Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز ۱۳۸۸، دوره یکم، شماره دوم، صفحه ۵۹ - ۵۱

تخلیص آنزیم صنعتی گزیلاناز(EC:۳,۲,۱,۸) از محیط کشت باکتری *باسیلوس استئاروترموفیلوس* (ATCC ۱۲۹۸۰)

زهره فائزي زاده[۱] *، امیر قریب[۱]، محسن میرزایي[۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی

نویسنده مسئول: دکتر زهره فائزی زاده، استاد یار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد.
Faezizadeh@modares.ac.ir

دریافت:۸۸/۷/۲۰ پذیرش: ۸۸/۸/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: بخش عمده همی سلولز دیواره سلولی گیاهان را ماده گزیلان تشکیل می دهد. گزیلانازها (*EC 3.2.1.8*) آنزیمهایی هستند که از گونه های مختلف میکروارگانیسم ها از جمله برخی از قارچها و باکتریها استخراج گردیده اند. این آنزیمها قادرند اتصال قندهای *D*- گزیلوز را در ماده گزیلان تخریب نمایند و باعث آزاد شدن قند مذکور از گزیلان گردند. در سالهای اخیر گزیلانازها در صنایع مختلف از جمله در بی رنگ سازی کاغذ و شفاف کردن روغنهای خوراکی کاربرد وسیعی یافته اند.

روش بررسی: در این تحقیق آنزیم گزیلاناز از محیط کشت باکتری *باسیلوس استئاروترموفیلوس* (ATCC 12980) بوسیله چندین روش آزمایشگاهی نظیر رسوب با سولفات آمونیوم، سانتریفوژ و کروماتوگرافی های ژل فیلتراسیون با سفادکس *G-100* و تعویض یونی با دی اتیل آمینو اتیل- سلولز تخلیص گردید و سپس اثر pH و دما بر روی فعالیت این آنزیم بررسی گردید.

یافته ها: در کروماتوگرافی ستونی دی اتیل آمینو اتیل- سلولز سه پیک مجزا مشاهده گردید که فقط یک پیک فعالیت گزیلانازی از خود نشان داد و درجه تخلیص بدست آمده از فراکسیونهای این پیک معادل ۶۳/۰۹ تعیین شد. فعالیت ویژه آنزیم تخلیص شده برابر با ۸۷/۷ واحد بین المللی بر میلی گرم بدست آمد و بازده تخلیص آن ۱۷/۴۵ درصد بود. همچنین آنزیم تخلیص شده حداکثر فعالیت هیدرولیزی بر روی گزیلان را در pH معادل ۷ و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد نشان داد. این آنزیم توانست گزیلان را در طی ۱۶ ساعت تجزیه نماید. بررسی محصولات انتهایی هیدرولیز گزیلان توسط کروماتوگرافی کاغذی بر این دلالت داشت که آنزیم گزیلاناز تخلیص شده نوعی اِندوگزیلاناز می باشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده در مورد pH و دمای اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده مشخص گردید که این آنزیم جهت استفاده در صنعت بسیار مناسب می باشد.

واژه های کلیدی: *باسیلوس استئاروترموفیلوس*، **گزیلاناز، تخلیص، کروماتوگرافی**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آنزیم گزیلاناز(EC:3.2.1.8) توسط باکتریها و قارچهای ترموفیلیک گیاهی تولید می گردد (۱). این آنزیم می تواند همی سلولز متعلق به کربوهیدراتهای غیر نشاسته ای را هیدرولیز نماید (۲). در سالهای اخیر کاربرد صنعتی این آنزیم توجه بسیاری از محققین را در دنیا به خود جلب نموده است، به طوریکه آنزیم فوق در صنایع مختلفی از جمله صنعت کاغذ سازی (در روند بی رنگ سازی کاغذ)، در شفاف کردن روغنهای خوراکی و در تبدیل سوخت های جامد به مایع مورد استفاده قرار گرفته است (۳و۴). این آنزیم از منابع مختلف باکتریایی و قارچی توسط محققین جداسازی شده است و مشخص گردیده که میزان فعالیت این آنزیم و مقدار آن در منابع مختلف متفاوت می باشد (۵). آنزیمهای گزیلاناز استخراج شده از باکتری‌ها به عنوان کاتالیزورهای هیدرولیزکننده گزیلان نسبت به سایر گزیلانازها بعلت مواردی نظیر عملکرد بسیار اختصاصی و تولید محصولات جانبی از اهمیت بیشتری برخوردارند (۶). *باسیلوس استئاروترموفیلوس*، یک باکتری گرما دوست بوده و یکی از عوامل فساد محصولات غذایی می‌باشد (۷). سوش استاندارد ATCC 12980 این باکتری از نظر صنعتی منبعی برای تولید آنزیم اِندونوکلئاز *BstPI* می‌باشد (۸). این باکتری در نوارهای کاغذی به عنوان یک شناساگر بیولوژیکی جهت عمل استریلیزاسیون بکار می‌رود، همچنین یک منبع مناسب جهت تولید آنزیم‌های مقاوم به گرما جهت کاربردهای صنعتی می‌باشد (۹). در این کار تحقیقی آنزیم گزیلاناز از محیط کشت باکتری *باسیلوس استئاروترموفیلوس* (ATCC 12980) تخلیص شده و پس از مطالعات اولیه نظیر اندازه گیری pH و دمای اُپتیمم آن، توانایی این آنزیم در تجزیه گزیلان مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

