

بررسی افزایش پایداری حلالی آنزیم لاکاز باکتریایی با استفاده از تکنیک جهش‌زایی هدفمند

بهنام راسخ^{1*}، خسرو خواجه²، بیژن رنجبر³، نسرين ملانیا⁴،
محمد فاضل فروغیان‌یزدی⁵، بنفشه الماسی‌نیا⁶

1- استادیار بیوشیمی، گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

2- استاد بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران، تهران، ایران

3- استاد بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران، تهران، ایران

4- استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، ایران، سبزوار، ایران

5- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، ایران، تهران، ایران

6- دانشجوی دکتری زمین‌شناسی، مدیریت پژوهش و فناوری، شرکت ملی نفت ایران، تهران، ایران

* تهران، صندوق پستی 137_14665

behnam_rasekh@yahoo.com

چکیده- لاکازها از پلی‌فنل‌اکسیدازهایی هستند که توانایی اکسید کردن تعداد زیادی از ترکیبات فنلیک شامل فنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، ترکیبات آروماتیک آمین‌دار و نیز استخلاف‌های غیرفنلی با استفاده از اکسیژن مولکولی به عنوان پذیرنده نهایی الکترون را دارند. بنابراین، این آنزیم‌ها در فرایندهای بیوتکنولوژی مانند سیستم‌های تصفیه فاضلاب، زیست سالم‌سازی خاک آلوده و غیره کاربرد فراوان دارند. نتایج تحقیقات قبلی نشان از افزایش پایداری دمایی لاکاز باکتری بومی *Bacillus sp. HR03* با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند (SDM) و نقش اسیدآمین E188 در ناحیه لوپ سطحی بین دومین 1 و 2 در مقاومت دمایی آنزیم دارد. هدف از انجام این پژوهش بررسی مقاومت حلالی جهش‌یافته‌های اسیدآمین مذکور در حضور حلال‌های دی متیل سولفوکساید (DMS) و دی متیل فراماید (DMF) می‌باشد. مقایسه پارامترهای ستنیکی از جمله K_{cat} / K_m ، $\Delta\Delta G^\ddagger$ و C50 نشان از افزایش پایداری آنزیم‌های جهش‌یافته نسبت به آنزیم وحشی داشته که کاربرد صنعتی چنین آنزیم‌هایی را سهل‌تر می‌کند.

کلیدواژگان: لاکاز، جهش‌زایی هدفمند، پایداری حلالی.

1- مقدمه

اکسیدازهای آبی‌رنگ³ بوده که همزمان با احیای اکسیژن مولکولی سبب اکسیداسیون طیف وسیعی از ترکیبات آلی از جمله فنل‌ها، پلی‌فنل‌ها و همچنین برخی ترکیبات

لاکازها¹ (EC 1.10.3.2)، پارادی‌فنول؛ دی‌اکسیژن اکسیدور دوکتاز) از اکسیدازهای چند مسی² و معروف به

3. Blue oxidase

1. Laccases
2. Multicopper oxidases

معدنی از طریق انتقال تک الکترون می‌گردند [۱،۲]. این آنزیم‌ها در اغلب گیاهان و قارچ‌ها و نیز در باکتری‌ها یافت شده‌اند [3]. بیشتر ویژگی‌های لاکازها از مطالعات انجام گرفته بر روی لاکازهای قارچی به ویژه گروه بازیدیومیست‌هاست. همچنین در سایر قارچ‌های وابسته به گروه‌های اسکومیست‌ها، دئوترمیست‌ها و قارچ‌های تجزیه‌کننده سلولز تولید لاکاز بررسی و گزارش شده است. تحقیقات صورت گرفته بر روی این آنزیم نشان از دخیل بودن این آنزیم در سیستم شکست ترکیبات لیگنین¹ در قارچ‌هاست. همچنین گزارش‌های متعددی راجع به کاتالیز نمودن واکنش‌های اکسیداسیون ترکیبات غیر فنلی در حضور واسطه‌های احیاء شده² مانند سرین گالدازین³ و ABTS وجود دارد [4]. علی‌رغم گستردگی فراوان لاکاز در پروکاریوت‌ها تنها تعداد معدودی از آن‌ها خالص‌سازی و تعیین خصوصیت شده‌اند. اولین گزارش لاکاز پروکاریوتی مربوط به باکتری *Azospirillum lipoferum* می‌باشد [5]. این آنزیم در ایجاد رنگدانه سلولی و تجزیه ترکیبات فنلی نقش دارد. گزارش دیگر مربوط به لاکاز باکتری دریایی به نام *Marinomonas mediterranea* می‌باشد. این باکتری تولید کننده دو نوع متفاوت پلی فنول اکسیداز بوده که قادر به اکسیده کردن سوبستراهای لاکاز و نیز تیروزیناز است [6]. فعالیت شبه لاکازی در پروتیین‌های باکتریایی دیگری از جمله *CopA* از *Pseudomonas syringae*، *PcoA* از *Escherichia coli* و *EpoA* از *Streptomyces griseus* گزارش شده است [7]. اما بهترین مطالعه در مورد لاکاز باکتریایی، بر روی Cot A است که از جمله پروتئین‌های پوششی اسپور باکتری *Bacillus subtilis* است. این پروتئین 65 کیلو دالتون وزن داشته و در تولید رنگ‌دانه قهوه‌ای اسپور مشارکت می‌کند [8]. همچنین به نظر می‌رسد که این پروتئین وظیفه

