

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

## DIPLOMSKO DELO

Janja Debevc

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO  
VISOKOŠOLSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM KEMIJSKA  
TEHNOLOGIJA

**STABILNOST ALFA-AMILAZE V RAZLIČNIH  
ORGANIZMIH**

DIPLOMSKO DELO

Janja Debevc

MENTOR: prof. dr. Jurij Lah

Ljubljana, 2019

# IZJAVA O AVTORSTVU

## diplomskega dela

Spodaj podpisana, Janja Debevc, sem avtorica diplomskega dela z naslovom Stabilnost alfa-amilaze v različnih organizmih.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je diplomsko delo rezultat mojega raziskovalnega dela pod mentorstvom prof. dr. Jurija Laha;
- sem poskrbela, da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem diplomskem delu, navedena oziroma citirana v skladu z navodili;
- se zavedam, da je plagiatorstvo, v katerem so tuje misli oziroma ideje predstavljene kot moje lastne, kaznivo po zakonu (Zakon o avtorski in sorodnih pravicah – uradno prečiščeno besedilo (ZASP-UPB3) (Ur. list RS, št. 16/2007));
- sem poskrbela za slovnično in oblikovno korektnost diplomskega dela;
- je elektronska oblika diplomskega dela identična tiskani obliki diplomskega dela.

V Ljubljani, 19.9.2019

Podpis avtorice:

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Juriju Lahu za strokovno pomoč, napotke, svetovanje in usmeritve pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvalila bi se staršem in sestri Jasmini, ki so me spodbujali in podpirali v času študija, kot tudi pri pisanju diplomskega dela.

Zahvalila bi se rada tudi prijateljem, ki so kakorkoli pripomogli, me spodbujali v času študija ter pri izdelavi diplomskega dela.

## **Stabilnost alfa-amilaze v različnih organizmih**

**Povzetek:** Primerjala sem stabilnostne krivulje, ki predstavljajo temperaturno odvisnost Gibbsove proste energije razvitja psihofilnih, mezofilnih in termofilnih  $\alpha$ -amilaz. Objavljeni rezultati kažejo, da je stabilnost največja pri termofilni  $\alpha$ -amilazi in najmanjša pri psihofilni  $\alpha$ -amilazi. Razvidne so tudi različne temperature, pri katerih se razvijejo tako imenovane temperature taljenja. Najvišja je pri termofilni  $\alpha$ -amilazi in najnižja pri psihofilni  $\alpha$ -amilazi.

**Ključne besede:**  $\alpha$ -amilaza, psihofil, mezofil, termofil

## **Stability of alpha-amylase in different organisms**

**Abstract:** Stability curves representing the temperature dependence of the Gibbs free energy of the unfolding of psychophilic, mesophilic and thermophilic  $\alpha$ -amylases are compared. The published results indicate that the stability is highest in the case of thermophilic  $\alpha$ -amylase and lowest for psychophilic  $\alpha$ -amylase. The unfolding transition temperatures, the so-called melting temperatures, are also evident. Melting temperature is highest for thermophilic  $\alpha$ -amylase and lowest for psychophilic  $\alpha$ -amylase.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, psychrophile, mesophile, thermophile

# Kazalo

<b>1</b>	<b>Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1	Beljakovine.....	1
1.2	Encimi.....	1
1.3	Amilaza.....	2
1.4	$\alpha$ -amilaza .....	2
<b>2</b>	<b>Namen dela.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Rezultati in razprava.....</b>	<b>5</b>
3.1	Stabilnost $\alpha$ -amilaz .....	5
<b>4</b>	<b>Zaključek.....</b>	<b>6</b>
<b>5</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>7</b>

## **Seznam uporabljenih kratic in simbolov**

**PPA** - homolog prašičja pankreasa

**BBA** - *Bacillus amyloliquefaciens*

**AHA** - *Pseudoalteromonas haloplanktis*



# 1 Uvod

## 1.1 Beljakovine

Beljakovine so sestavljene iz aminokislin, imajo veliko različnih bioloških funkcij in oblik. Sestavljene so iz več kot 100 aminokislin, povezane s peptidnimi vezmi. Zaporedje aminokislin, ki je zapisano v genih, določa strukturo proteina. Beljakovina se zvije v določeno tridimenzionalno strukturo - temu rečemo nativna konformacija. Imajo veliko funkcijsko raznovrstnost: sodelujejo pri krčenju mišic, pri vzdrževanju čvrstosti struktur, prenosu oziroma skladiščenju majhnih molekul,.. Med beljakovine se prišteva tudi protitelesa, encime in nekatere hormone. Vzrok za tako veliko število raznolikih bioloških funkcij se skriva v številnih možnih kombinacijah v zaporedju in sestavi aminokislin [1].