تهیه باکتری: باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس (ATCC 12980) از شرکت Rockville آمریکا خریداری شد. این باکتری در محیط کشت مایع اختصاصی جهت تولید بهینه آنزیم گزیلانازکشت داده شد (۱۰). جهت تهیه یک لیتر از این محیط کشت در یک ارلن، ۱۰ گرم گزیلان، ۲۰ گرم پلی‌پپتون، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم نیتریت آمونیوم، ۲ گرم فسفات مونوپتاسیک، ۱ گرم سولفات منیزیم آبدار و ۰/۰۵ گرم سولفات منگنز ریخته شد و با آب مقطر حجم آن به یک لیتر رسانده شد و pH آن روی ۷ تنظیم گردید.

استخراج و تخلیص آنزیم گزیلاناز: آنزیم گزیلاناز از محیط کشت باکتری مذکور به روش Roy به شرح زیر استخراج و تخلیص گردید (۱۱).

استخراج آنزیم گزیلاناز از محیط کشت: ابتدا محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در یک انکوباتور شیکردار انکوبه شد. پس از انکوباسیون محیط کشت مذکور در دمای $4^{\circ}C$ با دور ۱۰۰۰۰*g برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به محلول شفاف روئی بدست آمده سولفات آمونیوم اشباع اضافه گردید و با دور ۱۰۰۰۰*g برای ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب بدست آمده حاوی آنزیم گزیلاناز، در۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار وpH معادل ۷) حل گردید، و در مقابل ۵ لیتر از همان بافر به مدت ۵ تا ۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد دیالیز شد.

تخلیص آنزیم گزیلاناز: تخلیص آنزیم گزیلاناز طی دو مرحله مجزای کروماتوگرافی ستونی ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تعویض یونی انجام گردید.

کروماتوگرافی ستونی ژل فیلتراسیون: محلول دیالیز شده حاوی آنزیم، به ستون کروماتوگرافی(۱۰۰cm× ۲/۷) حاوی سفادکس G-۱۰۰ در تعادل با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار وpH معادل ۷) اضافه گردید. سپس ستون با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار وpH معادل ۷) با سرعت جریان۱۲۰ میلی لیتر در ساعت شستشو داده شد و محلول خروجی به وسیلهٔ دستگاه فراکشن کالکتور جمع آوری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی- ماوراء بنفش جهت بررسی وجود پروتئین قرائت شد. سپس فراکسیونهای دارای فعالیت گزیلانازی با یکدیگر مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در مقابل بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار وpH معادل ۷) دیالیز شدند. این مخلوط تا حجم ۱۰ میلی لیتر با استفاده از دستگاه روتاری اواپوراتور تحت شرایط خلاء تغلیظ گردید (۱۱).