محافظت در برابر UV و پراکسید هیدروژن را بر عهده دارد. به هر حال لاکاز علاوه بر نقش اصلی در تجزیه زیستی لیگنین توانایی اکسید نمودن ترکیبات آروماتیک را داشته که این توان با استفاده از مدیتورها افزایش می‌یابد [9 و 2]. در سال 2006 میلادی آزمایشگاه آنزیم‌شناسی دانشگاه تربیت‌مدرس موفق به جداسازی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی لاکاز (cotA) در سویه *Bacillus sp. HR03* بومی ایران شد [10] و تحقیقات برای بررسی و افزایش مقاومت دمایی در این آزمایشگاه در حال انجام است. تلاش‌های متعددی برای افزایش پایداری حرارتی آنزیم‌ها و اخیراً نیز برای شناسایی اسیدآمین‌های مؤثر در مقاومت حلالی لاکاز قارچی و سایر آنزیم‌های باکتریایی و نیز افزایش و بهبود پایداری آن‌ها در شرایط حلالی صورت گرفته که از جمله می‌توان به بررسی نقش اسیدهای آمینه در پایداری لیپاز در حضور حلال‌های آلی اشاره کرد که به کمک روش جهش‌زایی هدفمند بر روی لیپاز وحشی، جهش‌های پایدارتر در حضور حلال‌های آلی از جمله DMSO حاصل شد [11]. گزارش‌های متعددی از بررسی پایداری و فعالیت لاکازهای سویه‌های مختلف قارچی در حضور حلال‌های آلی از جمله اتانل و دی اکسین وجود دارد [12]. همچنین تحقیقات دیگری بر روی لاکاز قارچی در حالت تثبیت شده و در حضور حلال‌های آلی صورت گرفت و فعالیت این آنزیم در هر دو حالت آزاد و تثبیت شده و در حضور حلال‌های آلی مقایسه شده است [13]. در تحقیق دیگری فعالیت لاکازهای قارچی در سیستم‌های حلالی سه‌تایی⁴ بررسی گردید که بیشترین پایداری آنزیم‌ها در سیستم‌های مبتنی بر مونوترپن گزارش شد و در سایر حالت‌ها فعالیت و پایداری آنزیم به دلیل کاهش دسترسی سوبسترا به ریز محیط آنزیمی، کاهش می‌یابد [14].

انجام واکنش‌های آنزیمی در حضور حلال‌های آلی

1. Ligninolytic
2. Mediator
3. Syringaldazine

4. Ternary System

چندین پیامد جذاب صنعتی دارد که برخی از آنها عبارتند از: افزایش حلالیت سوبستراهای غیرقطبی، بازگشت از تعادل ترمودینامیکی در واکنش‌های هیدرولیزی، حذف و خاموش شدن واکنش‌های جانبی وابسته به آب، تناوب در ویژگی سوبسترا و آنانتیومر شدن ایزومرها، حذف آلودگی-های میکروبی، از سویی دیگر استفاده از آنزیم‌ها در محیط آلی محدودیت‌هایی دارد چون فعالیت و پایداری بیشتر آنزیم‌ها در حلال‌های آلی کاهش می‌یابد [15].

روش‌های مختلفی برپا ارتقای فعالیت و یا پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی وجود دارد که از مهمترین آنها می‌توان به تولید آنزیم‌های پایدار از طریق دستکاری ژنتیکی موجودات مزوفیل، پایدارسازی آنزیم‌های غیرپایدار از طریق روش‌های مهندسی پروتئین، اصلاح و تغییر شیمیایی، تثبیت بر روی پایه‌های غیر محلول و مهندسی محیط [16] اشاره کرد.

حلال‌های به کار رفته در این تحقیق شامل دی متیل فرمامید که یکی از حلال‌های رایج در صنعت برای انجام واکنش‌های شیمیایی است و کاربرد اصلی این ماده تولید فیبرهای اکریک و پلاستیک‌هاست و حلال دی متیل سولفوکساید که به عنوان حلال در واکنش‌های شیمیایی به ویژه در واکنش‌های جابجایی هسته دوست¹ کاربرد داشته و به میزان گسترده به عنوان حلال استخراج در بیوشیمی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

2- مواد و روش‌ها

تمام محیط‌های کشت و مواد شیمیایی از شرکت مرک و آنزیم‌ها و مواد مورد نیاز دست‌ورزی² ژنتیکی و بررسی خلوص پروتئین از شرکت سینا کلون تهیه گردید.

1-2- دست ورزی مولکول DNA (روش جهش‌زایی هدفمند³):

1. Nucleophile
2. Manipulation
3. Site Directed Mutation

ژن کد کننده لاکاز که از منشأ *Bacillus sp. HRO3* در حامل بیانی pET-21a وارد شده بود به عنوان الگو در این پژوهش استفاده شد [17]. جهش‌زایی هدفمند با استفاده از روش Quick-change که توسط فیشر و همکاران ارائه شده است، انجام شد. جهش‌زایی هدفمند روشی ارزشمند برای مطالعه رابطه ساختار و عملکرد پروتئین، بیان ژن و انجام تغییراتی در وکتور است. این روش اجازه هر نوع تغییر در پلاسمید دو رشته ای را داده و لذا نیاز به کلون مجدد در وکتورهای باکتریوفاژی مبتنی بر M13 و DNA تک رشته‌ای را مرتفع می‌سازد [18].

