الإنتاج المطعم ودراسة خصائص إنزيم السيليوليز من آركيون بيروكوكس أبسي المحبة للحرارة العالية

إعداد

رضوان بن محمد الغامدي

تقدم هذه الرسالة استكمالًا لمتطلبات درجة الماجستير في علوم الكيمياء الحيوية

قسم الكيمياء الحيوية – كلية العلوم
جامعة الملك عبدالعزيز
جدة – المملكة العربية السعودية

١٤٤١هـ / ٢٠٢٠م

المستـخلـص

السليلوز هو واحد من أكثر السكريات الموجودة بوفرة على كوكب الأرض. السيليوليز يحفز التحلل المائي للرابطة بيتا ١-٤-جلايكوسايديك بين جزيئات الجلوكوز في السيليلوز. لا يوجد هذا الإنزيم في الإنسان وبعض الحيوانات مما يجعلهم غير قادرين على هضم السليلوز. يتم إنتاجه بواسطة الميكروبات الموجودة في أمعاء المجترات مما يساعد الحيوانات على هضم السليلوز. للإنزيم العديد من التطبيقات في الزراعة والوقود الحيوي والصناعات النسيجية. في هذه الدراسة، إنزيم السيليوليز المطعَّم تم إنتاجه من آركيون بايروكوكس أبسي المحبة للحرارة العالية. الجين المكون من ١٠٤٧ شفرة جينية تمت مضاعفته عن طريق PCR ومن ثم استنساخه في E. coli باستخدام pET21a (+). وقد تم التعبير عن الجين وتكثيره في وجود ٠,٥ ملي مولار IPTG. وتم تنقية الإنزيم من خلال تسخين الحرارة الإنتقائي لبروتينات *E. coli* المتبوعة بـDEAE-cellulose والمعتمدة على تقنية الكروموتوغرافي ذات التبادل الأيوني. وتم العثور على الإنزيم بوزن جزيئي حوالي ٤٠ كيلو دالتون على SDS-PAGE. النشاط المحدد للإنزيم في وجود CM-cellulose كان ١٠٣٠ وحدة لكل ملي جرام من البروتين. الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة المثلى كانت ٦ و٩٠ درجة مئوية على التوالي. دراسات *In silico* أظهرت أن الإنزيم وجد كمونومر (الوحدة الأساسية لتكوين البوليمر). الإلتحام الجزيئي مع عدد قليل من روابط البروتين المحتملة أظهرت أن Lys256, Asp 177, His 63 هي أهم بقايا الأحماض الأمينية النشطة في الموقع.

Recombinant production and properties of cellulase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*

By

Radwan Mohammed Alghamdi

A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the award of degree of Master of Science in Biochemistry

Supervised By

Dr. Muhammad Shahid Nadeem

Assistant Professor

Department of Biochemistry

Dr. Mazin A. Zamzami

Associate Professor

Department of Biochemistry

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
KING ABDULAZIZ UNIVERSITY
JEDDAH-SAUDI ARABIA
1441 H – 2020 G

ABSTRACT

Cellulose is one of the most abundantly found polysaccharides on the planet earth. The enzyme β-1,4 – endoglucanase or cellulase catalyzes the hydrolysis of β-1,4 glycosidic bond between the glucose molecules in cellulose. The enzyme is not found in human and many animals making them unable to digest cellulose. It is produced by the microbes in the gut of ruminants, where it helps the animals to digest cellulose. The enzyme has applications in the agriculture, biofuel and textile industries. In the present study we have produced a recombinant of cellulase from highly thermophilic archaeon Pyrococcus abyssi. A 1047 bp gene coding for cellulase was PCR amplified and cloned in E. coli using pET21a (+). The gene was expressed in the presence of 0.5mM IPTG. The enzyme was purified by selective heat denaturation of E. coli proteins followed by DEAE-cellulose based anion exchange chromatography. The enzyme was found to have a molecular weight of about 40 kDa on SDS-PAGE. The specific activity of enzyme with CM-cellulose was 1030 U per mg of protein. The optimum pH and temperature for the activity were found 6 and 90°C respectively. In silico studies have shown that the enzyme was found as a monomer. Molecular docking with a few potential protein ligands have shown that Lys256, Asp 177, His 63 are the main active site amino acid residues.