

مطالعه تاثیر فعال کننده ترکیبات پورینی بر آنزیم آلفا آمیلاز: احتمال وجود جایگاه تنظیم فعالیت در ساختار آنزیم

الهه کاشانی امین^۱، پریچهره یغمایی^۱، باقر لاریجانی^۲، آزاده ابراهیم حبیبی^{۲*}

چکیده

مقدمه: مهارکننده‌های آلفا آمیلازهای پستانداران به عنوان داروهایی برای دیابت و چاقی بطور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما گزارش‌های معدودی در مورد فعال‌سازی آنزیم، که می‌تواند در این بیماری‌ها مضر باشند وجود دارد. در این جا، اثر ترکیبات مشتق از پورین روی آلفا آمیلاز پانکراس خوک (به عنوان مدل آنزیم انسانی) بررسی شده است.

روش‌ها: تاثیر ترکیبات پورینی بر فعالیت آنزیم در حضور سوبسترای طبیعی، نشاسته و یک سوبسترای صنعتی، ۴- نیتروفنیل آلفا- دی- مالتوهگزانوئازید بررسی شد. جهت یافتن جایگاه احتمالی برهم کنش این ترکیبات با آنزیم از روش داکینگ (مدل‌سازی مولکولی) استفاده شد.

یافته‌ها: مشتقات متیل گرانتین ۲۰ تا ۳۰ درصد فعالیت آنزیم را افزایش دادند. اثر فعال‌سازی مستقل از غلظت است و در دامنه ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار این ترکیبات دیده می‌شود. با بررسی‌های جای‌گیری، مشخص می‌شود که احتمالاً یک جایگاه تنظیم فعالیت مستقل از نواحی اتصال ثانویه گزارش شده پیشین، در ساختار آنزیم وجود دارد.

نتیجه‌گیری: می‌توان پیشنهاد کرد که افزایش قند خون دیده شده در نتیجه مصرف کافئین ممکن است تا حدودی مربوط به اثر فعال‌کنندگی این ترکیب بر آنزیم باشد. وجود یک ناحیه احتمالی تنظیم فعالیت در آنزیم امکان در نظر گرفتن این ناحیه را برای مطالعات بعدی فراهم می‌کند.

واژگان کلیدی: کافئین، تئوبرمین، آلفا آمیلاز، فعال کننده

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: aehabibi@sina.tums.ac.ir

مقدمه

آلفا آمیلازها متعلق به خانواده ۱۳ از گلیکوزیل هیدرولازها هستند و پیوندهای (آلفا ۱ به ۴) داخلی را در نشاسته و ترکیبات مشابه آن مثل گلیکوژن هیدرولیز می کنند [۱]. هضم کربوهیدراتها در بدن به عهده این گروه از آنزیمهاست. اعضای خانواده ۱۳ در توالی ژنی شباهت کمی به هم دارند اما در ساختار سوم بسیار حفاظت شده اند، بنابراین تشکیلات کاتالیتیک آنها بسیار مشابه است [۲،۳]. آلفا آمیلاز در پستانداران، به دو شکل اصلی بزاقی و پانکراسی دیده می شود [۴].

از آن جایی که این آنزیم نقش مهمی در کنترل قند خون بازی می کند، مطالعات زیادی بر روی مهار کننده های این آنزیم صورت گرفته است. این ترکیبات به طور کلی به دو دسته اصلی پروتئینی و غیر پروتئینی تقسیم می شوند [۵-۹]. بر خلاف مهارکننده ها، مطالعات کمی روی فعال کننده های این آنزیم صورت گرفته است. یون کلر فعال کننده آلوستریک این آنزیم است که بخوبی شناخته شده است [۱۰،۱۱]. البته اثر آنیونهای دیگری هم روی آنزیم پانکراسی انسانی بررسی شده است. در یک مطالعه، آنیونهایی نظیر نیترات، کلرات و فرمات اثر فعال کنندگی شبیه به کلر را نشان داده اند، در حالی که بعضی دیگر نظیر یون آزاید ظاهراً با سازوکاری دیگر، فعالیت آنزیم را افزایش می دهند زیرا میزان تاثیر کلری را که قبلاً وصل شده بود بالا می برند [۱۲].