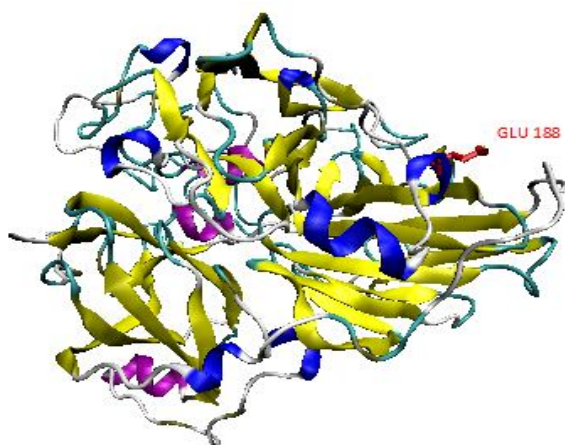
محصول به دست آمده بعد از اتمام واکنش PCR با آنزیم DpnI تیمار می‌شود. آنزیم اندونوکلاز DpnI (ترادف هدف: 5'-Gm6ATC-3') به طور ویژه مولکول‌های متیله و نیمه متیله DNA را برش می‌زند و به منظور هضم DNA الگوی والدی مورد استفاده قرار می‌گیرد تا مولکول‌های DNA ساخته شده حاوی جهش را جدا کند. مقدار اندک مولکول DNA آغازی، صحت بالای آنزیم DNA پلی‌مراز و تعداد کم چرخه‌های گرمایی همگی در بازده بالای جهش و پتانسیل کاهش یافته آن برای ایجاد جهش‌های تصادفی در طی انجام این واکنش مشارکت می‌کنند [19]. محیط کشت رشد و بیان پروتئین‌ها محیط LB همراه با آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب گردید.

2-2- طراحی پرایمر جهش

آنالیز آماری باقی‌مانده‌های سطحی این پروتئین نشان داد که تعداد باقی‌مانده‌های قطبی و به خصوص باردار منفی در بیرونی‌ترین لایه سطحی آن بیشتر از تعداد باقی‌مانده-های غیرقطبی است که در انطباق با عمده لاکازهای تعیین ساختار شده است (شکل 1).

بخاطر اینکه CotA در منطقه سطحی در حفاصل بخش 1 و 2 خود دارای بسته‌های با بار مثبت است و از آنجا که CotA باکتری *Bacillus subtilis* در برابر دما بسیار مقاوم

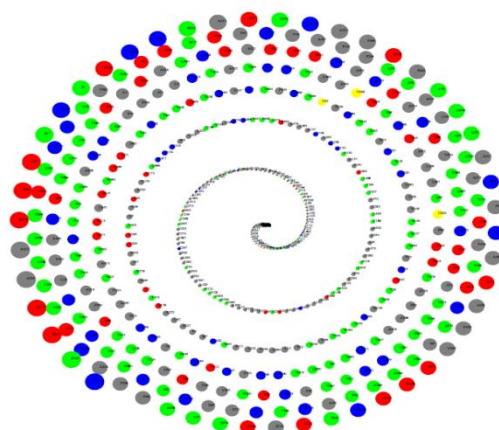
LB همراه با میزان 100 میلی گرم در لیتر آمپی سیلین (37°C , 125 rpm) تهیه و پس از رسیدن به دانسیته نوری 0.4-0.6 حرکت شیکر قطع گردید. به این پیش کشت ها CuSO_4 با غلظت نهایی 2 میلی مولار و IPTG با غلظت 0/1 میلی مولار برای القا اضافه شد. برای به دست آوردن بهترین شرایط بیان با مقادیر بالایی از پروتئین محلول و فعال، سلول ها تحت شرایط نیمه هوازی در دمای 37°C گرماگذاری شدند. ارلن ها به مدت 4 ساعت با دور rpm 120 هوادهی شدند، سپس 20 ساعت بدون دور در دمای 18°C نگهداری شدند.



شکل 2 دیاگرام ریپونی مدل ساخته شده بر اساس ساختار کریستالی لاکاز *Bacillus subtilis* (کد بانک اطلاعات پروتئین: GSK1) که موقعیت اسیدآمینه گلو تامیک اسید 188 آنزیم را نشان می دهد.

محتویات هر ارلن خارج شده از انکوباتور در داخل فاکون ها تقسیم و سانتریفیوژ شد (8000 g و 20 دقیقه)، توده باکتری برای مطالعات بعدی مورد استفاده گردید. در مرحله بعد رسوب به دست آمده در بافر فسفات 50 میلی مولار pH 7 حاوی مهار کننده پروتئاز PMSF (1mM) محلول و بر روی یخ سونیکیت² شد. سلول های شکسته شده با سانتریفیوژ ته نشین شدند (8000 g و 20 دقیقه و 4°C). از آنجا که این پروتئین در دمای 70°C تا حدودی

است و این آنزیم قرابت زیادی از نظر توالی آمینواسید و ساختار با لاکاز مطالعه شده از *Bacillus sp.* HR03 دارد (98% همولوژی ساختاری با این آنزیم نشان می دهد)، ارتباط بین این گروه های با بار مثبت و پایداری دمایی آنزیم بررسی و مورد تأیید قرار گرفت. انتخاب اسیدآمینه مورد نظر در ناحیه 176-189 توسط دو سرور I-Mutant و Eris انجام گردید و در نهایت یک جایگاه (Glu188) انتخاب شد و به لیزین و آرژنین (اسیدآمینه باردار مثبت) و آلانین (اسید آمینه بدون بار) تبدیل شد. در مطالعات قبلی انجام گرفته افزایش پایداری این جهش های در مقایسه با سویه وحشی کاملاً تأیید شده بود (شکل 2) [20].



