

## تخلیص آنزیم گزیلاناز (EC:3.2.1.8) از باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس (ATCC12980) و بررسی اثر آن در تجزیه گزیلان

زهره فائزی زاده\*، امیر قریب و محسن میرزایی

بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۶

### چکیده

ماده گزیلان یک پلی ساکارید ناهمگن بوده و بخش عمده همی سلولز دیواره سلولی گیاهان را تشکیل می دهد. گزیلانها (EC 3.2.1.8) آنزیمهایی هستند که از گونه های مختلف میکروارگانیسم ها 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 این تحقیق آنزیم گزیلاناز از محیط کشت باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس (ATCC 12980) به وسیله چندین روش آزمایشگاهی نظیر رسوب با سولفات آمونیوم، سانتیفریژ و کروماتوگرافی های ژل فیلتراسیون با سفادکس G-100 و تعویض یونی با دی اتیل آمینو اتیل- سلولز تخلیص گردید. 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 به دست 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 به دست 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 ۶۰ درجه سانتی گراد 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 اندوگزیلاناز می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص گردید که آنزیم گزیلاناز تخلیص شده از باکتری مذکور جهت استفاده در صنعت بسیار مناسب می باشد.

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

\*نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۴-۳۵۰۰۲۰۱ پست الکترونیکی: zohrehfaezizadeh@yahoo.com

### مقدمه

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 (۲ و ۵). گزیلانازهای استخراج شده از باکتریها به عنوان کاتالیزورهای هیدرولیزکننده گزیلان نسبت به سایر گزیلانازها به علت مواردی نظیر عملکرد بسیار اختصاصی و تولید محصولات جانبی از اهمیت بیشتری برخوردارند. باسیلوس استئاروترموفیلوس، یک باکتری گرما دوست بوده و یکی از عوامل فساد محصولات غذایی محسوب می

آنزیم گزیلاناز (EC:3.2.1.8) توسط باکتریها و قارچهای ترموفیلیک گیاهی تولید می گردد (۳). این آنزیم می تواند همی سلولز متعلق به کربوهیدراتهای غیر نشاسته ای را هیدرولیز نماید (۲۲). در سالهای اخیر کاربرد صنعتی این آنزیم توجه بسیاری از محققین را در دنیا به خود جلب نموده است. به طوری که آنزیم فوق در صنایع مختلفی از جمله صنعت کاغذ سازی (در روند بی رنگ سازی کاغذ)، در شفاف کردن روغنهای خوراکی و در تبدیل سوختهای جامد به مایع مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸ و ۲۳). این

شود (۲۵). سوش استاندارد ATCC 12980 این باکتری از نظر صنعتی منبعی برای تولید آنزیم اندونوکلئاز *BstPI* می-باشد (۱۹). این باکتری در نوارهای کاغذی به عنوان یک شناساگر بیولوژیکی جهت عمل استریلیزاسیون به کار می-رود. همچنین یک منبع مناسب جهت تولید آنزیمهای مقاوم به گرما جهت کاربردهای صنعتی می-باشد (۱۴). در این کار تحقیقی آنزیم گزیلاناز از محیط کشت باکتری باسیلوس استناروترموفیلوس (ATCC 12980) تخلیص شده و پس از مطالعات اولیه روی آن، توانایی آن در تجزیه گزیلان مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

### مواد و روشها

**تهیه باکتری باسیلوس استناروترموفیلوس ( ATCC 12980) و کشت آن:** باکتری باسیلوس استناروترموفیلوس (ATCC 12980) از شرکت Rockville آمریکا خریداری شد. این باکتری در محیط کشت مایع اختصاصی جهت تولید بهینه آنزیم گزیلاناز کشت گردید. جهت تهیه یک لیتر از این محیط کشت در یک ارلن، ۱۰ گرم گزیلان، ۲۰ گرم پلی پپتون، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم نیتريت 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 (۱۷).