www.SID.ir

Archive of SID

کروماتوگرافی ستونی تعویض یونی: محلول آنزیمی تغلیظ شده از مرحله ژل فیلتراسیون به ستون کروماتوگرافی(cm ۴۰×۱/۵) حاوی DEAE- سلولز که در حال تعادل با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار وpH معادل ۷) بود اضافه گردید. سپس بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار وpH معادل ۷) با سرعت جریان ۲۵ میلی‌لیتردر ساعت از ستون عبور داده شد. پس از عبور ۱۵۰۰ میلی لیتر از بافر مذکور از ستون، گرادیان ۰ تا ۰/۲۵ مولار NaCl توسط بافر فسفات پتاسیم(۰/۰۵ مولار و pH معادل ۷) حاوی NaCl از ستون عبور داده شد و فراکسیونهای خارج شده توسط دستگاه فراکشن کالکتور جمع آوری گردید. سپس جذب فراکسیونهای جدا شده درطول موج۲۸۰ نانومتر قرائت و در مرحله بعد فراکشنهای حاوی جذب از نظر فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار (۱۱).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گزیلاناز: جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گزیلاناز در نمونه‌های بدست آمده از مراحل مختلف استخراج و تخلیص آنزیم از روش Miller و همکارانش استفاده گردید (۱۲). مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمونه در یک لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سوسپانسیون گزیلان در بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار وpH معادل ۷) اضافه گردید. سپس محتویات لوله با همزن برقی مخلوط شد و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس مخلوط مذکور به سرعت در آب سرد حاوی یخ قرار داده شد و بعد از آن با دور g×۱۰۰۰۰ برای مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید در این حالت گزیلانهای تجزیه نشده توسط آنزیم گزیلاناز رسوب نمود. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی درون یک لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد ۳ و ۵- دی نیتروسالیسیلیک اسید اضافه گردید. بعد از آن لوله مذکور به مدت ۵ دقیقه درون بن‌ماری آب جوش قرار داده شد و سپس محتویات آن توسط جریان آب ، سرد گردید. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نوری آن در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد و با استفاده از نمودار استاندارد، فعالیت آنزیم مذکور در نمونه اندازه گیری شد. طبق تعریف یک واحد آنزیم گزیلاناز عبارتست از مقدار آنزیمی که قادر است در مدت زمان یک دقیقه یک میکرومول قند D- گزیلوز را از سوبسترای گزیلان تحت شرایط استاندارد (دمای۶۰ درجه سانتیگراد و pH معادل ۷) آزاد نماید.

اندازه گیری مقدار پروتئین: مقدار پروتئین نمونه ها در تمام مراحل این کار تحقیقاتی بر اساس روش *Lowry* و همکارانش اندازه گیری گردید (۱۳).

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید(SDS-PAGE): مراحل مختلف تخلیص آنزیم گزیلاناز توسط روش الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید(SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. درصد ژل پایینی ۱۲/۵ درصد انتخاب شد (۱۵و۱۴).

تعیین دما وpH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده: تعیین دما وpH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده با استفاده از روشRoy و همکارانش انجام گرفت(۱۱). جهت تعیین دمای اُپتیمم یک میلی لیتر محلول آنزیمی حاوی ۵ واحد بین‌المللی آنزیم با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار وpH معادل ۷) تهیه گردید. سپس در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ده دقیقه قرار داده شد و فعالیت آنزیم در آن اندازه‌گیری و درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم گزیلاناز در دمای مذکور محاسبه شد. همین عمل برای دماهای ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتیگراد تکرار گردید.

برای تعیین pH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده نیز با استفاده از بافرهای مختلف با pH های متفاوت (بین ۴ و ۹) انجام گرفت. ابتدا یک میلی‌لیتر محلول آنزیم گزیلاناز حاوی ۵ واحد بین‌المللی از آنزیم تخلیص شده با استفاده از بافر استات سدیم با pH معادل ۴ تهیه شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و مجدداً فعالیت آنزیم گزیلاناز در آن اندازه‌گیری شد و درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم گزیلاناز در این pH تعیین گردید. همین عمل برای pH های ۵ تا ۹ نیز با استفاده از بافر استات سدیم (با pH معادل ۵)، بافر فسفات پتاسیم (با pH های معادل ۶ ،۷ و۸) و در نهایت بافر تریس- HCl (با pH معادل ۹) تکرار گردید.

بررسی اثر آنزیم گزیلاناز تخلیص شده بر تجزیه گزیلان

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری درصد هیدرولیز گزیلان: در این مرحله از پروژه تحقیقاتی از روش khasin و همکارانش استفاده گردید (۱۶). در یک لوله آزمایش محلولی شامل یک واحد بین‌المللی از آنزیم گزیلاناز در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pHمعادل۷) تهیه شد و به آن ۲۵ میلی‌گرم گزیلان اضافه گردید. لوله مذکور پس از به همزدن محتویاتش به مدت دو ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس مقدار D- گزیلوز تولید شده در آن با استفاده از نمودار استاندارد برحسب میکرومول محاسبه گردید. سپس با استفاده از معادله زیر درصد هیدرولیز گزیلان توسط آنزیم گزیلاناز در طی یک ساعت اندازه‌گیری شد:

$$\text{درصد هیدرولیز گزیلان} = \frac{\text{مقدار میکرومول D- گزیلوز تولید شده درطی یک ساعت}}{\text{وزن گزیلان اولیه (میلی گرم)}} \times ۱۰۰ \times ۹/۰$$

در این معادله عدد ۰/۹ فاکتوری ناشی از افزایش مولکولهای آب به سوبسترا در طی واکنش هیدرولیز می‌باشد. همین عمل برای مدت زمانهای ۴، ۸ و ۱۶ ساعت تکرار شد و در نهایت نمودار تغییرات درصد هیدرولیز گزیلان طی ساعات مذکور رسم گردید.

