مقاله پژوهشی

افزایش ویژگی‌های عملیاتی آنزیم اندوگلوکاناز از طریق تغییر اسیدآمینه‌ای

نوید پورزردشت*[۱]، بهرام یغمایی[۲]،علی اکبرزاده[۳]

تاریخ دریافت 1392/06/16 تاریخ پذیرش 1392/08/25

چکیده

پیش زمینه و هدف: اقتصادی‌ترین نوع اتانول تولیدی بیواتانول می‌باشد که از مواد گیاهی سلولزی که ارزان قیمت و تجدیدپذیر هستند تهیه می‌گردد. در طی این روند ژن سلولاز در اختیار مخمر قرار می‌گیرد و توسط آن به خارج از محیط سلول ترشح می‌گردد سپس بافت‌های سلولزی توسط این آنزیم به گلوکز تجزیه می‌شوند و توسط مخمر تخمیر شده و تولید اتانول می‌کنند. هدف این مطالعه این است که با استفاده از فن جهش‌زایی هدفمند جهشی در ژن آنـزیم سـلولاز اعمال شود به طوری که آنزیم جدید نسبت به آنزیم اصلی قابلیت‌های صنعتی بالاتری داشته باشد.

مواد و روش‌ها: برای این منظور ژن آنزیم مذکور با ترجیح کدونی مخمر طراحی و در داخل پلاسمید کلونینگ قرار گرفت. سپس توسط فن جهش‌زایی هدفمند جهشی در ژن اعمال گردید و سپس ژن موجود در پلاسمید برای تکثیر به داخل باکتری کلون شد، بعد از استخراج پلاسمید با استفاده از آنـزیم‌هـای محـدود کننده ژن از پلاسمید کلونینگ جدا و به پلاسمید بیانی متصل گردید در مرحله بعد با کمک الکتروپوریشن به داخل مخمـر انتقـال پیـدا کـرد و بعـد از بیـان پروتئین مورد نظر توسط مخمر خصوصیات آنزیمی از جمله pH و دمای اپتیمم، ثابت ویژگی و مقاومت حرارتی آن‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: جهش اعمال شده تأثیری بر روی دما و pH اپتیمم نداشته ولی باعث بهبود ثابت ویژگی و مقاومت حرارتی آنزیم گردید.

بحث و نتیجه گیری: بهبود دو ویژگی عملیاتی آنزیم در کنار ثابت بودن سایر خصوصیات آن منجر به تولید آنزیم جدیدی شده است که قابلیت بیشتری برای تولید محصول دارد و در نهایت می‌تواند منجر به بهبود تولید اتانل در مقیاس صنعتی گردد.

کلمات کلیدی: جهش‌زایی هدفمند، کلونینگ، بیواتانل، بیوتکنولوژی آنزیمی، مهندسی پروتئین

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دهم، ص ۸۳۸-۸۳۱، دی ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: : ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، تلفن: ۰۹۱۱۳۳۷۷۵۳۳

Email: pourzardosht@yahoo.com

مقدمه

زیست توده‌های سلولزی می‌توانند در تولید اتانول از طریق تخمیر مورد استفاده قرار بگیرند. اتانولی که از این روش تهیه می‌گردد سوخت منحصر به فردی است که از جنبه زیست محیطی و اقتصادی بسیار مفید می‌باشد(۱). این نوع اتانول که بیواتانول نامیده می‌شود از منابع مختلفی از جمله ضایعات کشاورزی، علف‌ها (۲)، چوب، کاغذ (۱, ۳)، علوفه غلات، کاه گندم(۴) تهیه گردند. کلیه این مواد ارزان قیمت و به میزان زیاد در دسترس هستند و به عنوان یک منبع انرژی تجدیدپذیر شناخت می‌شوند(۵-۶). در طی این فرایند گلوکز که از طریق تجزیه سلولز به وجود می‌آید در طی فرایندهای تخمیری به اتانول تبدیل می‌شوند.