**استخراج و تخلیص آنزیم گزیلاناز:** آنزیم گزیلاناز از محیط کشت باکتری مذکور به روش Roy استخراج و تخلیص گردید (۲۱).

**جداسازی آنزیم گزیلاناز از محیط کشت:** به طور خلاصه در این روش محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد و در تمام این مدت محیط کشت توسط دستگاه شیکر مخلوط شد. محیط کشت مذکور در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۰۰۰۰g برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به

**تخلیص آنزیم گزیلاناز:** تخلیص آنزیم گزیلاناز طی دو مرحله مجزای کروماتوگرافی ستونی ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تعویض یونی انجام گردید (۲۱).

**کروماتوگرافی ستونی ژل فیلتراسیون:** محلول دیالیز شده حاوی آنزیم، به ستون کروماتوگرافی (۲/۷ × ۱۰۰cm) حاوی سفادکس G-۱۰۰ در تعادل با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH=۷) اضافه گردید. سپس ستون با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH=۷) با سرعت جریان ۱۲۰ میلی لیتر در ساعت شستشو داده شد و محلول خروجی به وسیله دستگاه نمونه بردار خودکار جمع آوری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی- ماوراء بنفش جهت بررسی وجود پروتئین قرائت شد و فراکسیونهای دارای فعالیت گزیلانازی با یکدیگر مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در مقابل بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH=۷) دیالیز شدند. این مخلوط تا حجم ۱۰ میلی لیتر با استفاده از دستگاه روتاری اوپورتور تحت شرایط خلاء تغلیظ گردید (۲۱).

**کروماتوگرافی ستونی تعویض یونی:** محلول آنزیمی تغلیظ شده از مرحله ژل فیلتراسیون به ستون کروماتوگرافی (۱/۵×۴۰ cm) حاوی DEAE- سلولز که در حال تعادل با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار با pH=۷) بود اضافه گردید. سپس بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار با pH=۷) با سرعت جریان ۲۵ میلی لیتر در 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

اندازه گیری مقدار پروتئین: مقدار پروتئین نمونه ها در تمام مراحل این کار تحقیقاتی بر اساس روش Lowry و همکارانش اندازه گیری گردید (۱۱).

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE): مراحل مختلف تخلیص آنزیم گزیلاناز توسط روش الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید مورد بررسی قرار گرفت. درصد ژل پایینی ۱۲/۵ درصد انتخاب شد (۱۳ و ۱۰).

تعیین دما و pH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده: تعیین دما و pH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده با استفاده از روش Roy و همکارانش انجام گردید (۲۱). جهت تعیین دمای اُپتیمم یک میلی لیتر محلول آنزیمی حاوی ۵ واحد بین المللی آنزیم با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH=۷) تهیه گردید. سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ده دقیقه قرار داده شد و فعالیت آنزیم در آن اندازه گیری گردید و درصد فعالیت باقیمانده آنزیم گزیلاناز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد محاسبه شد. همین عمل برای دماهای ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد 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 میلی لیتر محلول آنزیم گزیلاناز حاوی ۵ واحد بین المللی 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 سانتی گراد انکوبه گردید و مجدداً فعالیت آنزیم گزیلاناز در آن اندازه گیری 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، ۸) و در نهایت بافر تریس - HCl (با pH معادل ۹) تکرار گردید.

بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار با pH=۷) حاوی NaCl از ستون عبور داده شد و فراکسیونهای خارج شده توسط دستگاه فراکشن کالکتور جمع آوری گردید. سپس جذب فراکسیونهای جدا شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. در مرحله بعد فراکشنهای حاوی جذب از نظر فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند (۲۱).