در مطالعه ای دیگر، که با هدف افزایش فعالیت آنزیم و پایداری آن، در طول مدت آزمایش انجام شده بود، دریافتند که برخی افزاینده ها می توانند روی فعالیت آلفا آمیلاز پانکراس خوک (PPA) مؤثر باشند. پلی اتیلن گلیکول (PEG)، پلی وینیل الکل (PVA) و تریتون X₁₀₀، می توانند ۲۵ تا ۶۰ درصد فعالیت آنزیم را افزایش دهند و آن را در طول زمان ثابت نگه دارند [۱۳]. مهارکننده های خوراکی آنزیم که بالقوه در مهار هایپر گلاسمی بعد از غذا [۱۴،۱۵] مؤثر هستند، می توانند به عنوان داروی مکمل در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ استفاده شوند [۱۶]، بنابراین فعال کننده های آن نیز باید به

عنوان عواملی بالقوه مضر در کنترل قند خون در نظر گرفته شده و مطالعه شوند.

در تحقیقی با هدف یافتن مهار کننده های جدید آلفا آمیلاز، تئوبرمین، مشتقی از گزانتین، تا ۲۴ درصد فعالیت PPA را افزایش داد [۱۷]. بنابراین، اثر مشابه دیگر ترکیبات پورینی (N⁶-متیل آدنین، ۶-بنزیل آمینوپورین)، به همراه مشتقات گزانتین (تئوبرمین، تئوفیلین، آمینوفیلین، پنتوکسی فیلین و کافئین)، روی فعالیت آنزیم بررسی شد. این مقاله نتایج این بررسی را بیان می کند.

روشها

آلفا آمیلاز پانکراس خوک (PPA) (E.C.3.2.1.1)، پنتوکسی فیلین، آمینوفیلین، تئوفیلین، ۶-بنزیل آمینوپورین، N⁶-متیل آدنین، تئوبرمین، کافئین، ۴- نیتروفیل آلفا- دی- مالتوهگزانوآزاید، ۴-نیتروفنل و ۵،۳-دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) از سیگما (Sigma; St. Louis, MO, USA) خریداری شده اند. دی متیل سولفوکساید (DMSO)، نشاسته محلول، مالتوز و دیگر ترکیبات شیمیایی از مرک (Merck; Darmstadt, Germany) تهیه شده اند.

اثر هر یک از ترکیبات روی PPA، با استفاده از دو سوبسترای مختلف، ۴-نیتروفیل آلفا-دی- مالتوهگزانوآزاید (سوبسترای صنعتی) و نشاسته (سوبسترای طبیعی)، بررسی شد. آزمایشها در بافر فسفات با pH معادل ۷/۲ ± ۰/۱ در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد برای سوبسترای صنعتی و ۲۵ درجه سانتیگراد برای نشاسته انجام شد.

آنزیم بمدت ده دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد، با هر ترکیب به آرامی مخلوط شد و سپس فعالیت آن به دو روش کینتیکی ممتد (برای سوبسترای صنعتی) [۱۸] و نقطه نهایی (برای نشاسته) [۱۹] اندازه گیری شد. مبنای اندازه گیری فعالیت آلفا آمیلاز، میکرومولهای تولید شده پارانیتروفنل (محصول سوبسترای صنعتی) و مالتوز (محصول سوبسترای طبیعی) است. جذب نوری نمونه ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر شیمادزو UV-1800 اندازه گیری شد و محاسبات به کمک نرم افزار UV-Probe انجام گرفت. فعالیت باقیمانده نمونه (پس از مجاورت) به صورت درصدی از فعالیت نمونه کنترل بیان شده است.

این دو نشان می دهند [۲۱] و عملکردشان براساس طول های متفاوت سوپسترا فرق می کند [۲۲].

