

## افزایش پایداری حرارتی آنزیم گزایلوزیداز باکتری *Selenomonas ruminantium* با حذف آمینو اسید سیستئین آزاد 286 درون ساختار پروتئین

احسان دهنوی<sup>1</sup>، سید امید رعنائی سیادت<sup>2\*</sup>، امیر صاحبی<sup>3</sup>، خسرو خواجه<sup>4\*</sup>

- 1- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران  
2- استادیار، آزمایشگاه مهندسی نانویوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران  
3- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری کشاورزی، مرکز تحقیقات پروتئین دانشگاه شهید بهشتی، تهران  
4- استاد گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

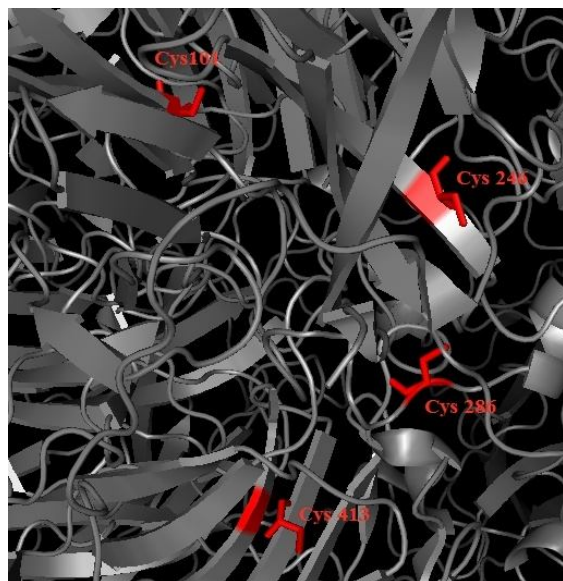
\* تهران، صندوق پستی 14115 - 175

khajeh@modares.ac.ir, o\_ranaei@sbu.ac.ir

(دریافت مقاله: 93/10/26 پذیرش مقاله: 93/12/6)

**چکیده-** در صنعت از آنزیم گزایلوزیداز باکتری سلنوموناس رومینانتیوم (SXA) برای تجزیه زیستی پلیمر گزایلان کمپلکس دیواره سلولی استفاده می‌شود. مهمترین کاربرد صنعتی این آنزیم، تجزیه دیواره سلولی باقی مانده‌های گیاهی برای تولید سوخت زیستی (Bioethanol) می‌باشد. یکی از مشکلات صنعتی در استفاده از SXA، پایداری حرارتی نسبتاً پایین آن در دماهای بیش از 50 °C می‌باشد. هر زیر واحد این آنزیم هموترامر دارای 4 آمینو اسید سیستئین آزاد است. به نظر می‌رسد که سیستئین آزاد 286 نقشی در فعالیت آنزیمی ندارد. برای بررسی اثر سیستئین آزاد بر پایداری حرارتی SXA، این آمینو اسید با جهش‌زایی هدفمند به آمینو اسید هم اندازه آن، والین تبدیل شد. جهش یافته مورد نظر سپس وارد مخمر *پیکیا پاستوریس* شده و پارامترهای کیتیکی و پایداری حرارتی گزایلوزیداز جهش یافته با تیپ وحشی مورد مقایسه قرار گرفت. در حالی که دمای بهینه، pH بهینه و کارایی کاتالیتیکی آنزیم جهش یافته تا حدود زیادی شبیه تیپ وحشی بود، نیمه عمر SXA جهش یافته در دمای 55 °C حدود 65% بیشتر از آنزیم طبیعی به دست آمد، بدین ترتیب که نیمه عمر SXA جهش یافته در دمای 55 °C حدود 14 دقیقه تعیین شد، در حالی که در مورد آنزیم طبیعی حدود 8/5 دقیقه می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که حذف سیستئین آزاد موجود در بخش‌های درونی و آب‌گریز SXA از طریق افزایش میان‌کنش‌های آب‌گریز بین زنجیره‌های جانبی آمینو اسیدها، منجر به افزایش پایداری حرارتی گزایلوزیداز می‌شود. این گزایلوزیداز مقاوم به حرارت کاربردهای بسیار فراوانی در زیست فناوری دارد.

کلیدواژگان:  $\beta$ -گزایلوزیداز، سلنوموناس رومینانتیوم، سیستئین آزاد، پایداری حرارتی، جهش‌زایی هدفمند.



