

## مهندسی پروتئین آنزیم اندوگلوکاناز قارچی از طریق ایجاد جهش هدفمند به منظور بهبود خصوصیات آنزیمی و بیان آن در مخمر

فرناز نیکزاد جمنانی<sup>۱\*</sup>؛ سید امید رعنائی سیادت<sup>۲</sup>؛ سهراب مرادی<sup>۲</sup>؛ محمدتقی برجیان بروجنی<sup>۲</sup>؛ شیرین یوسفیان<sup>۲</sup>

### چکیده

زمینه: استفاده از سوخت‌های فسیلی باعث افزایش بهای آن و کاهش منابع شده است. لذا منابع تجدیدپذیر انرژی و تولید سوخت‌های زیستی مورد توجه قرار گرفته است. ترکیبات سلولزی از مناسب‌ترین مواد اولیه برای تولید سوخت‌های زیستی می‌باشد. تجزیه سلولز تنها توسط میکروارگانیسم‌هایی که حاوی آنزیم سلولاز هستند، انجام‌پذیر است که مهم‌ترین آن‌ها قارچ *Trichoderma reesei* می‌باشد.

روش‌ها: توالی نوکلئوتیدی آنزیم اندوگلوکاناز II که از کلیدی‌ترین آنزیم‌های این کمپلکس و آغازگر حمله به زنجیره سلولزی است، از روی توالی آمینواسیدی آن در قارچ *T. reesei* براساس ترجیح کدونی میزبان یعنی مخمر پیکیاپاستوریس سنتز شد. به منظور تولید آنزیم‌های بهینه و کاهش زمان تولید و بهای آنزیم از مهندسی پروتئین استفاده می‌شود و از انواع آن ایجاد جهش هدفمند است که در آن جایگزینی آمینواسیدها صورت می‌گیرد. در این تحقیق با کمک روش ایجاد جهش هدفمند، دو جهش در ژن آنزیم اندوگلوکاناز II از طریق PCR ایجاد شد که در آن دو سیستمین آزاد شماره ۱۶۹ و ۳۹۳ به ترتیب به آمینواسیدهای والین و هیستیدین تبدیل شدند. سپس این ژن جهش‌یافته به پلازمیدبیانی *pPinka* وارد و جهت تکثیر به باکتری اشرشیاکلائی و سپس از طریق الکتروپوریشن به مخمر پیکیاپاستوریس منتقل شد.

یافته‌ها: ایجاد دو جهش مذکور بر روی این ژن از طریق تعیین توالی تأیید شد. حضور آنزیم پس از بیان ژن موردنظر در محیط BMMY، با تست دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید و ژل SDS-PAGE اثبات گردید.

نتیجه‌گیری: با بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نشان داده شد که دو جهش ایجادشده به‌طور همزمان در مقایسه با آنزیم فاقد جهش، باعث کاهش قدرت کاتالیتیکی و پایداری حرارتی و افزایش میل ترکیبی آنزیم و سوبسترا شده است.

کلیدواژه‌ها: اندوگلوکاناز، مخمر، مهندسی پروتئین، جهش هدفمند، پایداری حرارتی

«دریافت: ۱۳۹۲/۳/۷ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۲۶»

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۲. گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران

\* عهده‌دار مکاتبات: تهران، ولنجک، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه

Email : Far\_nikjam@yahoo.com

نانوبیوتکنولوژی، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۱۷۸۲

### مقدمه

از ۵۰ سال آینده، جواب‌گوی نیاز انرژی بشر باشد (۱) و (۲). بنابراین به‌کارگیری منابع طبیعی تجدیدپذیر برای انرژی و تولید سوخت‌های زیستی بسیار بااهمیت است و کشورها باید وابستگی خود را به سوخت‌های فسیلی از بین ببرند (۳). از مزایای سوخت‌های زیستی می‌توان به در دسترس بودن، تجدیدپذیر بودن منابع اولیه، کاهش

تامین سوخت و انرژی برای حفظ آرامش هر جامعه‌ای ضروری است. این روزها افزایش استفاده از سوخت‌های فسیلی، کاهش منابع آن و بالا رفتن قیمت‌ها، توجه انسان را به ماهیت محدود منابع فسیلی جلب کرده است. پیش‌بینی می‌شود سوخت‌های فسیلی تنها برای کم‌تر

(۱۰ و ۱۱). از راه کارهای کاهش بهای آنزیم در صنعت، تولید آنزیم بهینه و کوتاه کردن زمان تولید آن به کمک مهندسی پروتئین است. ۳ راه کار عمده شامل تولید سویه‌هایی که آنزیم بیشتری تولید می‌کنند، آنزیم‌هایی که عمر و پایداری بیشتری دارند و آنزیم‌هایی که فعالیت بالاتری داشته باشند برای بهینه‌سازی آنزیم وجود دارد (۱۲). هدف از این تحقیق بهبود خصوصیات آنزیمی آنزیم اندوگلوکاناز II با انجام مهندسی پروتئین و القای دو جهش هدفمند است.