تا بحال تعدادی از آنیون ها [۱۱] و برخی ترکیبات پلی مری [۱۳] به عنوان فعال کننده های آلفا آمیلاز پستانداران شناخته شده اند. یون کلر و جانشین های آن، می توانند تا ۵ برابر (در مورد یون آزاید) فعالیت آنزیم پانکراسی انسان را زیاد کنند اما غلظت اپتیمم آنیون ها در محدوده میلی مولار و مولار بوده است [۱۱]. اثر یون کلراید را احتمالاً مربوط به تأثیر آن روی جایگیری صحیح رزیدوهای کاتالیتیک آنزیم و پایدارسازی منطقه ای از آنزیم که برای فعالیت کاتالیتیک ضروری است، می دانند [۱۱]. بنظر می آید ترکیبات پلی مری که روی آلفا آمیلازهای به دست آمده از منابع گوناگون، اثر پایدار کنندگی دارند، می توانند باعث فعال سازی آنها نیز باشند [۱۳]. بین تریتون X-100، پلی وینیل الکل و پلی اتیلن گلیکول (با توجه به وزنشان)، پلی اتیلن K ۱/۵ بهترین فعال کنندگی (افزایش فعالیت تا ۵۴ درصد) را داشته است و غلظت های استفاده شده این ترکیبات از ۰/۰۲ تا ۰/۰۴ از ترکیب مورد اندازه گیری بوده است. پیشنهاد شده که این ترکیبات پلی مری روی پیشش آنزیم و بهینه سازی این پیشش فعال اثر می گذارند [۱۳]. در مورد ترکیبات پلی مری، اثر مستقل از دوز دیده می شود مثلاً تریتون X-100 در مقدار ۰/۰۲ درصد خود ۴۵ درصد فعالیت را افزایش می دهد در حالی که با مقدار ۰/۰۴ خود، ۴۰ درصد اثر افزایشی دارد. در مورد ترکیبات گرانانتینی موجود در تحقیق حاضر نیز چنین اثر مستقل از غلظتی دیده می شود. همچنین دیده شده که تریتون X-100 می تواند اثر پایدار کنندگی نیز روی PPA داشته باشد، زیرا در رقت ۰/۰۲ درصد خود، بمدت ۲۵۰ دقیقه فعالیت آنزیم را ۱۰۰ درصد نگه می دارد در حالی که بدون حضور تریتون X-100، آنزیم کل فعالیت خود را در ۱۸۰ دقیقه از دست می دهد [۱۳]. مشابه این آزمایش را برای پنتوکسی فیلین روی PPA انجام دادیم، لیکن هیچ اثر پایدار کنندگی روی آنزیم مشاهده نشد (نتایج نشان داده نشده اند). اثر پایدار کنندگی ترکیبات پلی مری مذکور همچنین می تواند مربوط به اثری عمومی تر باشد که بطور متداول برای حفاظت از پروتئین ها (مثل داروهای

تمام تست ها سه بار انجام شد. SD و CV محاسبه شد و نتایجی با $CV \leq 5/5$ (سوپسترای صنایعی) و $CV \leq 6$ (نشاسته) قابل قبول تلقی شده اند.

داکینگ (Docking)

داکینگ با Auto dock vina [۲۰] انجام شد. فایل 2L3L.pdb ابتدا پردازش شد: مولکولهای اضافی همراه آنزیم نظیر حلال حذف شدند و ساختار پروتونه شده برای pH خنثی تنظیم شد. محفظه مکعبی شکلی (Grid box) با ابعاد $68 \times 80 \times 70$ با فضایی ۱ آنگسترومی و مرکز مکعب روی $x = 37/263$ و $y = 31/087$ و $z = 44/144$ تعریف شد. ۱۰۰ جایگیری برای پنتوکسی فیلین، تئوبرمین و کافئین به دست آمد.