اندازه گیری فعالیت آنزیم گزیلاناز: جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم گزیلاناز در نمونه های به دست آمده از مراحل مختلف استخراج و تخلیص آنزیم از روش میلر استفاده گردید (۱۵). مقدار ۰/۵ میلی لیتر محلول نمونه در یک لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون گزیلان در بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار با pH=۷) اضافه گردید. سپس محتویات لوله با همزن برقی مخلوط شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس مخلوط مذکور به سرعت در آب سرد حاوی یخ قرار داده شد و بعد از آن با دور ۳۰۰۰ برای مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید در این حالت گزیلانهای تجزیه نشده توسط آنزیم گزیلاناز رسوب نمود. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول شفاف رویی درون یک لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۰/۵ میلی لیتر محلول ۰/۵ درصد ۳ و ۵- دی نیتروسالیسیلیک اسید اضافه گردید. بعد از آن لوله مذکور به مدت ۵ دقیقه درون بن ماری 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 (دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و pH=۷) آزاد نماید.

بعد گزیلان رسوب نموده با استفاده از عمل سانتریفوژ (دور ۱۰۰۰۰g برای مدت ۱۰ دقیقه) از محلول رویی جدا گردید. سپس محلول شفاف رویی با پیپت پاستور جمع‌آوری گردید و تا حجم ۵۰۰ میکرولیتر با استفاده از دستگاه روتاری اوپوراتور تحت شرایط خلاء 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 به خود گرفت.

### نتایج

نتایج به دست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون: نتایج حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G-100 در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان طور 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).

بررسی اثر آنزیم گزیلاناز تخلیص شده بر تجزیه گزیلان با اندازه‌گیری درصد هیدرولیز گزیلان: در این مرحله از پروژه تحقیقاتی از روش khasin و همکارانش استفاده گردید (۸). در یک لوله آزمایش محلولی شامل یک واحد بین‌المللی از آنزیم گزیلاناز در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH=۷) تهیه شد و به آن ۲۵ میلی‌گرم گزیلان اضافه گردید. لوله مذکور پس از به هم زدن 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.

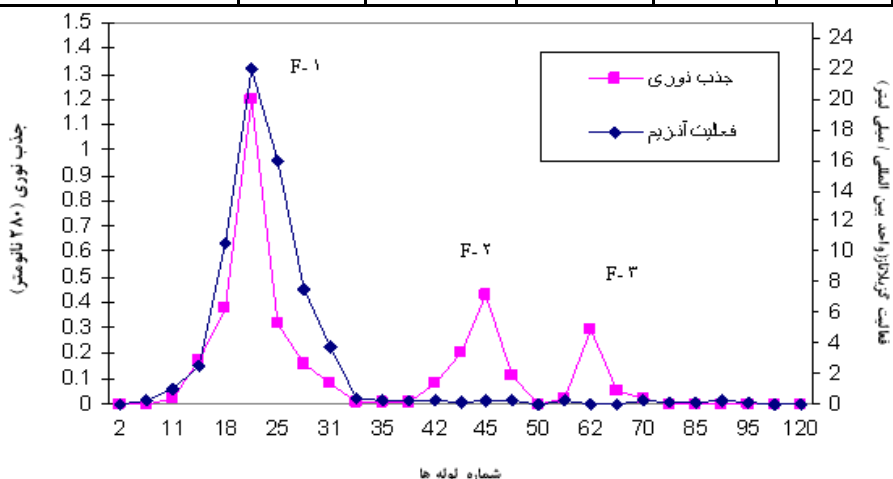
$$\text{درصد هیدرولیز گزیلان} = \frac{\text{مقدار میکرومول D- گزیلوز تولید شده در طی یک ساعت}}{\text{وزن گزیلان اولیه (میلی گرم)}} \times 100 \times 0.9$$

در این معادله عدد ۰/۹ فاکتوری ناشی از افزایش مولکولهای آب به سوپسترا 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.

