

بررسی بیوترمودینامیکی آنزیم سیکلومالتودکستریناز بومی و برخی جهش‌یافته‌های آن

جمشید مهروند^۱، نسیم حیاتی رودباری^۱، لیلا حسنی^۲، وهب جعفریان^۳ و خسرو خلیفه^۴*

^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، زنجان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی، گروه زیست‌شناسی

^۳ ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۴ ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۵

چکیده

آنزیم سیکلومالتودکستریناز (CDase) متعلق به رده آنزیم‌های درگیر در تجزیه هیدرات‌های کربن است و از مهمترین آنزیم‌های خانواده آمیلازها با کاربردهای بسیار مهم صنعتی محسوب می‌شود. اخیراً یک گونه بومی از این آنزیم شناسایی و گزارش شده است (کد شناسایی: AMB26774). در مطالعه قبلی بر روی این آنزیم و سه جهش‌یافته از آن شامل C127Q، A123V و جهش‌یافته دوگانه مربوطه یعنی A123V/C127Q مشخص شد که اعمال جهش نقطه‌ای در سطح بینابینی زیرواحدها اثرات ساختاری و عملکردی دارد. در این مطالعه مجموعه کاملی از بررسی‌های آزمایشگاهی و روش‌های مدل‌سازی برای مشخص کردن رفتار ترمودینامیکی سویه‌های آنزیم در آزمایش‌های واسرشتگی شیمیایی با استفاده از گوانیدینیوم کلراید (GdmCl) به عنوان ماده شیمیایی واسرشته‌کننده ساختار انجام شد. مشخص شد که پروتئین وحشی با بیشترین مقدار ΔG^{H_2O} در مقایسه با جهش‌یافته‌ها پایدارترین سویه است. به نظر می‌رسد که جایگزینی باقیمانده‌ها در سطح بینابینی رشته‌ها باعث انعطاف‌پذیری بیشتر زنجیره‌ها نسبت به یکدیگر و سهولت نفوذ و میانکنش گوانیدینیوم کلراید با آنزیم‌های جهش‌یافته در مقایسه با نوع وحشی شده است. ما چنین نتیجه‌گیری کردیم که این مناطق نقاط حساسی هستند که می‌توان با دست‌کاری بیشتر آن‌ها باعث سوق دادن آنزیم به سمت پایداری دمایی و شیمیایی شد.

واژه‌های کلیدی: سیکلومالتودکستریناز، آمیلاز، پایداری دمایی، واسرشتگی، بیوترمودینامیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۴۳۳۰۵۲۵۳۱، پست الکترونیکی: v.jafarian@znu.ac.ir, khalifeh@znu.ac.ir

مقدمه

آنزیم‌های آمیلولیتیک (Amylolytic Enzymes) جزو مهمترین دسته آنزیم‌های صنعتی و زیست‌فناوری به شمار می‌آیند و امروزه جداسازی این آنزیم‌ها از میکروارگانیزم‌های ترموفیل (Thermophile) بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از طرف دیگر، آنزیم‌های مقاوم به گرما دارای اهمیت بسیاری در صنعت می‌باشند، چرا که برای اهداف تجاری مختلف استفاده می‌شوند. در این میان آنزیم‌های خانواده آلفا-آمیلاز (α -Amylase) یکی از مهمترین آنزیم‌ها

های صنعتی محسوب می‌شوند که در حدود ۲۵ درصد از بازار آنزیم‌های مورد استفاده در صنایعی مانند صنایع غذایی، نساجی، کاغذسازی، نانوبی و مهم‌تر از همه داروسازی و تولید پودرهای شستشو را به خود اختصاص داده‌اند (۴، ۲۵، ۲۰ و ۲۹). انواع بسیار زیادی از آمیلازهای طبیعی، با خواص منحصر به فرد جداسازی شده و در صنعت نشاسته کاربردهای مختلفی را به خود اختصاص داده‌اند. بسیاری از ویژگی‌های ساختاری این پروتئین‌ها

شده است. در مقام مقایسه، این آنزیم‌ها در هیدرولیز نشاسته و پلولان ناکارآمد می‌باشند (۳، ۱۵ و ۱۶). اعضای این خانواده قادر به هیدرولیز حداقل دو مورد از سه نوع سوبسترای نشاسته شامل سیکلودکسترین‌ها، پلولان و نشاسته هستند و با همین ویژگی از یک آلفا آمیلاز معمولی متمایز می‌شوند (۱۵). سیکلومالتودکستریناز همچنین قادر به عمل بر روی سایر سوبستراهای مرتبط مانند نشاسته و پلولان (Pullulan) است، اما CDها اختصاصی‌ترین سوبسترا نسبت به سایر سوبستراها هستند (۲۱). با توجه به ویژگی‌پذیری سوبسترای CDase بر روی آمیلوز و آمیلوپکتین، CDase برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی به ویژه تولید نشاسته بدون آمیلوز یا دارای مقادیر مختلف آمیلوز پیشنهاد شده است. نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین در نشاسته برنج عمدتاً بر طعم برنج پخته تأثیر می‌گذارد. علاوه بر این، برنج کم آمیلوز، ۵ تا ۱۵ درصد آمیلوز، برای برنج پخته منجمد مناسب است (۲۲). علاوه بر این، Auh و همکاران گزارش کردند که تیمار با CDase به طور قابل توجهی رتروگریداسیون برنج پخته شده را به تعویق می‌اندازد، زیرا مقدار قابل توجهی از آمیلوز توسط عمل آنزیم تجزیه می‌شود (۷). این آنزیم‌ها علاوه بر هیدرولیز، فعالیت سنتزی تحت عنوان ترانس گلیکوزاسیون را به منظور تشکیل مولکول‌های قند با طول‌های مختلف از خود نشان می‌دهند. بنابراین بواسطه شکل باریک و شکاف عمیق در جایگاه فعال ساختار دایمرها این آنزیم‌ها، هدایت مولکول‌های کوچکی مانند سیکلودکسترین نسبت به نشاسته به طرف این آنزیم بیشتر است. از سوی دیگر، فضای بزرگی در پایین شکاف جایگاه فعال کشف شده است که می‌تواند مولکول‌های کوچک قند را برای واکنش-های ترانس گلیکوزاسیون جای دهد. در حال حاضر با توجه به این یافته‌ها، می‌توان دریافت که چگونه دو نوع فعالیت کاتالیتیکی مختلف (به عنوان مثال، هیدرولیز و ترانس گلیکوزاسیون) در جایگاه فعال آنزیم رخ می‌دهد (۳). ساختار مونومر سیکلومالتودکستریناز دارای یک دُمین