بررسی اثر هیدرولیزی آنزیم گزیلاناز با استفاده از کروماتوگرافی کاغذی: در این مرحله از تحقیق از روش Kar و همکارانش در سال ۲۰۰۶ استفاده گردید (۱۷). بدین صورت که ابتدا ۵۰ میلی لیتر محلول گزیلان یک درصد با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH معادل ۷) تهیه شد و به آن ۴۵۰۰ واحد بین المللی آنزیم گزیلاناز افزوده گردید و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس در مدت زمانهای ۱، ۴، ۸ و ۱۶ ساعت ۵ میلی‌لیتر از این محلول برداشته شد. گزیلان موجود در هر نمونه که مصرف نشده بود با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد. در مرحله بعد گزیلان رسوب نموده با استفاده از عمل سانتریفوژ (g× ۱۰۰۰۰برای مدت ۱۰ دقیقه) از محلول رویی جدا گردید. سپس محلول شفاف رویی با پی‌پت پاستور جمع‌آوری گردید و تا حجم ۵۰۰ میکرولیتر تغلیظ گردید. سپس از هر نمونه بر روی کاغذ کروماتوگرافی عمل لکه‌گذاری صورت گرفت. از محلول D- گزیلوز نیز به عنوان استاندارد در عمل لکه‌گذاری استفاده شد. در مرحله بعد کاغذ در جار کروماتوگرافی محتوی سه حلال استون و ایزوبوتانل و آب (به ترتیب با نسبت حجمی ۸ به ۱ به ۱) قرار گرفت. بعد از عمل جداسازی و بالا آمدن حلالها، عمل رنگ‌آمیزی کاغذ با اسپری مخلوطی از ۰/۵ میلی‌لیتر آنیزآلدئید و ۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک و ۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک انجام شد و سپس کاغذ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. در این وضعیت قند D- گزیلوز روی کاغذ رنگ سبز-خاکستری بخود گرفت.

یافته ها

نتایج بدست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون: نتایج حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G-100 در نمودار۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد این نمودار حاوی سه پیک F-۱ ، F-۲ و F-۳ می‌باشد. بررسی جذب فراکسیونهای جداسازی در ۲۸۰ نانومتر نشان داد که هر سه پیک مذکور حاوی پروتئین می‌باشند، ولی فقط فراکسیونهای موجود در پیک F-۱ دارای فعالیت گزیلانازی بودند. فراکسیونها جمع‌آوری شده پیک F-۱ حجمی معادل ۴۲ میلی‌لیتر داشتند که بر روی هم ریخته شده و تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر تغلیظ گردیدند و جهت انجام کروماتوگرافی تعویض یونی در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفتند. مقدار پروتئین تام در فراکسیونهای پیک F-۱ برابر با ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۱).

نتایج بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی: نتایج کروماتوگرافی تعویض یونی ژل DEAE- سلولز در نمودار۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می گردد سه پیک مجزای F-۱a ، F-۱b و F-۱c ایجاد گردید که در ۲۸۰ نانومتر دارای جذب بودند ولی فقط فراکسیونهای پیک F-۱b فعالیت گزیلانازی داشتند. این پیک شامل ۸ فراکسیون با حجم نهایی معادل ۱۶ میلی‌لیتر بود. فراکسیونهای پیک F-۱b پس از تغلیظ شدن توسط الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید مورد ارزیابی قرار گرفتند. ایجاد یک باند پروتئینی بر روی ژل مذکور نشان دهنده تخلیص آنزیم مذکور بود (شکل۱). مقدار فعالیت ویژه و فعالیت کل آنزیم تخلیص شده در تمامی مراحل خالص سازی آنزیم در جدول ۱ مشاهده می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از تعیین دمای اُپتیمم آنزیم گزیلاناز: نمودار۳ بیانگر تغییرات درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم گزیلاناز تخلیص شده در دماهای۵۰ تا ۸۰ می‌باشد. همانطور که در این نمودار مشاهده می‌گردد در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد فعالیت باقی‌مانده آنزیم مذکور حداکثر (٪۱۰۰) می‌باشد. بنابراین این دما، دمای اُپتیمم فعالیت آنزیم مذکور است.

نتایج حاصل از تعیین pH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز: مطابق روش ذکر شده در بخش ۲-۶ برای تعیین pH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده، میزان فعالیت ۵ واحد بین‌المللی از این آنزیم در pH های مختلف (۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در نمودار ۴ مشاهده می‌گردد در pH برابر۷، درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم ۱۰۰ درصد است، بنابراین pH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده معادل ۷ می‌باشد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری درصد گزیلان هیدرولیز شده توسط آنزیم گزیلاناز: با اثر دادن آنزیم گزیلاناز تخلیص شده بر گزیلان طی ساعات مختلف، درصد هیدرولیز گزیلان تعیین گردید. نمودار ۵ نشان‌دهنده تغییرات درصد هیدرولیز گزیلان در زمانهای ۱، ۴ ، ۸ و ۱۶ ساعت می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌گردد بیشترین درصد هیدرولیز گزیلان (٪۵۰) مربوط به ۱۶ ساعت پس از انکوباسیون است.