### مواد و روش‌ها

سنتز ژن و انتخاب جهش‌ها: توالی آمینواسیدی<sup>۱</sup> پروتئین اندوگلوکاناز EGII II (در قارچ *T. reesei*) بررسی شد و توالی نوکلئوتیدی آن (ژن)<sup>۲</sup> بر اساس ترجیح کدونی میزبان بیانی یعنی مخمر *Pichia pastoris* طراحی و توسط شرکت Gene Art سنتز و در پلاسمید همسانه‌ساز pMA با طول ۱۱۹۷ bp بین دو جایگاه برشی XhoI و KpnI دریافت شد. این پلاسمید همسانه‌ساز دارای ناحیه مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین می‌باشد. چگونگی ایجاد جهش‌ها: یکی از روش‌های بهبود خصوصیات آنزیمی مهندسی پروتئین است که از انواع آن می‌توان به site-directed-mutagenesis اشاره کرد (۱۲). در این تحقیق دو سیستم آزاد به‌طور همزمان در جایگاه ۱۶۹ و ۳۹۳ با روش ذکرشده، به ترتیب به آمینواسیدهای والین و هیستیدین تبدیل شد. برای هر کدام از جهش‌ها به‌طور جداگانه آغازگر طراحی شد که برای جهش اول کدون TGT (سیستئین) با کدون GTT (والین) و برای جهش دوم کدون TGT (سیستئین) با کدون CAT (هیستیدین) جایگزین شد (جدول ۱).

کشت مایع از استوک *E. coli* DH<sub>5</sub> $\alpha$  حاوی پلاسمید pMA دارای ژن EGII در محیط LB حاوی ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۱ درصد تریپتون و ۱ درصد سدیم کلرید

آلودگی محیط زیست (کاهش گازهای گلخانه‌ای و دفع پسمان‌ها) و ایجاد مشاغل در سطح روستایی اشاره کرد (۴). از مهم‌ترین و مورد توجه‌ترین سوخت‌های زیستی، اتانول زیستی یا بیواتانول (Bioethanol) است. بیواتانول برخلاف سوخت‌های فسیلی، یک سوخت اکسیژنی است که شامل ۳۵ درصد اکسیژن می‌باشد (۵). سوخت‌های زیستی به‌طور مستقیم از محصولات زراعی نظیر قند و نشاسته و یا به‌طور غیرمستقیم از محصولات زیستی نظیر سلولز، همی‌سلولز و لیگنین (توده زیست‌گیاهی) تولید می‌شوند. تبدیل سلولز به اتانول شامل دو فرآیند هیدرولیز سلولز به قندهای قابل تخمیر مثل گلوکز و تخمیر این قندها به اتانول می‌باشد. سلولز که فراوان‌ترین ماده آلی بر روی کره زمین است، از واحدهای ساختمانی گلوکز که به‌وسیله پیوندهای (۴ $\rightarrow$ ۱ $\beta$ ) به هم متصل شده‌اند، ساخته شده‌است (۶). تجزیه سلولز و تبدیل آن به گلوکز تنها توسط میکروارگانیسم‌هایی که حاوی آنزیم سلولاز هستند، انجام‌پذیر است. کمپلکس آنزیمی سلولاز شامل اندوگلوکانازها (Endoglucanase)، اگزوگلوکانازها (Exoglucanase) و  $\beta$ -گلوکوزیدازها ( $\beta$ -Glucosidase) می‌باشد. آنزیم اندوگلوکاناز از کلیدی‌ترین آنزیم‌های این کمپلکس می‌باشد و آغازگر حمله به زنجیره سلولز است که به‌طور تصادفی درون زنجیره را برش می‌دهد و الیگوساکاریدهایی با طول و اندازه متفاوت ایجاد می‌کند، اگزوگلوکانازها از انتهای احیاکننده و غیراحیاکننده الیگوساکاریدها را برش می‌دهند و دی ساکارید سلوبیوز تولید می‌کنند و در نهایت  $\beta$ -گلوکوزیداز سلوبیوز را به گلوکز تجزیه می‌نماید (۷ و ۸). سلولاز توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شود که بیشتر آن از قارچ‌های متعلق به جنس‌های تریکودرما و اسپریژیلوس می‌باشد (۹). قارچ *Trichoderma reesei* سیستم کامل سلولازی را ترشح می‌کند. در حال حاضر به‌نظر می‌رسد که جهش یافته‌های این قارچ بهترین گزینه برای تولید صنعتی سلولاز هستند

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ178347>

2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF340120>

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای جهش‌زایی هدفمند C169V و C393 H

Primer Names	Primer sequences
EGII F-C169V	5'-GTCTTTGGGTGCTTACGTTATCGTTGACATCCACATC-3'
EGII R-C169V	5'-GATGTGGATGTCAACGATAACGTAAGCACCCAAAGAC-3'
EGIIF-C393H	5'-CTTCCTTGGTTTCATCTGTTTGGCAAGAAAGTAGTTG-3'
EGIIR-C393H	5'-CAACTACTTTCTTGCCAAACAGGATGAAACCAAGGAAG-3'

پس از انجام PCR به منظور حذف پلاسمیدهای مادری فاقد جهش از آنزیم برشی Kpn1 استفاده شد. انتقال پلاسمیدهای EGII-2mutations pMA- به درون باکتری: برای تراریزش سلول‌های مستعد *E. coli* DH<sub>5</sub> $\alpha$  از روش شوک حرارتی (Heat shock method) استفاده شد. برای تأیید صحت کلونینگ بروی کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط انتخابی LB+AMP، PCR گذاشته شد (جدول ۴). از کلونی‌هایی که بر روی محیط انتخابی حاوی آمپی‌سیلین رشد کردند و پس از انجام colony PCR تأیید شدند، کشت Master تهیه شد.

هضم آنزیمی دو طرفه پلاسمید pMA جهت جداسازی ژن جهش‌یافته: هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های Kpn I و Xho I که در دو سمت ژن قرار گرفته‌اند، برای تأیید حضور ژن در پلاسمید و همچنین برای جدا کردن ژن از پلاسمید pMA و انتقال آن به پلاسمید بیانی pPink $\alpha$ -HC انجام شد. برش طبق در دمای ۳۷°C به مدت ۹۰ دقیقه انجام گرفت (جدول ۵). سپس ژن EGII دارای دو جهش بوسیله کیت استخراج DNA شرکت Vivantis خالص‌سازی شد.

