مجله علمی – پژوهشی زیست شناسی جانوری تجربی

سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹۱ (۱۲- ۱)

افزایش در مقدار آنزیم اندوگلوکانازهای حاصل از قارچ *تریکودرما رزیی* با استفاده از روش تغلیظ با بوتانل

بهزاد لامع راد*

استادیار دانشگاه پیام نور مرکز تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲۵ ، تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/٤/۲۱)

چکیده

استفاده از محصولات آنزیم سلولاز در صنعت بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از این آنزیم در صنایع کاغذ سازی، رنگ سازی، روغن کشی ونساجی استفاده می شود. تبدیل سلولز به گلوکز و سپس تبدیل گلوکز به اتانول می تواند جایگزین سوخت های فسیلی شود. سلولز یک پلی ساکارید قابل بازیافت است که شاید در آینده نزدیک بسیاری از فراورده های سوختی لازم مخصوصاً برای حمل و نقل را تامین کند. سلولز توسط آنزیم سلولاز تبدیل به قندهای قابل حل می گردد. یکی از موجوداتی که مطالعه زیادی روی آن انجام شده است، قارچی با ریشه نرم به نام تریکو درما رزیی (*Trichoderma reesei*) می باشد. این قارچ تولید تمام آنزیم های سلولولیتیک مورد نیاز برای شکستن پیوندهای β- ۱، ۴- گلیکوزیدی در سلولز و مشتقات آن را انجام می دهد. یکی از آنزیم های مهم در کمپلکس چند آنزیمی سلولاز ، اندوگلوکاناز است که تخلیص آن از قارچ تریکو درما رزیی با روش های مختلف انجام شده است. تغلیظ این آنزیم با استفاده از بوتانل انجام شد. وقتی از این روش تغلیظ استفاده شود، غلظت آنزیم اندوگلوکانازها تقریباً ۱۰٪ بیشتر از سلوبیوهیدرولازها می شود و این موضوع مخالف گزارشات قبلی است. برای اثبات آن از ستون کروماتوگرافی DEAE- Sepharose-CL-6B استفاده شد و معلوم گردید که مقدار و فعالیت اندوگلوکانازها خیلی بیشتر است.

واژه های کلیدی: سلولاز، اندوگلوکاناز، تریکودرما رزیی، بوتانل

* نویسنده مسئول: بهزاد لامع راد

Email: b_lame@pnu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آنزیم اندوگلوکاناز[1] یا کربوکسی متیل سلولاز[2] (CMCase) جزء کمپلکس چند آنزیمی سلولاز می باشد که باعث تبدیل سلولز به قندهای قابل حل در آب می شود (Bhat and Bahat, 1977) آنزیم سلولاز حاصل از قارچ تریکودرما رزیی دارای اندوگلوکاناز (EC.۳.۲.۱.۴)، اگزوگلوکاناز[3] یا سلوبیوهیدرولاز[4] (EC ۳.۲.۱.۹۱) و β- گلوکوزیدآز[5] (EC ۳.۲.۱.۲۱) است. آنزیم های اندوگلوکاناز شامل اندوگلوکاناز I (EGI/Cel7B) ، اندوگلوکاناز II (EGII / Cel5A)، اندوگلوکاناز III (EGIII / Cel12A)، اندوگلوکاناز IV (EGIV /Cel61A) و اندوگلوکاناز V (EGV / Cel45A) است. آنزیم های اگزوگلوکاناز یا سلوبیوهیدرولازها شامل سلوبیوهیدرولاز I (CBHI / CelA) و سلوبیوهیدرولازII (CBHII / Cel6A) است که به صورت هم افزایی عمل کاتالیزوری روی سلولز انجام داده و آن را تبدیل به سلوبیوز (گلوکوزیل β- ۱ ، ۴ – گلوکز) می کنند(Cohen *et al*.,2004; Momcilovic *et al*., 2003; Richardson and Gorton, 2003; foreman *et al*., 2003) این کمپلکس آنزیمی دارای دو β- گلوکوزیدآز (BGLI / Cel3 A و BGII / Cel 1 A) است که باعث تبدیل سلوبیوز به دو مولکول گلوکز می شود (Takashima *et al*., 1999).

