

۲-۳-۱-۱ طراحی پرایمر..... ۳۷

۲-۳-۱-۲ مراحل PCR..... ۳۹

۲-۳-۱-۳ کلون مجدد در حامل بیانی ۴۰

۲-۳-۲ جهش زایی هدفدار ۴۴

۲-۳-۲-۱ اصول روش Quick-change ۴۴

۲-۳-۲-۲ طراحی پرایمر..... ۴۶

۲-۳-۲-۳ واکنش PCR ۴۸

۲-۳-۲-۴ هضم مخلوط واکنش PCR با *Dpn*I ۴۸

۲-۳-۲-۵ انتقال محصول هضم آنزیمی به میزبان XL1-blue ۴۹

۲-۳-۲-۶ تأیید ایجاد جهش مورد نظر در پلاسمید ۴۹

۲-۴ بیان ژن آلفا-آمیلاز نوع وحشی و انواع جهش یافته های ایجاد شده..... ۵۱

۲-۴-۱ انتقال پلاسمید pET-21a (+) نوترکیب به باکتری اشریشیا کولی BL21 (DE3) ۵۱
۲-۴-۲ فرآیند بیان ۵۱
۲-۴-۲-۱ القاء باکتری و بیان پروتئین نوترکیب ۵۱
۲-۴-۲-۲ بررسی بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از روش الکتروفورز ۵۲
۲-۴-۲-۲-۱ الکتروفورز پروتئین ها به روش SDS-PAGE ۵۳
الف- مواد و محلولهای مورد نیاز برای انجام SDS-PAGE ۵۳
۲-۵ تخلیص پروتئین های نوترکیب ۵۵
۲-۵-۱ بافر های مورد نیاز تخلیص پروتئین نوترکیب ۵۵
۲-۵-۲ روش تخلیص پروتئین نوترکیب ۵۶
۲-۵-۳ آماده سازی پروتئین برای مطالعات آنزیمی ۵۷
۲-۶ مطالعات اولیه آنزیم شناسی BMW-amylase ۵۸
۲-۶-۱ تعیین فعالیت آنزیمی ۵۸
۲-۶-۱-۱ تهیه معرف رنگی DNS ۵۸
۲-۶-۱-۲ سنجش فعالیت آنزیمی با روش Miller ۵۸
۲-۶-۱-۳ واحد آنزیمی ۵۸
۲-۶-۲ مطالعات دو رنگ نمایی دورانی و فلورسانس ۵۹
۲-۶-۳ تعیین دمای بهینه ۶۰
۲-۶-۴ تعیین خصوصیات سینتیکی آنزیم ۶۰
۲-۶-۵ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر ۶۰
۲-۶-۶ تعیین پارامترهای ترمودینامیکی فعالیت و غیر فعال شدن آنزیمی ۶۱
۲-۷ مطالعات آنزیم شناسی pullulanase ۶۱

۲-۷-۱ سنجش فعالیت آنزیمی ۶۱
۲-۷-۲ سنجش مهار فعالیت آنزیمی ۶۲
۲-۷-۳ بررسی تأثیر یون های فلزی و واکنشگرها بر فعالیت آنزیمی ۶۳
فصل سوم: نتایج ۶۴
۳-۱ کلون مجدد ژن BMW-amylase بدون ترادف نشانه ای در حامل بیانی pET-21a..... ۶۶
۳-۲ تعیین ترادف ژن آلفا-آمیلاز کلون شده..... ۶۸
۳-۳ جهش زایی هدفدار ۷۱
۳-۳-۱ انتخاب جهش در BMW-آمیلاز..... ۷۱
۳-۳-۲ ایجاد جهش در BMW-آمیلاز ۷۲
۳-۴ تعیین ترادف ژن آلفا-آمیلاز جهش یافته..... ۷۴
۳-۵ بیان ژن آلفا-آمیلاز نوترکیب سویه های وحشی و جهش یافته..... ۷۴
۳-۶ مطالعات دو رنگ نمایی دورانی و فلورسانس ۷۷
۳-۷ نیمرخ دمایی انواع BMW-آمیلاز ۸۰
۳-۸ تعیین پارامترهای سینتیکی انواع BMW-آمیلاز ۸۰
۳-۹ پارامترهای ترمودینامیکی واکنش هیدرولیز انواع BMW-آمیلاز ۸۳
۳-۱۰ پایداری حرارتی انواع BMW-آمیلاز ۸۴
۳-۱۰-۱ نیمه عمر انواع BMW-آمیلاز ۸۴
۳-۱۰-۲ سرعت غیر فعال سازی انواع BMW–آمیلاز در غلظت های مختلف کلسیم ۸۷
۳-۱۰-۳ وابستگی پایداری انواع BMW –آمیلاز به غلظت کلسیم ۹۲
۳-۱۰-۴ سینتیک واسرشتگی انواع BMW –آمیلاز..... ۹۳
۳-۱۱ پارامترهای سینتیکی آنزیم L_{14} -آمیلوپلولاناز (L_{14}-APU)..... ۹۴