شکل 1 موقعیت سیستئین های آزاد موجود در گزایلوzydاز باکتری سلنوموناس رومینانتیوم با استفاده از ساختار کریستاله پروتئین (Pdb-code: 3C2U)

با استفاده از نرم افزارهای Eris و I-mutant پیش بینی شد که در میان چهار آمینو اسید سیستئین آزاد موجود در  $\beta$ -گزایلوzydاز باکتری سلنوموناس رومینانتیوم (101, 246, 286 و 413)، سیستئین 286 سبب ناپایداری در ساختار پروتئین SXA می شود. در این تحقیق، جهش یافته ای ایجاد شد که در آن سیستئین 286 با والین جایگزین گردید. جهش یافته مورد نظر سپس از طریق ناقل بیانی pPink $\alpha$ -HC به داخل ژنوم مخمر پیکیا پاستوریس انتقال داده شد. در پایان، خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم، پایداری حرارتی گزایلوzydاز جهش یافته و ساختار آن با استفاده از فلورسانس ذاتی و دورنگ نمایی حلقوی (Circular Dichroism) مورد مطالعه قرار گرفت.

## 2- مواد و روش ها

### 1-2- سویه ها، پلاسمیدها، مواد شیمیایی و محیط های کشت

از باکتری اشریشیا کلی سویه DH5 $\alpha$  برای انجام مراحل

## 1- مقدمه

آنزیم گزایلوzydاز باکتری سلنوموناس رومینانتیوم (SXA) متعلق به گروه 43 از خانواده گلیکوزید هیدرولازها (GH43) است (EC.3.2.1.37). این آنزیم به کمک آنزیم گزایلاناز و با مشارکت آنزیم های دیگر از این خانواده مانند  $\alpha$ -گلوکورونیداز سبب تجزیه زیستی پلیمر گزایلان موجود در دیواره سلولی می شود [1]. نسبت به دیگر گزایلوzydاهای کشف شده، SXA بیشترین کارایی کاتالیتیکی بر روی سوبسترای مصنوعی پارانیتروفیل  $\beta$ -گزایلوپیرانوزید (PNPX) را از خود نشان می دهد. به همین دلیل در بسیاری از فرایندهای صنعتی از قبیل تولید اتانول سوختی از این آنزیم استفاده می شود [2]. یکی از مشکلات صنعتی در استفاده از SXA، محدودیت فعالیت آن در دماهای بیش از 50 °C است. بهبود پایداری حرارتی این آنزیم با استفاده از روش های مهندسی پروتئین یکی از چالش های مهم پیش روی محققان است [3].

سیستئین های آزاد موجود در پروتئین ها معمولاً در فعالیت زیستی، ساختار و پایداری پروتئین ها نقش دارند [4]. عملکرد سیستئین های آزاد که در قسمت های داخلی پروتئین ها جای گرفته اند و نقشی در اتصال و فعالیت کاتالیتیکی پروتئین ها ندارند، چالش برانگیز شده است. به دلیل واکنش پذیری زیاد گروه های تیول موجود، سیستئین های آزاد سبب ایجاد مشکل در تاخوردگی پروتئین ها می شوند. اکسیداسیون سیستئین ها می تواند منجر به تاخوردگی نادرست<sup>1</sup> پروتئین ها شود [5]. وجود سیستئین های نسبتاً آب دوست در قسمت های آب گریز پروتئین ها منجر به ناپایداری آن ها می شود [6]. 4 آمینو اسید سیستئین آزاد در SXA وجود دارد که در ایجاد پیوند دی سولفیدی مشارکت ندارند (موقعیت های 101, 246, 286 و 413) (شکل 1).

### 1. Misfolding

در مرحله بعد، محصول PCR تحت تاثیر هضم آنزیمی با *DpnI* قرار گرفت (90 دقیقه در دمای °C 37) و سپس محصول هضم آنزیمی به باکتری *اشرشیاکلی منتقل* گردید. غربالگری بر وی محیط کشت LB حاوی کانامایسین انجام و جهش با استفاده از تعیین توالی تایید شد (شرکت MWG آلمان).

### 2-3- انتقال به پیکیا پاستوریس و غربالگری

ژنهای جهش یافته و طبیعی با استفاده از جایگاههای *XhoI/KpnI* در ناقل *pPinkα-HC* کلون گردیدند. این ژنها در پایین دست سیگنال ترشحي  $\alpha$ - mating و تحت تاثیر پروموتور الکل اکسیداز (*AOX1*) قرار گرفتند. پلاسمیدهای دارای ژن طبیعی و جهش یافته با استفاده از آنزیم *BspT1* خطی شدند تا در طی فرایند انتقال به مخمر پیکیا پاستوریس بتوانند فرایند نوترکیبی همولوگ (*Homologous recombination*) را با ناحیه *TRP2* پیکیا پاستوریس انجام دهند.

ناقل های خطی شده به وسیله الکتروپوریشن به مخمر پیکیا پاستوریس سویه GS115 منتقل شدند (دستگاه BTX آمریکا، 1800 V, 200  $\Omega$  and 25  $\mu$ F). با استفاده از کلونی PCR، وارد شدن ژنهای *SXA* طبیعی و جهش یافته در داخل ژنوم سلولهای مخمری پذیرنده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با توالی زیر تأیید شدند:

Forward: 5'-  
TCTCTCGAGTCAAAGGCAACAAACTGT-3'

Reverse: 5'-  
GGTACCGCATGCCTACTACTTTCTT-3'.

