

افزایش ویژگی‌های عملیاتی آنزیم اندوگلوکاناز از طریق تغییر اسید آمینه‌ای

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 آنزیم سلولاز 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 آنزیم‌های محدود کننده ژن از پلاسمید کلونینگ جدا و به پلاسمید بیانی متصل گردید در مرحله بعد با کمک الکتروپوریشن به داخل مخمر انتقال پیدا کرد و بعد از بیان پروتئین مورد نظر توسط مخمر خصوصیات آنزیمی از جمله pH و دمای ایتیم، ثابت ویژگی و مقاومت حرارتی آن‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: جهش اعمال شده تأثیری بر روی دما و pH ایتیم 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 اتانول در مقیاس صنعتی گردد.

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

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

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

Email: pourzardosht@yahoo.com

مقدمه

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).

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

^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

تغییرات پس از ترجمه مربوط به سلول‌های یوکاریوتی و نیز راحتی دست‌ورزی ژنتیکی. سیستم بیان مخمر پیکیا پاستوریز بر اساس پروموتور (AOX1) می‌باشد و متانول عامل القاگر این پروموتور 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 تریکودرماریسی برای بهبود قابلیت‌هایشان مورد دست‌ورزی قرار گرفته‌اند تا آنزیم‌های حاصله با توانایی‌های بالاتر هزینه‌های مربوطه را کاهش دهند (۱۷).

امروزه جایگزین کردن سیستم‌های 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 ریسی که با ترجیح کدونی مخمر پیکیا پاستوریز طراحی شده است اعمال می‌شود. در طی این تغییر سیستم‌های 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 تریکودرما ریسی (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 سیستمین (TGT) کدون والین (CAT) داشته باشد (جدول ۱).

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) گزولگوزیداز 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 ریسی 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،

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

پرایمرها	توالی پرایمرها
EGIIF-C190V	5'-GTCCTTTGGGTGCTTACGTATCGTTGACATCCACAAC-3'
EGIIF-C190V	5'-GTTGTGGATGTCAACGATAACGTAAGCACCCAAAGAC-3'

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 تأیید حضور ژن در آن‌ها استخراج پلاسمید از آن‌ها کلونی PCR صورت گرفت و بر روی ژل آگارز برده شدند که نتیجه وجود آن را تأیید 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 تأیید وجود پروتئین در محیط، سوپرناتانت 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 سوسترای اختصاصی یعنی سی‌ام سی پر چگال و سوسترای 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 در $\text{pH} = \frac{4}{8}$ 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 پرسم ۵ در غلظت‌های مختلف از سوسترهای 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 سوستر افزوده شد و سپس مخلوط واکنش در شرایط استاندارد قرار داده شد.

سپس واکنش PCR با آنزیم DNA پلیمرز 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 ۱ درصد 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 تأیید حضور جهش‌های مورد نظر در داخل ژن EGII، ژن مورد توالی یابی قرار گرفت و نتایج آن صحت وجود جهش در ژن را تأیید کرد.

برای تکثیر و تمایز، پلاسمید حاوی ژن جهش یافته به داخل باکتری Ecoli.DH5 α 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 تأیید حضور ژن در داخلشان کلونی PCR گذاشته شد و سپس از کلونی‌هایی که وجود ژن در آن‌ها مورد تأیید 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.DH5 α انتقال پیدا کرد و بر روی محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین منتقل شدند. سپس برای تأیید حضور ژن در باکتری کلونی PCR گذاشته 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 ریکامینیشن وارد ژنوم مخمر گردند ابتدا پلاسمید pPINK-EGII-C169V با کمک آنزیم BspI خطی شده سپس با کمک الکتروپوریشن به داخل مخمر انتقال پیدا کرد. سپس مخمرهای

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 ۱ و ۲) و همچنین بهینه دمای فعالیت آنزیم‌ها در دمای ۷۵ درجه بوده است (شکل ۳ و ۴).

کنتیک آنزیمی:

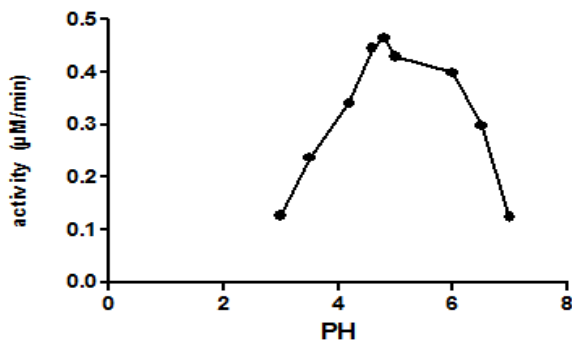
با استفاده از سه سوبسترای سی‌ام سی پر چگال و سی‌ام سی کم چگال و آویسل پارامترهای کنتیکی هر دو آنزیم نوترکیب یعنی V_{max} و K_m بررسی گردید که در جدول (۳ و ۲) ذکر شده است. همان‌طور که از جداول مشخص است K_m آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم اصلی با استفاده از تمام سوبستراها بجز سی‌ام سی کم چگال کاهش نشان می‌دهد و همچنین V_{max} برای تمام سوبستراها برای آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم اولیه افزایش یافته است.