۳-۱۲ مهار آنزیم L_{14} -آمیلوپلولاناز (L_{14}-APU) توسط اکاربوز ۹۵

۳-۱۳ اثر یونهای فلزی و سایر واکنشگرها بر آنزیم L_{14} -آمیلوپلولاناز (L_{14}-APU)..... ۹۸

۳-۱۴ بررسی تعداد جایگاههای فعال در آنزیم L_{14}-آمیلوپلولاناز ۹۹

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۱۰۲

۴-۱ کلون مجدد ژن BMW-amylase بدون ترادف نشانه ای در حامل بیانی pET-21a..... ۱۰۳

۴-۲ طراحی هدفدار جهش ها ۱۰۶

۴-۳ مطالعات دو رنگ نمایی دورانی و فلورسانس ۱۰۸

۴-۴ پارامترهای سینتیکی انواع BMW-آمیلاز..... ۱۰۸

۴-۵ پارامترهای ترمودینامیکی واکنش هیدرولیز انواع BMW-آمیلاز ۱۰۹

۴-۶ پایداری حرارتی انواع BMW-آمیلاز ۱۱۰

۴-۷ مطالعات مهارکنندگی آنزیم آمیلوپلولاناز توسط اکاربوز ۱۱۲

۴-۸ بررسی اثر یونهای فلزی و سایر واکنشگرها بر فعالیت دوگانه آنزیم آمیلوپلولاناز ۱۱۴

۴-۹ آیا L_{14}-APU یک یا دو جایگاه فعال مستقل از یکدیگر دارد؟..... ۱۱۵

نتیجه گیری ۱۱۷

پیشنهادات ۱۱۹

منابع ۱۲۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱ آنزیم ها، کاتالیزورهای حیاتی

موجودات زنده به واسطه وقوع انواع گوناگون واکنشهای بیوشیمیایی توانایی ادامه حیات را کسب نموده اند. تقریبا" تمامی این واکنش ها به وسیله گروهی از مواد حیاتی موسوم به آنزیم ها انجام می شوند. آنزیم ها کاتالیزورهای زیستی هستند. اغلب آنزیم ها از جنس پروتئین هستند و به طور کلی تابع همان قوانین حاکم بر رفتار سایر مواد هستند. بعلاوه آنزیم ها در مقایسه با کاتالیزورهای شیمیایی دارای ویژگیهای اختصاصی می باشند ازجمله اینکه واکنشهای آنزیمی با سرعت و ویژگی بیشتر و تحت شرایط ملایم تر انجام می شوند و نیز قابلیت تنظیم دارند. با کشف روز افزون آنزیم های جدید، نیاز به روشی برای نامگذاری سیستماتیک آنها احساس شد. بر اساس روش پیشنهادی در سال ۱۹۶۱ توسط کمیسیون بین المللی آنزیم ها بر حسب نوع واکنش کاتالیز شده توسط آنزیم ها آنها را می توان در شش گروه اصلی قرار داد که عبارتند از (۱):