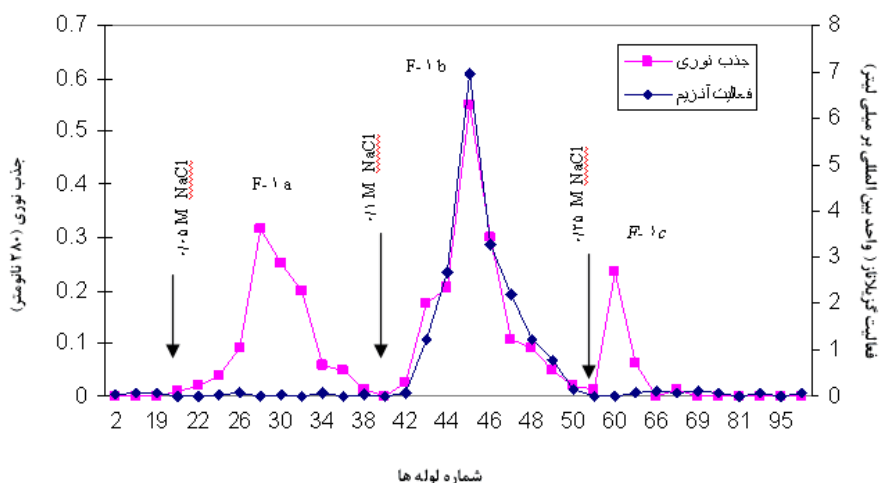
بررسی اثر هیدرولیزی آنزیم گزیلاناز با استفاده از کروماتوگرافی کاغذی: در این قسمت از تحقیق از روش Kar و همکارانش استفاده گردید (۶). بدین صورت که ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر محلول گزیلان یک درصد با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH=۷) تهیه شد و به آن ۴۵۰۰ واحد بین‌المللی آنزیم گزیلاناز افزوده گردید 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

جدول ۱- نتایج به دست آمده از مراحل مختلف استخراج و تخلیص آنزیم گزیلاناز

مراحل	حجم نهایی (ml)	توتال پروتئین (mg/ml)	فعالیت ویژه (u/mg)	فعالیت کل (units)	%Yield	Purification fold
مرحله جداسازی سلولهای باکتری از محیط کشت	۹۳۲/۸	۴۷۰	۱/۳۹	۶۵۳	۱۰۰	۱
مرحله رسوب با سولفات آمونیوم	۵	۱۲۵	۲/۸۸	۳۶۰	۵۶/۶۹	۲/۰۷
کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با Sphadex G-100	۴۲	۸	۳۸/۷۵	۳۱۰	۴۷/۴۷	۲۷/۸۷
کروماتوگرافی با DEAE-Cellulose	۱۶	۱/۳	۸۷/۷	۱۱۴	۱۷/۴۵	۶۳/۰۹



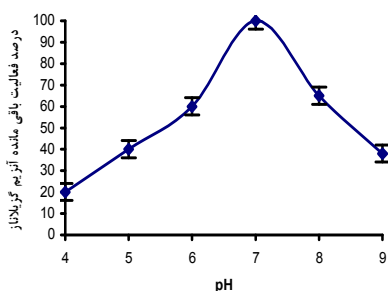
نمودار ۱- کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۱۲۵ میلی گرم پروتئین به دست آمده از مرحله رسوبات با سولفات آمونیوم بر روی ستون سفادکس G-100 به ابعاد (۱۰۲×۲/۵ سانتیمتر) در تعادل با بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار با pH=۷ و سرعت جریان ۱۲۰ میلی لیتر در ساعت.



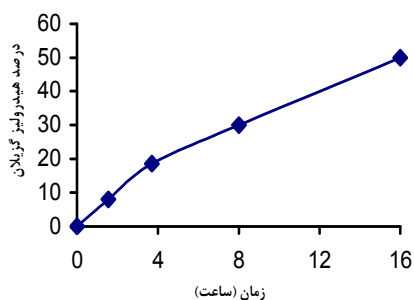
نمودار ۲- کروماتوگرافی تعویض یونی پیک F-۱ حاصل از مرحله ژل فیلتراسیون روی ستون DEAE- سلولز به ابعاد (۴۰×۱/۵ سانتیمتر) در تعادل با بافر فسفات پتاسیم و گرادیان نمکی ۰۰/۲۵ مولار NaCl و سرعت جریان ۳۰ میلی لیتر در ساعت.