مشترک هستند. با این حال، آمیلازها را می‌توان با توجه به برش نشاسته، فعالیت‌های ترانس گلیکوزاسیون یا حلقوی-سازی و سایر ویژگی‌های ساختاری تقسیم بندی کرد (۹، ۱۱ و ۱۳). به دلیل تنوع بالا و شیوه‌های عملکرد مختلف، پایگاه اطلاعاتی تخصصی با عنوان CAZY (Carbohydrate degrading enzymes) حاوی اطلاعات ساختاری و عملکردی این آنزیم‌ها بوده و براساس ویژگی‌های ساختاری این آنزیم‌ها را دسته‌بندی نموده است (۶). براساس این تقسیم‌بندی، خانواده آلفا آمیلاز (خانواده گلیکوزید هیدرولاز ۱۳) یکی از پنج ساختار خانواده تجزیه‌کننده هیدرولایتیکی نشاسته است و دربرگیرنده آنزیم‌هایی با فعالیت اختصاصی بر روی اتصال‌های گلیکوزیدی $\alpha(1-4)$ و $\alpha(1-6)$ نشاسته است. اعضای خانواده گلیکوزید هیدرولاز ۱۳، آنزیم‌های چند دُمینی $(\alpha/\beta)_8$ خمیره‌مانند (Barrel-like) هستند و با داشتن ساختاری بسیار متنوع، به تعدادی سوبستراهای اختصاصی نیز نیاز دارند (۲۳). سیکلومالتودکستریناز (Cyclomaltodextrinase) با علامت اختصاری CDase (EC 3.2.1.54) هیدرولیز سیکلودکسترین‌ها (CDs) را کاتالیز می‌کند. این ترکیب یک ساختار حلقه بسته متشکل از ۶، ۷ یا ۸ باقی‌مانده گلوکز است که از طریق پیوندهای آلفا- (۴و۱) به هم متصل شده‌اند (۲۸). از خانواده گلیکوزید هیدرولاز ۱۳، سه گروه از آنزیم‌ها با عنوان‌های سیکلومالتودکستریناز، مالتوزینیک آمیلاز (EC 3.2.1.133) و نئوپولولاناز (EC 3.2.1.135) موثر بر هیدرولیز سیکلومالتودکسترین‌شناسایی شده‌اند. این سه آنزیم تقریباً از لحاظ خواص کاتالیتیکی و ساختار سه بعدی معادل هم هستند. در پایگاه داده‌های عمومی، بیش از ۲۰ نوع آنزیم مانند سیکلومالتودکستریناز، مالتوزینیک آمیلاز یا نئوپولولاناز با همسانی توالی در محدوده ۴۰-۸۶ درصد یافت می‌شود. این آنزیم‌ها با داشتن یک دُمین اضافی در آمین انتهایی از آلفا آمیلازهای معمولی متمایز هستند و ترجیح سوبسترای سیکلومالتودکسترین بیش از نشاسته برای آن‌ها مشخص

جهدش‌های نقطه‌ای در نزدیکی جایگاه فعال آنزیم مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). همچنین از طریق مقایسه توالی این آنزیم و توالی آنزیم‌های همولوگ، و براساس مشاهده نواحی تغییرپذیر در موقعیت‌های خاص توالی، جهدش‌های مورد نظر در بخش بینابینی زیرواحدها طراحی و ساخته شدند و تأثیر جهدش‌ها در پایداری دمایی پروتئین مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). در پژوهش اخیراً، پایداری پروتئین وحشی و جهدش‌یافته‌های مورد نظر در برابر گوانیدینیوم کلراید به عنوان ماده واسرشته‌کننده شیمیایی (Chemical denaturant)، با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و مدل‌سازی مبتنی بر قوانین بیوترمودینامیک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

مواد مصرفی: سوبستراهای آلفا-سیکلودکستین (α -CD)، بتا-سیکلودکستین (β -CD) و گاما-سیکلودکستین (γ -CD)، سدیم پتاسیم تارتارات، CaCl_2 ، ایزوپروپیل‌بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، محیط کشت (LB) و DpnI از شرکت Fermentas (آلمان) خریداری شدند. ستون آگارز-Ni-NTA از QIAGEN (هیلدن، آلمان)، Pfu PCR Permixon، کیت خالص‌سازی PCR و کیت استخراج پلاسمید از Bioneer (کره جنوبی) و کانامایسین از Madison (ایالات متحده) تهیه شده است.

زیست‌شناسی مولکولی: آنزیم سیکلومالتودکستریناز مورد مطالعه در این پژوهش با کد شناسایی آنزیمی EC: ۳,۲,۱,۵۴ از سویه بومی *Anoxybacillus flavithermus subsp. flavithermus strain ZNU.NGA* جداسازی، به‌صورت نوترکیب تولید و در بانک ژن با کد KT633577 ثبت شده است. کلونینگ ژن، ترانسفورماسیون به ایشرشیا کولی و بیان CDase و جهدش‌ها برای کلونینگ در پلاسمید pET28a و برای بیان ژن در BL21 شرکت Invitrogen انجام شده است. مراحل مولکولی مرتبط با

انتهایی آمینی و یک دُمین کربوکسیل انتهایی، متصل به دُمین مرکزی خم‌مره مانند با عنوان تخصصی $(\alpha/\beta)_8$ است. دُمین آمین انتهایی (رزیدوهای ۱-۱۲۳) و کربوکسیل انتهایی (رزیدوهای ۵۰۵-۵۸۳) ترکیب‌بندی منحصر به فردی از رشته‌ها و صفحات بتا هستند (۱۵). پژوهشگران از طریق تکنیک‌های مختلف مهندسی پروتئین، پایداری و فعالیت آنزیم‌ها را برای کاربردهای گوناگون بهبود داده‌اند (۱۰ و ۱۴). در حال حاضر یکی از روش معمول دست‌ورزی آنزیم با در نظر گرفتن سوبسترا و واکنش انتخابی، طراحی و انجام جهدش‌زایی هدفمند است. امروزه انواع مالتوزینیک آمیلازهای با کارایی کاتالیتی بالایی هیدرولیزی، تغییر ویژگی‌پذیری سوبسترای و بهبود ویژگی محصول با جهدش‌زایی ساخته شده‌اند. همچنین با دست‌ورزی آب‌گریزی جایگاه فعال از طریق مهندسی پروتئین، امکان تغییر فعالیت کاتالیتیکی ترانس‌گلیکوزاسیون آنزیم نسبت به فعالیت هیدرولیزی به صورت چشم‌گیری افزایش می‌یابد (۳). پایداری کفورماسیونی پروتئین‌های کروی معمولاً پایین بوده و به طور کلی در محدوده ۵ تا ۱۵ کیلوکالری بر مول است. در اکثر کاربردهای صنعتی، هدف ایجاد آنزیم‌هایی پایدارتر از حالت طبیعی است که بعد از دست‌ورزی هم فعالیت آنزیمی مورد نظر را داشته باشند. چنین تغییر ساختاری ممکن است توسط جهدش‌زایی هدفمند و با تغییر در توالی آمینواسیدی ایجاد شود یا با روش‌های دیگری نظیر تغییر در ساختار یک زنجیره جانبی توسط تغییرات شیمیایی ایجاد گردد (۲۶). روش جهدش‌زایی هدفمند به وفور برای افزایش پایداری حرارتی آنزیم‌های مختلف و از طریق مقایسه توالی همتایان ترموپیل و مزوفیل و یا مطالعه اطلاعات ساختار سه بعدی آنزیم‌ها بکار برده می‌شود (۲۴). در تحقیقات قبلی ویژگی‌های آنزیمی این آنزیم و رابطه تکاملی آن با پروتئین‌های مشابه گزارش شد (۵). در ادامه تحقیقات بر روی این آنزیم، با در نظر گرفتن خواص فیزیکو-شیمیایی آمینواسیدها و موقعیت آن‌ها در ساختار، اثر ساختاری و عملکردی

و هریک از جهش‌یافته‌ها انکوئاسیون شیمیایی در دمای معمولی صورت گرفت. زمان انکوئاسیون ۵ ساعت در نظر گرفته شد. سپس اندازه‌گیری‌های شدت فلورسانس با برانگیختگی در طول موج ۲۸۰ نمت و شدت طیف نشر یافته در فاصله ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر انجام گردید. پهنای باند طول موج تحریکی و نشری هر دو بر روی ۵ نانومتر و سرعت اسکن در ۱۰۰ نانومتر بر دقیقه تنظیم گردید. با رسم تغییرات شدت فلورسانس بر حسب غلظت گوانیدینیوم کلراید منحنی‌های واسرشتگی شیمیایی بدست آمد و در مرحله بعد با پیش‌فرض‌های بیولوژیکی ذکر شده در قسمت نتایج و بحث با استفاده از نرم‌افزار کالیداگراف مدل‌سازی منحنی‌های سیگموییدی واکنش واسرشتگی انجام شد.