عملکرد مخلوطی از دو یا چند آنزیم در سلولازها بهتر از عملکرد هر یک از آنها به تنهایی است. عمل تعاونی بین اندوگلوکانازها و سلوبیوهیدرولازها را هم افزایی endo – exo می نامند که قابلیت تبدیل سلولز به قندهای قابل حل را بالا می برند (Wood and Crae, 1986).

برای خالص سازی کمپلکس سیستم های سلولولیتیک از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی استفاده می‌کنند. وقتی از این روش استفاده شود، کمپلکس مزبور به ژل چسبیده و جدا کردن آن از ژل کروماتوگرافی مشکل خواهد شد. لذا باید از روش های دیگری برای خالص سازی استفاده کرد. روش دیگری که توسط محققین انجام می‌شود، روش کروماتوگرافی تعویض یونی می باشد که از لحاظ صنعتی با صرفه نیست (Ellouz *et al*.,1987).

سلولز یک پلیمر طبیعی است که به عنوان ماده خام در صنعت استفاده می شود. مثلا در صنایع

[1] Endoglucanase
[2] Carboxymethyl cellulase
[3] Exoglucanase
[4] Cellobiohydrolase
[5] β- glucosidase

Archive of SID

www.SID.ir

کاغذ سازی، رنگ سازی، نساجی ، غذایی، دارویی و پودر رختشویی مصرف دارد. جهت استفاده از سلولز در صنعت ابتدا آن را توسط روش های فیزیکی یا شیمیایی تغییر می دهند. خصوصیات سلولز تغییر یافته بستگی به چندین عامل دارد مثل نوع واکنش هایی که موجب این تغییر می شوند، جرم مولی، خواص مواد جانشین شده، درجه و مقدار پخش مواد جانشین شده در داخل زنجیر پلیمر. یکی از عوامل تغییر دهنده، هیدرولیز پلیمر سلولز توسط آنزیم اندوگلوکانازها است که تولید الیگومرهای کوتاهتر را می‌کند. در نتیجه سلولز غیر محلول تبدیل به ترکیبات محلول می‌گردد. اندوگلوکانازها آنزیم هایی هستند که قادرند زنجیر سلولز را از قسمت های داخلی هیدرولیز نمایند. با توجه به ساختار جایگاه فعال اندوگلوکانازهای مختلف و موقعیت واحدهای انیدروگلوکز و همچنین ساختار مختلف زنجیرهای پلیمر، قابلیت هیدرولیز کردن پلیمر سلولز در گلوکانازهای مختلف کمی با هم فرق دارند. بنابراین تخلیص اندوگلوکانازها و روشی که ساده تر و کم هزینه تر باشد اهمیت خاصی در صنعت پیدا می کند. مانیز بر آن شدیم که با کمی تغییر در روش خالص سازی آنزیم های گلوکاناز به این هدف نزدیکتر شویم.

هدف از انجام این کار تحقیقی، استفاده از روشی ساده برای تغلیظ آنزیم‌های سلولولیتیک است. برای انجام این عمل معمولاً از روش اولترافیلتراسیون استفاده می‌شود که هم به زمان طولانی احتیاج دارد و هم اینکه از لحاظ صنعتی مشکل ایجاد می‌شود. اما روش تغلیظ توسط بوتانل بسیار سریع و ساده و در دمای محیط قابل اجرا است. از طرف دیگر تا-کنون گزارشی مبنی بر استفاده از این روش مطرح نشده است. بنابراین پس از خالص سازی کمپلکس سلولاز از محیط کشت حاوی *T.reesei* (Lameh Rad and Yazadanparast, 1998)، تغلیظ توسط n- بوتانل انجام شد و برای اثبات وجود غلظت زیاد و فعالیت بیشتر آنزیم اندوگلوکاناز از روش کروماتوگرافی DEAE- Sepharose- CL- 6B استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

سلولز میکروکریستالی (پودر سلولز با قطر µm ۲۰)، D- سلوبیوز (۹۸٪ بیشتر از نوع β)، EDTA، Tween-80، Foline- Ciocalteu ازشرکت مرک (Darmstadt, Germany) و ژل DEAE- Sepharose CL- 6B از فارماسیا خریداری شد. سایر مواد analytical grade بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

میکروارگانیزم:

قارچی که از آن برای تولید آنزیم سلولاز استفاده شد *Trichoderma reesei* بود. این سویه از هلند و شرکت Schimmelcultures CBS 392.92 Central bureau voor خریداری گردید. این سویه روی محیط کشت (Potato Dextrose Agar) PDA در ۲۸ ̊C رشد داده شد و در ۴ ̊C نگهداری شد. روش کار در قسمت تولید سلولاز آمده است.