یافته ها و بحث

قبلاً از تئوبرمین (مشتق میتیل گزانتین)، اثر فعال کنندگی روی PPA مشاهده کرده بودیم [۱۷]. بر اساس این مشاهدات، اثر تعدادی از مشتقات پورین و گزانتین (۳،۷-دی هیدرو-پورین-۲،۶-دیون) روی فعالیت PPA بررسی شد. اولین سری آزمایش ها با استفاده از سوپسترای صنایعی ۴-نیتروفیل آلفا-دی-مالتوهگزاوزاید انجام شد. هیچ الگوی وابسته به غلظتی دیده نشد، اما در بعضی غلظت های ترکیبات پورینی، اثری ثابت بر شدت فعالسازی دیده شد. در کل نتایج قابل تفسیری دیده نشد. سه غلظت ۴۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از همه لیگاندها انتخاب شدند تا اثر آنها در حضور سوپسترای طبیعی، نشاسته، بررسی شوند. نتایج آن در شکل ۱ نشان داده شده است. در حالی که مشتقات پورینی اثر قابل توجهی نشان ندادند، مشتقات گزانتین، به جز تئوفیلین، اثر فعالسازی قابل توجهی نشان دادند. در غلظت ۱۰۰ میکرومولار پنتوکسی فیلین، فعالیت آنزیم ۳۰ درصد افزایش یافت و میزان فعالسازی در همین غلظت ها برای کافئین و تئوبرمین، به ترتیب ۲۶ و ۲۵ درصد بود. این تغییر رفتار در حضور دو سوپسترای مختلف می تواند مربوط به تفاوت در سایز این دو سوپسترا باشد زیرا آلفا آمیلازها اختصاصیت متفاوتی برای

پروتئینی) در برابر تخریب یا تجمعشان از این اثر استفاده می شود [۲۳].

برای درک چگونگی تعامل ترکیبات گزانتینی با PPA، داکینگ برای تئوبرمین، کافئین و پنتوکسی فیلین انجام شد. با استفاده از روش داکینگ کور، یعنی بدون تعریف محلی خاص برای اتصال لیگاند برای نرم افزار، محل اتصال احتمالی در سطح آنزیم پیدا شد. محل فرضی اتصال لیگاندها در این محل در شکل ۲ نشان داده شده اند. این ناحیه بسیار آب دوست است و تعداد زیادی رزیدوی آرژینین دارد (شکل ۲). ساختارهای گوناگونی از آلفا آمیلاز دارای « نواحی اتصال ثانویه » یا « نواحی اتصال ساکارید » هستند [۲۵،۲۴] که بعضی از آن ها به نظر می آید که در عمل هیدرولیتیک آنزیم نقش داشته باشند [۲۴]. ناحیه ای که با روش داکینگ پیدا کردیم، حداقل در ساختارهای دیگر آنزیم های پانکراسی و بزاقی، جزو این مناطق گزارش شده نبود؛ اما یک ناحیه اتصال مالتوتریوز در ساختار 1E40.pdb [۲۶] گزارش شده است، که با این ناحیه یافت شده قابل تطبیق است. این ساختار یک ساختار کایمری از دو آلفا آمیلاز باسیلوسی است و محل اتصال مالتوتریوز در نزدیکی انتهای آمینی آنزیم مشاهده شده است [۲۶] که در مورد داکینگ انجام شده برای ترکیبات گزانتینی هم صدق می کند.

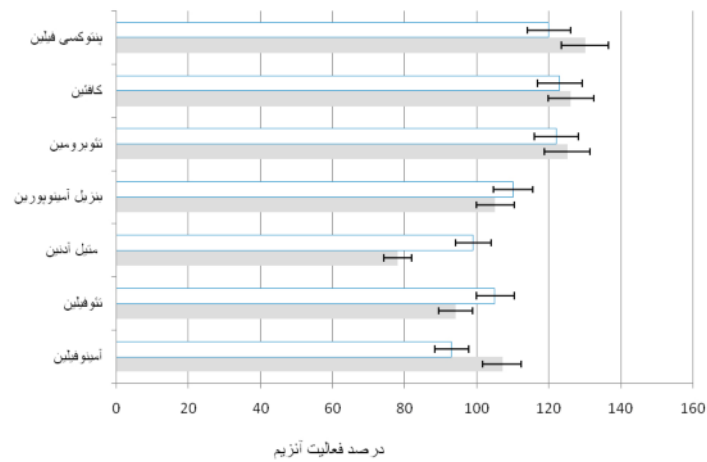
در نتیجه، بر اساس اثر مشاهده شده در حضور سوبسترای طبیعی، به نظر می آید در مقایسه با تئوبرمین و کافئین (که یک گروه میتیل در جایگاه ۱ هسته پورین دارند) زنجیره بلندتر ۵-اکسو-هگزیل پنتوکسی فیلین در همین جایگاه، در ایجاد اثر دیده شده در این آزمایش نقش دارد.