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 میلی لیتر بود. فراکسیونهای پیک F-۱b پس از تغلیظ شدن توسط

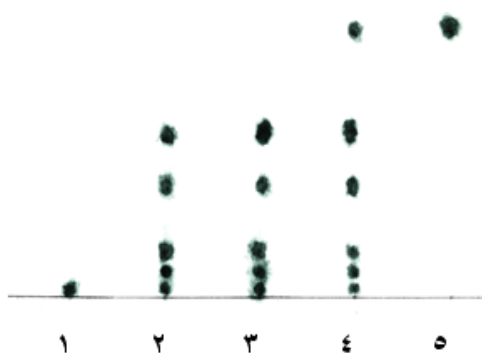
نتایج به دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی: نتایج کروماتوگرافی تعویض یونی ژل DEAE- سلولز در نمودار ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می گردد سه پیک مجزای F-۱a، F-۱b و F-۱c ایجاد گردید



نمودار ۴ - تغییرات درصد فعالیت باقیمانده آنزیم گزیلاناز در pH های ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹.



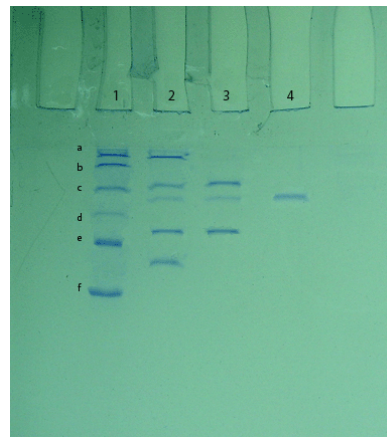
نمودار ۵ - تغییرات درصد هیدرولیز گزیلاناز توسط آنزیم گزیلاناز طی ۱۶ ساعت



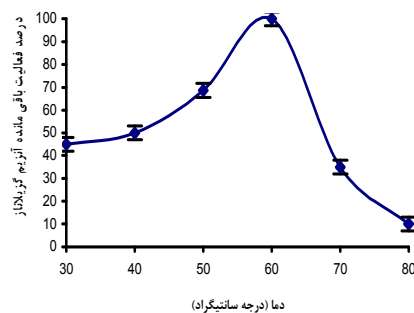
شکل ۲ - کروماتوگرافی کاغذی گزیلاناز انکوبه شده با آنزیم گزیلاناز (ردیف ۱، یک ساعت پس از انکوباسیون، ردیف ۲، چهار ساعت پس از انکوباسیون، ردیف ۳، هشت ساعت پس از انکوباسیون، ردیف ۴، شانزده ساعت پس از انکوباسیون و ردیف ۵، قند D- گزیلوز به عنوان استاندارد)

مقدار فعالیت ویژه و فعالیت کل آنزیم تخلیص شده در تمامی مراحل خالص سازی آنزیم در جدول ۱ مشاهده می گردد.