۱- اکسیدو ردوکتازها ۲- ترانسفرازها ۳- هیدرولازها

۴- لیازها ۵- ایزومرازها ۶- لیگازها

هر یک از شش طبقه اصلی از چند گروه و هر گروه نیز از زیر گروههای خاص خود تشکیل شده اند که نام های سیستماتیک و اعداد دسته بندی EC را می توان با رجوع به آدرس اینترنتی زیر جستجو نمود:

http://www.expasy.ch/sport/enzyme.html

۱-۲ منابع تولید کننده آنزیم ها

منابع تولید کننده آنزیم ها بسیار متعدد هستند. آنزیم ها را می توان از منابع حیوانی، گیاهی و یا میکروارگانیسم ها بدست آورد اما میکرو ارگانیسم ها بنا به دلایلی که به آنها اشاره خواهد شد مهمترین و عمده ترین منبع تولید کننده آنزیم ها هستند. هر سویه از موجودات، تعداد زیادی از آنزیم ها را تولید می کند اما تولید مقادیر نسبی و مطلق هر یک از آنزیم های جداگانه در بین گونه ها و حتی سویه های یک گونه متنوع می باشد. آنزیم های تجاری از منابع قارچی، باکتریایی و مخمرها همانطور که در جدول زیر نشان داده شده است تأمین می شوند (۲):

جدول ۱-۱: مهمترین منابع تولید کننده آنزیم های تجاری

منبع	آنزیم	میکروارگانیسم
قارچ	آمیلاز	*Aspergillus oryzae*
	گلوکوزیداز	*Aspergillus flavus*
	پروتئاز	*Aspergillus niger*
	پکتیناز	*Aspergillus niger*
	پنی سیلیناز	*Penicillium notatum*
	کاتالاز	*Aspergillus niger*
باکتری	آمیلاز	*Bacillus subtilis*
	پروتئاز	
	گلوکز اکسیداز	
مخمر	اینورتاز	*Saccharomyces cerevisiae*
	لاکتاز	*Saccharomyces fragilis*

بنا به دلایل زیر میکروب ها به عنوان منابع آنزیمی نسبت به گیاهان و جانوران ترجیح داده می شوند:۱- برای تولید عموما" ارزانند، ۲- آنزیم های موجود در آنها بیشتر قابل پیش بینی و کنترل هستند، ۳- بافتهای گیاهی و جانوری مواد مضر بیشتری دارند (مانند ترکیبات فنلی در گیاهان، مهارکننده های داخل سلولی و پروتئازها)، ۴- میکروب ها را نسبت به گیاهان و جانوران راحت تر می توان از نظر ژنتیکی دستکاری نمود، ۵- میکروارگانیسم ها را می توان در مقادیر بالا و در یک مدت زمان نسبتا" کم از طریق روشهای تخمیر کشت داد، ۶- پروتئین های میکروبی اغلب نسبت به همتاهای جانوری و گیاهی خود پایدارترند (۳).

امروزه پیشرفت های اخیر در فناوری DNA نوترکیب جهت تولید بالای آنزیم مطلوب در میکروارگانیسم ها به کار گرفته می شود.

۱-۳ آمیلازهای میکروبی

مسیر گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک فرآیندهای مهم و عمده تولید انرژی از گلوکز در سلول می باشند. این مسیر ها در بین موجودات مختلف تنوع فراوانی را نشان می دهند، اما به نظر می رسد که بسیاری از آنزیم های اصلی این مسیر در اکثر موجودات زنده از جمله موجوداتی که ژنوم آنها تعیین ترادف شده است حفظ شده باشد (۵،۴). وجود این مسیر ها در بین موجودات مختلف نشان می دهد که گلوکز یک منبع مهم و اصلی انرژی می باشد. گلوکز در طبیعت به مقدار فراوان، عمدتا" بصورت پلیمری یافت می شود و موجوداتی که قادر به هضم پلیمر های گلوکزی هستند مقادیر فراوانی از گلوکز را در اختیار دارند. تنوع فراوانی که در آنزیم های هیدرولیز کننده پلیمری گلوکز یافت می شود نشان از اهمیت این پلیمر ها برای حیات است. از بین پلیمرهای گلوکزی، نشاسته فراهم کننده عمده گلوکز مصرفی موجودات زنده می باشد زیرا اکثر موجودات قادر به هضم سلولز، فراوانترین ماده آلی در طبیعت، نمی باشند. بنابراین آنزیم