به عبارت دیگر، مشتقات گزانتینی مؤثر، برعکس تئوفیلین، یک گروه میتیل در جایگاه ۷ هسته پورین دارند. بنابراین مطالعات بیشتر روی مشتقات گزانتین با گروه های عاملی روی این دو جایگاه می تواند فعال کننده های بالقوه آنزیم را معرفی کنند.

جالب این که کافئین به عنوان عامل مشخص افزایشنده قند خون شناخته شده است [۲۷]. از طرف دیگر، استفاده از قهوه برای کاهش خطر افزایش قند خون مفید است [۲۹،۲۸]، اما این اثر در هر دو قهوه کافئینه و غیر کافئینه دیده شده و پیشنهاد شده به فاکتوری دیگر جز کافئین [۲۹]، مثلاً کلورژنیک اسید [۳۰] مربوط است. بنابراین، تفاوت بین افزایش قند خون ایجاد شده توسط کافئین و تأثیر مصرف دراز مدت قهوه باید مورد توجه قرار گیرد [۳۱]. گرچه پیشنهاد شده است که اثر افزایش قند خون در کافئین به اثر آن در افزایش مقاومت در برابر انسولین از طریق گیرنده آدنوزین و سازوکارهای فعال کننده آدرنرژیک وابسته است [۳۲]، پیشنهاد می کنیم که خصوصیت فعال کنندگی آلفا آمیلاز دیده شده در اینجا ممکن است در این رابطه نقش داشته باشد. جالب است یادآوری کنیم که کولینرژیک اسید، جزء دیگری از قهوه، که پیشنهاد شده در فرایند کاهش شیوع دیابت مؤثر است، خصوصیت مهارکنندگی آلفا آمیلاز را دارد [۳۳].

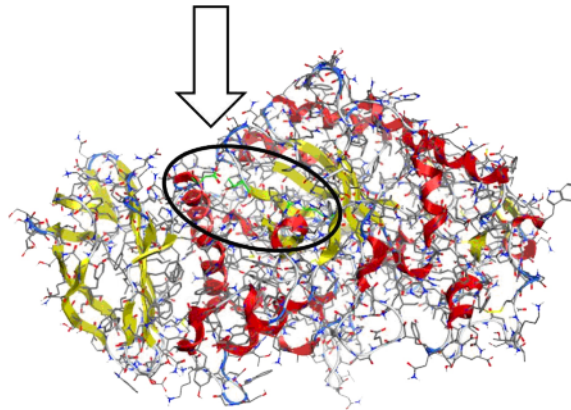
سپاسگزاری

این مطالعه در قالب یک طرح مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

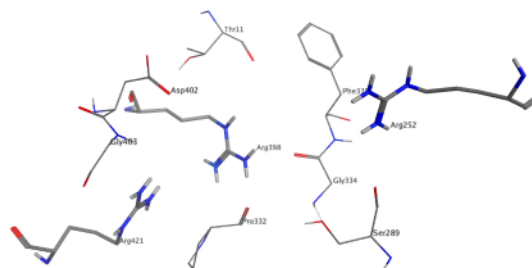


شکل ۱- اثر غلظت های انتخابی (۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول) از مشتقات پورینی روی فعالیت PPA با استفاده از نشاسته. فعالیت باقیمانده به عنوان درصدی از فعالیت نمونه کنترل (بدون ترکیبات مورد نظر با ۱۰۰ درصد فعالیت) محاسبه شد. ستون های سفید مربوط به نتایج حاصل از غلظت ۱۰۰ میکرومول و ستون های خاکستری مربوط به نتایج حاصل از غلظت ۲۰۰ میکرومول می باشد.