الکتروفورز SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. ایجاد یک باند پروتئینی بر روی ژل مذکور نشان دهنده تخلیص آنزیم مذکور بود (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز SDS-PAGE صفحه‌ای (slab) از مراحل مختلف استخراج و تخلیص آنزیم درصد ژلهای پایین و بالا به ترتیب ۱۲/۵ و ۴ درصد و ولتاژ به کار گرفته شده برابر با ۱۲۰ ولت می‌باشد. ردیف ۲ نشان‌دهنده پروتئینهای موجود در رسوب به دست آمده با استفاده از سولفات آمونیوم می‌باشد. ردیف ۳ نشان‌دهنده پروتئینهای موجود در پیک F-۱ به دست آمده از عمل کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بوده و در نهایت ردیف ۴ نشان‌دهنده آنزیم گزیلاناز تخلیص و تغلیظ شده (پیک F-۱b) ناشی از عمل کروماتوگرافی تعویض یونی روی ستون DEAE- سلولز می‌باشد. در ردیف ۱ نیز مارکهای وزن مولکولی (به ترتیب، a= فسفریلاز b با وزن مولکولی ۹۴KD، b= آلبومین سرم گاوی با وزن مولکولی ۶۶KD، c= اووآلبومین با وزن مولکولی ۴۵KD، d= کربنیک انیدراز با وزن مولکولی ۲۹KD، e= مهارکننده تریسپین سویا با وزن مولکولی ۲۰KD و f= لاکتالبومین با وزن مولکولی ۱۴/۴KD) قرار دارند که با توجه به وزن آنها، وزن مولکولی آنزیم تخلیص شده تقریباً ۴۰ کیلودالتون تعیین گردید.



نمودار ۳ - تغییرات درصد فعالیت باقیمانده آنزیم گزیلاناز در دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد

در این تحقیق محیط کشت اختصاصی طبق روش Nanmori و همکارانش تهیه گردید (۱۷). این محیط کشت حاوی ترکیباتی نظیر گزیلان، عصاره مخمر، پلی پیتون و غیره بوده و به ترتیب در سالهای ۱۹۹۳ و ۱۹۹۸ توسط Khasin و Mandeva و همکارانش جهت تولید بهینه آنزیم گزیلاناز مورد استفاده قرار گرفته است (۸ و ۱۲). با استفاده از این محیط کشت اختصاصی تولید آنزیم گزیلاناز توسط باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس حداکثر می‌گردد (۱، ۳ و ۲۶). در این پروژه آنزیم گزیلاناز توسط روش Roy و همکارانش (۲۱)، استخراج و تخلیص گردید. بازده عمل در این روش حدود ۱۷/۴۵ درصد به دست آمد که بیشتر از مقدار گزارش شده توسط Nanmori و همکارانش (۱۱/۳ درصد) می‌باشد که این آنزیم را از سوش جدیدی از باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس استخراج نموده‌اند (۱۷).

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 (۴)، که این امر توجه‌کننده 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 مارکهای 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 (۸ و ۱۷).

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که وزن مولکولی آنزیمهای گزیلاناز جداسازی شده از سوشهای مختلف باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس تقریباً یکسان است در صورتی که وزن مولکولی این آنزیم در سوشهای باکتریهای

نتایج حاصل از تعیین دمای اُپتیمم آنزیم گزیلاناز: نمودار ۳ بیانگر تغییرات درصد فعالیت باقیمانده آنزیم گزیلاناز تخلیص شده در دماهای ۵۰ تا ۸۰ می‌باشد. همان طور که در این نمودار مشاهده می‌گردد در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد فعالیت باقیمانده آنزیم مذکور حداکثر (۱۰۰ درصد) می‌باشد. بنابراین این دما، دمای اُپتیمم فعالیت آنزیم مذکور است.

نتایج حاصل از تعیین pH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز: برای تعیین pH اُپتیمم فعالیت ۵ واحد بین‌المللی از آنزیم گزیلاناز تخلیص شده در pH های مختلف (۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) تعیین گردید. همان طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌گردد در pH برابر ۷ 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. همان طور که مشاهده می‌گردد بیشترین درصد هیدرولیز گزیلان (۵۰ درصد) 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. همان طور 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 و نتیجه‌گیری

بررسی تأثیر هیدرولیزی آنزیم گزیلاناز تخلیص شده توسط کروماتوگرافی کاغذی نشان داد که آنزیم مذکور از نوع اندوگزیلاناز می‌باشد. زیرا طبق گزارش Roy و همکارانش آنزیمهای اندوگزیلاناز در طی ۱۶ ساعت قادرند از گزیلان علاوه بر قند D- گزیلوز، سایر قندها نظیر گزیلوپیتوز، گزیلوتروز، گزیلوتریوز و گزیلویوز 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 (۲۱).