جدول ۴- برنامه PCR colony ژن EGII

تعداد سیکل‌ها	مرحله PCR	دمای PCR	زمان
۱	دنا تورا سیون اولیه	۹۵ °C	۵ دقیقه
	دنا تورا سیون	۹۵ °C	۳۰ ثانیه
۳۰	اتصال	۶۰ °C	۳۰ ثانیه
	طویل شدن	۷۲ °C	۱ دقیقه
۱	طویل شدن نهایی	۷۲ °C	۲ دقیقه

در شیکرانکوباتور ۳۷°C با دور ۳۰۰RPM تهیه و استخراج پلاسمید از محیط کشت انجام شد (جدول ۲ و ۳). سپس به منظور ایجاد دو جهش ذکر شده، با پرایمرهای C393H F -C393H R و C169V F -C169V R بر روی ژن EGII با طول ۱۱۹۷ bp PCR انجام شد. واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر تهیه شد که شامل ترکیبات زیر بود: بافر Taq پلیمرز ۱x، ۲/۵ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۰/۳ میلی مولار dNTP، ۰/۲۵ یونیت آنزیم Taq پلیمرز، ۲۵ نانوگرم الگو و هر یک از پرایمرها با غلظت نهایی ۰/۳ میکرومولار که با آب مقطر استریل به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد.

جدول ۲- برنامه PCR جهت ایجاد جهش C393H

زمان	دمای PCR	مرحله PCR	تعداد سیکل‌ها
۵ دقیقه	۹۵ °C	دنا تورا سیون اولیه	۱
۳۰ ثانیه	۹۵ °C	دنا تورا سیون	
۳۰ ثانیه	۶۸ °C	اتصال	۳۰
۳ دقیقه	۷۲ °C	طویل شدن	
۱۰ دقیقه	۷۲ °C	طویل شدن نهایی	۱

جدول ۳- برنامه PCR جهت ایجاد جهش C169V

زمان	دمای PCR	مرحله PCR	تعداد سیکل‌ها
۵ دقیقه	۹۵ °C	دنا تورا سیون اولیه	۱
۳۰ ثانیه	۹۵ °C	دنا تورا سیون	
۳۰ ثانیه	۶۵ °C	اتصال	۳۰
۳/۵ دقیقه	۷۲ °C	طویل شدن	
۱۰ دقیقه	۷۲ °C	طویل شدن نهایی	۱

شد. پس از تهیه سلول‌های مستعد مخمر پیکیاپاستوریس (۱۳)، جهت انتقال پلاسمیدهای حاوی ژن دارای دو جهش به درون میزبان نهایی، الکتروپوریشن طبق شرایط  $V: 1800v$ ،  $R: 200\Omega$  و  $C: 25\mu F$  انجام شد. سپس نمونه‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط انتخابی PAD فاقد آدنین به مدت ۱۰-۳ روز درون انکوباتور با دمای  $30^{\circ}C$  قرار داده شدند. از مخمرهای پیکیاپاستوریس استفاده شده استفاده شد که قادر به تولید آدنین نمی‌باشند، بنابراین تنها کلونی‌هایی بر روی این محیط انتخابی رشد می‌کنند که پلاسمید حاوی ژن را دریافت کرده باشند، زیرا پلاسمید pPink $\alpha$ -HC دارای ژن سازنده آدنین نمی‌باشد. جهت تأیید حضور ژن در کلونی‌های مخمری، colony PCR انجام شد (جدول ۴).

رشد و بیان پیکیاپاستوریس در محیط کشت BMMY و BMGY برای بیان دو جهش، در محیط کشت BMMY و BMGY انجام شد. پروتئین EGII درون ژنوم مخمر، لازم است که سلول‌های مخمر، مراحل رشد را در محیط BMGY (حاوی ۱٪ عصاره مخمر، ۲٪ پیتون، ۱٪ گلیسرول و ۱۰۰mM پتاسیم فسفات pH=6) سپری کنند. سلول‌های مخمر پس از سپری کردن فاز رشدی خود، وارد فاز بیانی می‌شوند که در این مرحله سلول‌های مخمر به محیط BMMY (حاوی ۱٪ عصاره مخمر، ۲٪ پیتون و ۱۰۰mM پتاسیم فسفات pH=6) که دارای متانول ۰/۵ درصد می‌باشد، منتقل شدند.

متانول، القاکننده پروموتور بیانی ژن EGII موجود در پلاسمید pPink (پروموتور AOX1) می‌باشد. در تحقیق قبلی در همین آزمایشگاه خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با اضافه کردن برجسب هیستیدین (اضافه کردن ۶ هیستیدین در انتهای ژن) انجام شد.

سنجش بیان خارج سلولی آنزیم نوترکیب اندوگلوکاناز II: سوبسترای مناسب برای فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز A $\alpha$ CMC (کربوکسی متیل سلولز) می‌باشد، پس از مخلوط کردن آنزیم و سوبسترا، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $50^{\circ}C$  قرار داده شد و سنجش فعالیت آن

اتصال (Ligation) ژن EGII دارای دو جهش درون پلاسمید pPink $\alpha$ -HC: برای همسانه‌سازی ژن EGII در پلاسمید pPink $\alpha$ -HC باید ژن و پلاسمید با آنزیم‌های محدودکننده مشابه بریده شوند تا دارای انتهای چسبنده مشابه بوده و اتصال به درستی صورت گیرد. بنابراین پلاسمید بیانی pPink $\alpha$ -HC نیز با استفاده از آنزیم‌های Kpn I و Xho I با همان مقادیر برش داده شد. سپس اتصال ژن با وکتور بیانی پس از گذشت ۵-۴ ساعت در دمای محیط صورت گرفت (جدول ۶) و انتقال پلاسمید pPink حاوی دو جهش، به باکتری جهت کلونینگ انجام شد.