سوبسترا:

به ۱۰ گرم سلولز میکروکریستالی ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک (v/v) ۳۰٪ اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه به حال خود رها شد. پس از سانتریفیوژ و شستشو با آب مقطر و محلول بی کربنات سدیم ۱٪ ، حجم رسوب نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. با این روش سلولز باد کرده به دست آمد.

طرز تهیه محیط کشت اولیه:

برای تهیه محیط کشت اولیه[6] از محیط کشت مندلز استفاده گردید (Mandels and Andreotti, 1973). منبع کربنی که در این محیط کشت استفاده شد، قند زیلوز ۱٪ بود.

تولید سلولاز:

یک میلی لیتر از سوسپانسیون حاوی قارچ *T. reesei* را به محیط کشت اولیه اضافه نموده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکر دار در دمای ̊C ۲۹ و با دور rpm ۹۰ قرار داده شد. سپس یک میلی لیتر از آن در شرایط استریل به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مندلز (حاوی سلولوز باد کرده) اضافه و در انکوباتور شیکردار با درجه حرارت ̊C ۲۹ و دور rpm ۹۰ برای مدت ۸ روز گذاشته شد. سپس براث حاوی آنزیم به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ °C با دور g × ۳۰۰۰ سانتریفیوژگردید. فعالیت آنزیم (FPase) و غلظت پروتئین در مایع رویی تعیین شد (نحوه تعیین فعالیت آنزیم در زیر آمده است). برای تعیین غلظت پروتئین از روش لاوری[7] استفاده گردید (Lowry *et al*., 1951).

تعیین فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم سلولاز با استفاده از روشDNS[8] و کاغذ واتمن شماره۱ مطابق روش گوس (Ghose, 1987) تعیین گردید. برای اندازه گیری فعالیت اگزوسلوبیوهیدرولاز از سوسپانسیون (w/v)۱٪ سلولز میکروکریستالی در تامپون استات سدیم یک مولار با pH ۴/۸ استفاده

[6] Preculture

[7] Lowry

[8] Dinitrosalicylic acid

Archive of SID

www.SID.ir

شد. یک میلی لیتر از آن را با آنزیم به مدت ۲ ساعت در حرارت ۵۰ ̊C قرار داده سپس با روش سوموگی- نلسن (Nelson, 1944) فعالیت آن اندازه گیری گردید. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase)، یک میلی لیتر از محلول ۱٪ (w/v) نمک سدیم کربوکسی متیل سلولز و ۰/۵ میلی لیتر از تامپون استات سدیم ۰/۱ مولار در pH ۵ در حرارت ۵۰ ̊C به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. قندهای احیا کننده توسط روش سوموگی و نلسون اندازه گیری شد و فعالیت آنزیم به دست آمد.

جذب آنزیم سلولاز به سلولز:

برای تعیین مقدار جذب آنزیم سلولاز به سلولز، ۱۰۰ میلی لیتر از براث حاوی سلولاز را به ۳ گرم سلولز اضافه کرده و پس از سانتریفیوژ با دور g× ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ ̊C ، رسوب جمع آوری گردید. برای این که مشخص شود چه مقدار از آنزیم به سلولز متصل شده، پس از سانتریفیوژ، غلظت پروتئین و فعالیت کلی آنزیم در مایع رویی تعیین گردید. مایع رویی که حاوی مقدار کمتری آنزیم سلولاز بود مجددا به ۳ گرم سلولز جدید اضافه شد و پس از سانتریفیوژ، غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم در مایع رویی تعیین شد. حاصل این بررسی در جدول (۱) آمده است.