شرایط واکنش PCR به صورت 5 دقیقه دمای °C 95، 30 سیکل با شرایط 1 دقیقه °C 95، 1 دقیقه °C 60 و 90 ثانیه °C 72 و در نهایت یک سیکل 5 دقیقه و دمای °C 72 تنظیم شد.

### 2-4- بیان گزایلوزیدازهای نوترکیب و تخلیص آنها

بیان سویه طبیعی و جهش یافته بر اساس روش گفته شده

کلونینگ و انتقال استفاده شد که از بانک ژن و پلاسمید انستیتو پاستور تهیه شد. پیکیا پاستوریس سویه GS115 و ناقل بیانی *pPinkα-HC* از شرکت اینویتروژن آمریکا خریداری گردید. از ژن سنتزی *SXA* که با ترجیح کدونی پیکیا پاستوریس سنتز شده به عنوان ژن اصلی استفاده شد (GenBank Accession No. JF193553.1). مواد مورد نیاز برای واکنشهای زنجیره ای پلیمرازی از شرکت سیناکلون ایران خریداری شد. تمامی آنزیمهای محدود کننده، مارکر DNA و پروتئین و آنزیم T4 لیگاز از شرکت ویوانتیس مالزی تهیه گردید. پرایمرهای مورد استفاده توسط شرکت سیناکلون سنتز شده اند. *DTNB* از شرکت ترموسایتیفیک آمریکا تهیه گردید. سلولهای *اشرشیا کلی* در محیط LB در دمای °C 37 کشت داده شدند در حالی که سلولهای پیکیا در محیط کشت YPD که دارای عصاره مخمر، پپتون و دکستروز است در دمای °C 30 کشت داده شدند. برای رشد و بیان پروتئین نوترکیب به ترتیب از محیطهای *Buffered Glycerol-complex* (*BMMY*) و *Buffered Methanol-complex* (*BMMY*) استفاده شد. این محیطهای کشت مخمری از شرکت اینویتروژن خریداری گردید. تمامی مراحل کلونینگ و انتقال ژن به غیر از موارد اشاره شده در متن بر اساس کتاب کلونینگ ملکولی سمبروک انجام شد [7].

### 2-2- جهش زایی هدفمند و تکثیر DNA

از ژن سنتزی *SXA* در ناقل *pMK-RQ* به عنوان الگو برای جهش زایی استفاده شد. جهش نقطه ای بر اساس روش *Quik Change site-directed mutagenesis* ایجاد شد [8]. از پرایمرهای زیر برای تبدیل سیستئین 286 به والین استفاده شد:

Primer Forward: 5'-  
GCACGCTTTTGTCCATTGGGTAGAGAGAC-3'

Primer Reverse: 5'-  
CCAATGGAAACAAAAGCGTGCTGCTCTC-3'

**2-6- تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم SXA طبیعی****و جهش یافته**

فعالیت گزایلوzydازی آنزیم‌ها با استفاده از سوبسترای مصنوعی پارا نیتروفیل  $\beta$ - گزایلوپیرانوزید (PNPX) بر اساس رها شدن ماده رنگی پارا نیتروفیل تعیین گردید (شرکت سیگما- آمریکا). فعالیت SXA بوسیله 1 میلی‌مولار PNPX در بافر استات سدیم 50 میلی‌مولار با pH 4.8 در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  به مدت 10 دقیقه سنجش شد و واکنش با اضافه کردن 1 میلی‌لیتر محلول بی کربنات سدیم 1 مولار متوقف گردید و میزان جذب در 405 نانومتر اندازه‌گیری شد. هر واحد آنزیمی معادل فعالیت مقداری از آنزیم تعریف شد که 1 میکرومول سوبسترا را در دقیقه آزاد کند. برای رسم نمودار میکائیلیس-متنن از غلظت‌های مختلف سوبسترای PNPX (1 تا 6 میلی‌مولار) استفاده شد. ثابت میکائیلیس ( $K_m$ )، حداکثر سرعت  $V_{max}$  و  $k_{cat}$  آنزیم‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad prism 5 اندازه‌گیری شد.

دما و pH بهینه برای فعالیت بیشینه آنزیم‌های SXA طبیعی و جهش یافته با استفاده از سنجش استاندارد در دماها و pHهای مختلف تعیین شد. پایداری حرارتی آنزیم با استفاده از دو روش مورد بررسی قرار گرفت. در روش اول، آنزیم در  $55^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید و فعالیت باقی‌مانده در زمان‌های مختلف با استفاده از روش استاندارد گفته شده تعیین شد. در روش دوم، آنزیم گزایلوzydاز در دماهای مختلف به مدت یک ساعت انکوبه گردید و میزان فعالیت هیدرولیز کنندگی آنزیم انکوبه شده با استفاده از روش استاندارد اندازه‌گیری شد.