انجام الکتروپوریشن جهت انتقال پلاسمید pPink $\alpha$ -EGII-2Mut به مخمر پیکیاپاستوریس: استخراج پلاسمیدهای pPink $\alpha$ -EGII-2Mut جهت خطی کردن با آنزیم BsptI انجام شد، واکنش خطی کردن شامل ۶۰ میکرولیتر پلاسمید و  $12 U/\mu l$  آنزیم BsptI، بافر ۱x بود. حجم نهایی توسط آب مقطر به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده

جدول ۵- هضم آنزیمی pMA-EGII-2mutations با دو آنزیم KpnI و XhoI به‌طور همزمان

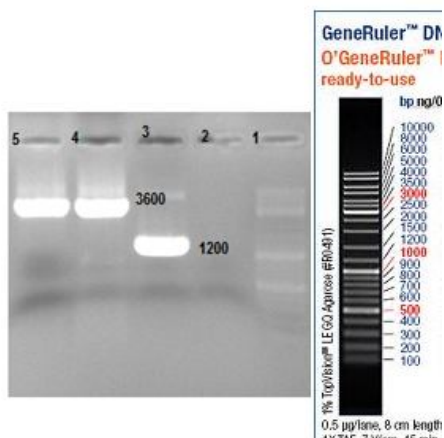
Plasmid	$2\mu l$
KpnI (2500 U/ $\mu l$ )	$0.4\mu l$
XhoI (2500 U/ $\mu l$ )	$0.4\mu l$
BØ L (10X)	$1\mu l$
DDW	$6.2\mu l$
Total	$10\mu l$

جدول ۶- مقادیر لازم برای اتصال ژن EG II دارای دو جهش در درون پلاسمید خطی شده pPink $\alpha$ -HC

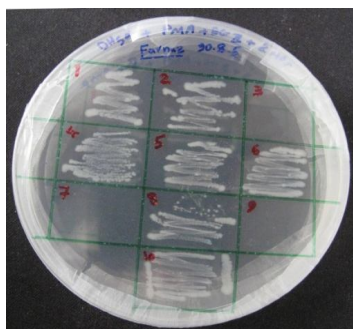
EGII	$9\mu l$
Ppink $\alpha$ -HC	$3\mu l$
BØ (10x)	$2\mu l$
T $_4$ DNA Ligase	$1\mu l$
DDW	$5\mu l$
Total	$20\mu l$

### یافته‌ها

پس از انجام PCR به منظور ایجاد دوجهد بر روی ژن EGII، باندهای موردنظر بر روی ژل آگارز ۱ درصد دیده شد (تصویر ۱) و در نهایت محصول PCR برای تأیید انجام دو جهش به شرکت زیست فرآیند دانش فرستاده شد و این شرکت توالی حاصل ایجاد دو جهش به طور هم‌زمان را تأیید کرد. از کلونی‌های باکتری حاوی pMA-EGII دارای دو جهش کشت master تهیه شد (تصویر ۲). پس از هضم آنزیمی پلاسمید pMA-EGII دارای دو جهش (با طول ۲۴۰۰bp) با آنزیم‌های XhoI و KpnI و جداکردن ژن EGII دارای دوجهدش (باطول ۱۲۰۰bp)، پلاسمید pPinkα-HC نیز با آنزیم‌های محدودکننده مشابه بریده شد، سپس اتصال بین ژن و پلاسمید pPinkα با آنزیم لیگاز صورت گرفت (تصویر ۳ و ۴).



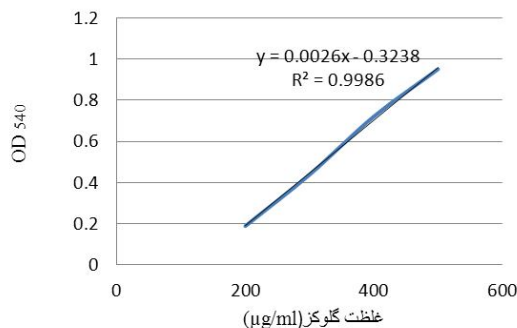
تصویر ۱- ژل آگارز ۱٪، چاهک ۱: DNA Ladder Mix# ۱: چاهک ۲: چاهک ۳: کنترل مثبت، چاهک ۴ و ۵: پلاسمید حاوی ژن جهش یافته ۳۹۳-۱۶۹



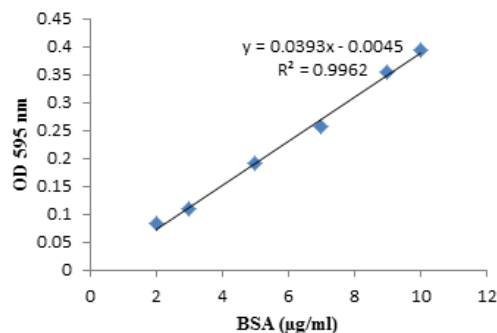
تصویر ۲- رشد باکتری‌های Ecoli.DH5α حامل EGII- pMA- 2mutations در خانه‌های پلیت Master