های هیدرولیز کننده نشاسته[1] از اهمیت ویژه ای بر خوردار بوده و می توان انتظار داشت که گستردگی زیادی در بین تمامی رده های حیات داشته باشند (۶). از میان آنزیم های تجزیه کننده نشاسته آلفا-آمیلازها اهمیت ویژه ای دارند زیرا آنها می توانند نشاسته را بصورتی قابل حل درآورند. آلفا-آمیلازها، هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی α-۱،۴ داخلی را هیدرولیز می کنند. بنابراین بصورتی ایده آل پلیمر نشاسته را به قطعات کوچکتر تبدیل می کنند. این آنزیم ها ویژگیهای سوبسترایی متفاوت، دما و pH بهینه متفاوتی دارند.

۱-۴ طبقه بندی آنزیم های دارای فعالیت آلفا-آمیلازی

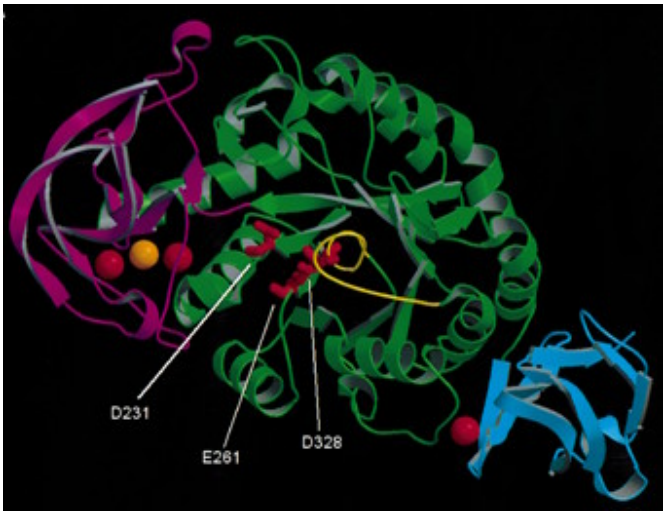
آنزیم های آمیلولیتیک گروهی از آنزیم ها را تشکیل می دهند که بر روی نشاسته و پلی ساکاریدهای مربوطه عمل می کنند. عمده این آنزیم ها در خانواده آلفا-آمیلازها دسته بندی شده اند که در طبقه بندی هیدرولازهای گلیکوزیدی بر مبنای ترادف، شامل دسته GH-H می شوندکه سه خانواده هیدرولازهای گلیکوزیدی را می پوشاند. GH-۱۳ خانواده عمده ای است که تقریبا" ۳۰ ویژگی آنزیمی را شامل می شود و علاوه بر آلفا-آمیلاز، شامل سیکلودکسترین گلوکانوترانسفراز، اولیگو۱و۶-گلوکوزیداز، نئوپلولاناز، آمیلوسوکراز و غیره می شود (۷). آنزیم های دارای فعالیت آلفا-آمیلازی از لحاظ ترادف اسیدآمینه ای در دو خانواده گلیکوزیل هیدرولازی که از لحاظ ساختاری متفاوتند، بنام GH13 و GH57 قرار می گیرند. خانواده ۱۳ دارای ۵۱۴ ترادف و ۱۹ فعالیت آنزیمی مختلف می باشد که از میان آنها می توان CGTase، آلفا-گلوکوزیداز و آمیلاز تشکیل دهنده مالتوتترائوز را نام برد. از این خانواده ۷۳ ساختار کریستالی موجود است. خانواده ۵۷ فقط شامل ۱۳ ترادف و دو فعالیت آنزیمی متفاوت یعنی فعالیت آمیلازی و ۴-گلوکانوترانسفرازی می باشد. هیچ ساختار کریستالی برای آنزیم های این خانواده گزارش