الف



ب



شکل ۲- جایگاه احتمالی تنظیم فعالیت در آنزیم آلفا آمیلاز. الف. محل جایگاه در شکلی از ساختار کلی آنزیم. (محیط در برگزیده اسید آمینه های تشکیل دهنده جایگاه با دایره مشخص شده است). ب. اسید آمینه های جایگاه مذکور به صورت جداگانه مشخص شده اند.

مأخذ

- Gottschalk, T. E., Fierobe, H. P., Mirgorodskaya, E., Clarke, A. J., Tull, D., Sigurskjold, B. W., Christensen, T., Payre, N., Frandsen, T. P., Juge, N., McGuire, K. A., Cottaz, S., Roepstorff, P., Driguez, H., Williamson, G., and Svensson, B. Structure, function and protein engineering of starch-degrading enzymes, *Biochemical Society Transactions*. 1998. 26, 198-204.
- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Sierks, M. R., and Svensson, B. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes, *Biochemistry Journal*. 1991. 280 (Pt 1), 51-55.
- MacGregor, E. A., Janecek, S., and Svensson, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes, *Biochimica Biophysica Acta*. 2001, 1546, 1-20.
- Hagenbuchle, O., Bovey, R., and Young, R.A. Tissue-specific expression of mouse alpha-amylase genes: nucleotide sequence of isoenzyme mRNAs from pancreas and salivary gland, *Cell*. 1980. 21, 179-187.
- Qin, X., Ren, L., Yang, X., Bai, F., Wang, L., Geng, P., Bai, G., and Shen, Y. Structures of human pancreatic alpha-amylase in complex with acarviositins: Implications for drug design against type II diabetes, *Journal of Structural Biology* 2011. 174, 196-202.
- Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., and Chou, C. J. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human alpha-amylase, *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008. 51, 3555-3561.
- Rehm, S., Han, S., Hassani, I., Sokocevic, A., Jonker, H. R., Engels, J. W., and Schwalbe, H. The high resolution NMR structure of parvulostat (Z-2685) from *Streptomyces parvulus* FH-1641: comparison with tendamistat from *Streptomyces tendae* 4158, *Chembiochem* 2009.10, 119-127.
- Gu, Y., Hurst, W. J., Stuart, D. A., and Lambert, J. D. Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2011, 59, 5305-5311.
- Najafian, M., Ebrahim-Habibi, A., Hezareh, N., Yaghmaei, P., Parivar, K., and Larijani, B. Trans-chalcone: a novel small molecule inhibitor of mammalian alpha-amylase, *Molecular Biology Reports* 2011. 38, 1617-1620.
- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., and Haser, R. Structural basis of alpha-amylase activation by chloride, *Protein Science* .2002.11, 1435-1441.
- Maurus, R., Begum, A., Kuo, H. H., Racaza, A., Numao, S., Andersen, C., Tams, J. W. Vind, J., Overall, C. M., Withers, S. G., and Brayer, G. D. Structural and mechanistic studies of chloride induced activation of human pancreatic alpha-amylase, *Protein Science* .2005. 14, 743-755.
- Maurus, R., Begum, A., Williams, L. K., Fredriksen, J. R., Zhang, R., Withers, S. G., and Brayer, G. D. Alternative catalytic anions differentially modulate human alpha-amylase activity and specificity, *Biochemistry*. 2008. 47, 3332-3344.
- Yoon, S.H., Robyt, J.F. Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethyleneglycols, and polyvinyl alcohols. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, 37, 556-562.
- Oboh, G., Ademiluyi, A. O., and Faloye, Y. M. Effect of Combination on the Antioxidant and Inhibitory Properties of Tropical Pepper Varieties Against alpha-Amylase and alpha-Glucosidase Activities In Vitro, *Journal of Medicinal Food* 2011.14, 1152-1158.
- Akkarachiyasit, S., Charoenlertkul, P., Yibchok-Anun, S., and Adisakwattana, S. Inhibitory Activities of Cyanidin and Its Glycosides and Synergistic Effect with Acarbose against Intestinal alpha-Glucosidase and Pancreatic alpha-Amylase, *International Journal of Molecular Science* 2010.11, 3387-3396.
- Barrett, M. L., and Udani, J. K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control, *Nutrition Journal* .2011. 10, 24.
- Najafian, M. *Investigation of the effect of several natural compounds on activity of alpha-amylase and level of blood sugar in diabetic rats*. Ph.D. thesis in Biochemistry. 2010. Science and Research Branch, Azad University.
- David, H. Hydrolysis by human alpha-amylase of p-nitrophenyloligosaccharides containing four to seven glucose units, *Clinical Chemistry*. 1982. 28, 1485-1489.
- Bernfeld, P., Alpha- and beta-amylases. *Methods Enzymol* 1955, 1: 149-154.
- Trott, O., and Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 2010.31, 455-461.
- Habibi, A.E., Khajeh, K., and Nemat-Gorgani, M. Chemical modification of lysine residues in *Bacillus licheniformis* alpha-amylase: conversion of an endo- to an exo-type enzyme, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2004.37, 642-647.
- Ishikawa, K., Matsui, I., Honda, K., Kobayashi, S., and Nakatani, H. The pH dependence of the action pattern in porcine pancreatic alpha-amylase-catalyzed reaction for maltooligosaccharide substrates, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1991.289, 124-129.
- Lee, H. J., McAuley, A., Schilke, K. F., and McGuire, J. Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of protein drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011.63, 1160-1171.
- Ragunath, C., Manuel, S. G., Venkataraman, V., Sait, H. B., Kasinathan, C., and Ramasubbu, N. Probing the role of aromatic residues at the secondary saccharide-binding sites of human salivary alpha-amylase in substrate hydrolysis and bacterial binding, *Journal of Molecular Biology*. 2008. 384, 1232-1248.
- Larson, S. B., Day, J. S., and McPherson, A. X-ray crystallographic analyses of pig pancreatic alpha-amylase with limit dextrin, oligosaccharide, and alpha-cyclodextrin, *Biochemistry*. 2010. 49, 3101-3115.
- Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bisgaard-Frantzen, H., Svendsen, A., Borchert, T. V., Dauter, Z., Wilson, K. S., and Davies, G. J. Structural analysis of a chimeric bacterial alpha-amylase. High-resolution analysis of native and