یکی از مهم‌ترین دلایل پراکندگی دی اکسید کربن و سایر گازهای گلخانه‌ای در اتمسفر، استفاده از سوخت‌های فسیلی می‌باشد که منجر به تغییرات اساسی در وضعیت آب و هوای جهانی شده است(۳). علاوه بر آن سوخت‌های فسیلی دائمی نمی‌باشند و قابلیت تجدیدپذیری ندارند و بنابراین دسترسی به یک منبع جدید انرژی که از لحاظ حفظ محیط زیست و اقتصاد به مناسب باشد ضروری می‌باشد(۳, ۷).

---

[۱] کارشناسی ارشد، دانشجوی دکترای بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (نویسنده مسئول)

[۲] استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

[۳] دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

www.SID.ir

اتانول سوخت بسیار مؤثری می‌باشد زیرا که عدد اکتان و نیز دمای تبخیر بالایی دارد که منجر شده است به عنوان یک سوخت خالص مناسب‌تر از بنزین در نظر گرفته شود. تبخیر پذیری اتانول کمتر از بنزین است و نسبت به آن واکنش‌های فیتو شیمیایی کمتری را در اتمسفر منجر می‌شود. همچنین اتانول خالص دود زایی کمتری نسبت به بنزین دارد. برای کاهش مصرف بنزین و بهبود عدد اکتان و افزایش قدرت سوخت آن می‌توان اتانول را با آن و سایر سوخت‌ها مخلوط کرد(۳). همچنین سمیت اتانول در مقایسه با سایر سوخت‌ها بسیار کمتر می‌باشد و قابلیت انحلال در آب دارد(۳-۴, ۸).

سلولاز اصلی‌ترین پلی ساکارید در گیاهان محسوب می‌شود و به طور طبیعی قابلیت تجزیه‌پذیری دارد (۹). سلولز یک ماتریکس کریستالی است که از اجزای گلوکز با اتصالات بتا(۴-۱) تشکیل شده است(۱۰) و دارای وزن مولکولی بالایی می‌باشد(۱۱).

آنزیم‌های سلولازی انواع گلیکوزیل هیدرولازهایی هستند که پیوندهای بتا(۴-۱) را در سلولاز تجزیه می‌کنند. آنزیم سلولاز که بافت‌های سلولزی را به گلوکز تجزیه می‌کند در حقیقت یک کمپلکس آنزیمی می‌باشد و خود از ۳ آنزیم تشکیل شده است: (۱)اندوگلوکاناز که به صورت تصادفی رشته‌های سلولزی را از وسط تجزیه می‌کند،(۲)اگزوگلوکوزیداز که رشته‌های سلولزی را از طرفین برش می‌زند و (۳) بتا گالاکتوزیداز که واحدهای دی‌ساکاریدی باقی مانده را تجزیه کرده و تولید گلوکز می‌کند (۱۲-۱۴).

علاوه بر کاربرد سلولاز در فرایندهای بیوانرژی این آنزیم قابلیت‌های دیگری در صنایع نساجی، صنایع غذایی، صنایع کاغذ سازی(۹) و ساخت پودرهای لباس شویی دارد. (۱۵-۱۶).

موجودات مختلفی توانایی تولید آنزیم‌های سلولزی را دارند از جمله باکتری‌ها، گیاهان، پروتیست‌ها و حتی نماتدها و حشرات (۱۷). قارچ‌های رشته‌ای خصوصاً قارچ تریکودرما ریسئی به دلیل تولید آنزیم‌های سلولازی با قدرت کاتالیتیکی بالا بسیار مورد توجه هستند (۱۸).

