

بهینه‌سازی فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز Cel9A از باکتری آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس با روش رویه پاسخ (RSM)

محسن اکبریان¹، محمد پاژنگ^{2*}، علیرضا امانی قدیم³، فرشته سادات یونسی¹، حسین زارعی جلیانی⁴

1- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

2- استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

3- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

4- استادیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد

* تبریز، کدپستی 5375171379

pazhang@azaruniv.ac.ir , mpazhang@yahoo.com

(دریافت مقاله: 94/03/9 پذیرش مقاله: 94/4/9)

چکیده- آنزیم اندوگلوکاناز Cel9A از باکتری آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس (AaCel9A) یک آنزیم گرمادوست بوده و پیوندهای بتا 1 به 4 را در مولکول سلولز به طور اتفاقی هیدرولیز کرده و الیگوساکاریدهایی با سرهای احیا کننده تولید می‌کند. در این تحقیق ابتدا وکتور pDEST17 حاوی ژن آنزیم AaCel9A جهت بیان پروتئین نوترکیب به میزبان مناسب (اشریشیا کلی سویه BL21) منتقل شده و بعد از بیان، با استفاده از ستون نیکل آگارز خالص شد. سپس با توجه به تأثیرگذاری pH، دما و کلسیم بر روی فعالیت و پایداری آنزیم، با استفاده از این سه متغیر فعالیت آنزیم با استفاده از روش رویه پاسخ بهینه گردید. نتیجه الکتروفورز ژل SDS-PAGE نشان داد که آنزیم نوترکیب در حدود 59 کیلودالتون وزن مولکولی داشته و به خوبی بیان و خالص شده است. نتایج روش رویه پاسخ نشان داد که تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم بیشتر از دما، و دما بیشتر از کلسیم بوده و بهینه شرایط فعالیت آنزیم AaCel9A در محیط با pH 6/35، دمای 64/5°C و غلظت کلسیم برابر با 4/92 مولار است. در نهایت با توجه به همبستگی بالای نتایج آزمایشگاهی و نتایج پیش‌بینی شده می‌توان گفت مدل پیشنهادی در این تحقیق برای پیش‌بینی شرایط بهینه فعالیت آنزیم از صحت بالایی برخوردار است.

کلیدواژگان: آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس، اندوگلوکاناز، تخلیص پروتئین، روش رویه پاسخ، بهینه‌سازی فعالیت.

1- مقدمه

گلوکز با پیوند گلیکوزیدی بتا 1 به 4 بوده و می‌تواند به عنوان بهترین ذخیره برای تولید انرژی و مواد شیمیایی مورد نیاز انسان از جمله بیواتانول در نظر گرفته شود [2-4]. منابع سلولز علاوه بر دیواره سلولی گیاهان، در جلبک‌ها، بسیاری از قارچ‌ها و کیست برخی از

زیست توده گیاهان در سطح زمین به عنوان زیست توده غالب است. سلولز بخش عمده دیواره سلولی گیاهان را تشکیل می‌دهد و به عنوان فراوان‌ترین ماده آلی قابل تجزیه است [1]. سلولز پلی‌مری خطی از واحدهای

مخفف RSM) اشاره نمود [17]. این روش به عنوان ابزاری کارآمد در جهت بهینه‌سازی شرایط واکنش همچون دما و pH ارائه شده است [15]. در این تحقیق برای بهینه‌سازی عملکرد آنزیم AaCel9A، در اول ناقل pDEST17 حاوی ژن این آنزیم به باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21 منتقل شد. سپس بعد از بیان، آنزیم خالص شده و با استفاده از پارامترهای دخیل در عملکرد این آنزیم (pH، دما و غلظت کلسیم) جهت افزایش فعالیت آنزیم، شرایط واکنش آنزیمی بهینه شد.

2- مواد و روش‌ها

الفاگر IPTG² و اندازه نمای پروتئین از شرکت ThermoScience (آمریکا) و بقیه مواد استفاده شده در این تحقیق از شرکت Merck (آلمان) تهیه گردید.

1-2- سویه‌های باکتریایی و ناقل مورد استفاده

در این تحقیق برای تکثیر ناقل حاوی ژن (pDEST17 حاوی ژن آنزیم AaCel9A) از سویه TOP10 (Novagen) و برای بیان پروتئین نوترکیب از سویه BL21 (DE3) باکتری *اشریشیا کلی* استفاده شد. لازم به ذکر است pDEST17 حاوی ژن از گروه تحقیقاتی پروفیسور Moera [9] طی همکاری علمی تحویل گرفته شد.

2-2- بیان و تخلیص آنزیم

بعد از تکثیر ناقل‌های حاوی ژن در باکتری *اشریشیا کلی* سویه TOP10، ناقل‌های تکثیر شده با استفاده از کیت استخراج پلاسמיד شرکت Bioneer (کره جنوبی) استخراج شده و توسط شوک حرارتی به باکتری *اشریشیا کلی* سویه بیانی BL21(DE3) منتقل و سپس با استفاده از محیط کشت LB³ حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (100