به کمک تست DNS انجام شد (۱۴). پس از تأثیر آنزیم اندوگلوکاناز بر روی سوبسترا، محلول DNS به پایانه‌های احیاکننده گلوکز متصل می‌شود و رنگ قهوه‌ای ایجاد می‌کند. جهت محاسبه فعالیت ویژه آنزیم، اقدام به رسم نمودارهای استاندارد گلوکز و بردفورد شد (نمودار ۱ و ۲). هر یونیت آنزیم، مقدار آنزیمی است که در مدت زمان یک دقیقه، یک میکرومول سوبسترا را به محصول تبدیل می‌کند و واحد آن  $\mu\text{mol}/\text{min}$  می‌باشد. باتوجه به نمودار غلظت پروتئین بردفورد، واحد میزان پروتئین  $\text{mg}/\text{ml}$  می‌باشد که در نهایت واحد فعالیت ویژه برحسب  $\text{U}/\text{mg}$  به دست آمد.

سنجش خصوصیات بیوشیمیایی: پس از به دست آوردن آنزیم و انجام تست‌های تأییدی بر روی آن، آزمایش‌های متفاوتی در ۴ گروه به منظور پیدا کردن میزان پایداری حرارتی، بهترین فاکتور دمایی، pH و غلظت سوبسترای که در آن آنزیم بیشترین فعالیت را دارا می‌باشد، انجام گرفت.



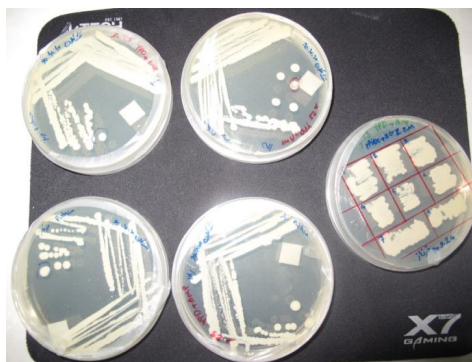
نمودار ۱- نمودار استاندارد گلوکز



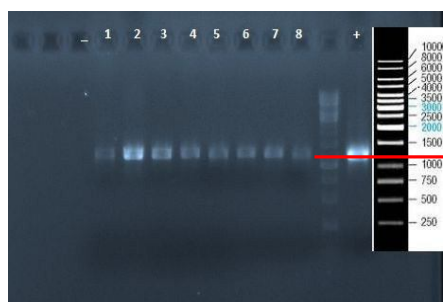
نمودار ۲- نمودار استاندارد بردفورد برای تعیین غلظت پروتئین EGII نوترکیب

از کلونی‌های مخمر نوترکیب، ابتدا به منظور رفع آلودگی کشت تک کلون بر روی پلیت YPD (حاوی ۱٪ عصاره مخمر، ۲٪ پیتون و ۲٪ گلوکز) انجام شد، سپس از تک کلون‌ها کشت master تهیه شد (تصویر ۶).

مشاهده و ظهور تک کلون بر روی محیط انتخابی PAD اطمینان انتقال توالی پلاسمید pPink را به درون ژنوم مخمر می‌دهد ولی نمی‌توان ادعا کرد که ژن‌های EGII دارای دو جهش وارد ژنوم مخمر شده‌اند، لذا برای تأیید کار انجام‌شده colony PCR گذاشته شد. باندهای حاصل از colony PCR با طول ۱۲۰۰ bp بر روی ژل دیده شد که صحت PCR و وجود ژن موردنظر را درون ژنوم مخمر تأیید کرد (تصویر ۷).

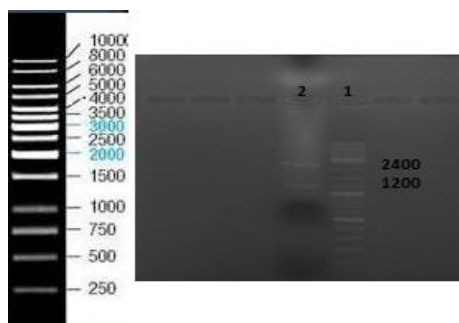


تصویر ۶- کشت تک کلون به منظور رفع آلودگی و تهیه کشت master

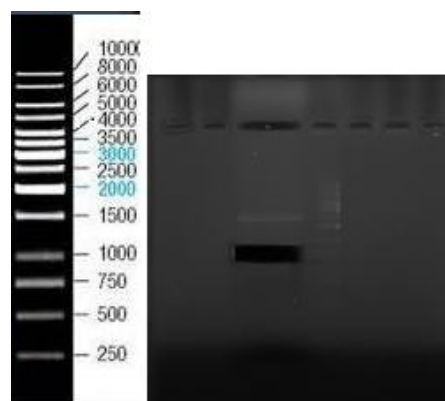


تصویر ۷- محصول colony PCR ژل آگارز ۱٪، نقشه مارکر DNA و چاهک شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸: محصول PCR

سنجش بیان آنزیم نوترکیب اندوگلوکاناز II: پس از رشد (تصویر ۸) و بیان سلول‌های مخمر نوترکیب حاوی ژن EGII در محیط BMMY و BMGY، حضور آنزیم

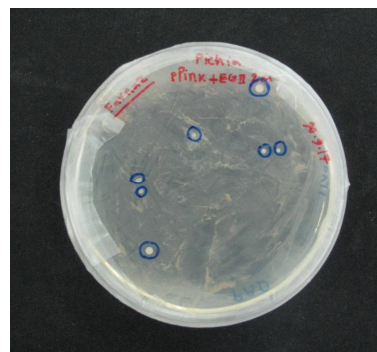


تصویر ۳- ژل آگارز ۱٪، چاهک شماره ۱: نقشه GenRuler#SM0331 DNA Ladder Mix، چاهک شماره ۲: محصول هضم آنزیمی پلاسمید pMA-EGII-2mutations با آنزیم‌های برشی KpnI و XhoI



تصویر ۴- بازیابی ژن EGII از روی ژل آگارز ۱٪ پس از هضم آنزیمی دو طرفه

پس از هضم آنزیمی پلاسمید pPink-EGII دارای دو جهش با آنزیم محدودکننده BspI، پلاسمیدهای حاوی ژن موردنظر خطی شده به درون مخمر از طریق الکتروپوریشن منتقل شدند. ظهور کلونی‌ها ۳-۵ روز پس از فرآیند انتقال بر روی محیط انتخابی PAD (تصویر ۵)، نشانه ورود توالی پلاسمید pPink به درون ژنوم است.