**2-7- مطالعات ساختاری پروتئین‌های طبیعی و جهش****یافته**

مطالعات دورنگ نامایی دورانی (Circular dichroism) در بافر فسفات سدیم 18 میلی‌مولار و بافر Tris-HCl 4

در پروتکول شرکت اینویترژن انجام شد [9]. پس از چهار روز بیان در فلاسک، سوپ رویی دارای آنزیم طبیعی و جهش یافته با سانتریفیوژ به دست آمد (با دور 3000g، مدت 5 دقیقه و دما  $4^{\circ}\text{C}$ ). مایع به دست آمده حاوی آنزیم‌ها با استفاده از رسوب با آمونیوم سولفات 80% به میزان 10 برابر غلیظ گردید (در دمای  $4^{\circ}\text{C}$ ). رسوب پروتئین در بافر سترات pH 4.8 (بافر سنجش گزایلوzydاز) حل گردید و با استفاده از همان بافر دیالیز انجام شد. در ادامه خالص‌سازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با رزین سفادکس S-200 (شرکت Amersham Pharmacia کشور سوئد) انجام شد. ستون مورد نظر با بافر فسفات پتاسیم 50 میلی‌مولار دارای 150 میلی‌مولار کلرید سدیم به تعادل رسانده شد و پروتئین با سرعت 0/8 میلی‌لیتر در هر دقیقه از ستون شسته شد. فراکشن‌های دارای آنزیم فعال با یکدیگر مخلوط گردید. پروتئین‌های خالص بر روی ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) با غلظت 12% آنالیز گردیدند. مقدار کلی پروتئین با روش برادفورد با استفاده از استاندارد BSA بدست آمد [10].

**2-5- تیتراسیون گروه‌های تیول**

غلظت گروه‌های تیول (SH) در پروتئین‌ها با استفاده از محلول دی تیونیترو بنزوئیک اسید (DTNB) در بافر 0/1 مولار فسفات سدیم (pH 8.0) دارای یک میلی‌مولار EDTA بر مبنای روش المان (Ellman) [11] بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده (ترموسایتیفیک آمریکا) تعیین شد. برای افزایش در دسترس قرارگیری گروه‌های تیول مدفون شده درون ساختار، پروتئین طبیعی و جهش یافته در معرض گوانیدین هیدروکلراید (GuHCl) 6 مولار به مدت 15 دقیقه قرار گرفت. تعداد گروه‌های تیول بر اساس جذب در طول موج 412 nm و ضریب خاموشی  $13/700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  محاسبه شد.

سیستین‌های آزاد، گروه‌های فعال تیول دارند که می‌توانند باعث ناپایداری پروتئین‌ها شوند. به طور مشخص، اکسیداسیون سیستین‌های آزاد از طریق گروه‌های تیول می‌تواند سبب ناپایداری پروتئین‌ها شود. به همین دلیل، تعویض این آمینو اسیدهای مدفون در ساختار پروتئین‌ها با آمینو اسید آب‌گریز در بسیاری از موارد سبب افزایش پایداری پروتئین‌ها شده است [13-17]. با توجه به این که سیستین موقعیت 286 درون فضای غیر قطبی پروتئین مدفون شده است، تصمیم گرفته شد با استفاده از جهش‌زایی هدفمند این اسید آمینه با اسید آمینه‌ای هم‌اندازه و آب‌گریز مانند والین جایجا شود تا بتوان تأثیر این جایجایی را بر روی پایداری حرارتی آنزیم SXA بررسی کرد.

### 3-2- تاثیر دما و pH بر فعالیت گزایلوزیداز طبیعی و

#### جهش یافته

از فرم خالص همه آنزیم‌ها برای بررسی دما و pH استفاده شد. اثر pH بر فعالیت آنزیم‌ها با استفاده از بافر 50 میلی‌مولار سیترات در محدوده pHهای مختلف (2/5 تا 8/0) تعیین شد. بیشترین فعالیت در هر دو فرم آنزیمی در pH 4.8 به دست آمد. وابستگی فعالیت آنزیم به دما در محدوده دمایی 30 °C تا 70 °C در بافر 50 میلی‌مولار سیترات pH 4.8 اندازه‌گیری گردید. آنزیم‌های طبیعی و جهش یافته در محدوده وسیع دمایی ذکر شده فعال بودند، اما بیشترین فعالیت آنزیمی در هر دو مورد در دمای 50 °C دیده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که دما و pH بهینه آنزیم جهش یافته و طبیعی بیان شده در پیکیا پاستوریس شبیه آنزیم گزایلوزیداز بیان شده در باکتری سلنوموناس رومینانتیوم است (شکل 2).