بیان پروتئین‌های نوترکیب در میزبان‌های مختلف متفاوت و پیچیده می‌باشد و تحت تأثیر تغییرات پس از ترجمه قرار می‌گیرد. گلیکوزیلاسیون یکی از تغییرات پس از ترجمه مهم می‌باشد که ویژگی‌های آنزیم‌های صنعتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در میزبان‌های مختلف متفاوت می‌باشد(۱۹). پیکیا پاستوریز یکی از انواع این میزبان‌ها می‌باشد، این میکرو ارگانیسم نوعی مخمر میتیلوتروف است و قابلیت بالایی در بیان پروتئین‌های نو ترکیب دارد و از جمله ویژگی‌های آن عبارتند از: قدرت ترشحی بالا، تغییرات پس از ترجمه مربوط به سلول‌های یوکاریوتی و نیز راحتی دست‌ورزی ژنتیکی. سیستم بیان مخمر پیکیا پاستوریز بر اساس پروموتر (AOX1) می‌باشد و متانول عامل القا گر این پروموتر می‌باشد(۱۷). پیکیا پاستوریز در اکثر موارد تأثیر خوبی بر روی پروتئین نوترکیب دارد برای مثال آنزیم فسفاتاز بیان شده در این مخمر قدرت کاتالیتیکی و مقاومت حرارتی بالاتری نسبت به نوع اصلی نشان داده است(۱۶).

بسیاری از مطالعات انجام شده در رابطه با سوخت‌های زیستی بر روی مسئله قیمت آنزیم‌های تولیدی و عملکرد آن‌ها متمرکز می‌شود. در حقیقت قیمت آنزیم‌ها در این فرایند سد اقتصادی برای تولید سوخت مایع محسوب می‌شود(۱۹-۲۰). به همین منظور اخیراً با استفاده از فن‌های مهندسی پروتئین آنزیم‌های سلولازی قارچ تریکودرماریسئی برای بهبود قابلیت‌هایشان مورد دست‌ورزی قرار گرفته‌اند تا آنزیم‌های حاصله با توانایی‌های بالاتر هزینه‌های مربوطه را کاهش دهند (۱۷).

امروزه جایگزین کردن سیستئین‌های آزاد با اسیدهای آمینه مناسب با استفاده از جهش‌زایی هدفمند بسیار مورد توجه می‌باشند(۲۱).

در این مطالعه جهشی بر روی ژن آنزیم اندوگلوکاناز II قارچ تریکودرما ریسئی که با ترجیح کدونی مخمر پیکیا پاستوریز طراحی شده است اعمال می‌شود. در طی این تغییر سیستئین آزاد در موقعیت ۱۶۹ پروتئین که از لحاظ ساختاری در وسط پروتئین قرار دارد به منظور بهبود ویژگی‌های آنزیمی به اسید آمینه والین با استفاده از جهش‌زایی هدفمند تغییر داده می‌شود. سپس ژن‌ها در داخل مخمر پیکیا پاستوریز بیان و بعد از آن خصوصیات آنزیم‌های بیان شده از لحاظ ویژگی‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها

ابتدا ژن آنزیم اندوگلوکاناز II (EGII) قارچ تریودرما ریسئی (۱۲۰۰bp) با ترجیح کدونی مخمر پیکیا پاستوریز تهیه گردید و در داخل پلاسمید PMA(۲۴۰۰bp) به عنوان پلاسمید کلونینگ قرار گرفت این پلاسمید دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است و در دو طرف جای گیری ژن در خود دارای جایگاه برش برای آنزیم‌های محدود کننده KpnI و XhoI می‌باشد.

برای اعمال جهش به‌وسیله جهش‌زایی هدفمند ابتدا پرایمرهایی تهیه گردید که در داخل خود به جای کدون سیستئین (TGT) کدون والین (CAT) داشته باشد (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره (۱): توالی پرایمرهای حاوی جهش مورد نظر

توالی پرایمرها	پرایمرها
5’-GTCTTTGGGTGCTTACGTTATCGTTGACATCCACAAC-3’	EGIIF-C190V
5’-GTTGTGGATGTCAACGATAACGTAAGCACCCAAAGAC-3’	EGIIF-C190V

سپس واکنش PCR با آنزیم DNAپلیمراز MaxTaq طبق شرایط زیر برقرار شد:

مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ قرار گرفتند و سپس برای ۲۰ سیکل در چرخه دمایی واکنش (۹۵ درجه ۳۰ ثانیه، ۶۸ درجه ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه) قرار گرفتند.

برای بررسی انجام واکنش ۲ ماکرو لیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱درصد منتقل شد و باند مورد نظر مشاهده گردید. سپس برای از بین بردن ژن‌های اولیه که فاقد جهش مورد نظر هستند محصول PCR به مدت یک ساعت و در دمای ۳۷ درجه با آنزیم DpnI انکوبه شد. برای تائید حضور جهش‌های مورد نظر در داخل ژن EGII ، ژن مورد توالی یابی قرار گرفت و نتایج آن صحت وجود جهش در ژن را تائید کرد.