نتایج و بحث

مطالعات بیوانفورماتیک و توصیف جهش‌ها: آنزیم‌های درگیر در متابولیسم هیدرات‌های کربن از تنوع بالایی برخوردار بوده و هر نوع از این آنزیم‌ها نیز از منابع مختلفی قابل استخراج و مشخصه‌بندی هستند (۱ و ۲). آنزیم سیکلومالتودکستریناز مورد مطالعه در این تحقیق نیز در زمره آنزیم‌های درگیر در متابولیسم ترکیبات هیدروکربنی بوده و از یک گونه بومی باکتریایی استخراج و کلون شده است. جهت طراحی جهش، ابتدا با استفاده از برنامه BLAST توالی‌های مشابه با توالی پروتئین مورد نظر در این مطالعه (NCBI ID: AMB26774) استخراج شده و از بین آن‌ها تعدادی توالی با درصد تشابه بالای ۷۰ درصد انتخاب شدند. مشاهده نتایج اجرای این برنامه نشان می‌دهد که همه پروتئین‌های بدست آمده در خروجی برنامه متعلق به آنزیم‌های درگیر در فرایندهای بیوشیمیایی مرتبط با کربوهیدرات‌ها هستند. بنابراین بررسی دقیق‌تری بر روی این آنزیم‌ها در پایگاه اطلاعاتی تخصصی آنزیم‌های مرتبط با کربوهیدرات‌ها (CAZy: <http://www.cazy.org>) نیز صورت گرفت تا اطلاعات ساختاری و عملکردی بهتری از

طراحی پرایمرها و شیوه جهش‌زایی هدفمند و همچنین شیوه بیان پروتئین‌ها و مشخصه‌بندی بیوشیمیایی آنزیم‌های نو ترکیب در مقاله قبلی شرح داده شده است (۱۸).

مطالعات بیوانفورماتیک و طراحی جهش: توالی آنزیم مورد نظر در این مطالعه با کد شناسایی AMB26774.1 در پایگاه اطلاعاتی پروتئین‌ها قرار داده شده است. توالی‌های مشابه با این پروتئین از طریق اجرای برنامه BLAST استخراج و انتخاب شدند (۶). همترازی چندگانه (Multiple Sequence Alignment (MSA)) این توالی‌ها با استفاده از برنامه Clustal Omega انجام شد (۱۷). ساختار سه‌بعدی آنزیم وحشی و جهش‌یافته‌ها با استفاده از برنامه MODELLER نسخه 10.2 (۱۲) و با استفاده از فایل ساختاری مبتنی بر تفرق اشعه ایکس از واریانتی از آمیلاز با کد شناسایی ISMA به صورت دایمر ساخته شدند (۱۶). باتوجه به اینکه از هر توالی چندین ساختار بدست می‌آید، بهترین ساختار برای هر پروتئین از طریق تعیین نمره Z برای آمینواسیدهای موجود در ساختار و از طریق اجرای برنامه MODELLER صورت گرفت (۲۷). ترسیم گرافیکی و بررسی ساختاری آنزیم‌ها با استفاده از برنامه Chimera نسخه 1.16 انجام شد.

بررسی ترمودینامیکی واسرشتگی شیمیایی: هدف از انجام آزمایش‌های بیوترمودینامیکی در این مطالعه، بررسی پایداری پروتئین‌ها در برابر واسرشته‌کننده شیمیایی گوانیدینیوم کلراید بود. بررسی تغییرات ساختاری ایجاد شده توسط ماده واسرشته‌کننده با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس صورت گرفت. در این آزمایش‌ها ابتدا نمونه خالص پروتئین‌های تعویض بافر شده و با غلظت ۱ میکرومولار در بافر دیالیز با pH برابر ۷/۰ آماده شدند. سپس محلول گوانیدین هیدروکلراید با غلظت ۶ مولار در بافر دیالیز با pH مورد نظر تهیه گردید و با استفاده از رقیق‌سازی آن با حجم‌های مختلف از بافر در همان pH، از غلظت ۰ تا ۶ مولار با فاصله غلظتی ۰/۵ با پروتئین وحشی

شده است. به همین دلیل آنزیم CDase مورد نظر نیز در مقایسه با آنزیم‌های منتخب از این پایگاه اطلاعاتی مورد آنالیز قرار گرفت. توصیف کامل پروتئین‌های انتخاب شده و همچنین رابطه تکاملی بین آن‌ها در مقاله مربوطه قابل مشاهده است (۱۸).

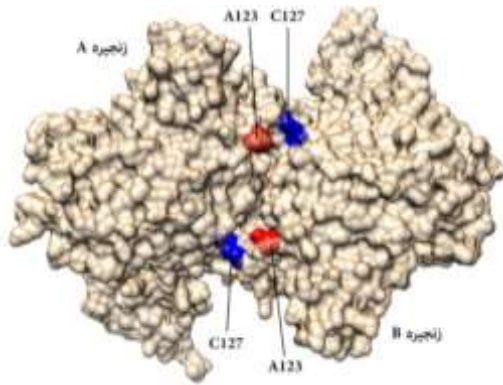
این پروتئین‌ها داشته باشیم. باتوجه به درصد بالای تشابه در توالی و همچنین شباهت‌هایی که در ساختار تاخوردده عملکردی این آنزیم‌ها دیده می‌شود، اعتقاد براین است که همگی این آنزیم‌ها، متعلق به یک ابرخانواده بوده و لذا دارای یک توالی به عنوان جد مشترک هستند که در طول زمان از طریق جهش‌های مختلف به توالی‌های بعدی واگرا