با توجه به ویژگیهای گزارش شده توسط Collins و همکارانش در مورد آنزیمهای گزیلاناز واجد شرایط کاربرد صنعتی (۳)، و با توجه به نتایج این پروژه مشخص می‌گردد که آنزیم گزیلاناز تخلیص شده کارآیی لازم را در این مورد دارد.

**تشکر و قدردانی:** 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 می‌آید.

دیگر نظیر آیروموناس کاویه و باسیلوس (Sp.) متفاوت بوده و به ترتیب معادل ۲۲ و ۳۶ کیلودالتون تعیین گردیده است (۴ و ۲۰). در این پروژه دمای اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده برابر با ۶۰ درجه سانتی گراد تعیین شد که طبق گزارشهای انجام شده توسط Collins و Kulkarni و همکارانشان دمای مناسبی جهت کاربرد صنعتی آنزیم مذکور می‌باشد (۳ و ۹). این دما تقریباً معادل دمای اُپتیمم آنزیمهای گزیلاناز تخلیص شده در سالهای ۱۹۹۳، ۱۹۷ و ۲۰۰۳ میلادی توسط محققان مختلف نظیر Nakamura ، Sunna ، Katapodis و همکارانشان می‌باشد که از جانداران گوناگونی این آنزیم را تخلیص نموده‌اند (۷، ۱۶ و ۲۴). همچنین pH اُپتیمم آنزیم گزیلاناز تخلیص شده در این پروژه تقریباً معادل pH اُپتیمم گزارش شده توسط Khasin، Nanmori و همکارانشان می‌باشد (pH=۷) که از سوشهای مختلف باکتری استرئوترموفیلوس آنزیم مذکور را استخراج نموده‌اند (۸ و ۱۷). بنابراین در این مورد نوعی شباهت قابل گزارش مشاهده می‌گردد که توسط Mandeva و همکارانش نیز ذکر گردیده است (۱۲).

## منابع

- 1-Beg, Q.K., Bhushan, B., Kappor, M., Hoodbdal, G. 2000. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces sp.* QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzy. Microbiol. Technol.* 27: 459 – 66.
- 2-Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 326–338.
- 3-Collins, T., Gerday, C., Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 3-23.
- 4-Gupta, S., Bhushan, B., Hoondal, G.S. 2000. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus Sp.* SG-B and its application in biobleaching of kraft pulp. *J. Appl. Microbiol.* 88: 325-334.
- 5-Kamal Kumar, B., Balakrishnan, H. and Rele, M.V. 2004. Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus NCL* (87-6-10) with commercial detergents and proteases. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 83–87
- 6-Kar, S., Mandal, A., Mohapatra, K. 2006. Production of cellulose-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. *Brazilian Journal of Microbiology.* 37:462-464.
- 7-Katapodis, P., Vrsanska, M., Kekos, D., Nerinckx, W., Biely, P., Claeysens, M., Macris, B.J. and Christakopoulos, P. 2003. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*. *Carbohydr. Res.* 338: 1884–1890.
- 8-Khasin, A., Alchanati, I., Shoham, Y. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus*