پروتوزوئرها نیز وجود دارد [5]. جهت استفاده از سلولز معمولاً آن را با روش‌های مختلف شیمیایی و بیولوژیکی به واحدهای اولیگوساکاریدی و یا مونوساکاریدی که ارزش تجاری دارد، تجزیه می‌کنند [5]. روش‌های بیولوژیکی مزیت بیشتری نسبت به روش‌های شیمیایی دارند؛ زیرا در شرایط ملایم (دمای پائین) انجام می‌پذیرند. در روش بیولوژیکی میکروروگانسیم‌ها با تولید مجموعه آنزیمی سلولاز باعث تجزیه سلولز می‌شوند [6]. مجموعه آنزیمی سلولاز از سه گروه آنزیم تشکیل شده‌اند. این سه گروه به طور همکار با یکدیگر در جهت تجزیه سلولز و تولید گلوکز عمل می‌کنند. این سه آنزیم شامل بتا 1-4 اندوگلوکاناز (EC:3.2.1.4)، سلوبیوهیدرولاز (EC:3.2.1.91) و بتاگوزیداز (3.2.1.21) می‌باشند [7]. آنزیم بتا 1-4 اندوگلوکاناز، پیوندهای گلیکوزیدی را به طور اتفاقی از درون مولکول سلولز شکسته و الیگوساکاریدهایی با سرهای احیا کننده تولید می‌کند [8,6]. آنزیم اندوگلوکاناز از باکتری *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس*¹ (AaCel9A) آنزیمی گرمادوست است [2]. این آنزیم حاوی 537 رزیدوی آمینواسیدی بوده و 59 کیلودالتون وزن مولکولی دارد. AaCel9A می‌تواند پلیمرهای سلولزی را به قطعات اولیگوساکاریدی تبدیل نماید [9]. همچنین این آنزیم اختصاصیت سوبسترای گسترده‌ای دارد [10]. بنابراین به لحاظ کاربردهای صنعتی می‌تواند مفید باشد. یکی از نکات مهم در استفاده صنعتی از آنزیم‌ها، افزایش کارایی عمل آن‌ها است تا میزان کاتالیز در مقیاس صنعتی افزایش یابد [11-12]. برای افزایش بهینه نمودن عملکرد آنزیمی روش‌های مختلفی همچون مهندسی پروتئین [13-14] و بهینه‌سازی شرایط محیطی برای فعالیت عملکرد آنزیم‌ها [15-17]، وجود دارد. از روش‌های بهینه‌سازی شرایط محیطی می‌توان به روش رویه پاسخ (Response Surface Methodology) یا بطور

2. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
3. Luria-Bertani

1. *Alicyclobacillus acidocaldarius*

کربوکسی متیل سلولز (CMC³) و تریس 20 میلی مولار (pH 6/5) 50 میکرولیتر محلول حاوی آنزیم (1/5 میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد. بعد از انکوبه نمودن مخلوط واکنش آنزیمی به مدت 3 دقیقه در دمای 65 درجه (سانتی گراد)، 1/5 میلی لیتر از محلول حاوی DNS به مخلوط واکنش آنزیمی اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت 5 دقیقه در در داخل آب در حال جوش، قرار داده شد. سپس جذب آن‌ها در طول موج 540 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Genway، انگلیس) اندازه گیری شد. طبق تعریف، یک واحد عمل آنزیمی (U) برابر با مقداری از آنزیمی است که در مدت یک دقیقه بتواند سرهای احیا کننده معادل یک میکرومول گلوکز تولید نماید. تعیین غلظت آنزیم با استفاده از روش برادفورد [20] و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد صورت گرفت.

2-4- طراحی آزمایش‌های مورد استفاده در روش رویه پاسخ (RSM):

آزمایش‌ها بر پایه سه پارامتر دما، میزان قدرت اسیدی محیط و غلظت یون کلسیم بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده توسط Eckert و همکاران دیده شده است که حضور یون کلسیم تا غلظت 10 میلی مولار در فعالیت و پایداری آنزیم AaCel9A اثر مثبت دارد [2]. بر این اساس در این بخش اثر یون کلسیم، دما و میزان قدرت اسیدی محیط بر فعالیت آنزیم مذکور بررسی گردید. فعالیت آنزیم در میزان سطوح پارامتر دما 52، 55، 61/5، 68 و 71 درجه سلسیوس سطوح قدرت اسیدی (یا pH) محیط 4/8، 5/5، 8/9، 8/2، 6/85 و سطوح غلظت کلسیم 2/5، 3/5، 5/5، 7/5، 8/5 بررسی شد. به طور کلی 20 آزمایش با توجه به نقاط مرکزی و تکرار آنها در نظر گرفته شد. در جدول 1 شرایط متفاوت آزمایش‌های پیشنهادی توسط

میلی گرم بر لیتر)، بیان پروتئین در دمای 30 درجه (سانتی گراد) توسط غلظت نهایی یک میلی مولار از IPTG به مدت 6 ساعت القا شد. 250 میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری‌های القا شده حاوی آنزیم AaCel9A به مدت 10 دقیقه در 10000×g و دمای 4 درجه (سانتی گراد) سانتریفیوژ شده و رسوب باکتری حاصله با افزودن بافر لیزکننده (تریس 20 میلی مولار، pH 7 و PMSF¹ 1 میلی مولار) دوباره به حالت سوسپانسیون درآمد. پس از آن سوسپانسیون باکتری به داخل فاکون 15 میلی لیتری شرکت Biocompare (آمریکا) تحت سونیکاسیون (10 دور سونیکاسیون هر دور، 25 ثانیه پالس و 35 ثانیه استراحت) قرار گرفت. سلول‌های لیز شده در 20000×g و در دمای 4 درجه (سانتی گراد) به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی، به روی ستون حاوی رزین نیکل-آگارز منتقل و ستون با بافر حاوی تریس 20 میلی مولار و ایمیدازول 20 میلی مولار، کلرید سدیم 150 میلی مولار و pH 8 شستشو شد. سپس پروتئین نوترکیب حاوی دنباله هیستیدینی (در انتهای N) با افزودن بافر حاوی تریس 20 میلی مولار، ایمیدازول 250 میلی مولار، کلرید سدیم 150 میلی مولار و با pH 8 از ستون خارج شد. محلول حاوی پروتئین نوترکیب خالص علیه بافر تریس 20 میلی مولار دیالیز شد. در نهایت آنزیم خالص شده جهت آنالیز بر روی ژل SDS-PAGE، الکتروفورز گردید [18].