رها سازی آنزیم های سلولولیتیک توسط حلال آلی:

جهت رهاسازی آنزیم های سلولولیتیک جذب شده به سلولز میکروکریستالی از سوبسترا، آن را به مدت یک شب در محلول حاوی ۶۰٪ گلیسرول (w/v) و ۲۰٪ دی اتیل اتر (w/v) قرار داده و پس از سانتریفیوژ، آنزیم موجود در گلیسرول به دست آمد.

تغلیظ با استفاده از n- بوتانول:

به آنزیم های رها شده در گلیسرول در دمای ۴ ̊C حلال n- بوتانول اضافه شد (به نسبت ۱ : ۱). فاز زیرین که حاوی آنزیم های سلولولیتیک بود جدا گردید.

استفاده از ستون کروماتوگرافی DEAE-Sepharose CL- 6B:

در این روش ۸۰۰ میکرولیتر محلول آنزیمی حاوی ۱۵ میلی گرم پروتئین روی ستونی به ابعاد ۱/۵ × ۱۴ سانتیمتر قرار داده شد. جهت رها سازی، از تامپون استات آمونیوم با شیب غلظت ۰/۰۱ تا ۲ و pH ۵ با سرعت جریان ۴ میلی لیتر در

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰ دقیقه استفاده شد. حجم هر یک از آنها ۴ میلی لیتر بود.

نتایج

در محیط کشتی که حاوی آنزیم سلولاز بود، سلولز اضافه شد در نتیجه آنزیم به سوبسترای خود متصل گردید. این عمل سه مرتبه تکرار شد و هر بار مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم در محلول رویی پس از سانتریفیوژ، اندازه گیری گردید. در این عمل می‌بایست مقدار آنزیم و فعالیت آن در هر مرتبه کاهش یابد و نتایج آن در جدول شماره ۱ آمده است. فعالیت آنزیم از FPU ۶/۴ به FPU ۱ رسید. برای اطمینان از صحت انجام روش فوق فعالیت ویژه آنزیم متصل شده محاسبه گردید و مشاهده شد که از FPase ۰/۰۳۷ به FPase ۰/۱ افزایش یافته است. ($P<0.05$)

جدول ۱- مراحل جذب آنزیم های سلولولیتیک به سلولز میکروکریستالین در قارچ *T.reesei*

مراحل جذب آنزیم به سوبسترا	حجم محلول آنزیمی (ml)	مقدار پروتئین (mg)	فعالیت آنزیم (FPU)*	فعالیت ویژه (FPase)	بازده هر مرحله (٪)	فاکتور خالص سازی هر مرحله
۰	۱۰۰	۱۷۴ ± ۵	۶/۴ ± ۰/۴	۰/۰۳۷	---	--
۱	۸۹ ± ۴	۷۱ ± ۷	۳/۶ ± ۰/۲	۰/۰۵۱	۵۸	۱/۳۷
۲	۷۷ ± ۳	۲۵ ± ۴	۱/۲ ± ۰/۱	۰/۰۸	۳۱/۵	۱/۵
۳	۶۷ ± ۴	۱۰ ± ۳	۱ ± ۰/۰۹	۰/۱	۵۷/۱	۱/۲۵

* واحد آنزیمی سلولولیتیک بر حسب FPU (Filter Paper Unit) : تعداد میکرومول گلوکز آزاد شده از یک میلی لیتر محلول آنزیمی در یک دقیقه در شرایط مطلوب است($P<0.05$)

زمان لازم برای تماس آنزیم به سوبسترا نیز فاکتور مهمی است چون بعد از مدتی مشاهده شد که آنزیم شروع به رها شدن از سلولز می کند. بنابراین اتصال آنزیم سلولاز به سلولز در زمان های مختلف مورد آزمایش قرار گرفت و فعالیت محلول رویی پس از سانتریفیوژ محاسبه گردید (جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

همانطور که مشاهده می‌کنید، پس از ۱۸۰ دقیقه ۳۲ mFPU گردید. مقدار پروتئین نیز محاسبه شد فعالیت آنزیم در محلول رویی بسیار زیاد شد یعنی و ۵۷ µg/test شد.