میلی‌مولار (pH 7.3) با استفاده از دستگاه (Avivo model of 215 CD spectropolarimeter) انجام شد. اطلاعات Far UV CD (200 تا 250 نانومتر) با غلظت آنزیمی 0/2 mg/ml اندازه‌گیری شد. نتایج بر اساس ضریب  $\theta$  ( $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ ) بیان گردید. ضریب  $\theta$  بر اساس معادله  $[\theta]_{\lambda} = (\epsilon \cdot 100\text{MWR}) / (c \cdot l)$  محاسبه شد. در این معادله، c غلظت پروتئین بر حسب mg/ml، l طول عبوری نور بر اساس سانتی‌متر و  $\theta$  بیضوی در طول موج مشخص در نظر گرفته شد.

طیف فلورسانس ذاتی پروتئین در دمای 25 °C با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر LS55 شرکت پرکین-المر اندازه‌گیری شد. طول موج تهییجی در 280 نانومتر تنظیم گردید و طیف نشری بین طول موج‌های 300 تا 400 نانومتر ضبط گردید. همه واکنش‌ها در بافر 50 میلی‌مولار تریس (pH 7.0) انجام شد. غلظت پروتئین در همه نمونه‌ها حدود 20  $\mu\text{g/ml}$  در نظر گرفته شد.

### 3- نتایج و بحث

#### 3-1- طراحی جهش

به منظور طراحی و ایجاد گزایلوزیداز پایدار از باکتری سلنوموناس رومینانتیوم، ساختار کریستاله آنزیم SXA (3C2U) مورد بررسی قرار گرفت [12]. با استفاده از روش المان مشخص گردید که 3 اسید آمینه سیستین درون ساختار پروتئین قرار گرفته‌اند (جدول 1).

**جدول 1** تیتراسیون گروه‌های تیول در حضور و عدم حضور گوانیدینوم هیدروکلراید 6 مولار

| غلظت SH<br>(عدم حضور GuHCl) | غلظت SH<br>(در حضور GuHCl) |           |
|-----------------------------|----------------------------|-----------|
| بر حسب میلی مولار           | بر حسب میلی مولار          |           |
| 1/23                        | 4/91                       | تیپ وحشی  |
| 1/22                        | 3/63                       | جهش یافته |

همچون فرم طبیعی از مورد مشابه بیان شده در باکتری بیشتر بود (اطلاعات اینجا نشان داده نشده است).

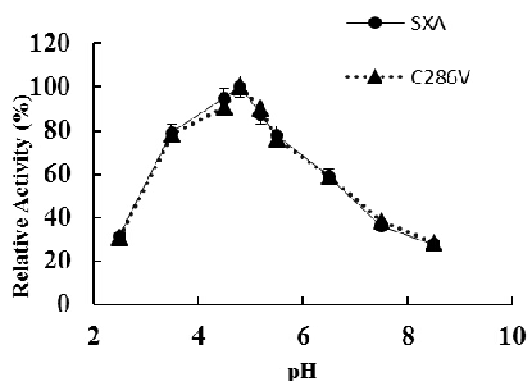
#### 4-3- پایداری حرارتی

پایداری حرارتی آنزیم‌ها در دمای 55 و 60 درجه سانتی‌گراد بر طبق روش گفته شده در قسمت مواد و روش‌ها محاسبه گردید. همان‌طور که در شکل 3 مشخص شده است، جهش یافته C286V در دماهای 55 °C و 60 °C پایداری بیشتری نسبت به فرم طبیعی SXA از خود نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که نیمه عمر آنزیم جهش یافته در دمای 55 °C و 60 °C به ترتیب 14 و 6/5 دقیقه می‌باشد که نسبت به آنزیم طبیعی افزایش یافته است (نیمه عمر آنزیم طبیعی در دمای 55 °C و 60 °C به ترتیب 8/5 و 4 دقیقه است).

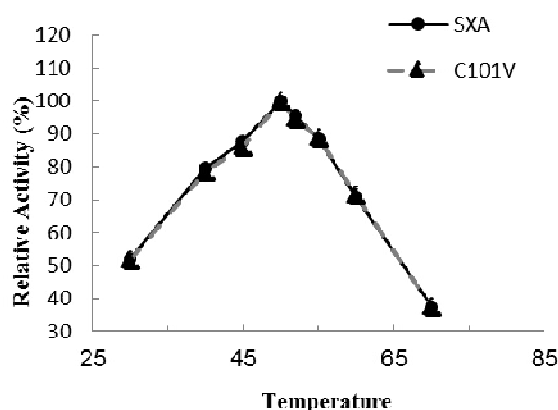
گزایلوzydاز جهش یافته نسبت به فرم طبیعی فعالیت ویژه کمتری نشان می‌دهد (جدول 2). تحقیقات قبلی نیز نشان داده بودند که افزایش پایداری حرارتی پروتئین‌ها با جهش‌زایی هدفمند می‌تواند منجر به کاهش نسبی فعالیت پروتئینی شود [14-17]. به نظر می‌رسد کاهش انعطاف‌پذیری ساختار آنزیم که در نتیجه پایداری حرارتی ایجاد شده است، می‌تواند منجر به از دست رفتن نسبی فعالیت آنزیمی شود [18].