شکل 1 مدل ASAView لاکاز که میزان حضور باقی مانده های باردار منفی را در سطح پروتئین نشان می دهد. دایره های قرمز، آبی، سبز و خاکستری به ترتیب نشان دهنده اسیدهای آمینه با بار منفی، بار مثبت، قطبی بدون بار و آب گریز است.

2-3- بیان و خالص سازی آنزیم ها

سطح بیان ژن لاکاز بستگی به شرایط محیط دارد. برای القاء باکتری و بیان پروتئین نوترکیب از روش نیمه هوازی¹ استفاده شد. به صورت جداگانه پیش کشت سلول های *E. coli* BL21 محتوی هر یک از جهش های مورد نظر در ارلن دو لیتری حاوی 450 میلی لیتر محیط

2. Sonicate

1. Microaerobic

مقاومت نشان می‌دهد پس محلول رویی در این دما، 15 دقیقه حرارت دیده و برای حذف پروتئین‌های واسرشت شده سانتریفیوژ گردید (g 13000 و 10 دقیقه و 4°C) [17و20].

4-2- روش تخلیص پروتئین

به منظور خالص‌سازی آنزیم‌ها از دستگاه FPLC (Amersham Pharmacia) استفاده شد. پس از آماده‌سازی ستون تعویض آنیونی Q-سفارز و به تعادل رساندن آن با بافر فسفات (20 mM و pH 7,6) محلول آنزیمی تغلیظ شده بر روی ستون بارگذاری شد و با استفاده از ایجاد یک گرادیان خطی 0-1 مولار سدیم کلراید در بافر مشابه، پروتئین‌های حاوی فعالیت لاکازی جمع‌آوری و به وسیله اولترافیلتراسیون (cut off filter 10kDa amicon) تغلیظ شدند. برای سنجش مقدار پروتئین از روش برادفورد¹ استفاده گردید و خلوص با استفاده از ژل SDS-PAGE بررسی شد [17و20].

5-2- سنجش فعالیت آنزیمی در حضور حلال‌های آلی

برای سنجش فعالیت آنزیم و تعیین پارامترهای سینتیکی، از غلظت‌های مختلف سوبسترای ABTS^2 در طول موج 420nm ($\epsilon=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده شد [21]. فعالیت سینتیکی لاکاز طبیعی و جهش‌یافته‌ها با استفاده از این سوبسترا و با رسم و بررسی منحنی‌های لینهور-برک³ مقدار $V_{\max}$ ، k_{cat} ، k_{cat}/K_m محاسبه شد. مقدار $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ (تغییر در انرژی پایدار سازی حالت گذار) مطابق رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\Delta\Delta G^{\ddagger} = -RT \ln [(k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{mutant}} / (k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{wild type}}]$$

مخلوط واکنش میزان 10% حجمی از هریک از حلال‌های آلی، 290 μL از 100 mM بافر فسفات-سیترات (pH 4).

35 μL از محلول 4mM ABTS (سوبسترا) و 35 μL از هریک از آنزیم‌های خالص شده (غلظت نهایی 1 $\mu\text{g/mL}$) با حجم نهایی 400 μL تهیه شد [22].

6-2- بررسی اثر غلظت حلال آلی بر روی فعالیت و

غیر فعال شدن دمایی در حضور حلال آلی

غلظتی از هریک از حلال‌ها که در آن 50% از فعالیت آنزیم مختل می‌شود (C_{50}) برای هر یک از جهش‌ها و نیز آنزیم وحشی محاسبه گردید. برای محاسبه این کمیت مخلوط واکنش شامل مقادیر مختلف از حلال‌های آلی (160 μL الی 0)، 35 μL از محلول 4 mM سوبسترا (ABTS)، 35 μL از هریک از آنزیم‌های خالص شده (غلظت نهایی 1 $\mu\text{g/mL}$) تهیه و با استفاده از بافر فسفات-استات 100mM (pH 4) حجم نهایی به 400 μL رسید. همچنین به منظور بررسی غیرفعال شدن دمایی و محاسبه ضریب k_i مخلوط واکنش شامل هر یک از آنزیم‌های خالص شده (غلظت نهایی 1 $\mu\text{g/mL}$)، در بافر فسفات 50 mM، pH 7 و در حضور هر یک از حلال‌های آلی (نسبت حجمی 10%) تهیه و در زمان‌های 0، 5، 10، 30، 60، 90 و 120 دقیقه در دمای 80°C گرماگذاری گردید. هر یک از نمونه‌ها همراه با نمونه شاهد پس از طی زمان مذکور به مدت 30 دقیقه در یخ سرد شد. سپس فعالیت هریک از نمونه‌ها به روش شرح داده شده ارزیابی گردید. لازم به ذکر است که برای اطمینان از صحت آزمایش‌های انجام شده تمامی آنها به صورت سه بار تکرار انجام و میزان انحراف استاندارد برای هر یک از ارزیابی‌ها از طریق نرم‌افزار اکسل محاسبه شد.