2-3- سنجش فعالیت آنزیمی و تعیین غلظت پروتئین

سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از روش دی-نیتروسالیسیلیک اسید (DNS²) انجام شد [19]. برای تعیین فعالیت آنزیم به روی 0/45 میلی لیتر از محلول حاوی سوبسترا (محلول حاوی 1% از سوبسترای

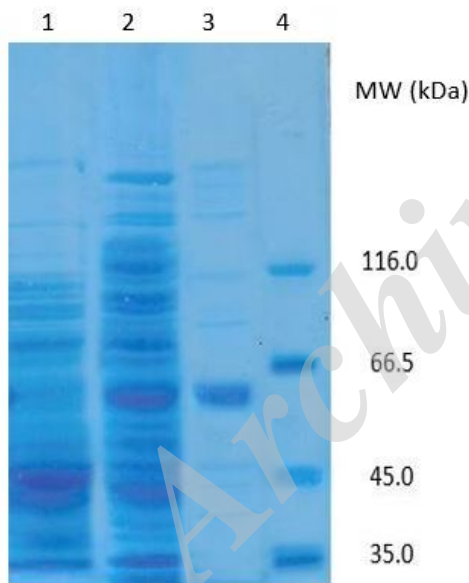
1. Phenylmethylsulfonyl fluoride

2. 3,5-Dinitrosalicylic acid

3. Carboxymethyl cellulose

نوترکیب در باکتری بیانی، شرایط بهینه بیان آنزیم، دمای 22 °C، زمان 5 ساعت با غلظت القاگر (IPTG) 1 میلی‌مولار بدست آمد.

همان‌طور که در شکل 1 قابل مشاهده است، پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی 59 کیلودالتون بیان شده است. با توجه به اینکه پروتئین بیان شده در انتهای N خود دارای دنباله هیستیدینی است، با استفاده از ستون نیکل آگارز، آنزیم AaCel9A تخلیص شد (شکل 1). همان‌طور که در شکل 1 مشاهده می‌شود، پروتئین نوترکیب تخلیص شده است. پس از تخلیص، غلظت آنزیم با استفاده از روش برادفورد 1/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. از آنزیم خالص شده جهت بهینه‌سازی عملکرد با روش رویه پاسخ استفاده شد.



شکل 1 نتیجه الکتروفورز ژل SDS-PAGE. ستون 1، عصاره سلولی باکتری‌های القا نشده، ستون 2 عصاره سلولی باکتری‌های القا شده (5 ساعت بعد از القا در دمای 22 درجه سانتی‌گراد)، 3، پروتئین نوترکیب AaCel9A تخلیص شده و 4، اندازه نمای پروتئین. در اندازه نمای پروتئین، وزن‌های مولکولی 116، 66/5، 45 و 35 کیلودالتون به ترتیب متعلق به پروتئین‌های بتاگالاکتوزیداز آلبومین سرم گاوی، اوآلبومین و لاکتات دهیدروژناز (35 کیلودالتون) است.

RSM ارائه شده است. لازم به ذکر است در این کار پژوهشی، روش طراحی نقطه مرکزی (CCD1) که یکی از الگوریتم‌های رایج RSM است، با استفاده از نرم افزار مینی‌تپ¹⁶ به کار گرفته شد.

جدول 1 شرایط آزمایش‌های پیشنهاد شده توسط CCD برای بهینه‌سازی و مدل‌سازی فعالیت آنزیم

شماره آزمایش	pH	T °C	غلظت کلسیم کلرید (mM)	U/ml تجری شده	U/ml محاسبه شده توسط مدل
1	6/5	60	5	0/9429	0/8935
2	6/5	60	2/5	0/8400	0/7504
3	5/5	55	3/5	0/3450	0/3791
4	7/5	65	6/5	0/6888	0/6162
5	7/5	55	3/5	0/4200	0/3779
6	7/5	65	3/5	0/5250	0/5706
7	6/5	52	5	0/2730	0/3381
8	6/5	60	5	0/8421	0/8935
9	6/5	60	5	0/8442	0/8935
10	6/5	60	7/5	0/5880	0/6894
11	5/5	55	6/5	0/3150	0/2609
12	8/2	60	5	0/1218	0/2089
13	6/5	68	5	0/9450	0/8916
14	7/5	55	6/5	0/4410	0/3564
15	6/5	60	5	0/8650	0/8935
16	6/5	60	5	0/9870	0/8935
17	6/5	60	5	0/8820	0/8935
18	4/8	56	5	0/3780	0/3026
19	5/5	65	6/5	0/6930	0/7266
20	5/5	65	3/5	0/7014	0/7775