Zgradbo beljakovin delimo na štiri strukturne ravni. To so primarna, sekundarna, terciarna in kvartarna strukturna raven. Primarna struktura vsebuje zaporedje aminokislin v polipeptidni verigi, ki tvori beljakovino. Sekundarna struktura nastane kot posledica vodikovih vezi med skupinami aminokislin na polipeptidni verigi. Vsebuje  $\alpha$ -vijačnico in  $\beta$ -strukturo. Terciarna struktura nastane, ko se vsi sekundarni elementi zložijo skupaj v tridimenzionalno obliko. Končno tridimenzionalno obliko določajo vse šibke in močne interakcije. Ko beljakovina izgubi tridimenzionalno obliko, ni več funkcionalna. Kvartarna struktura nam pove, kako so podenote usmerjene in razporejene druga na drugo. Ta strukturna raven velja samo za beljakovine z več podenotami, ne velja pa za beljakovine sestavljene iz enega samega polipeptida [2].

Denaturacija ali razvijanje beljakovine pomeni izgubo organizacije beljakovinske strukture. Pri denaturaciji se izgubijo sekundarna in terciarna struktura ter biološka aktivnost. Primarna struktura ostane nedotaknjena. Denaturacija je lahko tudi ireverzibilna, kar pomeni da se protein ne more vrniti v nativno konformacijo [1].

## 1.2 Encimi

Encimi so biokatalizatorji v živih organizmih. To pomeni, da sodelujejo in pospešujejo reakcije pri sintezah, metaboličnih razgradnjah ter pretvarjanju energije. To storijo tako, da zmanjšajo aktivacijsko energijo. Aktivacijska energija je energija, ki jo potrebujejo molekule, da se pretvorijo iz reaktantov v produkte. Prehodno stanje encima je visoko kratkoživo energijsko stanje, iz katerega se encim po reakciji povrne v prvotno stanje [1].

Encimi z znižanjem aktivacijske energije povišajo hitrost reakcije, med potekom reakcije se ne spremeni in jo ne porabijo, vplivajo samo na hitrost reakcije in ne na ravnotežje. Encimski kompleks nastane med vezavo molekule substrata z molekulo encima. Aktivno mesto je mesto, kjer se veže substrat na encim. Tam poteka kataliza [1].

Na aktivnost encima vpliva koncentracija encima, pH raztopine ter temperatura. Če povečamo koncentracijo encima, se bo povežala začetna hitrost reakcije, pod pogojem da je zadostna količina substrata. pH more biti optimalen, odvisen je od nabitih aminokislinskih ostankov v encimu oziroma substratu. Povišana temperatura vpliva na začetno hitrost reakcije, vendar ko pride do denaturacije encima, hitrost reakcije pade [1].

### 1.3 Amilaza

Amilaza je encim, ki razgrajuje škrob. Razširjena je v mikrobnih, rastlinskih in živalskih kraljestvih. Deluje s pomočjo hidrolize med sosednjimi enotami glukoze, pri čemer dobimo produkte, ki so značilni za posamezen encim [4].