جدول ۲- تاثیر زمان در رهاسازی آنزیم‌های سلولولیتیک از سلولز میکروکریستالی در قارچ *T.reesei*

زمان انکوباسیون (min)	محلول رویی *(mFPU)	قند احیا کننده †[RS]mg/test	مقدار پروتئین ‡[Pro]µgr/test
۹۰	۲۲ ± ۲	۰/۴ ± ۰/۰۵	۳۹ ± ۴
۱۸۰	۳۲ ± ۳	۰/۵۶ ± ۰/۰۷	۵۷ ± ۵
۲۷۰	۳۱ ± ۲	۰/۶۲ ± ۰/۰۷	۵۴ ± ۵
۳۶۰	۲۶ ± ۲	۰/۷۵ ± ۰/۰۶	۴۸ ± ۳

* واحد فعالیت آنزیمی سلولولیتیک بر حسب milli Filter Paper Unit

† قند احیا کننده Reduce Sugar (Reducing sugar)

‡ پروتئین Protein

(P<0.05)

جدول۳ نشان می دهد که با افزایش مقدار آنزیم، همانطور که مشاهده می شود هر چه حجم آنزیم جذب آن به سلولز نیز تغییر می کند. بنابراین افزایش یابد، مقدار جذب زیاد نشود.

جدول ۳- رها سازی آنزیم سلولاز از سلولز در قارچ *T.reesei*

دفعات رها سازی آنزیم	حجم محلول آنزیم (ml)	مقدار پروتئین (mg)	فعالیت آنزیم *(FPU)	فعالیت ویژه (FPase)	بازده هر مرحله (٪)	فاکتور خالص سازی هر مرحله
۱	۳۰ ± ۳	۵۹ ± ۳	۴ ± ۰/۲	۰/۶۷	۶۸/۹	۱/۸
۲	۳۵ ± ۲	۶۳ ± ۴	۴/۳ ± ۰/۳	۰/۰۶۸	۷۲/۱	۱/۸
۳	۳۵ ± ۳	۶۲ ± ۲	۴/۲ ± ۰/۲	۰/۰۶۵	۷۲/۴	۱/۸
۴	۱۰۰	۶۷ ± ۳	۴/۴ ± ۰/۴	۰/۰۶۰	۷۵	۱/۷

* واحد آنزیمی سلولولیتیک بر حسب FPU (Filter Paper Unit) : تعداد میکرومول گلوکز آزاد شده

یک میلی لیتر محلول آنزیمی در یک دقیقه در شرایط مطلوب است(P>0.05)

Archive of SID

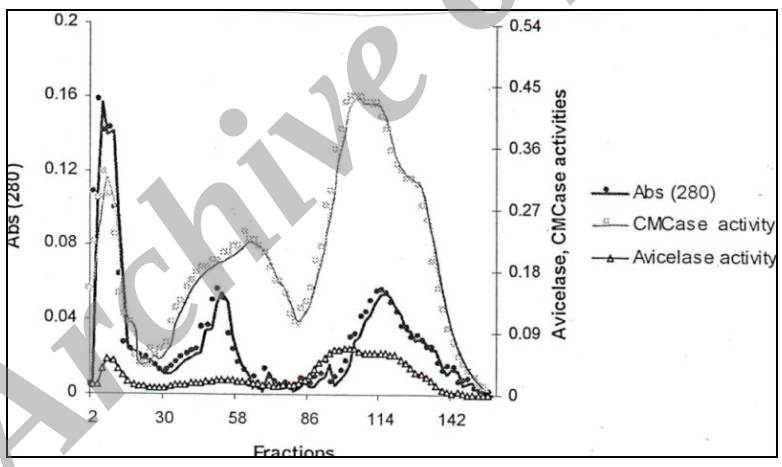
www.SID.ir

در جدول ۴ تغلیظ آنزیم سلولاز توسط n– بوتانل انجام شد و قبل از تغلیظ فعالیت آنزیم ۴/۴ FPU بود ولی بعد از تغلیظ تقریباً فعالیت آن دو برابر شد (۸/۶ FPU).