3- نتایج

1-3- خالص‌سازی و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی

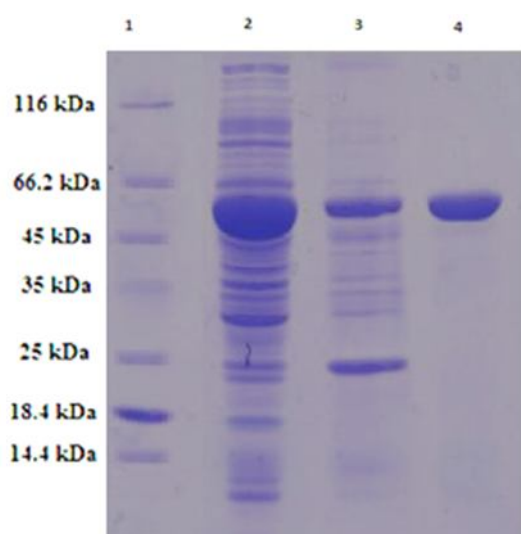
با استفاده از روش بهینه شده کشت در شرایط دمای پایین و کمبود اکسیژن (میکرواثر فیل) بیشترین بیان هر یک از پروتئین‌های مورد نظر به دست آمد. هر یک از آنزیم‌ها

1. Bradford

2. 2, 2'-Azino-Bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid)

3. Lineweaver-Burk

یافته‌ها و آنزیم وحشی اصلاح شده است.



شکل 3 باند پروتئینی در بخش‌های مختلف از مراحل تخلیص با روش SDS-PAGE. 1. مارکر وزن مولکولی، 2. محلول رویی عصاره سلولی پس از سانتریفوژ، 3. پس از شوک حرارتی، 4. پروتئین خالص شده بعد از عبور از ستون Q-سفارز

(جهش و وحشی) خالص گردیده و کلیه پارامترهای بیوشیمیایی مطابق جدول 1 محاسبه شد (شکل 3).

بر اساس نتایج به دست آمده در جدول 1، در محیط آبی (بدون حضور حلال آلی) جهش یافته E188R تنها آنزیمی است که در آن افزایش k_{cat} و بازده کاتالیتیکی و کاهش K_m و نیز کاهش قابل توجهی در انرژی آزاد پایداری حالت گذار ($10.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) ملاحظه گردید. در حالی که در همین شرایط در هر دو جهش یافته E188A و E188K کاهش پارامترهای k_{cat} و بازده کاتالیتیکی و افزایش K_m و افزایش قابل توجهی در انرژی آزاد پایداری حالت گذار نسبت به آنزیم وحشی ملاحظه گردید. همچنین بهبود تمامی پارامترهای سینتیکی در جهش یافته E188R و در حضور حلال DMF مشاهده گردید (جدول 1).

بر اساس نتایج به دست آمده در جدول 1 در جهش یافته E188A و در حضور حلال DMSO تمامی پارامترهای سینتیکی همچنین پارامتر $\Delta\Delta G^\ddagger$ نسبت به سایر جهش

جدول 1 خصوصیات سینتیکی لاکاز (CotA) از باکتری *Bacillus sp.* HR03 و انواع جهش یافته مقادیر حاصل میانگین سه بار تکرار با خطای استاندارد کمتر از 10% می باشد.

		Wild type	E188A	E188K	E188R
Aqueous	K_m (μM)	141/9 $\pm$ 7/5	171/4 $\pm$ 1/7	151/2 $\pm$ 2/2	110/7 $\pm$ 2/8
	k_{cat} (s^{-1})	45/8 $\pm$ 1	21/2 $\pm$ 1/5	1/3 $\pm$ 2/1	98/2 $\pm$ 1/3
	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kcal mol^{-1})	-	9/9	4/6	-10/6
	k_{cat}/K_m	0/32	0/12	0/21	0/9
DMSO	K_m (μM)	198/7 $\pm$ 6/3	163/3 $\pm$ 1/7	186/6 $\pm$ 5/5	175/5 $\pm$ 3/7
	k_{cat} (s^{-1})	15/9 $\pm$ 0/7	63/7 $\pm$ 1/8	39/2 $\pm$ 1	52/7 $\pm$ 1/2
	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kcal mol^{-1})	-	-16/4	-10	-13/7
	k_{cat}/K_m	0/08	0/39	0/21	0/3
DMF	K_m (μM)	185/2 $\pm$ 5/2	153/1 $\pm$ 3/1	137/8 $\pm$ 2/5	179 $\pm$ 4/9
	k_{cat} (s^{-1})	11/1 $\pm$ 0/4	41/3 $\pm$ 1/3	48/2 $\pm$ 1/6	23/3 $\pm$ 1
	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kcal mol^{-1})	-	-15/58	-8/01	-18/27
	k_{cat}/K_m	0/06	0/27	0/13	0/35

نسبت به سایر انواع نشان می‌دهد. میزان افزایش این پارامتر در این جهش‌یافته حدود 6% نسبت به آنزیم وحشی است.

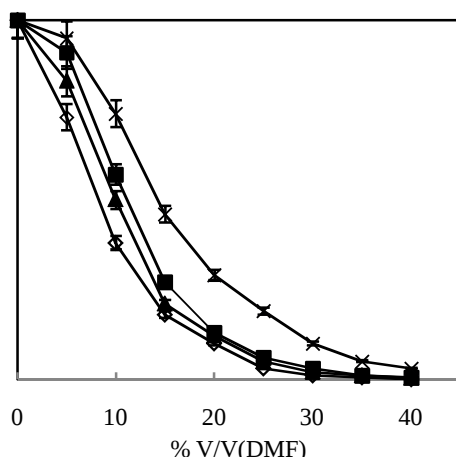
جدول 2 نتایج حاصل از محاسبه میزان C_{50} در لاکاز بومی و جهش‌یافته (% V/V) C_{50}^*

	DMSO	DMF
Wild type	9±0/3	8±0/2
E188A	11±0/5	11
E188K	10	10±0/1
E188R	13±0/1	14±0/3

* C_{50} عبارت است از میزان درصد حجمی حلالی که در آن 50% از فعالیت آنزیم باقی می‌ماند

3-3- نتایج غیرفعال شدن برگشت‌ناپذیر دمای آنزیم‌ها

فعالیت باقی‌مانده هر یک از آنزیم‌ها در دمای 80°C تا زمان 120 دقیقه و در حضور هر یک از حلال‌های آلی و محیط آبی محاسبه و مقایسه گردید (شکل 5). همچنین با استفاده از ABTS به عنوان سوبسترای احیایی، ضریب غیرفعال شدن برگشت‌ناپذیر (k_i) تمامی اشکال آنزیم‌های مطالعه، محاسبه و مقایسه شد (جدول 3).