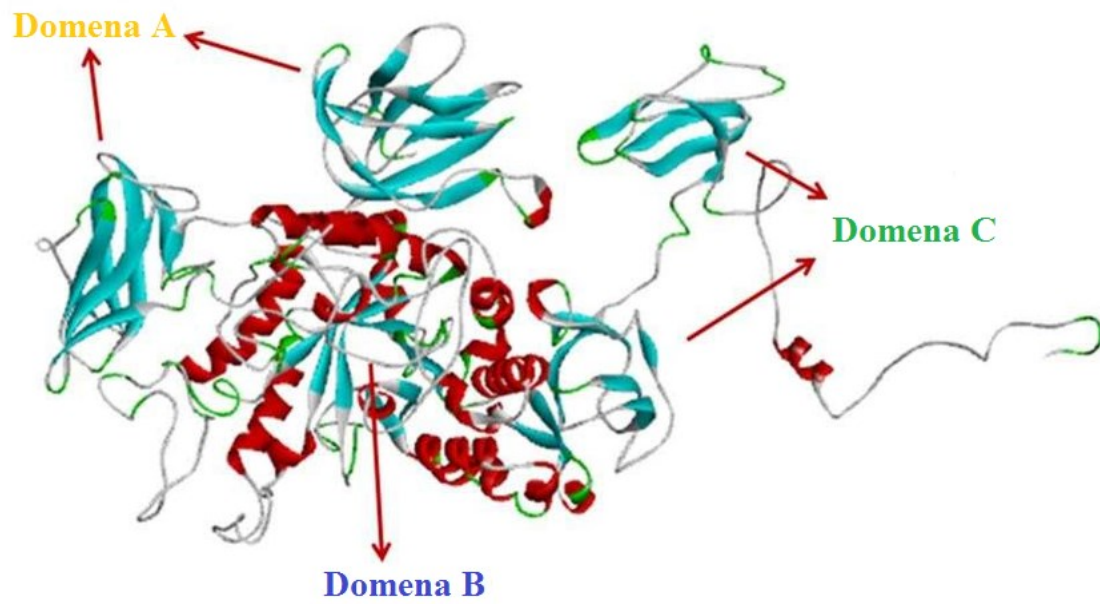
Poznamo  $\alpha$ -amilazo, ki se nahaja v živalih, rastlinah in mikrobih, cepi naključne  $\alpha$ -1,4 glikozidne vezi, njeni produkti pa so glukoza, maltoza in dekstrin;  $\beta$ -amilazo, nahaja se v rastlinah ter mikrobih, cepi pa drugo  $\alpha$ -1,4 glikozidno vez, produkt je maltoza;  $\gamma$ -amilazo, ki pa se nahaja v živalih ter mikrobih, cepi pa zadnjo  $\alpha$ -1,4 glikozidno vez, produkt je glukoza [5].

### 1.4 $\alpha$ -amilaza

$\alpha$ -amilaza ali  $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanohidrolaza je encim, ki deluje na notranje  $\alpha$ -glikozidne vezi polisaharidov kot sta škrob in glikogen in hidrolizira to vez, da proizvede  $\alpha$ -anomerične mono- ali oligosaharide [3].

$\alpha$ -amilaza se uporablja v industriji škroba. Bakterijske in glivične  $\alpha$ -amilaze, zlasti encimi iz vrste Bacillus, so posebej pomembne za obsežne biotehnološke procese zaradi svoje izjemne termostabilnosti in ker so za te encime na voljo učinkoviti ekspresijski sistemi [3].

Struktura je sestavljena iz ene polipeptidne verige, zložene v tri domene, A, B in C. Domena A je katalitična in je sestavljena iz zelo simetričnega nabora osmih vzporednih  $\beta$ -pramenov obdanih z osmimi  $\alpha$ -vijačnico. Domena B je tvorjena med tretjim  $\beta$ -pramenom in tretjo  $\alpha$ -vijačnico. Ima precej nepravilno  $\beta$ -strukturo in se med  $\alpha$ -amilazami močno razlikuje po velikosti in strukturi. Domena B tvori velik del mesta, ki veže substrat, domneva se, da je pomembna za razlike v specifičnosti substrata med  $\alpha$ -amilazami. Domena C predstavlja C-terminalni del zaporedja. Domeni B in C se nahajata na nasprotnih straneh domene A [3].