نتایج حاصل از کروماتوگرافی کاغذی جهت اثبات تجزیه گزیلان توسط آنزیم گزیلاناز:جهت اثبات تجزیه گزیلان توسط آنزیم گزیلاناز، نمونه‌های جدا شده در مدت زمانهای ۱، ۴، ۸ و ۱۶ ساعت پس از انکوباسیون با استفاده از کروماتوگرافی کاغذی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد آنزیم گزیلاناز تخلیص شده توانسته است پس از ۱۶ ساعت گزیلان را تجزیه نموده و از آن واحدهای D-گزیلوز تولید نماید.

بحث

در این تحقیق محیط کشت اختصاصی طبق روش Nanmori و همکارانش تهیه گردید (۱۰). این محیط کشت حاوی ترکیباتی نظیر گزیلان، عصاره مخمر، پلی‌پپتون و غیره بوده و به ترتیب در سالهای ۹۳ و ۹۸ توسط Khasin و Mandeva و همکارانشان جهت تولید بهینه آنزیم گزیلاناز مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶و۱۸). با استفاده از این محیط کشت اختصاصی تولید آنزیم گزیلاناز توسط باکتری *باسیلوس استئاروترموفیلوس* حداکثر می‌گردد (۱، ۱۹و۲۰). در این پروژه آنزیم گزیلاناز توسط روش Roy و همکارانش (۱۱)، استخراج و تخلیص گردید. بازده عمل در این روش حدود ۱۷/۴۵ درصد بدست آمد که بیشتر از مقدار گزارش شده توسط Nanmori و همکارانش (۱۱/۳) می‌باشد که این آنزیم را از سوش جدیدی از باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس استخراج نموده‌اند (۱۰).

همچنین بازده مذکور (۱۷/۴۵ درصد) بیشتر از بازده گزارش شده توسط Gupta و همکارانش (۵ درصد) است که آنزیم گزیلاناز را از سوش خاصی از *باکتری استافیلوکوکوس* (SG-13) جداسازی نموده‌اند(۲۱)، که این امر توجیه‌کننده چگونگی استفاده بیشتر از باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس نسبت به سایر باکتریها جهت تولید آنزیم گزیلاناز می‌باشد. در ادامه این تحقیق وزن مولکولی آنزیم گزیلاناز تخلیص شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آکریل آمید و مارکرهای تعیین‌کننده وزن مولکولی به طور تقریبی معادل ۴۰ کیلودالتون تعیین گردید که تقریباً معادل وزن مولکولی آنزیم گزیلاناز تخلیص شده توسط Nanmori (۳۹/۵ کیلودالتون) و همچنین Khasin (۴۳ کیلودالتون) و همکاران می‌باشد(۱۰و۱۶).

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که وزن مولکولی آنزیمهای گزیلاناز جداسازی شده از سوشهای مختلف باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس تقریباً یکسان است در صورتیکه وزن مولکولی این آنزیم در سوشهای باکتریهای دیگر نظیر *Aeromonas caviae*و *Bacillus Sp* متفاوت بوده و به ترتیب معادل ۲۲ و ۳۶ کیلودالتون تعیین گردیده است (۲۱و۲۲). در این پروژه دمای اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده برابر با ۶۰ درجه سانتیگراد تعیین شد که طبق تحقیقات انجام شده توسط Collinsو Arora و همکارانشان دمای مناسبی جهت کاربرد صنعتی آنزیم مذکور می‌باشد (۱ و۲۳). این دما تقریباً معادل دمای اُپتیمم آنزیمهای گزیلاناز تخلیص شده در سال‌های ۹۳، ۹۷ و ۲۰۰۳ میلادی توسط محققان مختلف نظیر Nakamura، Sunna، Katapodis و همکارانشان می‌باشد که از جانداران گوناگونی این آنزیم را تخلیص نموده‌اند (۲۴،۲۵و۲۶). همچنین pH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده

www.SID.ir

Archive of SID

در این پروژه تقریباً معادل pH اُپتیمم گزارش شده توسط Nanmori، Khasin و همکارانشان (pH~۷) می‌باشد که از سوشهای مختلف باکتری استئاروترموفیلوس آنزیم مذکور را استخراج نموده‌اند (۱۰و۱۶). بنابراین در این مورد نوعی شباهت قابل گزارش مشاهده می‌گردد که توسط Mandeva و همکارانش نیز ذکر گردیده است (۱۸).