جدول ۴– تغلیظ محلول آنزیمی حاوی قارچ *T.reesei* توسط n– بوتانل

قبل از تغلیظ		بعد از تغلیظ	
مقدار پروتئین (mg)	فعالیت آنزیم (FPU)	مقدار پروتئین (mg)	فعالیت آنزیم (FPU)
۶۷ ± ۳	۴/۴ ± ۰/۳	۵۲ ±۳	۸/۶ ±۰/۱

نمودار شماره ۱ بیانگر این است که با انجام تغلیظ توسط n– بوتانل، مقدار آنزیم اندوگلوکاناز وفعالیت آن (CMCase activity) زیاد شد



نمودار ۱– کروماتوگرافی تعویض یونی محلول آنزیمی حاوی قارچ *T.reesei* با استفاده از DEAE-Sepharose CL- 6B

در این روش ۸۰۰ میکرولیتر محلول شامل ۱۱ میلی گرم از تامپون استات آمونیوم با شیب غلظت ۲ – ۰/۰۱ مولار (pH برابر ۵) و با سرعت جریان ۴ میلی لیتر در ۱۰ دقیقه استفاده شد. حجم هر فراکسیون ۴ میلی لیتر می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

اتصال آنزیم‌های سلولولیتیک به سلولز بسیار محکم است، علت آن وجود دُمین (ناحیه) های کاتالیتیکی[9] CBD در روی آنزیم می‌باشد. قبلاً تصور می‌شد که جدا کردن آن امکان پذیر نمی باشد.

لیندر و همکارانش در سال ۱۹۹۶ نشان دادند (Linder and Teeri, 1996) که این فرآیند برگشت پذیر است. همانطور که در قسمت روش ها گفته شد، غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم در محلول رویی اندازه گیری شده و در جدول (۱) آمده است.

در جدول (۲) تاثیر زمان در رها سازی آنزیم‌های سلولولیتیک از سلولز میکروکریستالی آمده است. در این روش رسوب حاوی آنزیم متصل به سلولز تغلیظ شده جمع آوری گردید و در معرض گلیسرول و دی اتیل اتر در زمان های مختلف قرار داده شد (ستون اول جدول ۲). سپس سوسپانسیون حاصل را با دور g× ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در C° ۴ سانتریفیوژ نموده ومحلول رویی را که حاوی آنزیم جدا شده از سلولز است جهت تعیین فعالیت آنزیم (ستون ۲ جدول ۲)، مقدار قند (ستون ۳ جدول ۲) و بالاخره غلظت پروتئین (ستون ۴ جدول ۲) مورد بررسی قرار داده شد. بیشترین رها سازی آنزیم از سلولز در ۱۸۰ دقیقه (سه ساعت) صورت گرفت و مقدار پروتئین رها شده ۵۷ میکروگرم بود. در این زمان فعالیت آنزیم در محلول رویی mFPU گردید.

طبق فرضیه درگیر شدن[10] (Colowich, 1955)، وقتی آنزیم سلولاز توسط دُمین CBD روی سلولز قرار گرفت، دُمین کاتالیتیکی فعالیت خود را شروع کرده و سلولز اطراف خود را با استفاده از آنزیم های اندوگلوکاناز و اگزوگلوکاناز هیدرولیز می کند. وقتی عمل دُمین CBD در محل مربوطه خاتمه یافت باید به محل دیگری روی سوبسترا رفته و به آن متصل شود تا مجدداً در محل جدید هیدرولیز را آغاز کند. معمولاً رها سازی آنزیم‌ها از سوبسترا و دو باره پیوند شدن آنها به سلولز بسیار کند صورت می‌گیرد. در این تحقیق، بررسی ما نشان داد که جذب آنزیم سلولاز به سلولز بسیار سریع انجام شد (حدود ۲ دقیقه) ولی رها سازی آنزیم از سلولز بسیار سخت صورت می گیرد ولی این رها سازی امکان پذیر است. رها سازی آنزیم های سلولولیتیک طبق روش ذکر شده در بالا برای ۴ مرتبه با مقادیر مختلف محلول آنزیم انجام شد (جدول ۳). آنزیم های سلولاز رها شده از لحاظ

[9] Catalytic binding domain

[10] Tethering

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت ۱۰ در صد و از لحاظ میزان پروتئین ۱۳/۵ در صد رها سازی را نشان می دهند.