Slika 1: Struktura  $\alpha$ -amilaze (povzeto po [6])

## 2 Namen dela

Namen diplomskega dela je bilo preučiti stabilnost psihofilne, mezofilne in termofilne  $\alpha$ -amilaze. Termofili živijo tudi pri temperaturah nad 100 °C. Njihovi encimi so pokazali biotehnološki potencial, npr. različne termostabilne DNA polimeraze. Psihofilni mikroorganizmi živijo pri temperaturah okoli -20 °C. Ti mikroorganizmi morajo ohraniti encimsko katalizirane reakcije in metabolične stopnje blizu ali pod lediščem čiste vode. Aktivnost encimov pri nizki temperaturi se lahko doseže z več prilagoditvami proteinske strukture [7].

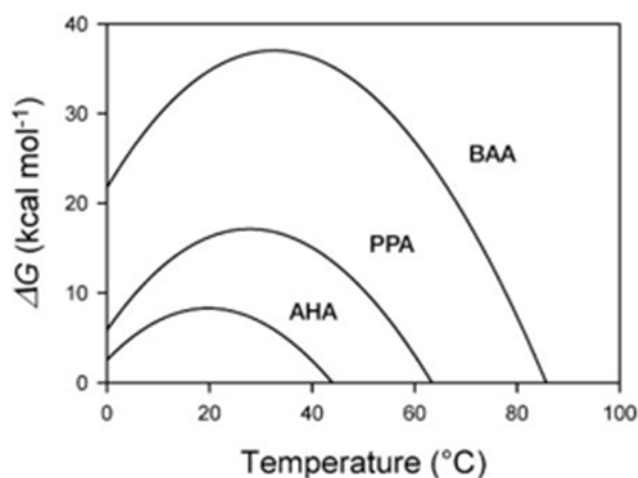
Kristalne strukture ekstremofilnih encimov kažejo na molekularne prilagoditve na temperaturo. Poveča se število vseh šibkih interakcij in strukturnih dejavnikov, ki sodelujejo pri stabilnosti beljakovin od psihofilov, mezofilov do termofilov. Zato je enak mehanizem molekularne prilagoditve vključen v zahtevo po stabilni strukturi in aktivnosti proteina v termofilih ter zahtevi po visoki aktivnosti encimov v psihofilih. To kaže na zapletene odnose med aktivnostjo in stabilnostjo pri encimih teh ekstremofilov [7].

$\alpha$ -amilaza iz *Pseudoalteromonas haloplanktis* (AHA), prej *Alteromonas haloplanctis*, je najbolj značilen psihofilni encim, izoliran iz antarktične bakterije. Njegov najbližji strukturni homolog prašičja pankreasna  $\alpha$ -amilaza (PPA), ki je vzeta kot referenca za mezofilni organizem. Vrste bakterij *Bacillus* lahko kolonizirajo zmerno termofilne habitate, *Bacillus amyloliquefaciens* pa izloča termostabilno  $\alpha$ -amilazo (BAA). Ta encim je bil izbran kot značilna termofilna beljakovina. Tridimenzionalne strukture teh  $\alpha$ -amilaz so podobne in se kažejo na dobro ohranitev aktivnega mesta sekundarne strukture. Zato predstavljajo ustrezno serijo homolognih encimov za študije prilagoditve beljakovin na različne temperature [7].

### 3 Rezultati in razprava

#### 3.1 Stabilnost $\alpha$ -amilaz

Krivulje stabilnosti za  $\alpha$ -amilaze iz psihofilne  $\alpha$ -amilaze iz AHA, mezofilne  $\alpha$ -amilaze iz PPA in termofilne  $\alpha$ -amilaze iz BAA (slika 2). Iz teh krivulj lahko sklepamo o stabilnosti ekstremofilnih encimov [7].



Slika 2: Gibbsova prosta energija razvitja za psihofilno  $\alpha$ -amilaze iz AHA, mezofilno  $\alpha$ -amilazo iz PPA in termofilno  $\alpha$ -amilaze iz BAA (povzeto po [7])

Krivulja stabilnosti ustreza delu, ki je potrebno, za razvitje proteina pri dani temperaturi. Največjo stabilnost  $\Delta G$  ima termofilna  $\alpha$ -amilaza iz BAA, sledi ji mezofilna  $\alpha$ -amilaza iz PPA, najslabšo stabilnost ima psihofilna  $\alpha$ -amilaza iz AHA [8].