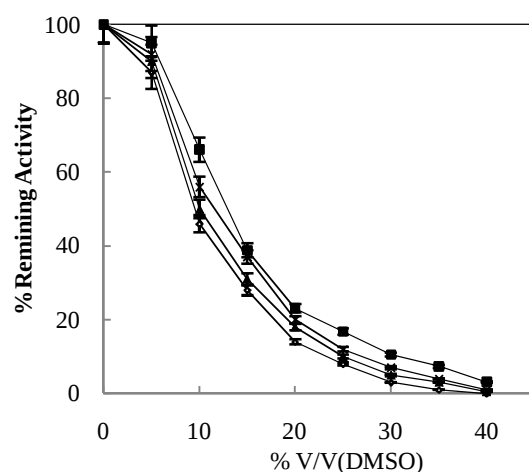
(ب)

3-2- بررسی فعالیت و محاسبه پارامتر C_{50} در حضور حلال‌های آلی

فعالیت آنزیم وحشی و اشکال جهش‌یافته آن در حضور دو حلال آلی و تا چهل درصد حجمی هریک از آنها در بافر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان از کاهش فعالیت تمامی حالت‌های آنزیم، شامل جهش‌یافته و وحشی، با افزایش تراکم حلال‌های آلی به کار رفته دارد (شکل 4).

همانگونه که ذکر گردید C_{50} عبارت از میزان درصد حجمی حلالی است که در آن 50% از فعالیت آنزیم باقی می‌ماند. جدول 2 نشان‌دهنده این پارامتر در حضور حلال‌های آلی مورد آزمایش در آنزیم‌های وحشی و نیز انواع جهش‌یافته است. نتایج افزایش این ضریب در انواع آنزیم‌های جهش‌یافته نسبت به آنزیم وحشی را نشان می‌دهد.

براساس نتایج به دست آمده در این جدول، در حضور حلال DMSO جهش‌یافته E188A بیشترین افزایش (حدود 4%) در پارامتر مذکور نسبت به آنزیم وحشی و نیز سایر انواع جهش‌یافته نشان می‌دهد. در بین جهش‌یافته‌ها و در حضور حلال DMF نوع E188R بیشترین افزایش را



(الف)

شکل 4 درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم‌های مورد مطالعه در حضور حلال‌های آلی و با استفاده از ABTS به عنوان سوبسترا (0: Wild type; ▲: E188K; ■: E188A; ×: E188R) در حضور ال - DMSO و ب - در حضور DMF (میزان انحراف استاندارد 5%)

جدول 3 نتایج ضریب غیرفعال شدن برگشت ناپذیر (k_i)¹ لاکاز وحشی و انواع جهش یافته آن در حضور حلال‌های آلی و دمای 80°C

	$k_i (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$		
	Aqueous media	DMSO	DMF
Wild type	24±3	25±2	132±2
E188A	15±4	19±3	82±3
E188K	13±5	19±3	64±3
E188R	25±4	19±3	124±2

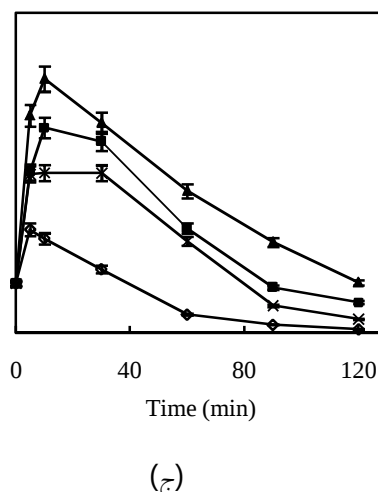
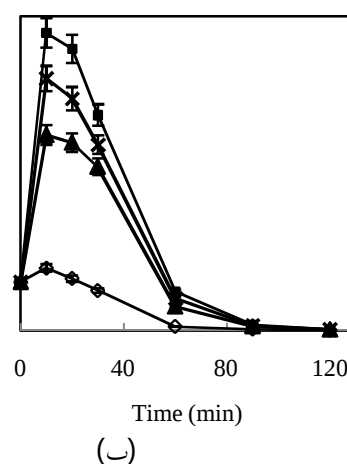
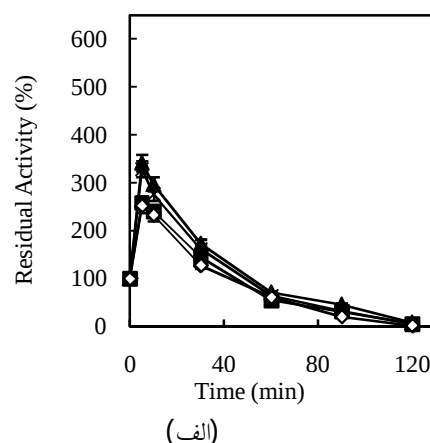
¹ فعالیت هر یک از آنزیم‌ها به صورت خالص در بافر فسفات 50 mM، pH 7، شامل 10% حجمی هر یک از حلال‌های آلی و در دمای 80°C در زمان‌های مختلف ارزیابی گردید.