از میان چندین حلال آلی که برای رها سازی آنزیم های سلولولیتیک از سلولز استفاده شد، گلیسرول و دی اتیل اتر (گاهی بوتانل) بهترین حلال آلی برای این منظور گزارش شده اند [۹]. تیمار سلولز حاوی آنزیم های سلولولیتیک با مخلوط گلیسرول و دی اتیل اتر (v/v ۱ : ۱) باعث رها سازی آنزیم از سلولز با بازدهی بالا گردید.

تغلیظ سیستم های آنزیمی سلولولیتیک :

با اضافه کردن n– بوتانل به سلولز رها شده در گلیسرول (v/v ۱ : ۱)، آنزیم سلولاز تغلیظ شده و عمل تغلیظ به آسانی صورت می گیرد (جدول ۴). برتری این روش نسبت به روش‌های معمول که امروزه انجام می شوند این است که معمولاً از اولترافیلتراسیون یا از دستگاه لیوفیلیز استفاده می شود که این روش ها در صنعت مقرون به صرفه نیست و روش تغلیظ توسط بوتانول می‌تواند جایگزین خوبی گردد.

جدا سازی آنزیم های سلولولیتیک توسط ستون کروماتوگرافی DEAE- Sepharose CL-6B:

بعد از تغلیظ آنزیم سلولاز، با استفاده از ستون کروماتوگرافی DEAE- Sepharose CL-6B جدا سازی هر یک از آنزیم های اگزوگلوکانازها و اندوگلوکانازها صورت گرفت. نمودار ۱–۱ مقدار فعالیت اندوگلوکاناز (CMCas) را که خیلی بیشتر از فعالیت اگزوکلوکاناز است ، نشان می دهد. در اثر تغلیظ با n– بوتانول، تجمع و بهم فشردگی آنزیم ها در کمپلکس سلولاز زیاد شده در نتیجه از دست دادن هر یک از آنزیم ها در کمپلکس سلولاز کمتر صورت می‌گیرد(این موضوع با مقایسه تغلیظ توسط روش های دیگر مورد سنجش قرار گرفت که در اینجا ذکر نشده اند). قارچ *T.reesei* دارای تقریبا ۶۰٪ آنزیم CBHI و ۲۰٪ آنزیم CBHII می‌باشد (Teeri, 1997). ولی همانطور که در نمودار (۱) مشاهده می‌شود، غلظت اندوگلوکانازهای به دست آمده نسبت به اگزوگلوکانازها خیلی بیشتر و قابل توجه می باشد. به هرحال ممکن است مقداری از سلوبیوهیدرولازها را با استفاده از این روش از دست داده باشیم یا استفاده از تغلیظ توسط بوتانل باعث می شود که هم مقدار اندوگلوکانازها زیاد شوند و هم این که فعالیت آنها افزایش یابد. به هر حال برای بررسی این موضوع نیاز به تحقیق بیشتری می باشد. طبق گزارشی احمد و همکارانش

Archive of SID

www.SID.ir

در پاکستان، نشان دادند که با استفاده از روش‌های خالص سازی دیگر مثل رسوب با آمونیوم سولفات، فیلتراسیون و ژل کروماتوگرافی توسط سفادکس G50 و G200، مقدار و فعالیت آنزیم های اگزوگلوکانازها خیلی بیشتر از اندوگلوکانازها شد و فعالیت اگزوگلوکاناز را ۴۹/۲۲ و اندوگلوکاناز را ۰/۶۳ IU/mg به دست آوردند (Ahmad *et al*., 2009). بنابراین روش خالص سازی می تواند تأثیر زیادی روی مقدار و فعالیت آنزیم های تشکیل دهنده کمپلکس سلولولیتیک داشته باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از تمامی افرادی که در این مطالعه همکاری نمودند تشکر و قدردانی میگردد.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES:

Ahmad S, Bashir A, Saleem H, Saadia M and Jamil A(2009); Production and purification of cellulose degrading enzyme from a filamentous fungus *T.harzianum.* Pak.J.Bot. 41(3): 1411-1419.

