# بررسی بیوانفورماتیکی آنزیم آمیلوپلولاناز باکتری گرمادوست *Cohnella* A01 و مقایسه آن با آنزیم‌های مشابه

**فائزه حسنی[۱و۲]، ناصر فرخی[۲]، سعید امین زاده[۱]، مجتبی ممرآبادی[۱]**

۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

۲- دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود

F.hasani26@yahoo.com

**چکیده**

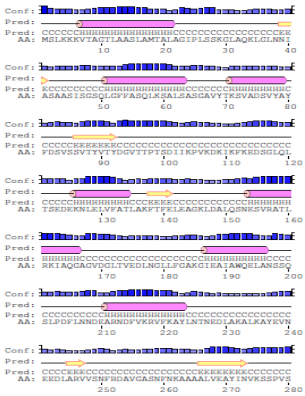
آمیلوپلولانازها از اعضای خانواده گلیکوزیل هیدرولازها (GH57) مقاوم به حرارت بوده و می‌توانند پیوندهای گلکوزیدی (۴-۱)-α و (۶-۱) را در نشاسته، پلولان، آمیلوپکتین و دیگر اولیگوساکاریدهای مرتبط هیدرولیز کنند. در این مطالعه با در دست داشتن توالی‌های نوکلئوتیدی به پیشگویی برخی خصوصیات بیوشیمایی و ساختارهای دوم و سوم آنزیم آمیلوپلولاناز موجود در باکتری گرمادوست *Cohnella* Ao1 که بومی ایران بوده از طریق برنامه‌های بیوانفورماتیکی و مقایسه آن با سایر آمیلوپلولانازهای موجود در باکتری‌های گرمادوست پرداختیم و در آخر درختچه فیلوژنیک برای درک روابط تکاملی این آنزیم ها برای توالی های ژنی و آمینواسیدی، رسم کردیم. تمامی این آنزیم ها با توجه به شاخص ناپایداری کمتر از ۴۰ پایدار بوده و در بین آن‌ها آمیلوپلولاناز موجود در باکتری *Cohnella* Ao1 با شاخص ناپایداری ۲۲/۳۱ و ضریب آلیفاتیک ۹۷/۲۰ مقاومت حرارتی بیشتری نسبت به بقیه داشت. آنزیم مورد نظر دارای سیگنال پپتید بوده و ترشحی می‌باشد و با توجه به بار خالص مثبت آن می‌توان با روش کروماتوگرافی تعویض یونی منفی خالص سازی کرد.

کلمات کلیدی: آمیلوپاولاناز، مقاوم به حرارت، *Cohnella* A01

**مقدمه**

پلولانازها (پلولان ۶ گلوکانوهیدرولاز؛ EC 3.2.41) که قادر به هیدرولیز پیوند (۶و۱) α از گلوکان خطی و تولید مالتوتریوز به عنوان محصول نهایی می‌باشند، به دو تیپ I و II تقسیم میشوند. تیپ I یا آنزیم‌های بی شاخه به طور اختصاصی پیوند (۶و۱) α در شاخه پلی‌ساکاریدها مثل نشاسته، پلولان و گلیکوژن را هیدرولیز می‌کنند. در حالیکه تیپ II یا آمیلوپلولانازها ( EC 3.2.1.1/41) هم پیوند گلیکوزیدی (۶و۱) α و هم پیوند (۴و۱) α را در نشاسته، پلولان و آمیلوپکتین و دیگر اولیگوساکاریدهای مرتبط را می‌شکنند [۲]. از زمانی که پلولاناز توسط بندر[۱]و والیوفلس[۲] در سال ۱۹۶۱ کشف شده است، این آنزیم از منابع تشخیص و جداسازی شده است. به علت توانایی ویژه در شکستن شاخه، استفاده از پلولاناز در صنعت پردازش نشاسته ارتقا یافته. پلولاناز در فرآیند قندسازی( Saccharification ) به منظور افزایش اختصاصیت فرآیند به کار گرفته می شود. علاوه بر این به کار گیری ترکیبی از پلولاناز با سایر آنزیم‌های آمیلولیتیک، ممکن است باعث افزایش کیفیت شربت