3- نتایج

3-1- بهینه‌سازی بیان و تخلیص آنزیم

پس از بررسی شرایط متفاوت جهت القای بهینه پروتئین

1. Central composite design
2. Minitab16

نرم افزار مینی تب بدست آمد) در جدول 2 ارائه شده است. اهمیت و معنی دار بودن مدل درجه دوم با سه معیار آزمون نسبت های فیشر² (آزمون F)، آزمون عدم برازش مدل (LOF) و ضرایب R^2 (Adj.) و R^2 مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول 2 تحلیل واریانس جهت ارزیابی مدل های پیشنهاد شده

RSM توسط				درجه آزادی	منبع
ANOVA برای مدل توصیف کننده					
P-value	F-value	Adj-MS	SS		
0/000	16/07	0/1383	1/245	9	رگرسیون
-	-	0/0860	0/0860	16	خطای باقی مانده
0/077	4/01	0/01378	0/06889	10	عدم برازش
-	-	0/0034	0/0171	5	خطای مطلق
-	-	-	1/3311	30	مجموع

$$R^2=93/53$$

در مورد هر یک از عوامل، هر کدام که درجه p کمتری داشته باشد از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و از آنجا که مقدار 95 درصد به عنوان سطح اطمینان در نظر گرفته می شود، در صورت عدم صدق شرط ($p < 0.05$)، دیگر عوامل که اهمیت کمتری دارند از مدل پیشنهادی حذف خواهند شد و مدل تعریف شده بر اساس عوامل پر اهمیت تعریف می شود. در مدل پیشنهاد شده مقدار F تجربی محاسبه شده برای رگرسیون مدل (سطر اول از جدول 2) بسیار بزرگتر از مقدار بحرانی آن (2/352) در سطح اطمینان 95% می باشد، که مؤید معنی دار بودن مدل است. همچنین مقدار P مربوط به هر یک از مدل ها

3-2- بهینه سازی شرایط واکنش آنزیم توسط روش

رویه پاسخ

بر طبق نتایج، دیده شده است که دما و pH بر روی عمل آنزیم تأثیر گذاشته و آنزیم در دمای 65 °C و pH 6/5 بیشترین فعالیت را دارد (یونسی و همکاران، نتایج منتشر نشده است). همچنین دیده شده است که کلسیم بر روی فعالیت و پایداری آنزیم AaCel9A تأثیرگذار است. بنابراین با توجه به تأثیرگذاری سه پارامتر دما، pH و غلظت کلسیم بر روی فعالیت آنزیم، برای بهینه سازی عمل آنزیمی از این سه متغیر استفاده شد. در بهینه سازی شرایط واکنش آنزیم AaCel9A، پس از انجام آزمایش ها بر اساس طرح آماری تنظیم شده در جدول و حصول نتایج (جدول 1) اقدام به ارائه مدل ریاضی (رابطه 1)) برای هر یک از فرایندها، تعیین عوامل مؤثر، بررسی تأثیر پارامترها با استفاده از نمودارهای دو بعدی و سه بعدی و در نهایت، تعیین شرایط بهینه با استفاده از روش CCD گردید.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^n (b_i x_i) + \sum_{i=1}^n (b_{ii} x_i^2) + \sum_{i,j=1}^n (b_{ij} x_i x_j) \quad (1)$$

همان طور که مشاهده می شود، این مدل درجه دو بوده و ضرایب مربوط به هر عامل از طریق رگرسیون محاسبه می شود. بر اساس برازش نتایج تجربی معادله رگرسیون برای فعالیت آنزیم عبارت است از:

$$y = 0.8935 - 0.0181[Ca^{2+}] - 0.0278pH + 0.1(-0.0613[Ca^{2+}]^2 - 0.2254pH^2 - 0.098507^2 + 0.02415([Ca^{2+}] \times pH) + 0.0168([Ca^{2+}] \times T - 0.0514(pH \times T)) \quad (2)$$

در رابطه (1) و (2)، y نشان دهنده فعالیت آنزیمی است. مقدار اهمیت و معنی دار بودن مدل و همچنین میزان دقت آن در پیش بینی نتایج توسط تحلیل واریانس¹ (ANOVA) ارزیابی شد. نتایج حاصل از ANOVA (که توسط

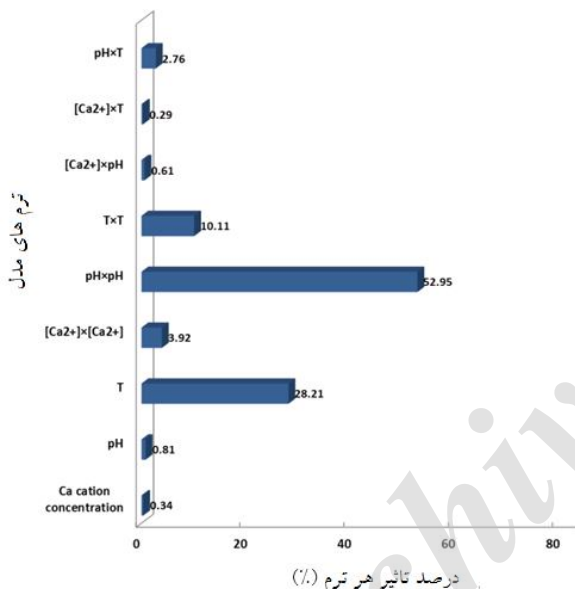
2. Fishers variance ratio test

1. Analysis of variance

از ترم، متغیر (مثلاً دما) و یا ترکیبی از متغیرهای (مثلاً دما و pH) مورد بررسی است.

$$P_i = \left(\frac{b_i^2}{\sum_{i=1}^n b_i^2} \right) \times 100 \quad i \neq 0 \quad (2)$$

