

تثبیت آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A بر روی ماکروبیدهای کیتوزانی

پرستو رحیمی زاده¹، سعید نژاوند^{2*}، محمد پاژنگ²، علیرضا امانی قدیم³، نادر چاپارزاده⁴،
فرشته سادات یونسی¹

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، 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- دانشیار گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

* تبریز، کد پستی 5375171379

saeed.najavand@gmail.com ، s.najavand@azaruniv.edu
(دریافت مقاله: 94/4/13 پذیرش مقاله: 94/7/8)

چکیده- سلولاز آنزیمی پرکاربرد در صنایع مختلف است. تثبیت سلولاز یکی از روش‌های پایدارسازی آن است که نه تنها امکان جداسازی آنزیم از واکنش، بلکه امکان استفاده مجدد از آن را فراهم می‌سازد و در نتیجه هزینه استفاده آنزیم در صنعت به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. استفاده از کیتوزان به عنوان بستر برای تثبیت آنزیم و استفاده گسترده آن در فرایندهای صنعتی همواره مورد توجه بوده است. ویژگی‌های فوق‌العاده از جمله زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و غیرسمی بودن آن، کیتوزان را بستری مناسب برای فرایند تثبیت معرفی می‌کند. در این مطالعه توالی ژنی کدکننده آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A در وکتور بیانی (+)pET28a همسانه‌سازی شد. نتایج حاصل از تعیین توالی مؤید قرارگیری صحیح قالب ژنی AaCel9A در وکتور بود. سپس وکتور حاوی ژن به سلول‌های مستعد/شریشیا کلی سویه BL21 منتقل شده و بیان پروتئین در آن‌ها القا شد. بیان آنزیم با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE و سنجش فعالیت آنزیم تایید و با ستون نیکل آگارز تخلیص بعمل آمد. ساخت ماکروبیدهای کیتوزان با روش ژله‌ای شدن صورت گرفت. مولکول‌های آنزیم با استفاده از لینکرهای گلو تارآلدئیدی به صورت کووالان به بستر متصل و تأیید تثبیت آنزیم توسط FTIR و نیز سنجش فعالیت آنزیمی از ماکروبیدهای حاوی آنزیم انجام پذیرفت. آنالیز نتایج نشان داد که بهترین شرایط برای تثبیت کووالان آنزیم بر روی بستر در غلظت گلو تارآلدئید 0/7% و بافر سدیم فسفات (7 pH) می‌باشد. همچنین آنالیز برادفورد و سنجش فعالیت آنزیمی مؤید تثبیت 85% از مولکول‌های آنزیم بر روی بستر بود.

کلیدواژگان: اندوگلوکاناز AaCel9A، پایدارسازی، تثبیت، کیتوزان.

1- مقدمه

سلولز دیواره سلولی گیاهان، یک منبع گسترده و تجدیدپذیر موجود بر روی سطح کره زمین است. تولید اتانول از منابع تجدیدپذیر مانند سلولز می‌تواند یک گام برای رهایش از گازولین باشد. با توجه به افزایش روز افزون جمعیت و کاهش سوخت‌های فسیلی، استفاده از منابع سلولزی از لحاظ اقتصادی و زیستی فوق‌العاده به صرفه است [1,2]. سلولزها، آنزیم‌هایی پرکاربرد در صنایع مختلف می‌باشند. این آنزیم‌ها در صنایع کاغذسازی، غذایی، بهبود غذای دام، منسوجات، شوینده‌ها کاربرد دارند. با وجود این مهمترین کاربرد سلولزها در تولید سوخت‌های زیستی است [3,4]. سلولزها بر حسب عملکرد کاتالیزوری در سه خانواده اندوگلوکاناز، β گلوکوزیداز و سلوبیوهیدرولاز دسته‌بندی می‌شوند [5]. هیدرولیز ساختار سخت سوبسترای سلولزی پس از تیمار-های شیمیایی با عملکرد کاتالیتیکی اندوگلوکاناز آغاز می‌شود که با عملکرد خود سوبسترای مورد نیاز برای 2 آنزیم دیگر از این خانواده را فراهم می‌سازد [6]. AaCel9A یک اندوگلوکاناز از خانواده 9 گلیکوزید هیدرولازهاست. این آنزیم مونومر دارای 537 رزیدو بوده و حاوی دو دمین شبه ایمینوگلوبولینی و کاتالیتیکی است [7,8].

برای استفاده گسترده از آنزیم باید پایداری آنزیم در فرایندهای صنعتی را که در شرایط فیزیکی شیمیایی خاصی انجام می‌شوند بهبود بخشید، زیرا ساختار آنزیم حین استفاده در فرایندهای صنعتی ممکن است واسرشته شده و بنابراین آنزیم فعالیت کاتالیزوری خود را از دست دهد [9]. روش‌های متعددی از جمله تثبیت، مهندسی پروتئین و مهندسی حلال برای پایداری آنزیم‌ها وجود دارد [10]. تثبیت آنزیم بر روی بستر، به علت حفظ عملکرد آنزیم در شرایط پیچیده صنعتی در چند دهه اخیر جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است [11,12].