برای تکثیر و تمایز، پلاسمید حاوی ژن جهش یافته به داخل باکتری Ecoli.DH5α انتقال پیدا کرد و سپس باکتری‌ها بر روی محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین برده شد و بعد از یک دوره شبانه از بین باکتری‌هایی که بر روی محیط کشت رشد یافته بودند برای تائید حضور ژن در داخلشان کلونی PCRگذاشته شد و سپس از کلونی‌هایی که وجود ژن در آن‌ها مورد تائید قرار گرفته بود کشت مایع تهیه گردید و از روی آن‌ها استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی صورت گرفت سپس در مرحله بعدی ژن با دو آنزیم KpnI و XhoI از پلاسمید کلونینگ خارج گردید و بعد از آن با ژن مورد نظر از داخل ژن تلخیص گردیدند. همچنین پلاسمید بیانی یعنی pPINK هم توسط دو آنزیم KpnI و XhoI برش خورده شد و بعد از الوت شدن همراه با ژن EGII-C169V بر روی یک ژل آگارز منتقل شدند از روی مقایسه شدت شفافیت آن‌ها به نسبت ۳ به ۱ ژن به پلاسمید به یکدیگر متصل شدند. سپس به منظور تکثیر ppink-EGII-C169V به داخل باکتری Ecoli.DH5α انتقال پیدا کرد و بر روی محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین منتقل شدند. سپس برای تائید حضور ژن در باکتری کلونی PCRگذاشته شد که در مرحله بعد از کلونی‌هایی که باند مشخصی داشتند استخراج پلاسمید صورت گرفت. از آنجایی که ژن انتقال یافته به داخل مخمر باید به روش همولوگوس ریکامبینیشن وارد ژنوم مخمر گردند ابتدا پلاسمید pPINK-EGII-C169V با کمک آنزیم BsptI خطی شده سپس با کمک الکتروپوریشن به داخل مخمر انتقال پیدا کرد. سپس مخمرهای ترانسفکت شده بر روی محیط کشت انتخابی PAD که فاقد آدنین می‌باشد منتقل شدند. بعد از رشد مخمرها بر روی این محیط کشت به منظور تائید حضور ژن در آن‌ها استخراج پلاسمید از آن‌ها کلونی PCRصورت گرفت و بر روی ژل آگارز برده شدند که نتیجه وجود آن را تائید کرد.

بیان:

به منظور بیان ژن مورد نظر در مخمر پیکیا پاستوریز ابتدا مخمرها به محیط کشت بی‌ام جی وای و سپس بی‌ام ام وای منتقل شدند. به منظور تائید وجود پروتئین در محیط، سوپرناتنت مخمرها با استفاده از الکتروفورز عمودی بررسی شدند که حضور باند مورد نظر بیانگر بیان پروتئین مورد نظر بود.

بررسی فعالیت آنزیمی:

برای بررسی فعالیت آنزیمی از سوبسترای اختصاصی یعنی سی‌ام سی پر چگال و سوبسترای فرعی سی‌ام سی کم چگال و آویسل با استفاده از روش‌های استاندارد استفاده گردد.

PH و دمای بهینه:

برای تعیین pH بهینه آنزیم‌ها هم نوع وحشی و هم نوع جهش یافته با استفاده از روش استاندارد سی‌ام سی در دمای ۵۰ درجه و در pH های ۳ الی ۷ قرار گرفتند. همچنین برای تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیمی، آنزیم‌ها در۴/۸ =PH در برابر دماهای ۵۰ تا ۸۰ قرار گرفتند.