تصویر ۵- رشد کلونی‌های تراریخت شده پیکاپاستوریس بر روی محیط PAD



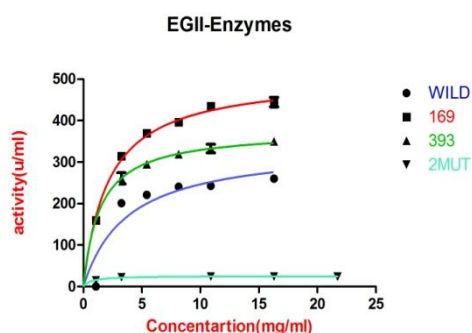
بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم: در نهایت آنزیم اندوگلوکاناز II حاوی دو جهش با آنزیم اندوگلوکاناز II تپ وحشی (فاقد جهش) مقایسه شد. همین‌طور در مقایسه با آنزیم‌های حاوی تک‌جهش C169V و C393H (که در تحقیق قبلی در همین آزمایشگاه تولید شدند) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل در بخش‌های ذیل قابل مشاهده است.

فعالیت ویژه برحسب U/mg در آنزیم EGII فاقد جهش برابر ۲۶۲۰/۹، در آنزیم EGII-C169V برابر ۳۱۱۱/۷، در آنزیم EGII-C393H برابر ۳۱۷۸/۳ و در آنزیم دارای دو جهش برابر ۲۰۴/۹ شد.

فعالیت آنزیم‌ها در غلظت‌های متفاوت سوبسترای بررسی شد (جدول ۷) و نمودار فعالیت آنزیم (میکائیلیس متن) توسط نرم‌افزار Graph Pad Prism رسم گردید (تصویر ۱۱).

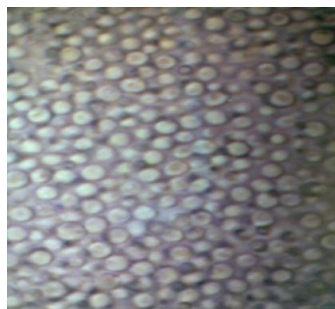
فعالیت آنزیم‌ها در pHهای متفاوت بافری بررسی شد و pH بهینه برای آنزیم‌های فاقد جهش، C169V و C393H برابر ۴/۸ و برای آنزیم دارای دو جهش برابر ۵/۴ به دست آمد.

فعالیت آنزیم در دماهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و دمای بهینه برای آنزیم‌های فاقد جهش، C169V و C393H برابر ۷۵°C و برای آنزیم دارای دو جهش برابر ۶۵°C به دست آمد.

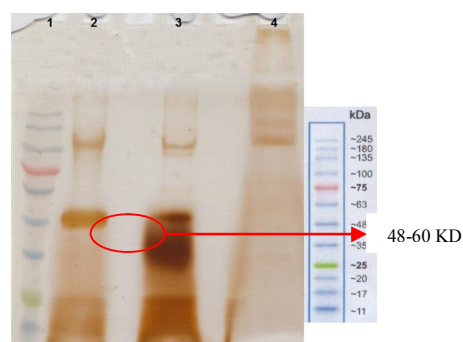


تصویر ۱۱- نمودار بررسی فعالیت ۴ آنزیم اندوگلوکاناز فاقد جهش، تپ دارای دو جهش، C169V و C393H در غلظت‌های متفاوت سوبسترای

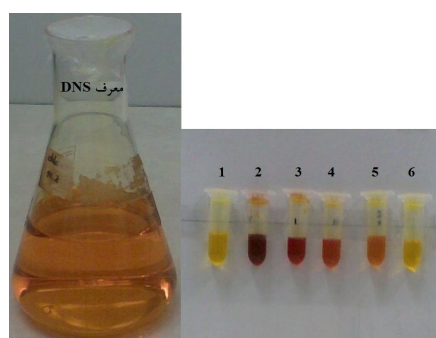
EGII دارای دو جهش توسط باند مشاهده شده (۶۰kD)- (۴۸) بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد SDS-PAGE و همین‌طور تست دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید (DNS) تأیید شد (تصویر ۹ و ۱۰).



تصویر ۸- رشد سلول‌های مخمر حاوی ژن EGII در محیط BMGY



تصویر ۹- حضور باند پروتئین نوترکیب EGII. چاهک اول: مارکر پروتئینی پیش‌رنگ‌آمیزی‌شده، چاهک ۲: آنزیم EGII تپ وحشی، چاهک ۳: آنزیم EGII دارای دو جهش، چاهک ۴: پیکاپاستورس حاوی وکتور pPink- HC فاقد ژن EGII



تصویر ۱۰- انجام واکنش و تغییر رنگ محلول واکنش با کمک معرف DNS. دو نمونه ۱ و ۶ نمونه صفر هستند که رنگ زرد دیده می‌شود، نمونه‌های دیگر معرف انجام واکنش هستند که به رنگ قهوه‌ای و نارنجی دیده می‌شود.