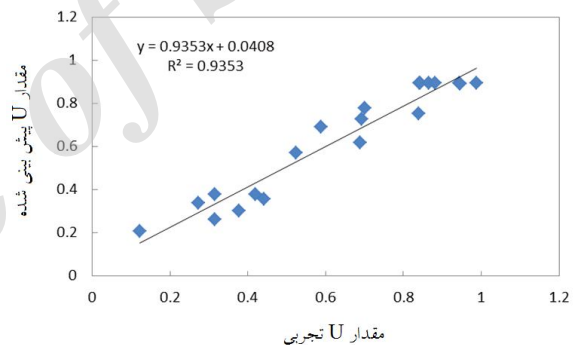
در این رابطه P_i درصد تأثیر هر ترم و b_i معرف ضریب هر ترم می‌باشد. نتایج حاصل از تحلیل پارتو در شکل 3 ارائه شده است. براساس نتایج حاصل شده دما و میزان pH مهمترین عامل مؤثر در فعالیت آنزیم می‌باشد.



شکل 3 نمودار تأثیر فاکتورهای مؤثر بر میزان فعالیت آنزیم

شکل 4 منحنی‌های رویه پاسخ و کانتور تأثیر دما و میزان pH را بر فعالیت آنزیم نشان می‌دهد. در مدل پیش فرض غلظت کلسیم 5 میلی‌مولار تنظیم شده است. طبق نتایج تأثیر همزمان pH و دما بر فعالیت (شکل 4) مشاهده می‌شود که دماهای بین 60 °C تا 68 °C و pH بین 6 تا 7 بیشترین فعالیت را دارند. همان‌طوریکه دیده می‌شود pH تأثیر بیشتری نسبت به دما بر روی فعالیت آنزیم دارد. منحنی‌های شکل 5 تأثیر همزمان کلسیم و دما را بر فعالیت آنزیم نشان می‌دهند. در این شرایط میزان اسیدی

کوچکتر از 0/05 (بر سطح اطمینان 95%) می‌باشد که مؤید مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی نتایج تجربی است. در شکل 2 نمودار پاسخ تجربی و پاسخ پیش‌بینی شده جهت بررسی میزان همبستگی بین آن‌ها نشان داده شده است. بر اساس منابع، مقادیر R بزرگتر از 80% معمولاً مؤید مناسب بودن پیش‌بینی مدل می‌باشد [17]. مقایسه نتایج تجربی برای 20 آزمایش طراحی شده و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل نشان داد که مقدار ضریب همبستگی¹ برای مدل‌های توصیف‌کننده شرایط بهینه فعالیت آنزیم برابر با 0/933 (93%) می‌باشد که نشان دهنده تطابق مناسب داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده می‌باشد.



شکل 2 میزان همبستگی نتایج تجربی و نتایج تئوری

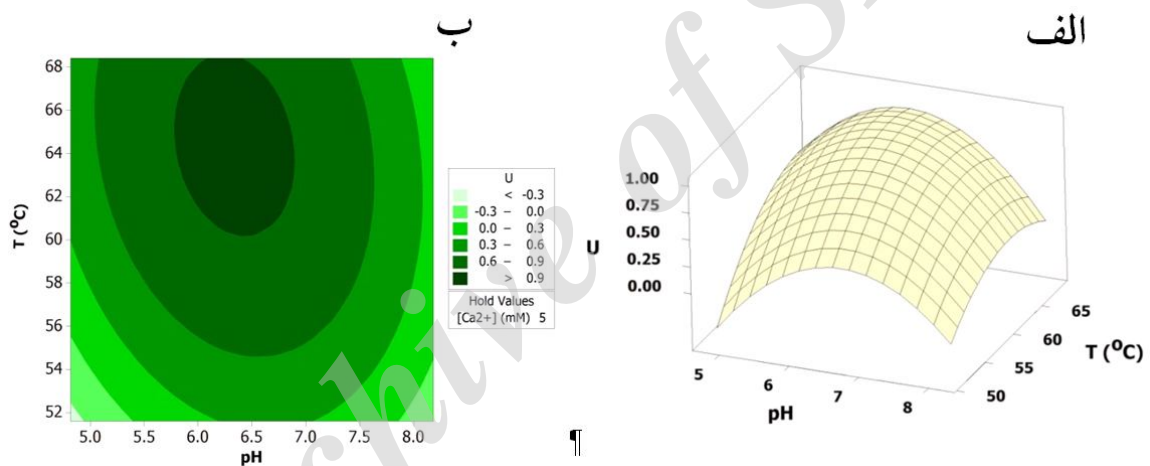
همچنین مقدار P بزرگتر از 0/05 (بر سطح اطمینان 95%) مربوط به معیار عدم پردازش مؤید مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی نتایج تجربی است. به عبارت دیگر مدل دارای عدم برازش نمی‌باشد. برای تعیین عوامل مؤثر بر فعالیت آنزیم، تحلیل پارتو² مورد استفاده قرار گرفت [21]. این تحلیل توسط نرم‌افزار مینی‌تب صورت پذیرفت. در این روش تأثیر هر فاکتور از طریق محاسبه درصد تأثیر هر ترم در پاسخ پیش‌بینی شده توسط رابطه زیر بدست می‌آید. قابل ذکر است که منظور