کنتیک آنزیمی:

پارامترهای کنتیک در دمای ۵۰ درجه و با استفاده از بافر سیترات ۵۰ میلی مولار مورد بررسی قرار گرفتند نمودار میکائیلیس منتن با استفاده از نرم افزار گراف پد پریسم ۵ در غلظت‌های مختلف از سوبستراهای مختلف رسم گردید و پارامترهای V_{max} و K_m از این نمودارها استخراج گردید. همچنین پارامتر ثابت ویژگی (kcat/km) که نشان دهنده قدرت کاتالیتیکی آنزیم‌ها می‌باشد با استفاده از این پارامترها محاسبه گردید.

مقاومت حرارتی:

برای تعیین میزان پایداری آنزیم‌های وحشی و جهش یافته در برابر حرارت و نیز مقایسه آن‌ها با یکدیگر، آنزیم‌ها در دماهای ۷۰ و ۸۰ درجه قرار گرفتند و در زمان‌های مشخصی از آن‌ها نمونه برداری شد و به سوبسترا افزوده شد و سپس مخلوط واکنش در شرایط استاندارد قرار داده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌ها

الگوی پاسخ به تغییرات دما و pH

هر دو آنزیم وحشی و جهش یافته بیشترین فعالیت خود را در PH ۴/۸ نشان دادند(شکل ۱و۲) و همچنین بهینه دمای فعالیت آنزیم‌ها در دمای ۷۵ درجه بوده است (شکل ۳و۴).

کنتیک آنزیمی:

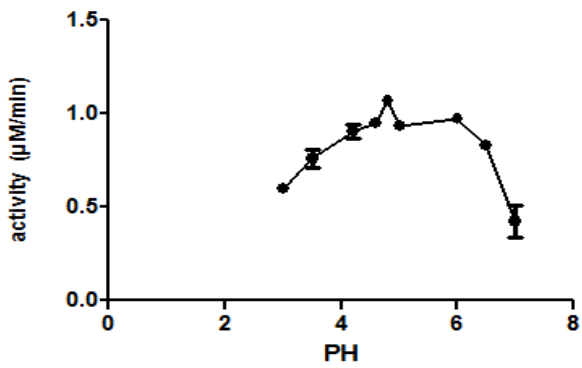
با استفاده از سه سوبسترای سی‌ام سی پر چگال و سی‌ام سی کم چگال و آویسل پارامترهای کنتیکی هر دو آنزیم نوترکیب یعنی K_m و V_{max} بررسی گردید که در جدول (۲و۳) ذکر شده است. همان‌طور که از جداول مشخص است k_m آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم اصلی با استفاده از تمام سوبستراها بجز سی‌ام سی کم چگال کاهش نشان می‌دهد و همچنین V_{max} برای تمام سوبستراها برای آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم اولیه افزایش یافته است.

ثابت ویژگی:

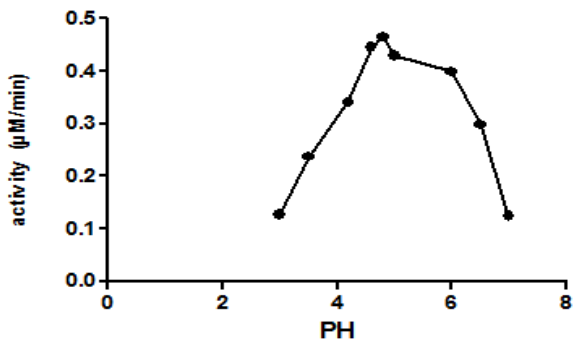
k_m و V_{max} هیچ‌کدام به تنهایی ملاکی از قدرت کاتالیتیکی نیستند. زیرا آنزیمی قدرت کاتالیتیکی بیشتری دارد که هم دارای k_m و هم V_{max} مناسبی باشد (k_m کمتر و V_{max} بیشتر) بنابر پارامتر جدیدی تعریف می‌شود به نام ثابت ویژگی که هر دو فاکتور k_m و V_{max} را در خود در بر می‌گیرد و به صورت نسبت K_{cat} (نسبت V_{max} به کل آنزیم موجود در واکنش) به k_m تعریف می‌شود داده‌های مربوط به این پارامتر در جدول (۴) ذکر شده است.