		123	127
Q5BLZ7	KRLQYVFLLEGKGERVYFGE	SGVSKER	.NRAGVFFQYAYIHESALFVTFPEWARD
P29964	KKFVYFFYLVSDDGGEKLYYTE	AGFYKKR	ENHFWGFFHYPPYIGEKDVFVFAPEWTS
AMB26774	RRRLRYGFELHAE.NEVLIYTE	KGFYQ	EAP TDDTAYYFCFPFLNHADVFCAPAWVKD
WP_003395492	RRRLRYGFELHAK.NEVLIYTE	KGFYQ	EAP TDDTAYYFCFPFLNHADVFCAPAWVKD
Q5BLZ6	RRRLRYGFELVSG.NERCVIYTE	KGFFH	EAP IDDDIAYYFCFPFLNRIDVHFAPTWVKD
WP_027408977	RRRLRYGFELLAE.SKRIIYTE	KGFYD	EVPCDDTAYYFCFPFLNKADIFQAPDVKD
Q68KL3	RRRLRYGFELTAG.SETIVYTE	KGFYNE	EAP TDDTAYYFCFPFLNKIDVHFAPDVKD
AKU27292	RRRLRYGFVLRAG.GEQLVYTE	KGFYH	EAP SDDTAYYFCFPFLHRRVDFLQAPDVKD
AKM17981.1	RRRLRYGFVLRAG.GEQLVYTE	KGFYH	EAP SDDTAYYFCFPFLHRRVDFLQAPDVKD
AAC15072	RRRLRYGFVLRAG.GEQLVYTE	KGFYH	EAP SDDTAYYFCFPFLHRRVDFLQAPDVKD
WP_021322528	RRRLRYGFVLRAG.GEQLVYTE	KGFYH	EAP SDDTAYYFCFPFLHRRVDFLQAPDVKD
Q52PU5	RRRLRYGFVLRAG.GEQLVYTE	KGFYH	EAP SDDTAYYFCFPFLHRRVDFLQAPDVKD
ADM86931	RRRLRYGFVLRAG.GEQLVYTE	KGFYH	EAP SDDTAYYFCFPFLHRRVDFLQAPDVKD
Q9A1V2	RRRLRYGFVLYSG.EEKLVIYTE	KGFYF	EAP IDDDTAYYFCFPFLHRRVDFLQAPDVKD
O82982	RRRLRYGFKLTSE.DETLYYTE	KGFYET	AP TDDTAYYFCFPFLINPVDIFQAPDVKD
CAL64396	RRRLRYGFELISDG.KTKSTYTE	RGFFA	ADSP.KDTSYFFCFPFLNGIDVFDAPDVKD
Q57482	RRRLRYGFELHSD.DQCLVYTE	DGFKE	KDP.KNAHFFVFLFLNGNDVFTAPEWVKD
F32818	RRRLRYGFIVNDR.KDSTCFTE	KGFYF	PPVNDISYFFSFPYVNDQADVFQAPDVKD
Q59226	RRVKYGFLLQQG.HEKRWMT	YDFL	TEPPRNPDRLFEYFFINPVDVTFQAPDVKD

شکل ۱- بخشی از فایل هم‌ترازی چندگانه توالی‌ها. توالی‌های مورد نظر برای مقایسه از طریق اجرای برنامه BLAST و با استفاده از توالی پروتئین سیکلوماتلودکستریناز با کد شناسایی AMB26774 به عنوان ورودی یافت شدند. هم‌ترازی توالی‌ها توسط برنامه ClustalOmega صورت گرفت و خروجی این برنامه به عنوان ورودی در برنامه ESPript به کار گرفته شد تا ترسیم گرافیکی مناسبی بدست آید. محل انجام جهش در شکل با علامت فلش مشخص شده است.

باین پیش‌فرض، اعتقاد بر این است که دست‌کاری نواحی با حفاظت‌شدگی بالا معقول نبوده و می‌تواند باعث تولید آنزیمی با ساختار غیرطبیعی و فاقد عملکرد باشد، مگر اینکه در شرایط مختلف از نظر پارامترهای بیوشیمی- فیزیکی بررسی شده و شرایط مناسب برای ایجاد ساختار تاخوردده عملکردی آن‌ها را پیدا کرد. به همین دلیل توجه ما در طراحی جهش بیشتر بر روی نقاطی متمرکز می‌شود که درجاتی از تغییرپذیری در طول تکامل را نشان دهند. نکته دیگری که در شکل نمودار ۱ وجود دارد این است که در موقعیت‌های دارای تغییرپذیری، باقیمانده‌های آمینواسیدی مشاهده شده در هر موقعیت ممکن است از نظر خواص بیوفیزیکی نظیر اندازه شاخه جانبی، فضای کنفورماسیونی، آبگریزی و یا قطبیت شاخه جانبی مشابه و یا متفاوت باشند که شیوه رنگ‌بندی کاراکترهای

دقت در شکل نمودار ۱ که بخشی از توالی کامل آنزیم‌ها را در بر می‌گیرد، نشان می‌دهد که در برخی موقعیت‌های توالی‌های مورد مقایسه، حفاظت‌شدگی بالایی دیده می‌شود، که بیانگر اهمیت بالای باقیمانده‌های حفاظت‌شده در ساختار و عملکرد آنزیم‌ها می‌باشد. به عبارت دیگر جهش‌های تصادفی ایجاد شده در این موقعیت‌ها برای موجود حاوی آنزیم، کشنده بوده و لذا اکنون شاهد حضور این تغییرات در توالی آنزیم‌های موجود در طبیعت نیستیم. یکی از دلایل این وضعیت می‌تواند ناشی از عدم سازگاری این جهش‌ها با شرایط زیست-محیطی حاکم بر موجودات در طول فرایند تکامل بوده است، به طوری که اگر زمین شرایط زیست محیطی دیگری را تجربه می‌کرد این احتمال وجود داشت که در باقیمانده‌های آمینواسیدی مشاهده شده در فایل هم‌ترازی توالی‌ها وضعیت دیگری را شاهد باشیم.



شکل ۲- ساختار سه‌بعدی آنزیم CDase با تاکید بر موقعیت جهش‌ها. ساختار آنزیم CDase با استفاده از الگوی ساختار مبتنی بر بلورنگاری اشعه ایکس با کد ساختاری ISMA و به صورت دایمر با دو زنجیره مشابه ساخته شده است. موقعیت باقیمانده‌های آمینواسیدی منتخب برای اعمال جهش یعنی جایگاه‌های ۱۲۳ و ۱۲۷ در هر زنجیره به ترتیب با رنگ‌های قرمز و آبی مشخص شده‌اند. برای سهولت مشاهده موقعیت‌های مورد نظر و میزان دسترس‌پذیری آن‌ها، ساختار پروتئین به حالت فضاپرکن نشان داده شده است. ترسیم گرافیکی شکل پروتئین و شیوه نمایش ساختار با استفاده از برنامه Chimera صورت گرفته است.

در نزدیکی همین آمینواسید و در موقعیت ۱۲۷ از فایل همترازی توالی‌ها، (نمودار ۱) در آنزیم CDase باقیمانده آمینواسیدی سیستمین وجود دارد و در موقعیت مشابه در آنزیم‌های دیگر این ابرخانواده تنوعی از آمینواسیدها مشاهده می‌شود. با توجه به قطبی بودن سیستمین، از بین آمینواسیدهای باردار، آبگریز و قطبی موجود در این ستون تکاملی، به نظر می‌رسد که گلوتامین مناسب‌ترین گزینه برای جایگزینی است، بنابراین جهش دوم با عنوان C127Q در این نقطه تعریف گردید. در این طراحی، عدم درگیر بودن سیستمین در میانکنش دی‌سولفید نیز در نظر گرفته شد. جهش دوگانه‌ای مشتمل بر اعمال همزمان هر دوی این جهش‌ها (A123V/C127Q) نیز برای بررسی اثر همزمان دو جهش طراحی گردید.