Stabilnost  $\Delta G$  je enaka nič pri  $T_m$ .  $T_m$  je temperatura, pri kateri se  $\alpha$ -amilaza razvije, to je tako imenovana temperatura taljenja. Pri  $\alpha$ -amilazi iz AHA je ta vrednost 45 °C, pri  $\alpha$ -amilazi iz PPA 65°C, pri  $\alpha$ -amilazi iz BAA pa 85°C. Stabilnost doseže najvišjo vrednost  $\Delta G_{max}$  oziroma vrh krivulje blizu sobne temperature, kljub velikim razlikam v  $T_m$  [7,8].

Ko je stabilnost najvišja,  $\Delta G_{max}$   $\alpha$ -amilaza doseže temperaturo maksimalne stabilnosti  $T_{max}$ . Najvišja  $T_{max}$  je pri termofilni  $\alpha$ -amilazi iz BAA, ki znaša 33 °C, pri mezofilni  $\alpha$ -amilazi iz PPA je 30 °C, najnižja  $T_{max}$  pa je pri psihofilni  $\alpha$ -amilazi iz AHA, ki znaša 20 °C [7,8].

## 4 Zaključek

Temperaturna odvisnost Gibbsove proste energije denaturacije kaže, da se stabilnost  $\alpha$ -amilaze v različnih organizmih razlikuje. Najbolj stabilna je termofilna  $\alpha$ -amilaza iz BAA, najmanj pa psihofilna  $\alpha$ -amilaza iz AHA. Psihofilna  $\alpha$ -amilaza iz AHA denaturira v krajšem temperaturnem območju kot mezofilna  $\alpha$ -amilaza iz PPA in termofilna  $\alpha$ -amilaza iz BAA. Ko stabilnost doseže najvišjo vrednost imamo temperaturo maksimalne stabilnosti, ki je najvišja pri termofilni  $\alpha$ -amilazi BAA in najnižja pri psihofilni  $\alpha$ -amilazi iz AHA. Pri temperaturi taljenja, ko stabilnost doseže vrednost nič, je najnižja pri  $\alpha$ -amilazi iz AHA, sledi ji  $\alpha$ -amilaza iz PPA, najvišja je pri  $\alpha$ -amilazi iz BAA [7, 8].

Razlike v stabilnosti so povezane z razliko v aminokislinskem zaporedju. Pri termofilni  $\alpha$ -amilazi so ugotovili višje vrednosti tirozina, glutaminske kisline ter arginina, kot pri mezofilni  $\alpha$ -amilazi in psihofilni  $\alpha$ -amilazi. Psihofilna  $\alpha$ -amilaza ima nižjo vsebnost aminokisline prolin, manjše število disulfidnih vezi ter večje število glicina kot mezofilna  $\alpha$ -amilaza in termofilna  $\alpha$ -amilazi [3,7].

## 5 Literatura

- [1] R. F. Boyer: Temelji biokemije. Ljubljana: Narodna in univerzitetna knjižnica 2005, str. 70 - 136.
- [2] Protein Structure. Lumen Learning.  
<https://courses.lumenlearning.com/introchem/chapter/protein-structure/>  
(pridobljeno 5. sept. 2019)
- [3] O. Prakash, N. Jaiswal:  $\alpha$ -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl. Biochem Biotechnol.* **2010**, 160, 2401-2414
- [4] P.V. Aiyer: Amylases and their applications. *Afr. J. Biotechnol.* **2005**, 4, 1525-1529
- [5] Amylase. Wikipedia, the free encyclopedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Amylase>  
(pridobljeno 14. avg. 2019)
- [6] A. Kumari, V.K. Singh, A.M. Kayastha: Molecular modeling of  $\alpha$ -amylase from germinated soybean (*Glycine max*) and its funkcional diversity. *Int. J. Genomics Proteomics.* **2013**, 4, 64-71
- [7] S. D'Amico, J. Marx, C. Gerday, G. Feller: Activity-Stability Relationships in Extremophilic Enzymes. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 7891-7896.
- [8] G. Feller: Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. Hindawi Publishing Corporation Scientifica. **2012**, 2013, 1-28.