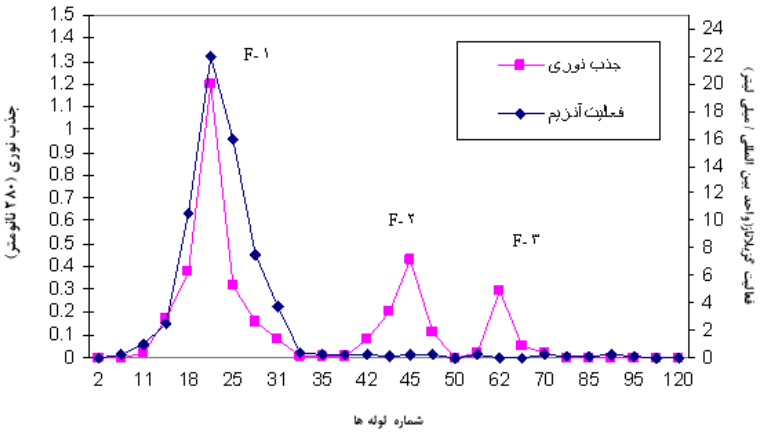
بررسی تأثیر هیدرولیزی آنزیم گزیلاناز تخلیص شده توسط کروماتوگرافی کاغذی نشان داد که آنزیم مذکور از نوع اِندوگزیلاناز می‌باشد. زیرا طبق گزارش Roy و همکارانش آنزیمهای اِندوگزیلاناز در طی ۱۶ ساعت قادرند از گزیلان علاوه بر قند D- گزیلوز، سایر قندها نظیر گزیلوپنتوز، گزیلوتتروز، گزیلوتریوز و گزیلوبیوز تولید نماید. همچنین کروماتوگرافی کاغذی هیدرولیز گزیلان توسط آنزیم تخلیص شده نشان داد که تولید D- گزیلوز توسط این آنزیم بعد از ۱۶ ساعت صورت می‌گیرد (۱۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این پروژه از جمله pH و دمای اپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده مشخص گردید که این آنزیم جهت استفاده صنعتی از کارایی لازم برخوردار است.

تشکر وقدردانی

انجام این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام گردیده است. بدین وسیله از زحمات این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می آید.



نمودار۱: کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۱۲۵ میلی‌گرم پروتئین بدست آمده از مرحله رسوبات با سولفات آمونیوم بر روي ستون سفادکس G-100 به ابعاد (۲/۵×۱۰۲ سانتیمتر) در تعادل با بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار با pH=۷ و سرعت جریان ۱۲۰ میلی‌لیتر در ساعت.

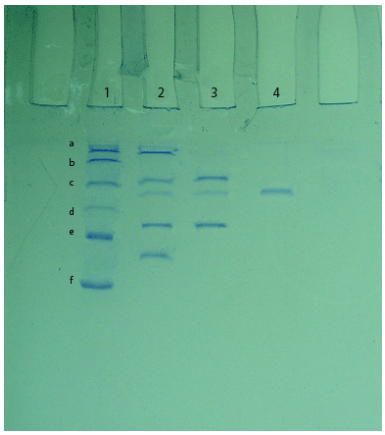
جدول ۱: نتایج بدست آمده از مراحل مختلف استخراج و تخلیص آنزیم گزیلاناز

مراحل	حجم نهايي (ml)	توتال پروتئین (mg/ml)	فعالیت ویژه (u/mg)	فعالیت کل (units)	%Yield	Purification fold
مرحله جداسازي سلولهاي باكتري از محيط كشت	۹۳۲/۸	۴۷۰	۱/۳۹	۶۵۳	۱۰۰	۱
مرحله رسوب با سولفات آمونيوم	۵	۱۲۵	۲/۸۸	۳۶۰	۵۶/۶۹	۲/۰۷
كروماتوگرافي ژل فيلتراسيون با Sphadex G-100	۴۲	۸	۳۸/۷۵	۳۱۰	۴۷/۴۷	۲۷/۸۷
كروماتوگرافي با DEAE-Cellulose	۱۶	۱/۳	۸۷/۷	۱۱۴	۱۷/۴۵	۶۳/۰۹