[1].bender
[2] .walleufels



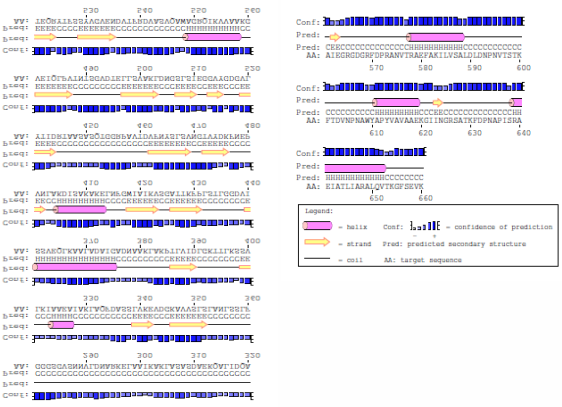
گلوکز شود. محصولات به دست آمده از پردازش نشاسته، کاربرد وسیعی در صنایع مختلف مثل نوشابه، شیرینی، کنسرو و بستنی سازی دارد. و همچنین می‌تواند در صنایع پخت و پز و شوینده به کار گرفته شود.. آنزیم های خانواده GH57، با توجه به ویژگی های گرمادوست خود، پتانسیل بسیار زیادی برای کاربردهای صنعتی و علمی مورد علاقه برای پژوهش به خود جلب کرده‌اند. [۳]

**مواد و روش ها**

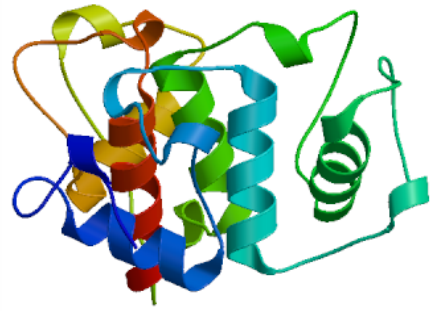
در این مطالعه با اطلاعات ژنومیک *cohnella* A01 با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و با استفاده از نرم افزارهای آنلاین به پیشگویی برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم آمیلوپلولاز مورد نظر پرداختیم. برای این منظور ابتدا با نرم افزار آنلاین http://web.expasy.org/translate توالی نوکلئوتیدی ژن مورد نظر را ترجمه کردیم و با نرم افزارهای آنلاین http://web.expasy.org/protparam، http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP، خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم مورد نظر را بررسی کردیم. در این بررسی ها توالی ها با فرمت FASTA در اختیار نرم افزارهای عنوان شده قرار گرفت. برای محاسبه خصوصیات بیوشیمیایی از جمله وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک (pI)، شاخص ناپایداری، ضریب آلیفاتیک و بار خالص پروتئین مورد نظر از نرم افزار Protparam استفاده کریم. برای محاسبه سیگنال پپتید از نرم افزار SignalP استفاده کردیم. برای پیش بینی ساختارهای دوم و سوم به ترتیب از نرم افزارهای http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred و http://swissmodel.expasy.org استفاده کردیم. و آنزیم های آمیلوپلولاناز در دیگر میکروارگانیسم های گرمادوست از پایگاه دادهای http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html گرفته گرفته شد و در ادامه به منظور بررسی روابط تکاملی توالی آمینواسیدی آنزیم مورد نظر با آنزیم های مشابه با استفاده از نرم افزار Mega 4 مقایسه و درختچه فیلوژنتیک مربوط به آمینواسیدهای آنزیم مورد نظر رسم گردید.