- ligand complexes, *Biochemistry*.2000. 39, 9099-9107.
27. Lane, J. D., Hwang, A. L., Feinglos, M. N., and Surwit, R. S. Exaggeration of postprandial hyperglycemia in patients with type 2 diabetes by administration of caffeine in coffee, *Endocrine Practice* 2007.13, 239-243.
 28. Smith, B., Wingard, D.L., Smith, T. C., Kritiz-Silverstein, D., and Barrett-Connor, E. Does coffee consumption reduce the risk of type 2 diabetes in individuals with impaired glucose?, *Diabetes Care* 2006.29, 2385-2390.
 29. Tunnicliffe, J. M., and Shearer, J. Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators, *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 2008. 33, 1290-1300.
 30. McCarty, M. F. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk, *Medical Hypotheses* 2005.64, 848-853.
 31. Battram, D. S., Arthur, R., Weekes, A., and Graham, T. E. The glucose intolerance induced by caffeinated coffee ingestion is less pronounced than that due to alkaloid caffeine in men, *Journal of Nutrition*.2006. 136, 1276-1280.
 32. Beaudoin, M. S., and Graham, T. E. Methylxanthines and human health: epidemiological and experimental evidence, *Handbook of Experimental Pharmacology* 2011.200, 509-548.
 33. Narita, Y., and Inouye, K. Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas alpha-amylase isozymes I and II, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2009.57, 9218-9225.