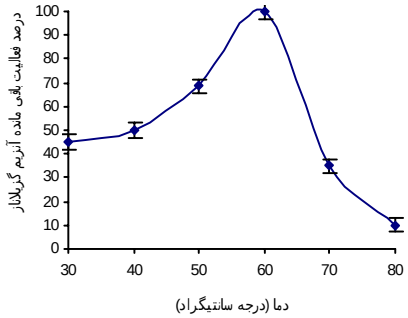
www.SID.ir

Archive of SID

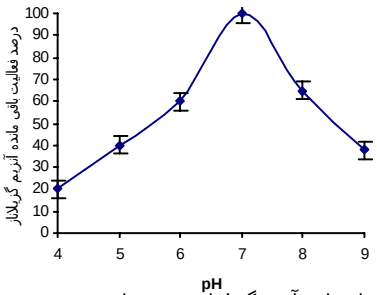
نمودار۲: كروماتوگرافي تعويض يوني پيك F-۱ حاصل از مرحله ژل فيلتراسيون روي ستون DEAE- سلولز به ابعاد (۴۰×۱/۵ سانتيمتر) در تعادل با بافر فسفات پتاسيم و گراديان نمكي ۰ تا ۰/۲۵ مولار NaCl و سرعت جريان۳۰ ميلي‌ليتر در ساعت.



شكل۱: الكتروفورز SDS-PAGE صفحه‌اي (slab) از مراحل مختلف استخراج و تخليص آنزيم درصد ژلهاي پايين و بالا به ترتيب ۱۲/۵ و ۴ درصد و ولتاژ بكار گرفته شده برابر با ۱۲۰ ولت مي‌باشد. رديف ۲ نشان‌دهنده پروتئينهاي موجود در رسوب بدست آمده با استفاده از سولفات آمونيوم مي‌باشد. رديف ۳ نشان‌دهنده پروتئينهاي موجود در پيك F-۱ بدست آمده از عمل كروماتوگرافي ژل فيلتراسيون بوده و در نهايت رديف ۴ نشان‌دهنده آنزيم گزيلاناز تخليص و تغليظ شده (پيك F-۱b) ناشي از عمل كروماتوگرافي تعويض يوني روی ستون DEAE- سلولز مي باشد. در رديف ۱ نيز ماركرهاي وزن مولكولي (به ترتيب، a= فسفريلاز b با وزن مولكولي ۹۴KD ، b= آلبومين سرم گاوي با وزن مولكولي ۶۶KD ، c= اووآلبومين با وزن مولكولي ۴۵KD، d= كربنيك انيدراز با وزن مولكولي ۲۹KD، e= مهاركننده تريسپين سويا با وزن مولكولي ۲۰KD و f= لاكتالبومين با وزن مولكولي ۱۴/۴KD) قرار دارند كه با توجه به وزن آنها، وزن مولكولي آنزيم تخليص شده تقريباً ۴۰ كيلودالتون تعيين گرديد.



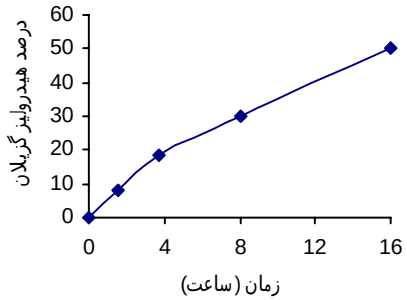
نمودار۳ : تغييرات درصد فعاليت باقي‌مانده آنزيم گزيلاناز در دماهاي ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتيگراد



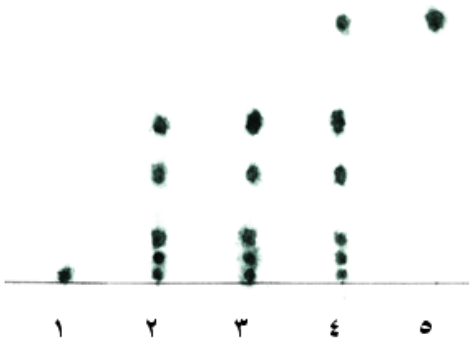
نمودار ۴ : تغييرات درصد فعاليت باقي‌مانده آنزيم گزيلاناز در pH هاي ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۵ : تغییرات درصد هیدرولیز گزیلان توسط آنزیم گزیلاناز طی ۱۶ ساعت



شکل ۲ : کروماتوگرافي کاغذي گزیلان انکوبه شده با انزیم کزیلاناز (ردیف ۱، یکساعت پس از انکوباسیون،ردیف ۲، چهار ساعت پس از انکوباسیون، ردیف ۳، هشت ساعت پس از انکوباسیون ، ردیف۴، شانزده ساعت پس از انکوباسیون و ردیف ۵ ، قند D- گزیلوز به عنوان استاندارد)

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Collins T, Gerday C, Feller, GXylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 2005, 29:, 3-23.

2- Chanjuan L, Hong Y, Shao Z, Lin L., Huang X, Liu P et al. Novel Alkali-Stable, Cellulase-Free Xylanase from Deep-Sea Kocuria sp. Mn22. J. Microbiol. Biotechnol. 2009, 19(9):873-80.