[1] Starch-hydrolyzing Enzyme

نشده است و بطور کلی کمتر از خانواده ۱۳ شناخته شده است. احتمالا" آلفا-آمیلازهای متعلق به خانواده ۵۷ ماهیت آنزیمی و ساختاری کاملا" متفاوتی نسبت به خانواده ۱۳ دارند (۶). با تعیین ساختار سه بعدی 4-α-glucanotransferase و مطالعات جهش زایی هدفمند، مشخص شد که از نظر اسید آمینه های کاتالیتیک، رابطه نزدیکی بین GH57 و خانواده آلفا-آمیلاز وجود ندارد (۱۰-۸). علی رغم این موضوع، هر دو گروه دارای یک مکانیسم مشترک (حفظ کانفیگوراسیون آنومری) و یک الگوی تاخوردگی مشترک ($(\beta/\alpha)_8$ barrel) می باشند (۸، ۱۱). تاکنون برای خانواده GH57 چهار فعالیت آنزیمی شناسایی شده است: آلفا-آمیلاز، آمیلوپلولاناز، آلفا-گالاکتوزیداز (EC3.2.1.22) و آلفا-گلوکانوترانسفراز (EC2.4.1.25). منشأ اغلب آنزیم های این خانواده از میکروارگانیسمهای extremophile به ویژه از آرکئوباکتریا هستند (۱۳-۱۱).

۱-۵ ساختار آلفا-آمیلاز

ساختار سه بعدی برخی آلفا آمیلازها از منابع مختلف به طریق کریستالوگرافی اشعه ایکس تعیین شده است و همگی شامل سه دمین A, B وC می باشند. استوانه مرکزی $(\alpha/\beta)_8$ یا دمین A شامل سه اسید آمینه Asp_{231} Glu_{261}, و Asp_{328} (طبق شماره گذاری *Bacillus licheniformis* α-amylase) در جایگاه فعال می باشد،بعلاوه دمین های B وC در دو وجه مخالف استوانه یا TIM barrel قرار دارند. دمین B بخش بزرگی از شکاف اتصال سوبسترا را تشکیل می دهد و تصور بر این است که مسئول تفاوت ویژگی سوبسترایی مشاهده شده در بین آلفا-آمیلازها می باشد. دمین C شامل بخش انتهای کربوکسیل و موتیف کلید یونانی است (شکل ۱). چهار ناحیه حفاظت شده که برای فعالیت کاتالیتیک آمیلاز ضروری هستند، بخوبی درآنها حفاظت شده اند و در تشکیل مرکز فعال، محل اتصال سوبسترا و اتصال کلسیم نقش دارند (۱۴).



شکل۱-۱: سازماندهی دمینی آلفا-آمیلاز. دمین های A, B وC و یونهای کلسیم و سدیم به ترتیب با رنگهای سبز، صورتی و آبی و توپ های قرمز و نارنجی در *Bacillus licheniformis* نمایش داده شده است . همینطور اسیدهای آمینه جایگاه فعال با رنگ قرمز مشخص شده اند. لوپ متصل کننده β_7 به α_7 نیز با رنگ زرد مشخص شده است.

۱-۶ یون های کلسیم، سدیم و کلر در ساختار آلفا-آمیلاز

همه آلفا-آمیلازهای شناخته شده حاوی یک یون کلسیم حفاظت شده می باشند که در حد فاصل دمین های A و B قرار گرفته اند و برای داشتن آنزیمی فعال و پایدار الزامی می باشد (۱۵). یون کلسیم بسیار محکم به آنزیم می چسبد بطوریکه ثابت جدایی یون کلسیم برای PPA و AHA به ترتیب ۴۴ و ۰.۰۰۵ نانومول گزارش شده است (۱۷،۱۶). یونهای کلسیم، پایداری و فعالیت آمیلازهای باسیلوسی را کنترل می کنند. بنظر می رسد کلسیم حفاظت شده اهمیت ساختاری داشته باشد زیرا از جایگاه فعال بسیار دور است و نمی تواند بطور مستقیم در کاتالیز شرکت کند (۱۸). یک یا چند یون کلسیم اضافه در چندین ساختار آمیلازی دیگر یافت شده است که جالبترین مورد، آرایش خطی Ca-Na-Ca یافت شده در BLA