**نتایج و بحث**

نتایج حاصل از پیش گویی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم آمیلوپلولاناز موجود در Cohnella A01 و مقایسه آن با آنزیم‌های مشابه به این شرح می‌باشد؛ ساختارهای دوم و سوم پیش‌گویی شده با استفاده از نرم افزار به ترتیب در شکل‌های ۱و۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: ساختار دوم پیش‌گویی شده برای آنزیم آمیلوپلولاناز باکتری *Cohnella* A01



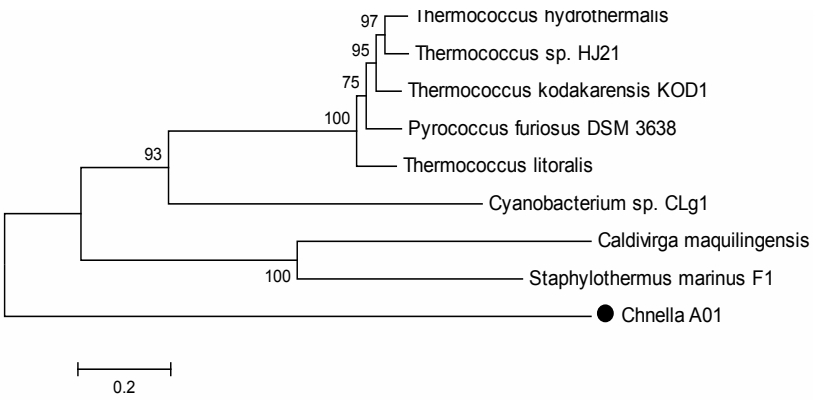
شکل ۲: ساختار سوم پیش‌گویی شده برای آنزیم آمیلوپلولاناز باکتری *Cohnella* A01

شاخص ناپایداری مقیاسی برای بیان پایداری آنزیم می‌باشد که شاخص ناپایداری گروه آنزیمی مطالعه شده در محدوده ۳۵/۸۴-۲۲/۳۱ بود که با توجه به اینکه محدوده مشخص شده کمتر از ۴۰ می‌باشد تمامی آنزیم‌های مطالعه شده پایدار هستند و در میان آن‌ها آمیلوپلولاناز مورد نظر با شاخص ناپایداری ۲۲/۳۱ از پایداری بالاتری برخوردار است. ضریب آلیفاتیک حجم اشغال شده توسط زنجیره‌های جانبی آمینواسیدهای Ala، Val، Leu، Ile پروئتین می‌باشد و در این گروه مطالعه شده در محدوده ۷۸/۶۸-۹۷/۲۰ بود که در بین آن‌ها آنزیم مورد نظر داشتن ضریب آلیفاتیک بالاتر با عدد ۹۷/۲۰ مقاومت حرارتی بیشتری نسبت به بقیه دارد. وزن مولکولی در این گروه در محدوده ۱۵۱/۳۹۱- ۶۸/۴۲ کیلو دالتون بود که آنزیم مورد نظر دارای وزن مولکولی ۶۹/۳۸۸ کیلودالتون است. با توجه به این که در این مقایسه تنها آنزیم آمیلوپلولاناز دارای بار خالص مثبت بود می‌توان با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی با بار منفی برای خالص سازی آنزیم مورد نظر استفاده نمود. آنزیم مورد نظر همچنین مانند اکثر آنزیم‌های موردمقایسه دارای آمینواسیدهای سیگنال پپتید بوده که این نشان می‌دهد این آنزیم‌ها ترشحی می‌باشند که این موضوع برای پروتئین نوترکیبی که قرار است در آزمایشگاه تولید شود می‌توان ناحیه سیگنال پپتید را حذف کرده و از ناحیه سیگال پپتید ناقل‌ها برای ترشح این آنزیم‌ها استفاده نمود. خصوصیات شیمیایی گروه آنزیمی مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. روابط تکاملی توالی‌های آمینواسیدی گروه آنزیمی موورد مطالعه در درختچه فیلوژنتیک مشخص شده که در شکل ۳ نشان داده شده است.