3- Shrivastava S, Poddar R, Shukla P, Mukhopadhyay K. Study of codon bias perspective of fungal xylanase gene by multivariate analysis. Bioinformation. 2009, 27;3(10):425-429.

4- Lee JM, Shin JW, Nam JK, Choi JY, Jeong CS, Han IS et al. Molecular cloning and expression of the trichoderma harzianum C4 endo-beta-1,4-Xylanase Gene in Saccharomyces cerevisiae. J. Microbiol. Biotechnol. 2009, 19(8):823-828 .

5- Ohbuchi T, Takahashi T, Azumi N, Sakaino M. Structual analysis of neutral and acidic xylooligosaccharides from hardwood kraft pulp, and their utilization by intestinal bacteria in vitro. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009, 73(9):2070-2076.

6- German DP, Bittong RA. Digestive enzyme activities and gastrointestinal fermentation in wood-eating catfishes. J. Comp. Physiol. 2009, 179(8):1025-1042.

7- Rahman Z, Shida Y, Furukawa T, Suzuki Y, Okada H, Ogasawara W et al. Application of Trichoderma reesei cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular beta-glucosidase I. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009 ,73(5):1083-1089.

8- Parkkinen T, Hakulinen N, Tenkanen M, Siika-aho M, Rouvinen J. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel Trichoderma reesei xylanase IV belonging to glycoside hydrolase family 5. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2004, 60: 542–544.

9- Jommuengbout P, Pinitglang S, Kyu KL, Ratanakhanokchai K. Substrate-binding site of family 11 xylanase from Bacillus firmus K-1 by molecular docking. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009, 73(4):833-839.

10- Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A, KawamuraY. Purification and properties of thermostable Xylanase and - Xylanase produced by a newly isolated Bacillus stearothermophilus strain .Journal of Bacteriology. 1990, 172(12):6669-6672.

11- Roy N, Rana M,Uddin S. Isolation and some properties of new xylanase from the intestine of herbivorous insects (Samia cynthia pryeri).J.Biol.Sci.2003,4(1):27-33.

12- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 1959,31: 238 –2 44.

13- Lowry HH, Rosenbrough NJ, Protein measurment with the folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193: 265 – 275.

14- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacterio phage T4. Nature. 1970, 227:680 – 685.

15- Mathlouthi N, Mohamed MA, Larbier M. Effect of enzyme preparation containing xylanase and betaglucanase on performance of laying hens fed wheat/barleyor maize/soybean meal-based diets. Br. Poult. Sci. 2003, 44, 60– 66.

16- Khasin A, Alchanati I, ShohamY, Purification and characterization of a thermostable xylanase from Bacillus stearothermophilus T-6. Appl.Enviroment. Microbiol, 1993,59(6): 1725-1730.

17- Kar S, Mandal A, Mohapatra K. Production of cellulose-free xylanase by trichoderma reesei SAF3. Brazillian Journal of Microbiology. 2006,37:462-464.

18- Mandeva R, Dimitrov P, Emanuilova E. General characteristics of two xylanolytic bacterial strains isolated from Bulgarion hot springs. J. Cul. Collections. 1998, 2:3-9 .

19- Meng X, Shao Z, Hong Y, Lin L, Li C, Liu Z. A Novel pH-Stable, Bifunctional Xylanase Isolated from a Deep-Sea Microorganism, Demequina sp. JK4. J. Microbiol. Biotechnol. 2009, 19(10):1077-1084.

20- He J, Yu B, Zhang K, Ding X, Chen D. Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from Trichoderma reesei in Pichia pastoris and functional characterization of the produced enzyme. BMC Biotechnol. 2009, 9:56-61.

21- Gupta S, Bhushan B, Hoondal GS. Isolation , purification and characterization of xylanase from Staphylococcus sp.SG-B and its application in biobleaching of kraft pulp .J.Appl.Microbiol. 2000, 88:325-334.

22- Ratanakhanok- chai, K, Kyu KL, Tanticharoen M. Purification and properties of a Xylan-binding end oxylanse from alkaliphilic Bacillus sp. Strain k-1. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65(2), 694-697.

23- Arora N, Banerjee AK, Mutyala S, Murty US. Comparative characterization of commercially important xylanase enzymes. Bioinformation. 2009, 3(10):446-453.

24- Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai Ryuichiro, Aono R. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic Bacillus sp. Strain 41M-1. Appl. Environ. Microbiol. 1993, 59(7): 2311-2316 .

25- Sunna A, Antranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Crit. Rev. Biotechnol. 1997, 17: 39–67.

26- Katapodis P, Vrsanska M, Kekos D, Nerinckx W, Biely P, Claeyssens M et al. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of Sporotrichum thermophile. Carbohydr.Res. 2003, 338: 1881–1890.

www.SID.ir