الاستنساخ الجزيئي وخصائص أنزيم ألفا أميليز المستخلص من سلالة جيوباسيلس DSM-465 المحبة للحرارة

إعداد

عبدالعزيز بن ضيف الله العمري

تقدم هذه الرسالة استكمالًا لمتطلبات درجة الماجستير في علوم الكيمياء الحيوية

إشراف

د. محمد شاهد نديم

استاذ مساعد

قسم الكيمياء الحيوية

أ.د. جلال الدين اعظم جلال اولياء خان

استاذ

قسم الكيمياء الحيوية

قسم الكيمياء الحيوية – كلية العلوم
جامعة الملك عبدالعزيز
جدة – المملكة العربية السعودية

١٤٤١هـ/ ٢٠٢٠ م

المستخلص

ألفا أميليز هو انزيم الأيض الأولي الذي يحفز التحلل من ألفا-١، ٤- رابطة جليكوسيدية بين جزيئات الجلوكوز في النشا. يتمّ إنتاج الإنزيم في اللعاب البشري والبنكرياس، ويوجد أيضا في مجموعة واسعة من الكائنات الحية. ألفا أميليز له تطبيقات صناعيّة في الخبْز والمشروبات والورق والنسيج والصناعات الدوائية. هنالك سوق كبير لهذا الانزيم لاستخدامه على نطاق صناعي. الإنزيمات من الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة لديها تنوع كبير واستقرارأفضل في درجات الحرارة الصناعية. أدوات وتقنيات الهندسة الوراثية الحديثة جعلت بالإمكان إنتاج وتنقية الإنزيم بكميات كبيرة. سلالة البكتريا الجديدة جيوباسيلس ثيرموديناياتريفيكنس دسم- ٤٦٥ المحبة للحرارة المعتدله (درجة النمو المثلى ٦٥ ° درجة مئوية) لم يتم استكشاف خصائص انزيماتها وبروتيناتها. يعزز استكشاف هذه السلالات البكتيرية من فرص اكتشاف بعض الإنزيمات الجديدة بخصائص فريدة. تهدف الدراسة المقترحة إلى الإنتاج المطعم ، والتنقية ، وخصائص ألفا أميليز من سلالة جيوباسيلس حددت حديثا.

الجين المتكون من ١٦٩٨ شفره جينيه لـ ٥٦٥ حمض أميني تم تكثيره عن طريقPCR (تقنية تفاعل البلمرة المتسلسلة)، ثم باستخدام تقنية T/A للاستنساخ تم ربط وتكثير الجين في البلازميد PTZ57R وتم إعادة تكثيره في البلازميد (+) pET21a. تم تكثير الانزيم في سلالة بكتريا القولون BL21 (DE3) شفرة RIL وتنقيته جزئيا باستخدام تقنية الكروموتوغرافي ذي التبادل الأيوني بناء على DEAE-Sephadex. وقد ظهر الانزيم بوزن جزيئي حوالي 66 KDa مع درجة حموضة مثلى ٨ اس هيدروجيني، ودرجة حرارة مثلى ٧٠ درجة مئوية. احتفظ الانزيم بنشاطه عند ٩٠ إلى ١٠٠ درجة مئوية عند حضنه لمدة ٥ دقائق وكانت قيمتهμM ١٥٧,٧.

Molecular cloning and characterization of α-amylase from thermophilic *Geobacillus* strain DSM-465

By

Abdulaziz Dhaifallah Alamri

A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the award of Degree of Master in Biochemistry

Supervised By

Dr. Muhammad Shahid Nadeem

Assistant Professor

Department of Biochemistry

Prof. Jalaluddin A. Khan

Professor

Department of Biochemistry

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
KING ABDULAZIZ UNIVERSITY
JEDDAH-SAUDI ARABIA
1441 H – 2020 G

ABSTRACT

Alpha-amylase is the enzyme of primary metabolism that catalyzes the hydrolysis of α-1, 4-glycosidic linkage in the starch molecules. The enzyme is ubiquitous in nature, found in the human saliva, pancreatic secretions, plants, fungi and bacteria. There is a big market for this enzyme in the baking, beverage, paper, textile and pharmaceutical industries. The present study describes cloning, *E. coli* expression, partial purification, kinetic properties, *in silico* structural and molecular docking analysis of alpha amylase from *Geobacillus thermodenitrificans* DSM-465. A 1698 bp gene coding for 565 amino acid protein was PCR amplified, T/A cloned in pTZ57R/T plasmid and subcloned in pET21a (+) expression plasmid. The enzyme was expressed in BL21 (DE3) RIL codon plus strain of *E. coli* under 0.5mM IPTG in LB broth containing 100µg of ampicillin per milliliter of medium adjusted at 200 rpm at 37°C. The enzyme was purified by DEAE-Sephadex based anion exchange chromatography. It gave a protein band at about 63 kDa on SDS-PAGE with optimum pH and temperature at 8 and 70°C respectively. The K_M value of recombinant alpha amylase was 157.7µM and Vmax was 333 U/mg. The enzyme retained considerable activity at 90 to 100°C when incubated for 5 minutes. A 3D protein model comprising of 31% α-helix, 15% β-Sheet, and 52% loop was built by Raptor-X, validated by Ramachandran plot and selected for molecular docking studies. Molecular Operating Environment (MOE) software was used for docking of protein model with selected ligands. The best bonding affinity of enzyme was found with amylopectin as indicated by the lowest docking energy (ΔG -10.59). The main interacting residues Asp232, Arg448, Glu385, Asp99 and, Arg175 with a distance less than 2.86Å make the potential active site of enzyme. In conclusion, the study provides an insight into the biochemical and structural properties of the enzyme. Stability and

activity at a broad range of pH and temperature makes it a strong candidate for industrial applications.