بر اساس نتایج به دست آمده جهش یافته E188K کاهش قابل ملاحظه‌ای در این پارامتر و در محیط آبی از خود نشان داد. در حضور حلال DMSO انواع جهش یافته پایداری بیشتری در مقایسه با آنزیم وحشی داشته در حالی که در حضور حلال DMF پایداری در جهش یافته E188K مشاهده گردید.

لازم به ذکر است که میزان کاهش ضریب k_i در این جهش یافته به میزان قابل توجهی در مقایسه با آنزیم وحشی (در حدود $68 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) بهبود یافته است.

4- بحث

مطالعات قبلی صورت گرفته و نتایج حاصل از این پژوهش نشان از نقش مهم اسید آمینه موجود در ناحیه سطحی بین دمین 1 و 2 در لاکاز بومی سویه باکتری *Bacillus sp. HR03* داشته به طوریکه با تغییر یکی از اسیدهای آمینه با بار منفی در این ناحیه تمامی پارامتر-های سینتیکی و شاخص‌های C_{50} و k_i و همچنین فعالیت دمایی در حضور حلال‌های آلی بهبود می‌یابد. حلال‌های آلی، از طرق مختلف بر روی فعالیت آنزیم‌ها اثر می‌گذارند که برخی از مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از نوع حلال آلی، میزان آب‌گریزی حلال آلی،



شکل 5 در صد فعالیت باقیمانده آنزیم‌های در حضور حلال‌های آلی دمای 80°C و با استفاده از ABTS به عنوان سوبسترا (◊: Wild type; ▲: E188K; ■: E188A; ×: E188R) الف- در محیط آبی، ب- در حضور DMSO و ج- در حضور DMF (میزان انحراف استاندارد 5% محاسبه شده است)

پیوندهای هیدروژنی و ممانعت استریک [13].

از سوی دیگر چندین برهمکنش غیر کووالان سبب حفاظت از ساختار و عملکرد آنزیم‌ها می‌شوند که از جمله آن‌ها می‌توان به برهم‌کنش‌های آب‌گریز، هیدروژنی و واندروالس اشاره نمود [23 و 24]. تخریب این برهم‌کنش‌ها در نتیجه حضور حلال‌های آلی می‌تواند سبب کاهش فعالیت آنزیم (در شرایط معمولی) گردد. همچنین از عناصر مهم و تاثیرگذار بر فعالیت آنزیم آب دسترس در سطح آنزیم (آب پیوندی) و محتوای آب محیط می‌باشد [13 و 25]. با توجه به این مسئله که اسیدهای آمینه باردار از طریق برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی نیرومند به آب سطحی آنزیم متصل می‌باشند، حضور حلال‌های آلی محلول در آب با توجه به تغییر قطبیت محیط سبب تضعیف این برهم‌کنش‌ها شده و در نتیجه حذف آب سطحی اتفاق می‌افتد [26]. حلال‌های DMF و DMSO دارای $\log p$ کمی هستند، این حلال‌ها با جدا کردن آب ضروری (Essential water) اطراف پروتئین باعث واسرشتگی پروتئین می‌شوند.

- بر اساس نتایج بدست آمده برای جهش‌یافته E188R تمامی پارامترهای مذکور در محیط آبی ارتقا یافته که می‌توان در مورد این جهش‌یافته چنین اظهار کرد که، با وجود فاصله میان اسیدآمینه جهش‌یافته و جایگاه فعال آنزیم، بهبود شاخص‌های سینتیکی ذکر شده در این جهش‌یافته می‌تواند ناشی از تخریب پل‌های نمکی میان اسیدآمینه E188 با اسیدآمینه‌های همسایه R248 و K340 در آنزیم وحشی و شکل-گیری پل نمکی جدید بین اسیدآمینه R188 و اسید-آمینه E246 در حالت جهش‌یافته باشد [20]. که این تغییرات می‌تواند سبب تغییر شکل و اندازه جایگاه اتصال سوپسترا و انرژی سازمان‌دهی مجدد و یا افزایش پتانسیل احیائی و تسهیل در جابجایی سرعت

انتقال الکترون بین سوپسترا و آنزیم شود [27-29].

- ارتقای پارامترهای سینتیکی و مقاومت حلالی و نیز بهبود ضریب غیر فعال‌شدن برگشت‌ناپذیر در جهش‌یافته E188A و در حضور DMSO را می‌توان چنین توجیه نمود که جایگزین شدن اسیدآمینه آب‌گریز آلانین در ناحیه لوپ سطحی و بین دمین 1 و 2 می‌تواند سبب افزایش هیدروفوبیسیته در این ناحیه شده و خود سبب افزایش دمین پکینگ و بهبود پارامترهای مذکور و نیز مقاومت دمایی و مقاومت حلالی در حضور این حلال شود.

- همچنین درباره بهبود قابل ملاحظه در پارامترهای سینتیکی جهش یافته E188K نسبت به آنزیم وحشی و در حضور حلال‌های آلی نیز می‌توان چنین اظهار داشت که جابجایی اسیدآمینه با بار منفی (گلوتامیک) با اسیدآمینه با بار مثبت (لیزین) در این جهش‌یافته و در ناحیه لوپ سطحی می‌تواند منجر به کاهش ممانعت فضایی میان ابر الکترونی اسیدآمینه با بار منفی مذکور از یکسو و سایر اسیدآمینه‌های همسایه با بار منفی از سوی دیگر شود.