#### 5-3- نتایج حاصل از مطالعات ساختاری

از مطالعات دورنگ نمایی دورانی و فلورسانس ذاتی برای مشخص شدن دلایل افزایش پایداری حرارتی جهش یافته نسبت به فرم طبیعی استفاده گردید. به منظور آنالیز تغییرات احتمالی ساختار دوم SXA بر اثر جهش از مطالعه Far UV CD استفاده شد. همان‌طور که در شکل 4 مشخص شده است تغییر محسوسی در ساختار دوم آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم گزایلوzydاز طبیعی دیده نمی‌شود.



(الف)



(ب)

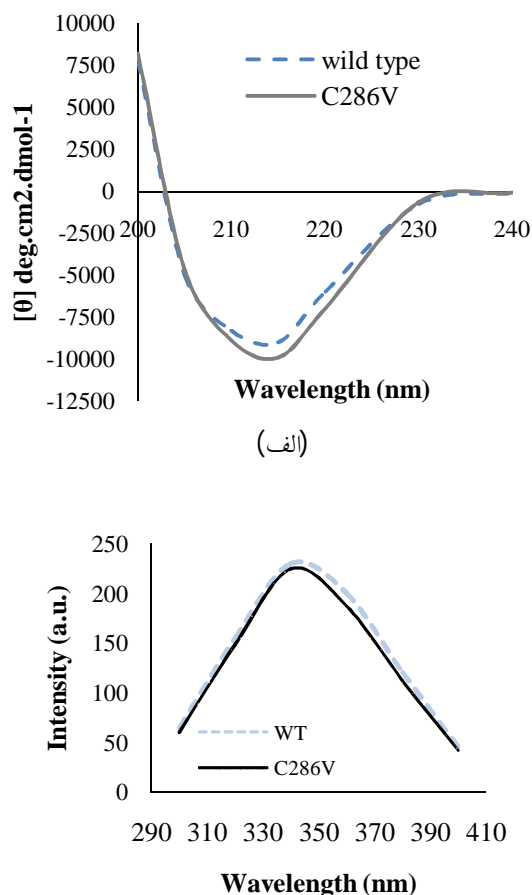
شکل 2 تعیین خصوصیات آنزیم‌های طبیعی و جهش یافته SXA: نیم‌رخ pH (الف) و نیم‌رخ دمایی (ب) در بافر سترات 50 میلی‌مولار. اندازه‌گیری بر اساس روش گفته شده در مواد و روش‌ها انجام شد.

#### 3-3- تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم‌های طبیعی و

##### جهش یافته

با استفاده از منحنی میکائیلیس-متن و نرم‌افزار پرسم، پارامترهای سینتیکی،  $K_m$ ،  $k_{cat}$  و  $V_{max}$  آنزیم گزایلوzydاز طبیعی و جهش یافته C286V محاسبه گردید. در مقایسه با SXA طبیعی، فرم جهش یافته تا حدودی  $k_{cat}$  پایین تری از خود نشان می‌دهد ( $142/5 S^{-1}$  در مقابل  $156/5 S^{-1}$  آنزیم طبیعی). در حالی که ثابت میکائیلیس ( $K_m$ ) آن تغییر محسوسی از خود نشان نداد. کارایی کاتالایتیکی آنزیم جهش یافته تغییر محسوسی نسبت به فرم طبیعی نشان نداد. البته میزان کارایی کاتالایتیکی جهش یافته نیز

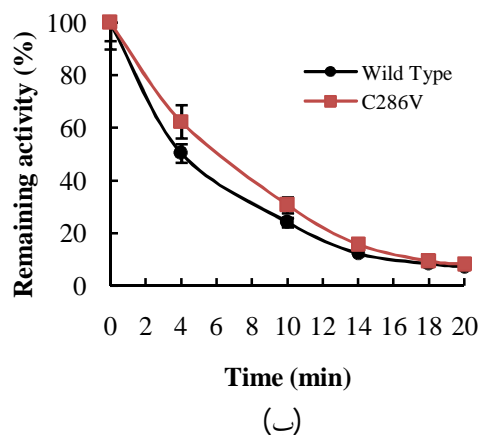
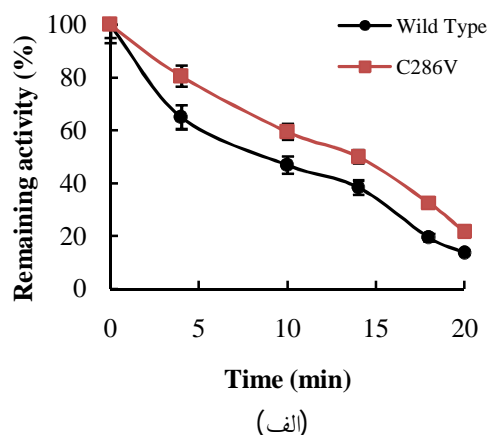
شکل 4 مشخص شده است طیف ذاتی در طول موج بیشینه 340 نانومتر جهش یافته شبیه SXA طبیعی است و تغییری دیده نمی‌شود.