- stearothermophilus* T-6. Appl. Environ. Microbiol. 59(6): 1725-1730.
- 9-Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 23: 411-456.
- 10-Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature. 227:680 – 685.
- 11-Lowry, H.H., Rosenbrough, N.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 – 275.
- 12-Mandeva, R., Dimitrov, P., Emanuilova, E. 1998. General characteristics of two xylanolytic bacterial strains isolated from Bulgarian hot springs. J. Cul. Collections. 2: 3-9.
- 13-Mathlouthi, N., Mohamed, M.A. and Larbier, M. 2003. Effect of enzyme preparation containing xylanase and betaglucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean meal-based diets. Br. Poult. Sci. 44: 60 – 66.
- 14-Mechaly, A., Teplitzky, A., Belakhov, V., Baasov, T., Shoham, G. and Shoham, Y. 2000. Overproduction and characterization of selenomethionine xylanase T-6. J. Biotechnol. 78: 83-86.
- 15-Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 238 – 44.
- 16-Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, Ryuichiro., Aono, R. 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* Strain 41M-1. Appl. Environ. Microbiol. 59(7): 2311-2316.
- 17-Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., Kawamura, Y. 1990. Purification and properties of thermostable Xylanase and  $\beta$ -Xylanase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain J. J. Bacteriol. 172(12): 6669-6672.
- 18-Pala, H., Mota, M. and Gama, F.M. 2004. Enzymatic versus chemical deinking of non-impact ink printed paper. J. Biotechnol. 108: 79 – 89.
- 19-Parkkinen, T., Hakulinen, N., Tenkanen, M., Siika-aho, M. and Rouvinen, J. 2004. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel *Trichoderma reesei* xylanase IV belonging to glycoside hydrolase family 5. Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr. 60: 542-544
- 20-Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., Tanticharoen, M. 1999. Purification and properties of a Xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* Strain k-1. Appl Environ Microbiol 65(2): 694-697
- 21-Roy, N., Rana, M., Uddin, S. 2003. Isolation and some properties of new xylanase from the intestine of herbivorous insects (*Samia cynthia pyryeri*). J. Biol. Sci. 4(1): 27-33.
- 22-Shallom, D. and Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. Curr. Opin. Microbiol. 6: 219-228.
- 23-Subramaniyan, S. and Prema, P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. Crit. Rev. Biotechnol. 22: 33-64.
- 24-Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Crit. Rev. Biotechnol. 17: 39-67.
- 25-Tenkanen, M., Burgermeister, M., Vrsanska, M., Biely, P., Saloheimo, M. and Siika-aho, M. 2003. A novel xylanase XYN IV from *Trichoderma reesei* and its action on different xylans In: Recent Advances in Enzymes in Grain Processing (Courtin, C.M., Veraverbeke, W.S. and Delcour, J.A., Eds.), pp. 41-46. Kat. Univ. Leuven, Leuven.
- 26-Wejse, P.L., Ingvorsen, K. and Mortensen, K.K. 2003. Purification and characterisation of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium. Extremophiles 7: 423-431.

## Purification of xylanase (EC:3.2.1.8) from *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 12980) and study of the effect's on xylan degradation

Faezizadeh Z., Gharib A. and Mirzaee M.

Laboratory Science Dept., Para-Medical School, Islamic Azad University, Brojerd, I. R. of IRAN

### Abstract

Xylan the major portion of the hemicellulose of plant cell walls are heterogeneous polysaccharides. Xylanases (EC:3.2.1.8) are enzymes obtained from different species of microorganisms that degrade the xylosidic linkages of xylan's backbone producing xylose with other monoresidues. In this study xylanase enzyme was purified from culture supernatant of *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 12980) by ammonium sulfate precipitation, gel filtration on sephadex G-100 followed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. In DEAE- cellulose column chromatography, three protein peaks F-1a, F-1b and F-1c were appeared. Among these peaks, only F-1b showed xylanase activity and the degree of purification attained 63.09 fold. The specific activity and purification fold of the purified xylanase was 87.7 U/mg of protein and 17.45, respectively. The enzyme gave maximum activity against xylan as substrate at pH 7.0 and temperature at 60°C. In paper chromatography xylose was detected as the hydrolysis products of oat-spelt xylan by the xylanase at 16 h. These results indicate that xylanase of *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 12980) was endoxylanase. In conclusion, these data suggested that purified xylanase can be suitable for industrial applications.

**Keywords:** *Bacillus stearothermophilus*, Xylanase, Purification, Chromatography