1. Correlation coefficient
2. Pareto

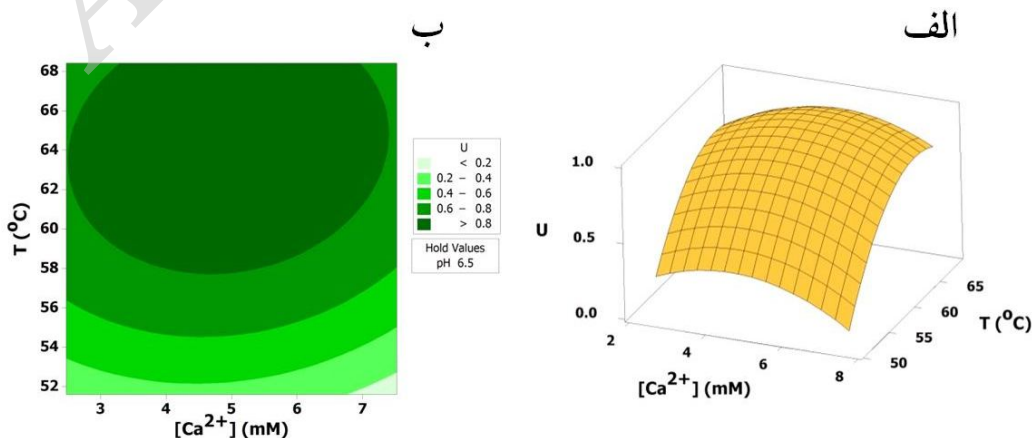
میزان کلسیم بین 3/6 تا 6/4 میلی مولار فراهم کننده بهترین شرایط مناسب برای فعالیت آنزیم هستند (شکل 6). در محدوده pH برابر 6/5 بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت نزدیک به 5 میلی مولار کلسیم کلرید است. همان طور که در شکل 6 مشاهده می شود، تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم بیشتر از یون کلسیم است.

مقادیر بهینه عوامل مؤثر، و همچنین پاسخ های پیش بینی شده و تجربی در این شرایط برای فعالیت بهینه آنزیم در جدول 3 ارائه شده است. نتایج نشان دادند که مقادیر تجربی مطابقت مناسبی با مقادیر پیش بینی شده دارند.

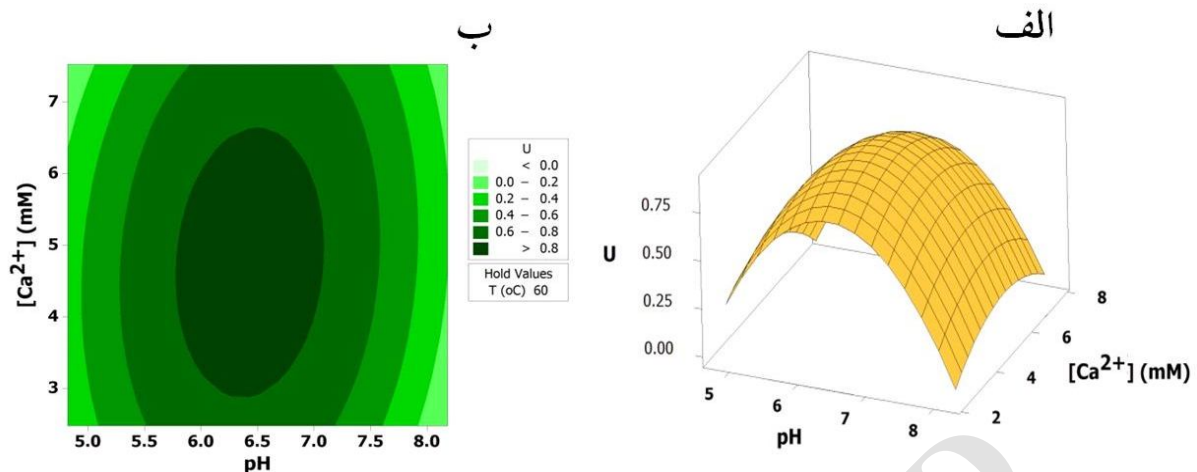
بودن محیط روی 6/5 تنظیم شده است. همان طور که در نمودار کانتور شکل 5- ب مشاهده می شود، دمای بین 58°C تا 68°C و غلظت های بین 3 تا 7 میلی مولار از کلسیم بهترین اثر را بر روی فعالیت دارند. لازم به ذکر است که در نمودار کانتور شدت رنگ نشان دهنده میزان فعالیت آنزیم است، بطوری که افزایش شدت رنگ (تیره تر شدن) نشان دهنده افزایش فعالیت آنزیم است. در نهایت با توجه به شکل 5 می توان مشاهده کرد که تأثیر حرارت بر روی عمل آنزیم بیشتر از کلسیم است. شکل 6 تأثیرات غلظت های مختلف کلسیم در محدوده pH مختلف است. نتایج نشان می دهد pH بین 6 تا 6/8 و



شکل 4 تأثیر همزمان دما و pH بر فعالیت آنزیم. منحنی رویه پاسخ (الف) و کانتور (ب). در این منحنی ها غلظت کلسیم 5 میلی مولار در نظر گرفته شده است.



شکل 5 تأثیر همزمان غلظت های مختلف کلسیم و دما بر فعالیت آنزیم. منحنی رویه پاسخ (الف) و کانتور در 6/5 pH حاصل شده اند.



شکل 6 تأثیر همزمان یون کلسیم و میزان pH بر فعالیت آنزیم. منحنی رویه پاسخ (الف) و کانتور (ب) در دمای 65 درجه سانتی‌گراد به دست آمده‌اند.