جدول ۷- پارامترهای آنزیمی ۴ آنزیم اندوگلوکاناز و نسبت تغییرات آن‌ها در رابطه با CMC High viscose %۱

$K_{cat}/K_m$ (s.mol.lit) <sup>-1</sup>	$K_{cat}$ (s) <sup>-1</sup>	$K_m$ (mol/lit)	$V_{max}$ (M/s)	Enzymes
۲۸۸/۹۵	۱۲۷۴	۴/۴۰۹	۳۵۴/۸	EGII-wild
۳۴۴/۲۲	۱۰۳۲	۲/۹۹۸	۵۸۴/۳	EGII-C169V
۳۷۵/۵۱	۸۷۱/۲	۲/۳۲۰	۴۱۰/۳	EGII-C393H
۱۲۰/۶۲	۱۷۲/۵	۱/۴۳	۲۷/۵۱	EGII-2mutations

افزایش داد (۲۱). سیستم‌های آزاد در واقع سیستم‌هایی هستند که تنها مانده‌اند، اما این قابلیت را دارند که با سایر سیستم‌های آزاد موجود در همان پروتئین و یا سایر پروتئین‌ها پیوند دی‌سولفیدی برقرار کنند و منجر به از بین رفتن ساختار و عملکرد پروتئین‌ها شوند، بنابراین می‌توانند باعث کاهش فعالیت آنزیم یا پایداری حرارتی شوند (۱۸ و ۱۹).

Radha chauhan در سال ۲۰۰۲ نشان داد که تبدیل سیستم‌های آزاد در موقعیت‌های ۶۱ و ۱۷۴ موجود در آنزیم آلکالان فسفاتاز میکوباکتریال به آلانین باعث افزایش فعالیت آنزیم، اما تغییر سیستم آزاد موجود در موقعیت ۱۷۶ به آلانین، منجر به کاهش خاصیت کاتالیتیکی آنزیم می‌شود (۲۲).

Didier Fournier و همکاران در سال ۲۰۰۲ با تغییر یک سیستم آزاد در موقعیت ۲۹۰ به والین در آنزیم استیل کولین استراز دروزوفیلا، منجر به افزایش پایداری آنزیم در برابر عوامل دنا توره‌کننده مانند حرارت و اوره به ۲/۷ برابر میزان اولیه شدند (۲۳).

Vinh tran و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی آنزیم  $\beta$ -گالاکتوزیداز، آلانین ۲۲۱ را به تریپتوفان تغییر دادند که منجر به افزایش  $K_m$  و کاهش میل اتصال آنزیم به سوبسترا گردید (۲۴).

Helderman و همکاران نشان دادند که تبدیل سه سیستم آزاد محافظت‌شده در جایگاه فعال آنزیم هیالورونات سنتاز به سرین و آلانین تأثیری بر فعالیت آنزیم ندارد (۲۵).

میزان پایداری حرارتی و نیمه عمر آنزیم‌ها بررسی شد و نیمه عمر آنزیم‌های فاقد جهش، دارای دو جهش، C169V و C393H در دمای ۷۰°C به ترتیب ۳۴/۳۵، ۱۳/۴، ۱۸/۷۳ و ۶۱/۶۵ دقیقه بود.

### بحث

دو جنبه مهم کار در این تحقیق، انتخاب آنزیم سلولاز و نیز میزان بیانی مناسب برای فرایندهای صنعتی بود. تاکنون میزان‌های بیانی مختلفی برای تولید صنعتی آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند که مهم‌ترین آن‌ها مخمرها هستند. مخمر *Pichia pastoris* به علت قدرت تکثیر بالا و نیز توانایی فوق‌العاده در ترشح پروتئین‌های خارج سلولی انتخاب شد (۱۵).

همین‌طور آنزیم سلولاز قارچ *T.reesei* انتخاب گردید، زیرا این آنزیم، قدرت کاتالیزوری ذاتی بالایی دارد که آن را از سایرین متمایز می‌کند. علی‌رغم وجود ویژگی‌های مناسب در این آنزیم، می‌توان با کمک تکنیک‌های مهندسی پروتئین، آنزیمی بهتر با قابلیت‌های صنعتی بالاتری نظیر مقاومت حرارتی بالا و فعالیت بیشتر تولید کرد (۱۶). در طی این تحقیق دو سیستم آزاد در جایگاه‌های ۱۶۹ و ۳۹۳ به‌طور همزمان به دو آمینواسید والین و هیستیدین تبدیل شدند و در واقع آنزیمی دارای دو جهش تولید شد. تحقیقات زیادی نشان داده است که سیستم‌های آزاد موجب کاهش پایداری حرارتی می‌شوند (۲۰-۱۷). Jihun Lee و Michael Blaber در سال ۲۰۰۹ نشان دادند با حذف سیستم‌های آزاد در فاکتور رشد فیروپلاست می‌توان پایداری حرارتی آن را



## نتیجه گیری

۷۵°C می‌باشند، در حالی که آنزیم دارای دو جهش دارای pH و دمای بهینه ۵/۴ و ۶۵°C بود. همین‌طور جهش‌های تکی باعث افزایش فعالیت آنزیم، افزایش پایداری حرارتی، افزایش سرعت حداکثر و افزایش میل ترکیبی آنزیم و سوبسترا شد. اعمال دو جهش به‌طور همزمان باعث کاهش فعالیت آنزیم، کاهش پایداری حرارتی و کاهش سرعت حداکثر شد، ولی میل ترکیبی آنزیم و سوبسترا را نسبت به آنزیم‌های دارای تک‌جهش و فاقد جهش افزایش داد.