مقاومت حرارتی:

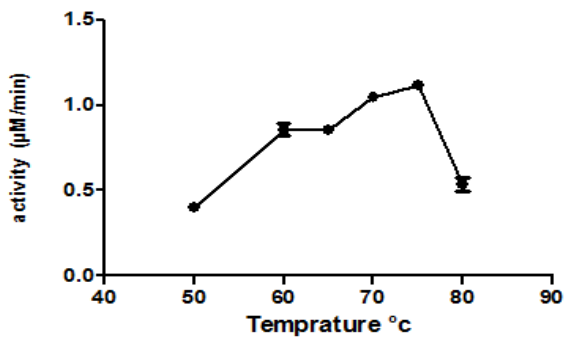
مقاومت حرارتی آنزیم‌ها در دو دمای ۷۰ و ۸۰ درجه مورد بررسی قرار گرفت و نیمه عمر آن‌ها در این دماها با استفاده از نرم افزار بدست آمد که در جدول ذیل ذکر شده است.



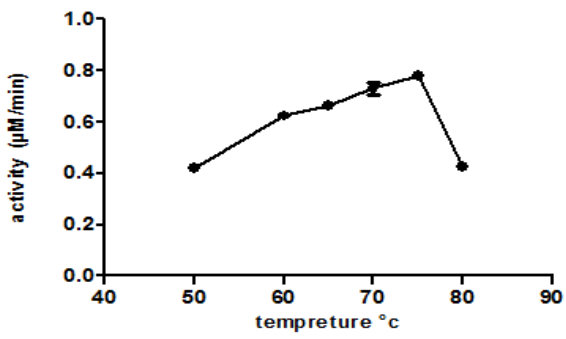
شکل شماره (۲): نمودار PH پروفایل آنزیم EG II- C169V



شکل شماره (۱): نمودار PH پروفایل آنزیم EG II- وحشی



شکل شماره (۴): نمودار Temperature پروفایل آنزیم EG II- C169V



شکل شماره (۳): نمودار Temperature پروفایل آنزیم EG II- وحشی

www.SID.ir

جدول شماره (۲): K_m آنزیم‌های نوترکیب وحشی و جهش دار

آنزیم	K_m (mg/mL) سی ام سی پر چگال	K_m (mg/mL) سی ام سی کم چگال	K_m (mg/mL) آویسل
آنزیم نوترکیب وحشی	۴/۸۲۷	۲/۸۲۷	۱۲/۳۸
آنزیم نوترکیب جهش یافته	۴/۷۴۷	۲/۹۶۱	۱۰/۰۳

جدول شماره (۳): V_{max} آنزیم‌های نوترکیب وحشی و جهش دار

آنزیم	V_{max} (u/mg) سی ام سی پر چگال	V_{max} (u/mg) سی ام سی کم چگال	V_{max} (u/mg) آویسل
آنزیم نوترکیب وحشی	۰/۵۳۸	۰/۶۴۰۱	۰/۰۲۸
آنزیم نوترکیب جهش یافته	۱/۲۴۹	۱/۴۸۰	۰/۰۳۱۶

جدول شماره (۴): ثابت ویژگی برای آنزیم‌های مختلف

آنزیم	Kcat/km $(mM.s)^{-1}$ سی ام سی پر چگال	Kcat/km $(mM.s)^{-1}$ سی ام سی کم چگال	Kcat/km $(mM.s)^{-1}$ آویسل
آنزیم نوترکیب وحشی	۴۷/۵۲۴	۱۰۱/۵۲۷	۰/۰۰۰۴۷
آنزیم نوترکیب جهش یافته	۹۳/۲۶۹	۱۷۹/۷۵۵	۰/۰۰۰۵۵

جدول شماره (۵): نیمه عمر آنزیم‌ها در دمای ۷۰ و ۸۰ درجه

آنزیم	نیمه عمر در ۷۰ درجه	نیمه عمر در ۸۰ درجه
آنزیم نوترکیب وحشی	۳۶/۳۴	۱/۴۰۱
آنزیم نوترکیب جهش یافته	۷۳/۱۸	۲/۸۲۹

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه پارامترهای مختلف آنزیمی برای آنزیم‌های جهش یافته و اصلی بدون جهش بیان شده در مخمر پیکیا پاستوریز مورد بررسی قرار گرفت و همان‌طور که از نتایج بر می‌آید جهش مورد نظر تأثیری بر روی pH دمای اپتیمم آنزیم جهش یافته نداشته است. ولی شاخص‌ترین نتیجه بدست آمده در این مطالعه افزایش مقاومت حرارتی و قدرت کاتالیتیکی این آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم اصلی می‌باشد.