مطالعات ترمودینامیک: در مطالعه ترمودینامیکی قبلی بر روی این آنزیم و جهش‌یافته‌های آن، پایداری این واریانت‌های آنزیمی در برابر پارامتر دما مورد بررسی

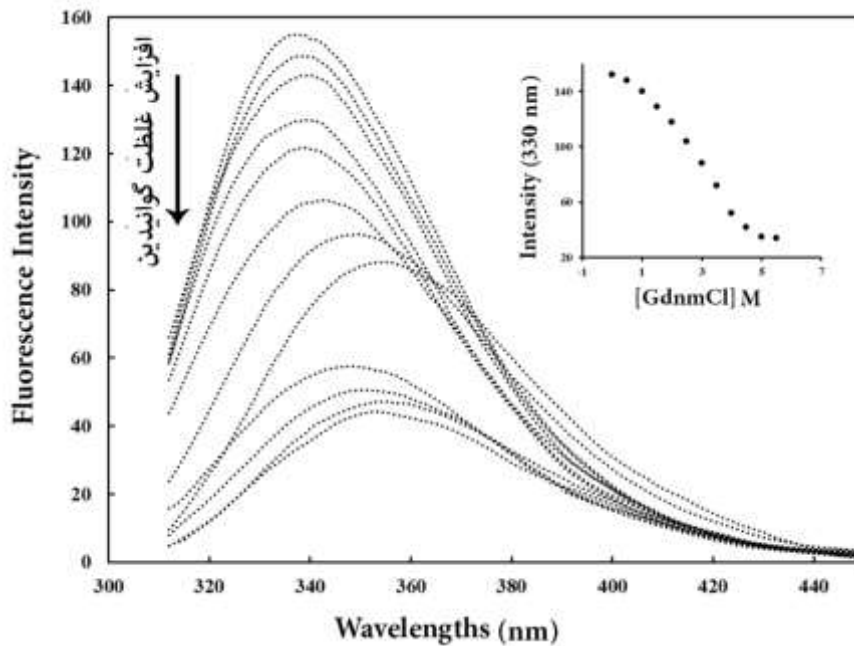
آمینواسیدی بازتابی از این موضوع است. با در نظرگرفتن همه این موارد و همچنین بررسی ساختار آنزیم CDase، (که در قسمت بعد اشاره خواهد شد) موقعیت‌های ۱۲۳ و ۱۲۷ در آنزیم CDase که به ترتیب توسط آمینواسیدهای آلانین و سیستمین اشغال شده‌اند، برای انجام عمل جهش‌زایی هدفمند انتخاب شدند. با در نظر داشتن پیش‌فرض‌های اشاره شده، در موقعیت ۱۲۳ مجوز تبدیل آلانین به یکی از آمینواسیدهای سرین، لیزین، ایزولوسین، والین و آسپارژین وجود دارد. آمینواسیدهای سرین، لیزین و آسپارژین در خط تکاملی مربوطه با رنگ متفاوت نشان داده شده‌اند که نشان دهنده متفاوت بودن این آمینواسیدها نسبت به آلانین است. به همین دلیل آمینواسیدهای ایزولوسین و والین برای انتخاب نهایی باقی می‌ماند که با توجه به اختلاف سایز این دو آمینواسید، علیرغم خواص مشابه فیزیکی-شیمیایی دیگر، برای انتخاب نهایی باید موقعیت آن‌ها را در ساختار پروتئین مشخص کنیم.

با توجه به اینکه آنزیم CDase فاقد ساختار سه‌بعدی تعیین‌شده به روش‌های آزمایشگاهی است، ساختار آن با استفاده از برنامه MODELLER مدل‌سازی شد. نمودار ۲ تصویری از ساختار سه‌بعدی آنزیم است که در آن موقعیت ۱۲۳ نیز مشخص شده است.

دقت در شکل ۲ نشان می‌دهد که موقعیت ۱۲۳ در آنزیم وحشی CDase که آمینواسید آلانین را شامل می‌شود، در حفاصل دو زنجیره قرار داشته و تا حدی در معرض مولکول‌های قطبی آب است. بنابراین به نظر می‌رسد که از بین دو گزینه والین و ایزولوسین (با توجه به تحلیل نمودار ۱)، والین شرایط مناسب‌تری برای جایگزینی دارد، چرا که زنجیره جانبی و آبگریز ایزولوسین نسبت به والین بزرگ‌تر بوده و از نظر ترمودینامیکی تماس آن با سطح قطبی پروتئین نامطلوب‌تر است. بنابراین، جهش A123V به عنوان اولین جهش معرفی شد.

طیف‌های فلورسانس ذاتی آنزیم CDase نوع وحشی پس از انکوباسیون در غلظت‌های مختلف گوانیدینیوم کلراید آورده شده است. همانطور که انتظار می‌رود توام با افزایش غلظت ماده شیمیایی غیرطبیعی کننده ساختار، شدت فلورسانس ذاتی کاهش پیدا کرده و این کاهش توام با جابجایی به سمت طول موج‌های بزرگ‌تر است.

قرارگرفت و با تحلیل نتایج مشخص شد که میانکشی‌های مرتبط با موقعیت‌های ۱۲۳ و ۱۲۷ در پایداری دمایی پروتئین نقش دارند. مطالعه ترمودینامیکی در این تحقیق شامل بررسی پایداری ساختاری آنزیم وحشی و جهش‌یافته‌های CDase در برابر گوانیدینیوم کلراید به عنوان واسرشته‌کننده شیمیایی ساختار است. در نمودار ۳