شکل 4 مطالعات الف) Far UV CD و ب) نشر ذاتی

آنزیم‌های طبیعی و جهش یافته در بافر 18 میلی مولار فسفات سدیم و 4 میلی مولار تریس pH 7.3

از آنجا که طبیعت پروتئین به طور گسترده‌ای بوسیله تعداد میان کنش‌های غیر کوالان تعیین می‌شود [19]، آمینو اسیدهای مجاور موقعیت 286 پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. به همین دلیل جهش یافته مورد نظر به سرور WHAT IF داده شد و متعاقب آن با استفاده از Pymol و Swiss-Pdb Viewer مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که Cys 286 درون ساختار پروتئین مدفون می‌باشد و توسط محیط هیدروفوب احاطه شده است و بنابراین



شکل 3 بررسی تاثیر دما بر پایداری سویه های طبیعی و جهش یافته SXA. الف) دمای 55 °C و ب) دمای 60 °C در بافر 50 میلی مولار pH 4.8. محلول آنزیمی در دماهای گفته شده انکوبه شد و باقی مانده فعالیت آن پس از زمان‌های مختلف بر اساس روش استاندارد اندازه گیری شد.

جدول 2 پارامترهای سینتیکی آنزیم های طبیعی و جهش یافته

| سویه      | $K_m$ (mM) | $k_{cat}$ ( $S^{-1}$ ) | $k_{cat}/K_m$ ( $S^{-1} \cdot mM^{-1}$ ) |
|-----------|------------|------------------------|------------------------------------------|
| تیپ وحشی  | 3/4        | 156/5                  | 46/2                                     |
| جهش یافته | 3/5        | 142/5                  | 40/7                                     |

با توجه به این که طیف نشری آمینو اسیدهای آروماتیک نسبتاً به محیط اطراف آنها حساس است، بنابراین تغییرات ساختاری حاصل از جهش را می‌توان با استفاده از اسپکتروسکوپی فلورسانس ردیابی کرد. همان‌طور که در

- Wagschal, K. (2014) Directed evolution of GH43  $\beta$ -xylosidase XylBH43 thermal stability and L186 saturation mutagenesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 489-498.
- [4] Nakaniwa, T., Fukada, H., Inoue, T., Gouda, M., Nakai, R., Kirii, Y., Adachi, M., Tamada, T., Segawa, S. I., Kuroki, R., Tada, T., and Kinoshita, T. (2012) Seven Cysteine-Deficient Mutants Depict the Interplay between Thermal and Chemical Stabilities of Individual Cysteine Residues in Mitogen-Activated Protein Kinase c-Jun N-Terminal Kinase 1. *Biochemistry*, 51 (42), 8410-21.
- [5] Tatara, Y., Yoshida, T., and Ichishima, E. (2005) A single free cysteine residue and disulphide bond contribute to the thermostability of *Aspergillus saitoi* 1, 2  $\alpha$ -mannosidases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (11), 2101-8.
- [6] Perry, L. J., and Wetzel, R. (1987) The role of cysteine oxidation in the thermal inactivation of T4 lysozyme. *Protein Eng.* 1, 101-105.
- [7] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold spring Harbor, N.Y.
- [8] Papworth C., Bauer J.C., Braman J. and Wright D.A. (1996) Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies* 9: 3-4.
- [9] Várnai, A., Tang, C., Bengtsson, O., Atterton, A., Mathiesen, G., and Eijsink, V. GH. (2014) Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter. *Microbial Cell Factories*, 13 (57).
- [10] Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-54.
- [11] Ellman G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1): 70-77.
- [12] Brunzelle, J. S., Jordan, D. B., McCaslin, D. R., Olczak, A., and Wawrzak, Z. (2008) Structure of the two subsite D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in complex with 1,3-bis [tris (hydroxymethyl) methylamino] propane. *Arc. Biochem. Biophys.* 474 (1), 157-66.
- [13] Fremaux, I., Mazères, S., Lougarre, A. B., Arnaud, M., Ladurantie, C., and Fournier, D. (2002) Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochemistry*, 3 (21).
- [14] Hari, S. B., Byeon, C., Lavinder, J. J., and Magliery, T. J. (2010) Cysteine-free Rop: A four-helix bundle core mutant has wild-type stability and structure but dramatically different

تغییر آن با آمینو اسید غیرقطبی والین می‌تواند سبب افزایش میان کنش‌های غیر کوالان و در نتیجه پایداری بیشتر آنزیم جهش یافته شود. با تبدیل سیستمین به والین گروه واکنش دهنده فعال تیول حذف شد و همچنین میزان آب گریزی زنجیره جانبی که به سمت داخل پروتئین است نیز افزایش یافت. مشابه با پژوهش‌های دیگر، افزایش آب گریزی آمینو اسیدهای مدفون در ساختار پروتئین معمولاً باعث افزایش پایداری حرارتی پروتئین‌ها می‌شود [20-22].