ثابت ویژگی:

V_{max} و K_m 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 V_{max} و K_m 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.

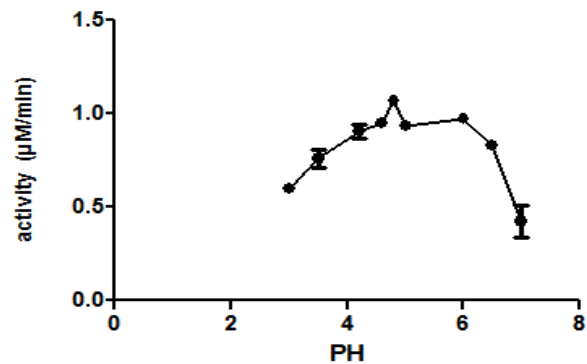
مقاومت حرارتی:

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.



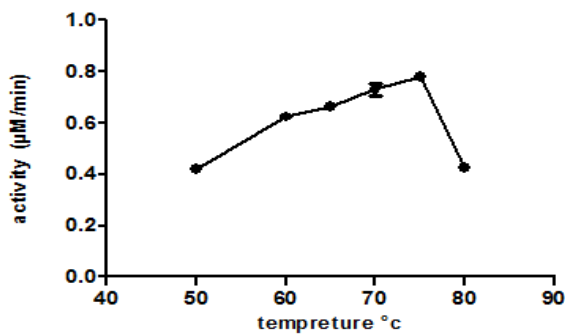
شکل شماره (۱): نمودار PH پروفایل

آنزیم EG II - وحشی



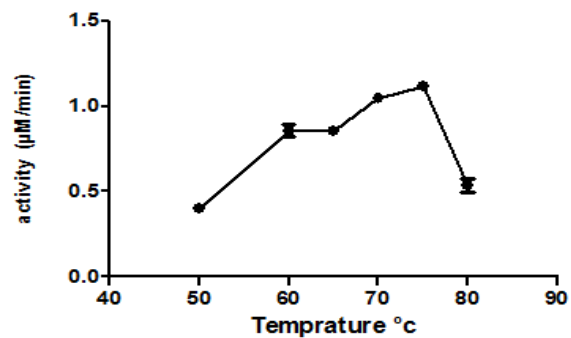
شکل شماره (۲): نمودار PH پروفایل

آنزیم EG II- C169V



شکل شماره (۳): نمودار Temperature

پروفایل آنزیم EG II - وحشی



شکل شماره (۴): نمودار Temperature

پروفایل آنزیم EG II- C169V

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

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

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

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

جدول شماره (۴): ثابت ویژگی برای آنزیم‌های مختلف

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

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

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

بحث و نتیجه گیری

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

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

سویسترا 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:

- Brethauer S, Wyman CE. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresour Technol* 2010;101(13):4862-74.
- Yang B, Wyman CE. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. Wiley Inter Science; 2006.
- 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.
- Mielenz JR, Bardsley JS, Wyman CE. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresour Technol* 2009;100(14):3532-9.
- 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.
- 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.
- 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 crosseana* in *Pichia pastoris*. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008;419-25.
- Bettiga M, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Comparing the xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol Biofuels* 2008;1(1):16.
- Zhang Y-HP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 2006;24:452-81.
- Himmel, Ruth, Wyman. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10(4):358-64.
- Bergensträhle M, Wohler J, Himmel ME, Brady JW. Simulation studies of the insolubility of cellulose. *Carbohydr Res* 2010;345(14):2060-6.
- Qing Q, Yang B, Wyman CE. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology* 2010;101:9624-30.
- 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.
- Quay DHX, Bakar FDA, Rabu A, Said M, Illias RM, Mahadi NM, et al. Overexpression,

- 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.

IMPROVEMENT OF ENDOGLUCANASE ENZYME OPERATING PROPERTIES BY MUTATION IN AMINO ACID

Navid Pourzardosht¹, Bahram Yaghmaei², Ali Akbaradeh³

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

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