مقاومت حرارتی مهم‌ترین ویژگی یک آنزیم صنعتی می‌باشد، از آنجایی که یکی از مهم‌ترین عوامل غیر فعال کننده آنزیم‌ها حرارت می‌باشد، هرچه مقاومت حرارتی آنزیمی بالاتر باشد این آنزیم دیرتر در برابر دما غیر فعال می‌شود و بنابراین مدت زمان فعالیت آن افزایش یافته و در نتیجه محصول بیشتری تولید خواهد کرد.

همچنین قدرت کاتالیتیکی یکی از ویژگی‌های مهم آنزیمی محسوب می‌شود، آنزیمی که قدرت کاتالیتیکی بیشتری داشته باشد می‌تواند در مدت زمان مشخصی محصول بیشتری را تولید کند.

علت این تغییر ویژگی مربوط به نوع جایگاه اسید آمینه تغییر یافته می‌باشد. این اسید آمینه سیستئین آزادی در میان پروتئین

Archive of SID

www.SID.ir

در جایگاهی که محیط اطراف آن هیدروفوب (آب گریز) است قرار دارد ولی خود اسید آمینه سیستئین یک اسید آمینه هیدروفیل (آب دوست) است و مسلماً وجود یک اسید آمینه آبدوست در محیط آب گریز منجر به ایجاد ناپایداری ترمودینامیکی در ساختار پروتئین می‌شود و بنابراین تغییر آن به اسید آمینه والین که یک اسید آمینه آب گریز و دارای ساختار مشابه با سیستئین است توانسته منجر به افزایش پایداری آنزیم جهش یافته نسبت به نوع اصلی شود. همچنین احتمالاً تغییر حاصل منجر به ایجاد تغییری در ساختار پروتئین شده به گونه‌ای که ویژگی عمل آنزیم نسبت به سوبسترا بهبود یافته و قدرت کاتالیتیکی آنزیم نسبت به نوع اصلی افزایش یافته است.

بنابراین آنزیم جهش یافته با توجه به بهبود این دو خصوصیت، آنزیم بهتری نسبت به آنزیم اولیه برای مصارف صنعتی می‌باشد و بازدهی بیشتری نسبت به آن خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم از تمامی اعضای تیم آزمایشگاه نانوتکنولوژی و مهندسی زیستی دانشکده مهندسی انرژی دانشگاه شهید بهشتی مراتب تشکر و قدر دانی را به عمل آوریم.

References:

1. Brethauer S, Wyman CE. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. Bioresour Technol 2010;101(13):4862–74.
2. Yang B, Wyman CE. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. Wiley Inter Science; 2006.
3. Gnansounou E, Dauriat A, Wyman CE. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. Bioresour Technol 2005;96(9):985–1002.
4. Mielenz JR, Bardsley JS, Wyman CE. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. Bioresour Technol 2009;100(14):3532–9.
5. Shao X, Lynd L, Wyman C. Kinetic modeling of cellulosic biomass to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation: Part II. Experimental validation using waste paper sludge and anticipation of CFD analysis. Biotechnol Bioeng 2009;102(1):66–72.
6. Shao X, Lynd L, Bakker A, LaRoche R, Wyman C. Reactor scale up for biological conversion of cellulosic biomass to ethanol. Bioprocess Biosyst Eng 2010;33:485–93.
7. Rui Guo, Ding M, Zhang S, Xu G, Zhao F. Expression and characterization of two secreted His6-tagged endo-β-1,4glucanases from the mollusc Ampullaria crossean in Pichia pastoris. Acta Biochim Biophys Sin 2008:419-25.
8. Bettiga M, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting Saccharomyces cerevisiae strains. Biotechnol Biofuels 2008;1(1):16.
9. Zhang Y-HP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances 2006;24:452–81.
10. Himmel, Ruth, Wyman. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. Curr Opin Biotechnol 1999;10(4):358–64.
11. Bergenstråhle M, Wohlert J, Himmel ME, Brady JW. Simulation studies of the insolubility of cellulose. Carbohydr Res 2010;345(14):2060–6.
12. Qing Q, Yang B, Wyman CE. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. Bioresource Technology 2010;101:9624–30.
13. Mekoo JLD, Yang Y, Li T, Cao R, Liu J. Molecular cloning and expression of a synthetic gene encoding a Beta-glucosidase of Aspergillus niger in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Int J Biology 2010;2(2): 40.
14. Quay DHX, Bakar FDA, Rabu A, Said M, Illias RM, Mahadi NM, et al. Overexpression,