#### 4- نتیجه گیری

$\beta$ - گزایلوzydازها نقش مهمی در تجزیه گزایلو ساکاریدها به قند گزایلوzyd دارند. این قند پنج کربنه حاصل، کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، نساجی و به خصوص تولید انرژی سوختی (بیواتانول) دارد [23-26]. در این تحقیق با کمک ساختار کریستال آنزیم گزایلوzydاز باکتری *سَلِنوموناس رومینانتیوم* که کارایی کاتالیکی بسیار بالایی دارد و با استفاده از جهش‌زایی هدفمند پروتئینی مقاوم‌تر به حرارت ایجاد شد که می‌تواند پتانسیل کاربردی فراوانی در بسیاری از زمینه‌های صنعتی داشته باشد. همچنین در این پژوهش مشخص شد که آمینو اسید سیستمین مدفون شده درون ساختار پروتئین‌ها می‌تواند باعث ناپایداری آن‌ها شود.

#### 5- منابع

- [1] Whitehead, T. R., and Cotta, M. A. (2001) Identification of a Broad-Specificity Xylosidase/Arabinosidase Important for Xylooligosaccharide Fermentation by the Ruminant Anaerobe *Selenomonas ruminantium* GA192. *Curr. Microbiol.* 43, 293-298.
- [2] Jordan, D. B., Li, X. L., Dunlap, C. A., Whitehead, T. R., and Cotta, M. A. (2007)  $\beta$ -D-Xylosidase From *Selenomonas ruminantium* of Glycoside Hydrolase Family 43. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 136-140, 93-104.
- [3] Singh, S. K., Heng, C., Braker, J. D., Chan, V. J., Lee, C. C., Jordan, D. B., Yuan, L., and



- [21] Yutani, K., Ogasahara, K. TsuJITA, T., and Sugino, Y. (1987) Dependence of conformational stability on hydrophobicity of the amino acid residue in a series of variant proteins substituted at a unique position of tryptophan synthase a subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 4441-44.
- [22] Buera, B. C. Meagherb, J. L. Stuckeyb, J. A., and Marsh, E. NG. (2012) Structural basis for the enhanced stability of highly fluorinated proteins. *PNAS.* 109 (13), 4810-15.
- [23] Marques S., Pala H., Alves L., Amaral-Collaco MT., Gama FM., and Gírio FM. (2003) Characterization and application of glycanases secreted by *Aspergillus terreus* CCMI 498 and *Trichoderma viride* CCMI 84 for enzymatic deinking of mixed office wastepaper. *J Biotechnol.* 100, 209-219.
- [24] Tsujibo H., Takada A., Kosaka M., Miyamoto K., and Inamori Y. (2001) cloning, sequencing, and expression of the gene encoding an intracellular  $\beta$ -D-xylosidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Biosci. Biotech. Biochem.* 65, 1824-1831.
- [25] Dornez E., Gebruers K., Cuyvers S., Delcour JA., and Courtin CM. (2007) Impact of wheat flour-associated endoxylanases on arabinoxylan in dough after mixing and resting. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7149-7155.
- [26] Jordan D. B., and Wagschal K. (2010) Properties and applications of microbial  $\beta$ -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1647-1658.
- unfolding kinetics. *Protein Sci.* 19, 670-79.
- [15] Jamnani, F. N., Siadat, O. R., Moradi, S., Borjian, M. T., and Yousefian, S. (2013) Endoglucanase enzyme protein engineering by site-directed mutagenesis to improve the enzymatic properties and its expression in yeast. *J. of Kermanshah Uni. of Medical Sciences*, 17 (8), 473-482.
- [16] Amaki, Y., Nakano, H., and Yamane, T. (1994) Role of cysteine residues in esterase from *Bacillus stearothermophilus* and increasing its thermostability by the replacement of cysteines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 (5), 664-8.
- [17] Kumar, A., Dutt, S., Bagler, G., Ahuja, P. S., and Kumar, S. (2012) Engineering a thermostable superoxide dismutase functional at sub-zero to  $>50$  °C, which also tolerates autoclaving. *Scientific reports*, 2 (387).
- [18] Ken, C. F., Lin, C. T., Der Wen, Y., and Wu. J. L. (2007) Replacement of Buried Cysteine from Zebrafish Cu/Zn Superoxide Dismutase and Enhancement of Its Stability via Site-Directed Mutagenesis. *Marine Biotechnology*, 9, 335-42.
- [19] Goomber, S., Sharma, P. K., Sharma, M., Singh. R., and Kaur, J. (2012) Enhancing thermostability of the biocatalysts beyond their natural function via protein engineering. *Int. J. for Biotechnology and Molecular Biology Res.* 3 (3), 24-29.
- [20] Pace, C.N. (1992) Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J. Mol. Biol.* 226 (1), 29-35.