## تشکر و قدردانی

تمامی مراحل این تحقیق در آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده‌ی مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهیدبهشتی و تحت حمایت مالی این آزمایشگاه به انجام رسیده است.

در این تحقیق دو جهش ذکر شده در آنزیم اندوگلوکاناز II فارچ T.reesei به‌طور همزمان ایجاد شد. سپس آنزیم دارای دو جهش و آنزیم تیپ وحشی یعنی بدون جهش در مخمر *Pichia pastoris* بیان شدند. در نهایت، ویژگی‌های بیوشیمیایی ۴ آنزیم تیپ وحشی (EGII-Wild)، دارای دو جهش ذکر شده (EGII-2mutations)، همچنین دو آنزیم دارای تک‌جهش C۱۶۹۷ (EGII-169) و C۳۹۳H (EGII-393) که در تحقیق قبلی در همین آزمایشگاه بیان شدند، مورد سنجش قرار گرفت. بررسی‌ها بر روی سوبسترای کربوکسی متیل سلولز ۱٪ انجام شد و آنزیم بدون جهش به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. ایجاد جهش‌های تکی، تغییری در میزان pH و دمای بهینه به‌وجود نیاورد و هر ۳ آنزیم فاقد جهش و جهش‌های تکی دارای pH و دمای بهینه به‌ترتیب ۴/۸ و

## References

- Demirbas A. Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2007;33:1-18
- Sims RE. A response to climate change Renewable energy. *Solar Energy*. 2004;76: 9-17.
- Gernot J, Zhuojun Wu, Kerstin G, Philip E, Tobias K, Roberto R, et al. Practical screening of purified cellobiohydrolases. *Biotechnol Biofuels*. 2010;3:18.
- Campo D, Algeria M, Echeverria I. Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2006;24:214-21.
- Mojovic L, Nikolic S, Rakin M, Vukasinovic M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*. 2006;85:1750-5.
- Miyamoto K. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. Japan: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1997; 128.
- Zhang YH, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*. 2004;88(7):797-824.
- Zakharenko AM, Kusaikin MI, Li BM, Huen FV, Khan HH, Sova VV, et al. [Catalytic properties of endo-1,3-beta-D-glucanase from the Vietnamese edible mussel *Perna viridis* (Russian)]. *Bioorg Khim*. 2009;35(1):62-9.
- Lavigne JA, Hill C, Tremblay A, St-Pierre P, Tomashek JT. Cellulase variants with reduced inhibition by glucose. US application patents, Iogen Energy Corporation. 2011.
- Durand H, Clanet M, Tiraby G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large-scale cellulase production. *Enzyme Microb Tech*. 1988;10(6):341-6.
- Medve J, Karlsson J, Lee D, Tjerneld F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnol Bioeng*. 2007;59(5):621-34
- Li F, Mullins JI. Site-directed mutagenesis facilitated by DpnI selection on hemimethylated DNA. *Methods Mol Biol*. 2002;182:19-27.
- Lin-Cereghino J, Wong WW, Xiong S, Giang W, Luong LT, Vu J, et al. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques*. 2005;38(1):44, 46, 48.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426-8.
- Brierley RA, Davis RG, Martin AG, Holtz CG. Production of insulin-like growth factor-I in methylotrophic yeast cells. US application Patents. 1994;5:324,639.

16. Vitikainen M, Arvas M, Pakula T, Oja M, Penttilä M, Saloheimo M. Array comparative genomic hybridization analysis of *Trichoderma reesei* strains with enhanced cellulase production properties. *BMC Genomics*. 2010;11:441.
17. Lee J, Blaber M. The interaction between thermodynamic stability and buried free cysteines in regulating the functional half-life of fibroblast growth factor-1. *J Mol Biol*. 2009;393(1):113-27.
18. Petersen MT, Jonson PH, Petersen SB. Amino acid neighbours and detailed conformational analysis of cysteines in proteins. *Protein Eng*. 1999;12(7):535-48.
19. Fremaux I, Mazères S, Brisson-Lougarre A, Arnaud M, Ladurantie C, Fournier D. Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem*. 2002;3:21.
20. Ortega S, Schaeffer MT, Soderman D, DiSalvo J, Linemeyer DL, Gimenez-Gallego G, et al. Conversion of cysteine to serine residues alters the activity, stability, and heparin dependence of acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*. 1991;266(9):5842-6.
21. Lee J, Blaber M. Structural basis of conserved cysteine in the fibroblast growth factor family: evidence for a vestigial half-cystine. *J Mol Biol*. 2009 Oct 16;393(1):128-39.
22. Chauhan R, Mande SC. Site-directed mutagenesis reveals a novel catalytic mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* alkylhydroperoxidase C. *Biochem J*. 2002;367(Pt 1):255-61.
23. Fremaux I, Mazères S, Brisson-Lougarre A, Arnaud M, Ladurantie C, Fournier D. Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem*. 2002;3:21.
24. Tran V, Hoffmann L, Rabiller C, Tellier C, Dion M. Rational design of a GH1 beta-glycosidase to prevent self-condensation during the transglycosylation reaction. *Protein Eng Des Sel*. 2010;23(1):43-9.
25. Heldermon CD, Tlapak-Simmons VL, Baggenstoss BA, Weigel PH. Site-directed mutation of conserved cysteine residues does not inactivate the *Streptococcus pyogenes* hyaluronan synthase. *Glycobiology*. 2001;11(12):1017-24.