خطای آزمایشگر نیز در پاسخ‌ها دخیل می‌باشند. به همین منظور استفاده از محاسبات کامپیوتری برای حصول نتایج دقیقتر و سریعتر، وارد برنامه کاری بسیاری از محققان در زمینه‌های مختلف علمی شد. روش رویه پاسخ یک روش محاسباتی و آماری بوده و در سال‌های اخیر برای بهینه‌سازی تولید آنزیم‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها به وفور مورد استفاده قرار گرفته است [16, 17, 22]. اما با توجه با اینکه برای افزایش کاتالیز، قط افزایش تولید آنزیم کافی نیست، برای بهینه نمودن کاتالیز (آن هم در مقیاس صنعتی) نیاز به بهینه‌سازی شرایط بهینه عملکرد آنزیم نیز می‌باشد. بنابراین امروزه از روش رویه پاسخ برای بهینه نمودن شرایط فعالیت آنزیم‌ها نیز استفاده می‌شود [15, 23]. Jeya و همکاران با استفاده از روش رویه پاسخ نشان دادند که فعالیت گلیکوزید هیدرولازی از *Stereum hirsutum* در دمای 37°C، pH 5 و غلظت سوبسترای 6/7 % بیشترین مقدار می‌باشد [23]. از طرف دیگر Singh و همکاران مشاهده نمودند، بهترین شرایط عمل سلولاز از *Aspergillus heteromorphus* در دمای 60°C و pH 4/8 است [15]. در این تحقیق دیده شد که بهترین شرایط عمل سلولاز (اندوگلوکاناز) در دمای 64/5°C، pH 6/35 و غلظت کلسیم 4/92 میلی‌مولار است. بنابراین می‌توان

جدول 3 شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط مدل

پاسخ		شرایط بهینه پیشنهادی		
تجربی	پیش‌بینی شده	[Ca] (mM)	pH	T (°C)
0/903	0/968	4/92	6/35	64/5

همان‌طور که ملاحظه می‌شود، نتیجه مدل پیشنهادی، تطابق قابل قبولی با نتیجه مشاهده شده در تجربیات آزمایشگاهی دارد. همچنین نتایج نشان داد که بهترین شرایط عمل آنزیم در دمای 64/5 درجه (سانتی‌گراد)، pH 6/35 و غلظت 4/92 از کلسیم می‌باشد.

4- بحث و نتیجه‌گیری

بهینه‌سازی شرایط عمل اندوگلوکانازها می‌تواند باعث تولید هر چه بیشتر اولیگوساکاریدها و مونوساکاریدها از سلولز شود. از آنجا که مطالعات زوش رویه پاسخ تا به حال بر روی AaCel9A صورت نگرفته و تعریف دقیقی از شرایط بهینه عملکرد آنزیم در دست نبوده است، با این مطالعه و بررسی آزمایشگاهی مدلی که تعرف می‌شود، می‌توان رفتار آنزیم را به خوبی درک کرد. آزمایش تأثیر همزمان دو یا چند عامل بر پاسخ یک فرایند به صورت تجربی امری بسیار وقت‌گیر و هزینه‌بر است، از طرفی

نتایج وجود دارد که این امر می‌تواند تأیید کننده صحت بالای مدل پیشنهادی در این تحقیق باشد.

5- سپاسگزاری

نویسندگان از مساعدت‌های گروه بیوتکنولوژی کشاورزی و از حمایت‌های مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

6- منابع

- [1] John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol* **102**, 186-193.
- [2] Eckert, K., Zielinski, F., Lo Leggio, L., Schneider, E. (2002) Gene cloning, sequencing, and characterization of a family 9 endoglucanase (CelA) with an unusual pattern of activity from the thermoacidophile *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC27009. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 428-436.
- [3] Cherry, J. R., Fidantsef, A. L. (2003) Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 438-443.
- [4] Ho, S. H., Li, P. J., Liu, C. C., Chang, J. S. (2013) Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour Technol* **145**, 142-149.
- [5] Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J. S. (2013) Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour Technol* **135**, 191-198.
- [6] Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 506-577, table of contents.
- [7] Bayer, E. A., Shoham, Y., Lamed, R., (2006) Cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems, Springer, pp. 578-617.
- [8] Hong, S. M., Sung, H. S., Kang, M. H., Kim, C. G., Lee, Y. H., Kim, D. J., Lee, J. M., Kusakabe, T. (2014) Characterization of *Cryptopygus antarcticus* endo-beta-1,4-glucanase from *Bombyx mori* expression systems. *Mol Biotechnol* **56**, 878-889.