- تمامی نتایج به دست آمده در این تحقیق و نیز نتایج حاصل از مطالعات قبلی نشان از ارتباط مستقیم افزایش مقاوت دمایی با بهبود پایداری در حضور حلال آلی دارد.

5- سپاسگزاری

به این وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل حمایت مادی از این تحقیق کمال تشکر را دارد.

از کارشناسان آزمایشگاه آنزیم‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس به ویژه جناب آقای اعتضاد و سرکار خانم دکتر دبیرمنش که بدون راهنمایی‌های علمی ایشان انجام این تحقیق امکان‌پذیر نبود، قدردانی می‌شود.

6- منابع

- Biophysical Research Communications. 400, 384–388.
- [12] Rabinovich, M. L., Bolobova, A.V., and Vasil'chenko, L.G. (2004) Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* Vol. 40, 1–17.
- [13] Wana, Y. Y., Xiaoc, L., Duc. Y. M., Miyakoshi. and T., Chend, C. L. (2010). Effects of Organic solvents on the activity of Rhus laccases. *Int. J. Biol. Macromol.* 47, 488-495.
- [14] Tziaila, A. A., Taha, A. A., Kalogeris, E., Stamatis, H., Aikaterini, A., Emmanuel Kalogeris, E., and Stamatis, H. (2009). Improving the catalytic performance of fungal laccases in monoterpene-based reaction systems. *Biotechnol. Lett.* 31, 1451–1456.
- [15] Noriyuki, D., and Ogino, H. (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal.* 48, 270-282.
- [16] Lye, P. V., Ananthanarayan, L. (2008) Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry.* 43, 1019–1032.
- [17] Mohammadian. M., Fathi-Roudsari, M., Mollania, N., Badoei-Dalfard, A. and K. Khajeh, K. (2010). Enhanced expression of a recombinant bacterial laccase at low temperature and microaerobic conditions: purification and biochemical characterization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 863-869.
- [18] Fisher, C. L., and Pei, G. K. (1997). Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method, *BioTechniques.* 23 (1997) 570-574.
- [19] Sambrook, J., and Russell. D. W. (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, CSHL PRESS, Third Edition, Vol 1-2.
- [20] Mollania, N., Khajeh, K., Ranjbar, B., and Hosseinkhani, S. (2011). Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop. *Enzyme. Microb. Technol.* 49, 446-452.
- [21] Childs, R. E., and Bardsley, W. G. (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2, 2' azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline-6- sulphonic acid] as chromogen. *Biochem. J.* 145, 93-103.
- [22] Wilkinson, A. J., A.R. Fersht, A. R., Blow, D. M., and Winter, G. (1983). Site-Directed Mutagenesis as a Probe of Enzyme Structure and Catalysis: Tyrosyl-tRNA Synthetase Cysteine-35 to Glycine-35 mutation. *Biochemistry.* 22, 3581-3586.
- [23] Schulz, G. E., and R.H. Schirmer, R. H. (1979). *Principles of protein structure*, Springer-verlag. New York.
- [24] Kumar, S., Tsai, C. J., and R. Nussinov, R.
- [1] Piontek, K., Antorini, M., and Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* 277, 37663-37669.
- [2] Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochem.* 35, 7608-7614.
- [3] Messerschmidt, A., and Huber, R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin, modeling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* 187, 341-352.
- [4] Bourbonnais, R., and Paice, MG. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS. Lett.* 267, 99-102.
- [5] Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, ML., and Bally, R. (1993) Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere : evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 108, 205-210.
- [6] Solano, F., Garcia, E., Perez de Egea, E., and Sanchez-Amat, A. (1997). Isolation and characterization of strain MMB-1 a novel melanogenic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3499-3506.
- [7] Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T., and Ueda, K. (2003). Enzymological characterization of Epo A, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* 133, 671-677.
- [8] Couto, S. R., Toca, Herrera J. L (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases. *Biotechnology Advances.* 24, 500-513.
- [9] Camarero, S., Ibarra, D., Martinez M. J., and Martinez, A. T. (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1775-1784.
- [10] Badoei Dalfard, A., Khajeh, K., Soudi, M. R Naderi Manesh, H., Ranjbar, B., and Reza Hassan Sajedi, R. H. (2006). Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme and Microbial Technology.* 39, 1409-1416.
- [11] Kawata, T., and Ogino, H. (2010). Amino acid residues involved in organic solvent-stability of the LST-03 lipase. *Biochemical and*

- [28] Moser, C .C., Dutton, P.L. (1996). In: Protein electron transfer, (Bendall, D.S., ed.), Bios Scientific Publishers Ltd. pp. 1-21.
- [29] Machonkin, T. E., Quintanar, L., Palmer, A. E., Hassett, R., Severance, S., Kosman, D. J., and Solomon, E. I. (2001). Spectroscopy and reactivity of the Type 1 copper site in Fet3p from *Saccharomyce scerevisiae*: correlation of structure with reactivity in the multicopper oxidases. J. Am. Chem. Soc. 123, 5507-5517.
- (2000). Factors enhancing protein thermostability. Protein. Eng. 13, 179-191.
- [25] Zaks, A., and Kilbanov, A. M. (1988). The effect of water on enzyme action in organic media, J. Biol. Chem. 263, 8017-8021.
- [26] Gorman, L. A., Dordick, J. S. (1992). Organic solvents strip water off enzyme, Biotechnol. Bioeng. 39, 392-397.
- [27] Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. Chem. Rev. 96, 2563-2605.