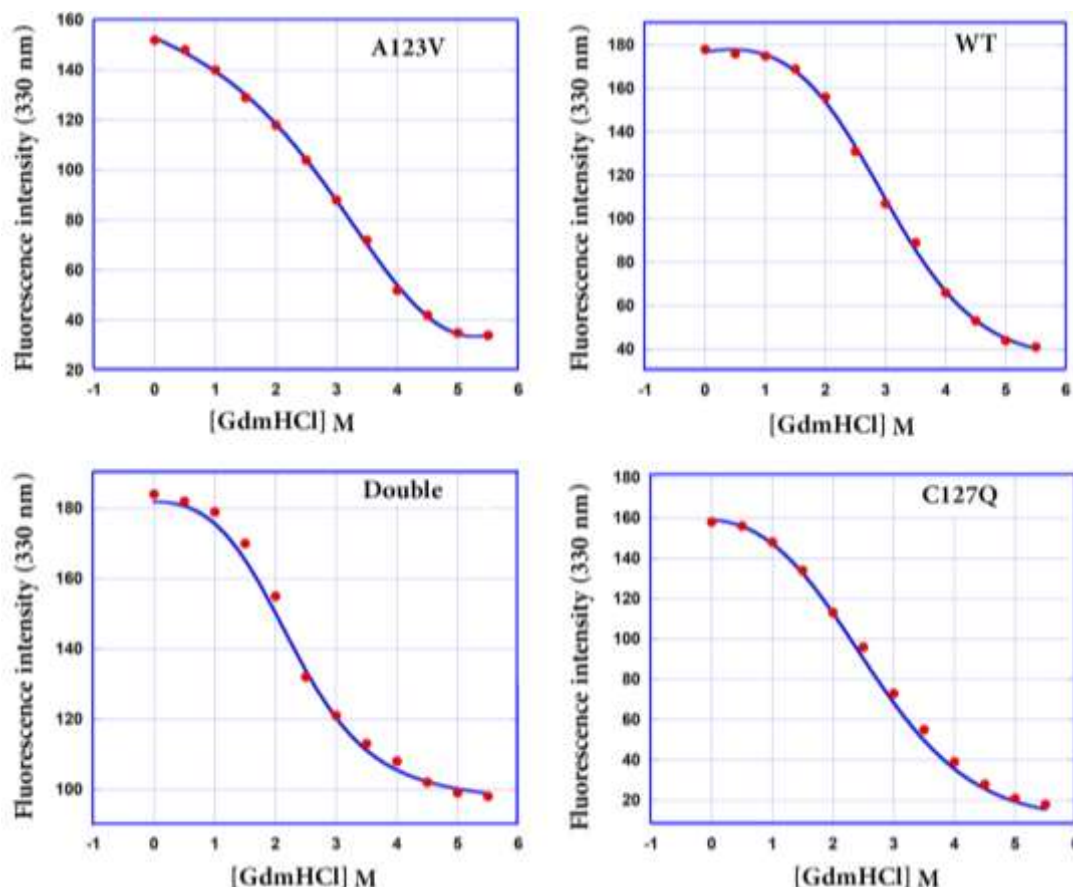


شکل ۳- منحنی فلورسانس ذاتی آنزیم وحشی CDase در غلظت‌های مختلف گوانیدینیوم هیدروکلراید. با افزایش تدریجی غلظت گوانیدینیوم کلراید و باز شدن ساختار پروتئین کاهش شدت فلورسانس ذاتی همراه با جابجایی به سمت طول موج‌های بلندتر را مشاهده می‌کنیم. با رسم تغییرات شدت فلورسانس ذاتی بر حسب تغییرات غلظت گوانیدین کلراید منحنی واسرشتگی تعادلی بدست می‌آید. منحنی واسرشتگی تعادلی در داخل نمودار اصلی آورده شده است.

آن بدست آمد. در این شکل خطوط پیوسته در بین نقاط حاصل مدل‌سازی این داده‌های آزمایشگاهی است که در زیر به جزئیات بیان خواهد شد.

همانطور که در منحنی‌های نمودار ۴ دیده می‌شود توام با افزایش غلظت ماده غیرطبیعی کننده ساختار، شدت فلورسانس نشری نیز پایین می‌آید که نشان دهنده باز شدن ساختار پروتئین و دسترس‌پذیری کروموفورهای تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین نسبت به مولکول‌های قطبی حلال است.

برای آنالیز نتایج خام این نوع آزمایش مطابق آنچه که در شکل ۳ برای پروتئین وحشی آورده شده است، طول موج ۳۳۰ نانومتر جهت مدل‌سازی داده‌ها انتخاب شده و منحنی تغییرات شدت فلورسانس در این طول موج بر حسب غلظت گوانیدینیوم کلراید رسم شد. علت انتخاب این طول موج آن بود که در این نقطه، آنزیم رفتاری ریاضیاتی در قالب یک منحنی سیگموئید را از خود نشان می‌دهد. پس از انتخاب طول موج مناسب برای هر آنزیم و رسم تغییرات شدت فلورسانس منحنی‌های نقطه‌ای شکل ۴ برای همه آنزیم‌ها، شامل پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌های



شکل ۴- منحنی تغییرات طول موج نشری فلوروسانس ذاتی در ۳۳۰ نانومتر برای آنزیم وحشی و جهش‌یافته‌های آنزیم CDase. هر نقطه در این منحنی‌ها حاصل طیف‌سنجی نشری پس از انکوباسیون پروتئین در غلظت مورد نظر از گوانیدینیوم کلراید است. نقاط موجود در نمودار نتایج مشاهدات آزمایشگاهی بوده و خطوط پیوسته حاصل مدل‌سازی این داده‌ها از طریق تطبیق با معادله سیگموئیدی با استفاده از نرم‌افزار کالبدگراف است، به طوری که این معادله حاوی پارامترهای زیستی است.

ساختار واسرشته دارد، بنابراین در غلظت صفر ماده غیرطبیعی‌کننده تقریباً ۱۰۰ درصد مولکول‌ها ساختار طبیعی دارند و در غلظت ۵,۵ مولار به بالا می‌توان گفت که ۱۰۰ درصد پروتئین‌ها دچار تبدیل ساختار از طبیعی به واسرشته شده‌اند. در منطقه گذار پروتئین نیز این درصد دچار تغییر می‌شود. با همین پیش‌فرض دو حالتی بودن فرایند واسرشتگی آنزیم، در منحنی‌های واسرشتگی نمودار ۴ را می‌توان با رابطه زیر تطبیق داده و پارامترهای زیستی را پیش‌بینی کرد (۲۸).

از دیدگاه مبتنی بر مکانیک کوانتوم، کاهش شدت نشر بر حسب غلظت گوانیدینیوم کلرایدبازتابی از باز شدن تدریجی ساختار مولکول‌های آنزیم است. با این حال از دیدگاه ترمودینامیک آماری، آنچه که تغییر می‌کند نسبت تعداد مولکول‌های واسرشته به مولکول‌های طبیعی در هر غلظت است که متحمل تغییر می‌شود. به بیان دیگر در دیدگاه مکانیک آماری فرض بر این است که مولکول‌های پروتئین در یک فرایند دو حالتی دچار تغییر ساختار می‌شوند و هر مولکول در هر لحظه یا ساختار طبیعی و یا

$$y = \frac{\left\{ (\alpha_N + \beta_N[\text{Urea}]) + (\alpha_D + \beta_D[\text{Urea}]) \times \exp\left(\frac{-(\Delta G^{H_2O} + m[\text{Urea}])}{RT}\right) \right\}}{\left(1 + \exp\left(\frac{-(\Delta G^{H_2O} + m[\text{Urea}])}{RT}\right)\right)}$$

(۱)

در این رابطه α_N و α_D به ترتیب محل برخورد خطوط مبنای مماس بر بخش‌های بالایی و پایینی منحنی سیگموئید هستند. پارامترهای β_D و β_N نیز به ترتیب شیب این خطوط می‌باشند. پارامتر ΔG^{H_2O} تغییرات انرژی آزاد گیبس مرتبط با واسرشتگی پروتئین است که براساس مشاهدات آزمایشگاهی به غلظت صفر گوانیدینیوم کلراید تعمیم داده شده و به عنوان معیاری از پایداری پروتئین‌ها در نظر گرفته می‌شود. به عبارت دیگر فرض دیگر مدل‌سازی این است که یک رابطه خطی بین غلظت گوانیدینیوم کلراید و غلظت‌های مختلف گوانیدینیوم کلراید طبق رابطه درجه اول زیر وجود دارد.

$$\Delta G^{H_2O} = \Delta G_{eq} - m[GdmCl] \quad (2)$$

پس می‌توان گفت که رابطه ۲ به طور ضمنی در معادله ۱ وارد شده است.