می باشد (۱۹). بررسی ساختارهای کریستالی فرم وحشی بدون کلسیم و جهش یافته سه گانه این آنزیم به Machius و همکاران اجازه داد که وجود مرحله ای گذار در تبدیل وضعیت نامنظم به منظم (disorder → order transition) در اثر اتصال کلسیم به فرم فاقد کلسیم این آنزیم را پیشنهاد کنند (۲۰). چندین آلفا-آمیلاز، حاوی یک یون کلر در جایگاه فعال می باشند که احتمالا" از طریق افزایش pK_a اسیدهای آمینه دهنده هیدروژن در جایگاه فعال، بازده کاتالیتیک را افزایش می دهد. یون های کلراید بطور عمده در آلفا-آمیلازهای پستانداران یافت شده اند بجز یک مورد که اخیرا" در آلفا-آمیلازی سرمادوست از منشأ *Alteromonas haloplanctis* گزارش شده است. افزایش تمایل به کلسیم در اثر اتصال کلر در آمیلازها مشاهده شده است و اعتقاد بر این است که اتصال یون کلر باعث القاء تغییرات شکل فضایی در اطراف جایگاه فعال می شود (۲۲،۲۱).

۱-۷ شکاف جایگاه فعال آلفا-آمیلاز

شکاف جایگاه فعال در حد فاصل دمین A وB و در انتهای آمینوی رشته های بتا در TIM barrel قرار گرفته است. مطالعات کریستالوگرافی آمیلازها با بازدارنده آکاربوز نشان داده است که شکاف اتصال سوبسترا می تواند ۴ تا ۱۰ واحد گلوکزی را بر حسب نوع گونه در خود جای دهد. هر واحد گلوکز توسط اسیدهای آمینه مشخصی به جایگاه فعال آنزیم متصل می شود (۲۳).

۱-۸ ترادف آلفا-آمیلاز

ترادف آلفا-آمیلازها شامل حداقل چهار ناحیه حفاظت شده می باشد که در TIM barrel روی رشته های بتای ۳ و ۴ و ۵ و در لوپ متصل کننده رشته بتای ۷ و مارپیچ آلفای ۷ قرار گرفته است. اسیدهای آمینه تشکیل دهنده ناحیه یک (I) در انتهای کربوکسی رشته بتای سوم استوانه مرکزی قرار گرفته و در حفظ تمامیت جایگاه فعال و اتصال به یون کلسیم حفاظت شده مشارکت دارند (۱۹،۲۰). اسیدهای آمینه ناحیه حفاظت شده دوم (II) در رشته بتای چهارم واقع شده است و بنظر می رسد که در فعالیت کاتالیتیک و اتصال به انتهای احیا کننده زنجیره گلوکزی در شکاف متصل شونده به سوبسترا نقش داشته باشند (۲۴). ناحیه سوم (III) شامل اسیدهای آمینه کاتالیتیک پروتون دهنده مانند Glu261 می باشد. اسیدهای آمینه تشکیل دهنده ناحیه چهارم (IV) جایگاه فعال را در مقابل حلال می پوشانند و شواهد کریستالوگرافی بدست آمده از آلفا-آمیلازها و CGTase نشان می دهد که در هنگام اتصال سوبسترا باید این لوپ جابجا شود (۲۷-۲۵).

		Region I	Region II	Region III	Region IV
	consensus	DAVINH	GFRLDAAKH	EVID	FVDNHD
amy	B1378	462 **DVVLNH**	546 **YFRVDTVKH**	579 **EAWG**	640 **FLGSHD**
	MSPAMY	469 **DVVVNH**	554 **YFRVDTVKH**	586 **EAWG**	652 **FLGSHD**
	CTHAMY	161 **DFAPNH**	251 **GIRLDAVKH**	283 **EWFL**	349 **FIDNHD**
	BSUAMY	138 **DAVINH**	213 **GFRFDAAKH**	249 **EILQ**	305 **WVESHD**
	BSTAMY	101 **DVVFDH**	230 **GFRLDAVKH**	264 **EYWS**	326 **FVDNHD**

شکل ۱-۲: نواحی چهارگانه حفاظت شده در بین آلفا-آمیلازها