Archive of SID

www.SID.ir

purification and characterization of the Aspergillus niger endoglucanase, EglA, in Pichia pastoris. Afr J Biotechnol; 10 (11): 2101-11

15. Shumiao Z, Huang J, Zhang C, Deng L, Hu N, Liang Y. High-level expression of an Aspergillus niger endo-beta-1,4-glucanase in Pichia pastoris through gene codon optimization and synthesis. J Microbiol Biotechnol 2010;20(3):467–73.
16. Qin Y, Wei X, Liu X, Wang T, Qu Y. Purification and characterization of recombinant endoglucanase of Trichoderma reesei expressed in Saccharomyces cerevisiae with higher glycosylation and stability. Protein Expr Purif 2008;58(1):162–7.
17. Nakazawa H, Okada K, Kobayashi R, Kubota T, Onodera T, Ochiai N, et al. Characterization of the catalytic domains of Trichoderma reesei endoglucanase I, II, and III, expressed in Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol 2008;81(4):681–9.
18. Beckham GT, Dai Z, Matthews JF, Momany M, Payne CM, Adney WS, et al. Harnessing glycosylation to improve cellulase activity. Curr Opin Biotechnol 2012;23(3):338–45.
19. Jeoh T, Michener W, Himmel ME, Decker SR, Adney WS. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. Biotechnol Biofuels 2008;1(1):10.
20. Wyman CE. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. Trends Biotechnol 2007;25(4):153–7.
21. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

IMPROVEMENT OF ENDOGLUCANASE ENZYME OPERATING PROPERTIES BY MUTATION IN AMINO ACID

Navid Pourzardosht [1] , *Bahram Yaghmaei* [2], *Ali Akbaradeh* [3]

Received: 7 Sep , 2013; Accepted: 16 Nov , 2013

Abstract

***Background & Aims*:** Ethanol produced from plant cellulose is called bioethanol and is recognized as a unique sustainable liquid fuel with powerful economic and environmental effects. In the present study we aimed at integrate a cellulase gene in to yeast genome to have the enzyme secreted out of the cell. Subsequently cellulose is depredated to glucose by the enzyme, and then it is ferment to ethanol.

***Materials & Methods*:** Using site directed mutagenesis, one of free cysteines was replaced by a valine residue. The gene with codon optimization in respect to pichia pastoris was sub-cloned in to cloning plasmid, then for amplification it was transformed into E. coli. The plasmid was extracted and excised by restriction enzyme and then was sub-cloned in to expression vector. In the next step using electroporation, gene was transferred in to yeast and recombinant protein was expressed. Enzyme properties like temperature and pH optimum, specific activity, specific constant, and thermostability survived were assessed.

***Result*:** Applied mutation did not have any effect on features like pH and temperature optimum but it led to an improvement in catalytic efficiency and thermostability.

***Conclusion*:** The mutant enzyme has better properties for industrial application.

***Keyword*:** Site direct mutagenesis, Cloning, Bioethanol, Enzymatic biotechnology, Protein engineering

Address: Department of Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Islamic Republic of Iran ***Tel***: +98 9113377533
Email: pourzardosht@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2013: 24(10): 838 ISSN: 1027-3727

Archive of SID

[1] *MSc., PhD. Student, Clinical Biochemistry Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *PhD Student of Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran*

www.SID.ir