هراندازه ΔG^{H_2O} عدد مثبت بزرگ‌تری باشد به این معناست که جمعیت بیشتری از پروتئین‌های موجود در محلولی که فاقد ماده غیرطبیعی کننده است، از ساختار طبیعی برخوردارند. پارامتر m نیز شیب خط راستی است که در معادله ۲ تغییرات انرژی آزاد گیبس بر حسب

غلظت‌های مختلف اوره را نشان می‌دهد. در این صورت هر اندازه این شیب بیشتر باشد به این مفهوم است که پروتئین مورد بررسی حساسیت بیشتری به گوانیدینیوم کلراید دارد که از نظر مولکولی به مفهوم فشرده‌تر بودن ساختار پروتئین در حالت تاخورده و یا بازشدگی بیشتر در حالت واسرشته یعنی اختلاف سطح در دسترس بین دو حالت تاخورده و واسرشته است. نتایج حاصل از مدل‌سازی داده‌های آزمایشگاهی از طریق تطبیق داده‌ها با منحنی‌های سیگموئیدی واسرشتگی در ستون‌های اول و دوم جدول ۱ آورده شده است. از طرف دیگر در نقطه میانی منطقه گذار در منحنی‌های واسرشتگی نسبت جمعیت مولکول‌های تاخورده پروتئین به مولکول‌های واسرشته پروتئین برابر بوده و در نتیجه ثابت تعادل برابر با ۱ خواهد بود. بنابراین بر طبق رابطه ترمودینامیکی $\Delta G_{eq} = -RT \ln K$ تغییرات انرژی آزاد واکنش واسرشتگی در این نقطه صفر است. در این صورت پارامتر ΔG_{eq} در رابطه ۲ برابر با صفر شده و از آنجا می‌توان غلظتی از گوانیدینیوم کلراید که نیمی از مولکول‌ها واسرشته شده‌اند را محاسبه نمود. نتیجه حاصل از این محاسبه در ستون سوم جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مقادیر ترمودینامیکی مرتبط با واکنش واسرشتگی شیمیایی آنزیم وحشی CDase و جهش‌یافته‌های آن. دو ستون اول به طور مستقیم و از طریق تطبیق داده‌های آزمایشگاهی (نمودار ۳) با معادله ۱ (نمودار ۴) بدست آمده‌اند. ستون سوم جدول نیز با استفاده از مقادیر تغییرات انرژی آزاد در آب خالص و شیب خط وابستگی انرژی آزاد به غلظت گوانیدینیوم کلراید محاسبه شده است.

	$(Kcal/mole)\Delta G^{H_2O}$	$(Kcal.mole^{-2})m$	$(M)C_m$
WT	3.8±0.20	1.3±0.05	2.9±0.11
A123V	3.0±0.15	1.1±0.04	2.7±0.10
C127Q	2.8±0.13	1.0±0.04	2.8±0.10
Double	1.8±0.08	0.8±0.03	2.3±0.09

جمعیت بیشتری از پروتئین وحشی ساختار تاخورده طبیعی دارند. نسبت بین تعداد مولکول‌های واسرشته به طبیعی در مورد جهش‌یافته‌های یگانه اگرچه از جهش‌یافته دوگانه وضعیت بهتری دارد، با این حال همین دو جهش‌یافته نیز نسبت به پروتئین وحشی از پایداری کمتری برخوردارند.

دقت در داده‌های جدول ۱ نشان می‌دهد که اختلاف پایداری بین پایدارترین و ناپایدارترین واریانت آنزیمی (پروتئین وحشی و جهش‌یافته دوگانه) برابر با ۲ کیلوکالری بر مول است که عدد قابل توجهی است و نشان دهنده این است که در شرایط استاندارد مورد نظر در مدل‌سازی

موثرتر مولکول‌های ماده شیمیایی غیرطبیعی‌کننده شده است. براساس این مشاهدات می‌توان گفت که این دو موقعیت از نقاط حساس این آنزیم بوده و لذا با انجام جهش‌های دیگر در این نواحی می‌توان به آنزیمی با خواص ساختاری و عملکردی بهبود یافته دست پیدا کرد.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن نتایج مطالعات قبلی در مورد این آنزیم و در مقایسه با مطالعه اخیر می‌توان گفت که دست‌کاری سطح بینابینی زیرواحدها با جهش‌های هدفمند، پایداری پروتئین را در برابر هر دو نوع واسرشته‌کننده حرارتی و شیمیایی تحت تأثیر قرار می‌دهد و از آنجا که جابجایی زیرواحدها نسبت به هم، در کاتالیز آنزیمی نقش دارد، بنابراین می‌توان گفت که با بررسی بیشتر این منطقه از ساختار آنزیم می‌توان به طور همزمان پایداری ساختاری و بازدهی کاتالیتیکی آنزیم را بهبود بخشید.

تقدیر و تشکر

مراحل مولکولی این پژوهش در دانشگاه زنجان و طیف‌سنجی فلورئوسانس ذاتی در دانشگاه علوم پایه و تحصیلات تکمیلی زنجان صورت گرفته است.

داده‌های ستون آخر جدول ۱ نیز نشان می‌دهد که غلظت مورد نیاز از ماده غیرطبیعی‌کننده برای واسرشته کردن نیمی از مولکول‌های پروتئین برای پروتئین وحشی بیشتر است که این داده نیز بازتابی از مقاومت بیشتر آنزیم وحشی در برابر گوانیدینیوم کلراید است براساس این داده، جهش‌یافته دوگانه در مقایسه با بقیه پروتئین‌های نوترکیب، غلظت کمتری از گوانیدینیوم کلراید به نصف تلفات ساختاری می‌رسد. مقدار عددی C_m برای دو جهش‌یافته یگانه تقریباً برابر بوده و اختلاف مشاهده شده در محدوده خطای آزمایشگاهی است. داده‌های مربوط به مقدار عددی m نشان می‌دهد که پروتئین وحشی به عنوان واریانت پایدارتر، از فشردگی ساختاری بیشتری در حالت تاخوردی برخوردار است که این موضوع می‌تواند در نفوذپذیری نسبت به مولکول‌های گوانیدینیوم کلراید تأثیر گذار بوده و مقاومت پروتئین را افزایش دهد. علاوه بر این با توجه به اینکه جهش‌های اعمال شده در سطح بینابینی زیرواحدها هستند، ناپایداری ایجاد شده را می‌توان به تضعیف میانکشی‌های بین مولکولی مرتبط با این دو نقطه نسبت داد، به طوری که در مورد جهش‌یافته دوگانه اثر تضعیف‌شدگی همزمان ناشی از تغییر در دو موقعیت ۱۲۳ و ۱۲۷ باعث انعطاف‌پذیری بیشتر زیرواحدها و امکان نفوذ

منابع

- ۱- مرادیان، ف.، عقبی‌طلب، ح.، رحیمی، ق.، و رحیمیان، ح.، ۱۳۹۳. کلونینگ ژن آلفا آمیلاز در وکتور انتقالی pGFK114.1 اشرشیاکولی - باکترئیدی و انجام کانژوگاسیون بین سویه‌های مختلف *Escherichia coli* جهت امکان استفاده از آن در محیط گوارشی نشخوارکنندگان، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۲۷، شماره ۲، صفحات ۳۱۵-۳۰۸.
- ۲- قبادی‌نصر، س.، حاجی‌حسن، ز.، و انصاری‌پور، ن.، ۱۳۹۸. کلون‌سازی و بیان ترشچی فاکتور رشد بتا-NGF انسانی با استفاده از پپتید نشانه‌ی اصلاح شده‌ی آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۳۲، شماره ۳، صفحات ۳۸۸-۳۷۷.
- 3- Abdul Manas, N.H., Jonet, M.A., Abdul Murad, A.M., Mahadi, N.M., and Illias, R.M., 2015. Modulation of transglycosylation and improved malto-oligosaccharide synthesis by protein engineering of maltogenic amylase from *Bacillus lehensis* G1. *Process Biochem* 50(10), PP: 1572-1580.
- 4- Adams, M.W.W., and Kelly, R.M., 1995. Enzymes from microorganisms in extreme environments, *Chem Eng News*, 73(51), PP: 32-42.
- 5- Aliakbari, N., Mirzaee, Z., Jafarian, V., Khalifeh, K., and Salehi, M., 2019. Genetic and biochemical characterization of a novel thermostable cyclomaltodextrinase from *Anoxybacillus flavithermus*, *Starch - Stärke*, 71, PP: 1-11.