گفت آنزیم مورد مطالعه در این تحقیق در دما و pH بالاتری نسبت به دو آنزیم دیگر عملکرد بهینه دارد. بنابراین AaCel9A می‌تواند در واکنش هیدرولیزی که نیاز به دمای بالاتری دارد نسبت به آنزیم‌های ذکر شده، عملکرد بهتری داشته باشد. این امر می‌تواند به لحاظ استفاده صنعتی از این آنزیم (AaCel9A) مطلوب باشد. نتایج نشان داد که تأثیرات pH بر فعالیت آنزیم بیشتر از تأثیرات اعمال شده توسط دما و کلسیم است. بعد از تأثیر pH، میزان دمای واکنش و در نهایت غلظت کلسیم از اهمیت برخوردار بودند. تغییر pH محیط به سرعت می‌تواند قسمت‌های یونیزه شونده گروه‌های جانبی آمینو اسیدها را تحت شعاع قرار داده و رفتار و ساختار آنزیم را تغییر دهد [24,25]. بنابراین می‌توان گفت احتمالاً ساختار آنزیم و همچنین گروه‌های یونیزه شونده درگیر در کاتالیز آنزیمی در AaCel9A نسبت به تغییرات pH، حساس‌تر از سایر عوامل مورد بررسی (دما و کلسیم) است. از طرف دیگر نتایج نشان داد که کلسیم کمترین تأثیر را در بین پارمترهای مورد بررسی بر روی فعالیت آنزیم داشته و بیشترین اثر خود را در بازه بین 3 الی 7 میلی‌مولار دارد. دیده شده است که کلسیم می‌تواند در پایداری و فعالیت آنزیم‌ها دخیل باشد [26]. همچنین گزارش شده که در برخی از اندوگلوکانازها مقادیر بالای کلسیم باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود [27]. این اثر کاهش فعالیت می‌تواند ناشی از آشفتگی شبکه پیوندهای هیدروژنی درگیر با آنزیم باشد [28]. بنابراین می‌توان گفت افزایش غلظت کلسیم از 7 میلی‌مولار می‌تواند باعث کاهش فعالیت آنزیم شود و از طرف دیگر با توجه به تأثیر کم کلسیم (نسبت به سایر عوامل مورد بررسی) بر روی فعالیت آنزیم می‌توان گفت کلسیم بیشتر از فعالیت، بر روی پایداری آنزیم AaCel9A تأثیرگذار است. در نهایت نتایج مربوط به تطبیق نتایج آزمایشگاهی با نتایج پیش‌بینی شده نشان داد که همبستگی مناسبی بین

- [19] Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* **31**, 426-428.
- [20] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- [21] Amani-Ghadim, A., Aber, S., Olad, A., Ashassi-Sorkhabi, H. (2013) Optimization of electrocoagulation process for removal of an azo dye using response surface methodology and investigation on the occurrence of destructive side reactions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **64**, 68-78.
- [22] Badoei-Dalfard, A., Karami, Z. (2013) Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: activity optimization by response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **89**, 15-23.
- [23] Jeya, M., Kalyani, D., Dhiman, S. S., Kim, H., Woo, S., Kim, D., Lee, J.-K. (2012) Saccharification of woody biomass using glycoside hydrolases from *Stereum hirsutum*. *Bioresour Technol* **117**, 216-219.
- [24] Zhang, Y. H., Lynd, L. R. (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng* **88**, 797-824.
- [25] Bu, L., Crowley, M. F., Himmel, M. E., Beckham, G. T. (2013) Computational investigation of the pH dependence of loop flexibility and catalytic function in glycoside hydrolases. *J Biol Chem* **288**, 12175-12186.
- [26] Zeng, J., Gao, X., Dai, Z., Tang, B., Tang, X. F. (2014) Effects of metal ions on stability and activity of hyperthermophilic pyrolysin and further stabilization of this enzyme by modification of a Ca²⁺-binding site. *Appl Environ Microbiol* **80**, 2763-2772.
- [27] Nacke, H., Engelhaupt, M., Brady, S., Fischer, C., Tautz, J., Daniel, R. (2012) Identification and characterization of novel cellulolytic and hemicellulolytic genes and enzymes derived from German grassland soil metagenomes. *Biotechnol Lett* **34**, 663-675.
- [28] Dey, R., Pal, K., Chauhan, S., Bhatt, D., Misra, J. (2002) Groundnut shell decomposition potential of some cellulolytic microorganisms. *Indian Journal of Microbiology* **42**, 165-167.
- [9] Eckert, K., Vigouroux, A., Lo Leggio, L., Morera, S. (2009) Crystal structures of *A. acidocaldarius* endoglucanase Cel9A in complex with cello-oligosaccharides: strong -1 and -2 subsites mimic cellobiohydrolase activity. *J Mol Biol* **394**, 61-70.
- [10] Telke, A. A., Ghatge, S. S., Kang, S. H., Thangapandian, S., Lee, K. W., Shin, H. D., Um, Y., Kim, S. W. (2012) Construction and characterization of chimeric cellulases with enhanced catalytic activity towards insoluble cellulosic substrates. *Bioresour Technol* **112**, 10-17.
- [11] Kumar, S., Tsai, C. J., Nussinov, R. (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng* **13**, 179-191.
- [12] Teilum, K., Olsen, J. G., Kragelund, B. B. (2011) Protein stability, flexibility and function. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 969-976.
- [13] Badoei-Dalfard, A., Khajeh, K., Asghari, S. M., Ranjbar, B., Karbalaee-Heidari, H. R. (2010) Enhanced activity and stability in the presence of organic solvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. *J Biochem* **148**, 231-238.
- [14] Asghari, S. M., Pazhang, M., Ehtesham, S., Karbalaee-Heidari, H. R., Taghdir, M., Sadeghizadeh, M., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K. (2010) Remarkable improvements of a neutral protease activity and stability share the same structural origins. *Protein Eng Des Sel* **23**, 599-606.
- [15] Singh, R., Kumar, R., Bishnoi, K., Bishnoi, N. R. (2009) Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* **48**, 28-35.
- [16] Tatineni, R., Doddapaneni, K. K., Potumarthi, R. C., Mangamoori, L. N. (2007) Optimization of keratinase production and enzyme activity using response surface methodology with *Streptomyces* sp7. *Appl Biochem Biotechnol* **141**, 187-201.
- [17] Jeya, M., Zhang, Y. W., Kim, I. W., Lee, J. K. (2009) Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. *Bioresour Technol* **100**, 5155-5161.
- [18] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.