Bhat MK and Bhat S (1977); Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, Biotechnol. Adv.; 15: 583- 620.

Cohen A , Schagerlof H, Nilsson C, Molander C, Tjerneld F and Gorton L (2004) Liquid chromatography- mass spectrometry analysis of enzyme- hydrolysed carboxymethylcellulose for investigation of enzyme selectivity and substituent pattern, J. Chromatogr A. 2004; 1029: 87- 95.

Colowich S P (1955) in "Methods in enzymology", Academic Press INC.; pp: 149.

Ellouz S, Durand H, and Tiraby G (1987) Analytical separation of *Trichoderma reesei* cellulases by ion- exchange fast protein liquid chromatography, J. Chromat.A.; 396: 307-317.

Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener L, Dunn- Coleman N S, Goedegebuur F, Houfek T D, England G J, Keley A S, Meerman H J, Teunissen PJM, Yao J, and Ward M (2003) Transcriptional regulation of biomass- degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei.* J. Biol.Chem.; 278: 31988- 31997.

Ghose TK.Measurement of cellulose activities (1987) Pure Appl.Chem.; 59: 257- 268. Lameh Rad B and Yazdanparast R (1998) Desorption of the cellulose systems of *Trichoderma reesei* and a Botrytis sp. From Avicel, Biotechnol. Tech.; 12:693-69.Linder M and Teeri T T (1996) The cellulose- binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. Proc. Nat. Acad. Sci. USA,; 93: 12231- 12255.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A L and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.; 193: 265- 275.

Mandels M and Andreotti R (1973) Microbiology sources of cellulose, Biotechnol. Bioeng. Symp.; 5: 81- 105.

Momciloric D, Wittgren B, Wahlund K.-G., Karlsson J and Brinkmalm G (2003) Sample preparation effects in matrix- assisted laser desorption/ ionization time- of flight mass spectrometry of partially depolymerised carboxymethyl cellulose, Rapid Commun. Mass Spectrom.; 17: 1107-1115.

Nelson N (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem.; 153: 37- 380.

Richardson S and Gorton L (2003) Characterisation of the substituent distribution in Starch and cellulose derivatives. Anal. Chim. Acta.; 497:27-65.

Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, Masaki H, and Uozumi T (1999) Molecular cloning and expression of the novel fungal β- glucosidase genes from *humicola grisea* and *Trichderma reesei*, J. Biochem (Tokyo); 125: 728-736.

Teeri TT (1997) crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Trends Biotechnol.; 15: 16- 167.

Wood TM and Mc Crae SI (1986) the cellulose of *Penicillium pinophilum*. Synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special Reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases, Biochem. J.; 234: 93-99.

Archive of SID

www.SID.ir

T. reesei endoglucanases increase by butanol concentration method

B. Laamerad*

Assistant Professor., Payame noor University, Tehran Iran

(Received: Mar. 16, 2012; Accepted: Jul. 11, 2012)

ABSTRACT

Cellulase products usage in industry is in demand considerably. This enzyme is used in paper, paint, oil and textile industries. Cellulase can convert cellulose to glucose and then glucose can be converted to ethanol which this process can be replaced with fossil fuels. Cellulose is a polysaccharide that can be renewable and may be in future providing fuel for transportation. Cellulase converts cellulose to soluble sugars. One of the most extensively studied organisms is the soft rot fungus *Trichoderma reesei.* This fungus produces a complete set of cellulolytic enzymes that are able to cleave β- 1, 4- glycosidic bonds present in cellulose or cellulose derivatives. One of the key enzymes in the multi- enzyme complexes is endoglucanase which is purified from different method. By using the butanol to concentrate this enzyme, we obtained remarkable active enzyme. The amount of cellobiohydrolases are much more than the concentration of endoglucanases (mentioned by several articles) in *Trichoderma reesei*. In this experiment, we could obtain the concentration of endoglucanases 20% more than cellobiohydrolases.

Keywords: Butanol, Cellulase, Endoglucanase, *Trichoderma reesei*

Archive of SID

* Corresponding author: Behzad Laamerad Email: b_lame@pnu.ac.ir

www.SID.ir