- 6- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool, *Journal Mol Biology* 215, PP: 403–410.
- 7- Auh, J.H., Hye, Y.C., Kim, Y.R., Shim, K.H., Yoo, S.H., and Park, K.H., 2006. Modification of rice starch by selective degradation of amylose using alkalophilic *Bacillus cyclomaltodextrinase*, *Journal Agric Food Chem*, 54(6), PP: 2314–2319.
- 8- Cantarel, B.I., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics, *Nucleic Acids Res*, PP : 233–238.
- 9- Cha, H.J., Yoon, H.G., Kim, Y.W., Lee, H.S., Kim, J.W., Kweon, K.S., Oh, B.H., Park, K.H., 1998. Molecular and enzymatic characterization of a maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose, *Eur Journal Biochem* 253(1), PP: 251–262.
- 10- Ding, S., Cargill, A.A., Medintz, I.L., and Claussen, J.C., .2015. Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation, *Curr Opin Biotechnol*, 34, PP: 242–250.
- 11- Far, B.E., Ahmadi, Y., Khosroushahi, A.Y., and Dilmaghani, A., 2020. Microbial alpha-amylase production: Progress, challenges and perspectives, *Adv Pharm Bull* 10(3), PP: 350–358.
- 12- Fiser, A., and Šali, A., 2003. MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models, *Methods Enzymol*, 374, PP: 461–491.
- 13- Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Arshad, M.K.M., Lakshmipriya, T., Voon, C.H., Hashim, U., and Chinni, S.V., .2017. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *Biomed Res Int*, PP: 1–9.
- 14- Höcker, B., Zielonka, S., .2022. Protein engineering & design: hitting new heights, *Biology Chem* 403, PP: 453–454.
- 15- Jae-Eun, L., In-Hwan, K., Jong-Hyun, J., Dong-Ho, S., Sung-Gyun, K., James, F., Holden, J.C., and Park, C.S., .2013. Molecular Cloning and Enzymatic Characterization of Cyclomaltodextrinase from Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus* sp. CL1, *JMB* 23(8), PP: 1060–1069.
- 16- Kim, J.S., Cha, S.S., Kim, H.J., Kim, T.J., Ha, N.C., Oh, S.T., Cho, H.S., Cho, M.J., Kim, M.J., Lee, H.S., Kim, J.W., and Choi, K.Y., et al., 1999. Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility, *Journal Biology Chem* 274(37), PP: 26279–26286.
- 17- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., and Lopez, R., 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI, *Nucleic Acids Res* 41(Web Server issue), PP: 597–600.
- 18- Mehrvand, J., Hayati Roodbari, N., Hassani, L., Jafarian, V., and Khalifeh, K., 2020. An evolution-based designing and characterization of mutants of cyclomaltodextrinase: Molecular modeling and spectroscopic studies, *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 230, PP: 118055–118064.
- 19- Mirzaee, Z., Jafarian, V., Shirdel, S.A., and Khalifeh, K., .2019. Structural and functional consequences of replacement of His403 with Arg near the catalytic site of *Anoxybacillus flavithermus* cyclomaltodextrinase, *Enzyme Microb Technol*, 131, PP: 1–7.
- 20- Myburgh, M.W., Cripwell, R.A., Favaro, L., and Zyl, W.H., 2019. Application of industrial amylolytic yeast strains for the production of bioethanol from broken rice, *Bioresour Technol*, 294, PP: 122–222.
- 21- Nakagawa, Y., Saburi, W., Takada, M., Hatada, Y., and Horikoshi, K., 2008. Gene cloning and enzymatic characteristics of a novel γ -cyclodextrin-specific cyclodextrinase from alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1784(12), PP: 2004–2011.
- 22- Park, K.H., 2008. *Carbohydrate-Active Enzymes: Structure, Function And Applications*. Elsevier Science.
- 23- Park, K.H., Kim, T.J., Cheong, T.K., Kim, J.W., Oh, B.H., and Svensson, B., 2000. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α -amylase family. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*, 1478(2), PP: 165–185.
- 24- Rahimzadeh, M., Khajeh, K., Mirshahi, M., 2012. Probing the role of asparagine mutation in thermostability of *Bacillus* KR-8104 α -pharmylase, *Int Journal Biology Macromol* 50(4), PP: 1175–1182.
- 25- Rothschild, L., and Mancinelli, R., 2001. Life in extreme environments, *Nature* 409, PP: 1092–1101.

- 26- Sakamoto, S., and Hamachi, I., 2019. Recent progress in chemical modification of proteins. *Anal Sciences* 35(1), PP: 5–27.
- 27- Shen, M.Y., and Sali, A., 2006. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures, *Protein Sciences* 15(11), PP: 2507–24.
- 28- Shirdel, S.A., and Khalifeh, K., 2019. Thermodynamics of protein folding: methodology, data analysis and interpretation of data, *Eur Biophys Journal* 48, PP: 305–316.
- 29- Soy, S., Nigam, V.K., and Sharma, S.R., 2019. Cellulolytic, amylolytic and xylanolytic potential of thermophilic isolates of Surajkund hot spring, *Journal Biosci* 44(5), PP: 1–12.
- 30- Turner, P., Labes, A., Fridjonsson, O.H., Hreggvidson, G.O., Schönheit, P., Kristjansson, J.K., Holst, O., and Karlsson, E.N., 2005. Two Novel Cyclodextrin-Degrading Enzymes Isolated from Thermophilic Bacteria Have Similar Domain Structures but Differ in Oligomeric State and Activity Profile, 100(4), PP: 380–390.

Thermodynamics study on the Cyclomaltodextrinase and its representative mutants

Mehrvand J.¹, Hayati Roodbari N¹, Hassani L.², Jafarian V.^{3*} and Khalifeh Kh.^{4*}

¹Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

²Dept. of Biological Sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan, I.R. of Iran

³Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

⁴Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

Abstract

Cyclomaltodextrinase (CDase) is belonging to a class of enzymes that are involved in carbohydrate degradation. It is one of the most important enzymes from the amylase family with highly important industrial applications. Recently, a variant of native CDase has characterized and reported (Accession number: AMB26774). Previous study on this enzyme and three representative mutants including A123V, C127Q and their respective double mutant, A123V/C127Q has shown that applying point mutations on the interface between the subunits has functional and structural consequences. In current work, complete set of experimental study and modelling procedures was performed to elucidate the thermodynamics behavior of the enzyme variants in chemical denaturation experiments using Guanidinium chloride (GdmCl) as chemical denaturant. It was shown that the wild-type protein with the maximum value of ΔG^{H_2O} is the most stable variant, as compared with mutants. It appears that the replacement of residues at positions 123 and 127 leads to increasing the flexibility of the protein chains and that the feasibility of the GdmCl penetration and interaction with mutants as compared with the WT protein. We concluded that these positions are hot spot points that can be more manipulated to change the structural features of the enzyme toward thermal and chemical stability.

Key words: Cyclomaltodextrinase, Amylase, Thermal stability, Unfolding; Biothermodynamics