*جدول ۱*: برخی خصوصیات بیوشیمیایی آمیلوپلولانازهای باکتری‌های گرمادوست

| میکروارگانیسم / ویژگی های مورد مطالعه | وزن مولکولی | شاخص پایداری | شاخص آلیفاتیک | pI | بار خالص | سیگنال پپتید |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Cohnella* A01 | ۶۹۳۸۸/۵ | ۲۲/۳۱ | ۹۷/۲۰ | ۵/۶۴ | ۰/۰۱۳ | دارد |
| *Caldivirga maquilingensis* | ۶۸۴۲۰/۱ | ۳۵/۸۴ | ۹۶/۲۷ | ۵/۸۴ | -۰/۱۰۵ | دارد |
| *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 | ۱۲۷۲۱۳/۵ | ۲۹/۶۲ | ۸۲/۷۷ | ۴/۶۵ | -۰/۴۰۴ | دارد |
| *Staphylothermus marinus* F1 | ۷۴۸۳۱/۷ | ۳۴/۳۵ | ۸۹/۶۹ | ۶/۸۶ | -۰/۳۶۹ | ندارد |
| *Thermococcus hydrothermalis* | ۱۴۹۹۰۵/۷ | ۲۹/۹۸ | ۸۱/۵۰ | ۴/۵۸ | -۰/۳۷۸ | دارد |
| *Thermococcus kodakarensis* KOD1 | ۱۲۵۴۰۹/۰ | ۳۱/۵۶ | ۷۸/۶۸ | ۴/۹۴ | -۰/۵۰۱ | دارد |
| *Thermococcus litoralis* | ۱۲۴۲۱۸/۱ | ۳۳/۵۷ | ۸۳/۲۲ | ۴/۷۲ | -۰/۴۱۷ | دارد |
| *Thermococcus* sp. HJ21 | ۱۵۱۳۹۱/۲ | ۲۹/۱۳ | ۸۲/۰۴ | ۴/۵۴ | -۰/۵۸۸ | دارد |

شکل ۳: درختچه فیلوژنتیک برای توالی‌های آمینواسیدی گروه‌های آنزیمی مورد مطالعه




## References

1. Saha, B.C. and J.G. Zeikus, *Novel highly thermostable pullulanase from thermophiles.* Trends in Biotechnology, 1989. **7**(9): p. 234-239.
2. Satyanarayana, T., et al., *Development of an ideal starch saccharification process using amylolytic enzymes from thermophiles.* Biochemical Society Transactions, 2004. **32**(2): p. 276-278.
3. Guan, Q., et al., *Cloning, purification and biochemical characterisation of an organic solvent-, detergent-, and thermo-stable amylopullulanase from Thermococcus kodakarensis KOD1.* Process Biochemistry, 2013. **48**(5): p. 878-884.

## Bioinformatics thermophilic bacteria enzymes amylopullulanase *Cohnella* A01 and Comparison with the same enzymes

Faeze hasani[1,2], naser farokhi[2], Saeed aminzadeh[1], Mojtaba mamarabadi[1]
1- National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology
2- University shahrood

F.hasani26@yahoo.com

**Abstract**
Amylopullulanases· family members Glycosil hydrolase (GH57) Thermostable and can Glycosid links α-(4-1) and α-(6-1) in starch, pullulan, amylopectin, and other related Amylopectin their hydrolysis. The nucleotide sequences having the prediction of biochemical properties and structures of the second and third Amylopullulanase enzyme in thermophilic bacteria *Cohnella* Ao1 native to Iran through Bioinformatics and comparison with other existing Amylopullulanases thermophilic bacteria examined and Finally, phylogenetic trees for understanding the evolutionary relationships of these enzymes for DNA and amino acid sequences, we draw. All of these enzymes due to the instability index less than 40, and among them Amylopullulanase stable in bacteria *Cohnella* Ao1 volatility index 22/31 and 97/20 aliphatic coefficient of thermal resistance was higher than others. A signal peptide and secreted enzyme. Due to the positive net charge can be purified by ion-exchange chromatography was negative.

Keywords: amylopullulanase, Thermostable, *Cohnella* A01