انتخاب روش و بستر مناسب برای تثبیت بسته به کاربرد-های متنوعی که برای آنزیم مطرح می‌شود اهمیت بسزایی دارد [13]. استفاده از پلیمرهای طبیعی از جمله سلولز، کاراگینان، کلاژن، کیتین و کیتوزان و پلیمرهای سنتتیک مانند پلی اکریل امید، امبرلیت، پلی وینیل الکل و ترکیبات معدنی نظیر سیلیس، ذرات رس و کربن فعال برای تثبیت آنزیم همواره مورد توجه بوده است [14-18]. کیتوزان پلی‌ساکاریدی خطی است که از داستیله شدن کیتین در شرایط سخت قلیایی بدست می‌آید. این پلی‌ساکارید از اتصال بتا 1 به 4 واحدهای 2-آمینو، 2-دئوکسی -D- گلوکوپیرانوز تشکیل شده است و به علت وجود گروه-های آمین و هیدروکسیل آزاد در سطح، بستری مناسب برای تثبیت آنزیم‌ها به شمار می‌رود [19]. ویژگی‌های فوق‌العاده کیتوزان مثل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و غیرسمی بودن کاربرد کیتوزان را به‌طور گسترده در صنایع مختلف امکان‌پذیر کرده است [20-22]. استفاده از لینکر گلو تار آلدهیدی برای تثبیت کوالان آنزیم به بستر امکان نشت آنزیم و محدودیت اعمال شده از سمت بستر بر روی فعالیت آنزیمی را به حداقل می‌رساند [23,24]. در این تحقیق ابتدا توالی ژنی کد کننده آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A در وکتور بیانی همسانه سازی و سپس بیان آن در سیستم بیانی پروکاریوتی صورت گرفت. پس از تولید و تخلیص آنزیم، تثبیت کوالان آن به‌واسطه لینکر گلو تار آلدهیدی بر روی ماکرو بیدهای کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت.

2- مواد و روش‌ها**مواد**

آنزیم‌های محدودالتر، DNA پلیمرز و آنزیم T4 لیگاز از شرکت فرمنتاز¹ تهیه شد. کیتوزان (وزن مولکولی متوسط، درصد داستیلاسیون 85%-75%) از شرکت سیگما-الدریچ

1. Fermentase

توالی ژنی برای تعیین توالی به شرکت بیونیر (کره جنوبی) فرستاده شد. مطالعات تطبیق توالی با استفاده از BLASTP و BLASTN از طریق سرور NCBI انجام شد.

2-2- بیان و تخلیص آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A

برای بیان اندوگلوکاناز AaCel9A، ناقل‌های حاوی توالی ژنی به اشرشیا کلی سویه بیانی BL21(DE3) منتقل و سپس با استفاده از محیط کشت LB³ حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (50 میلی گرم بر لیتر)، بیان پروتئین در دمای 22 درجه سانتی گراد به وسیله غلظت نهایی یک میلی مولار از IPTG⁴ به مدت 20 ساعت القا شد. 500 میلی لیتر از هرکدام از سوسپانسیون باکتری‌های القا شده به مدت 10 دقیقه در 10000g و دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و رسوب باکتری بدست آمده با افزودن بافر لیزکننده (سدیم فسفات 20 میلی مولار، pH 7 و PMSF⁵ 1⁵ میلی مولار) به حالت سوسپانسیون درآمد. پس از آن سوسپانسیون باکتری در داخل فالكون 15 میلی لیتری وارد و به روی یخ منتقل و سپس با دستگاه سونیکاتور شرکت بیوکامپیر⁶ (آمریکا) تحت سونیکاسیون (20 دور سونیکاسیون، هر دور 20 ثانیه پالس و 40 ثانیه استراحت) قرار گرفت. سلول‌های لیز شده در 20000g و در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره سلولی حاصل، برای تخلیص پروتئین نوترکیب دارای دنباله هیستیدینی در انتهای N، به روی ستون نیکل-NTA⁷ (شرکت کیاژن⁷) منتقل شده و پروتئین خالص شد. برای آنالیز بیان و تخلیص به ترتیب عصاره سلولی و پروتئین خالص شده با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE (ژل پلی آکریل آمید 12% وزنی-حجمی) توسط روش لاملی⁸ مورد بررسی قرار گرفت [26].

(آمریکا) خریداری شد. سایر مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک¹ خریداری گردید.

روش‌ها

1-2- همسانه سازی ژن آنزیم AaCel9A

برای تکثیر ژن اندوگلوکاناز AaCel9A از پرایمرهای رفتی: (5'GGAATTCATATGCGCTCTCGCTGCCAAATCG3') و برگشتی:

(3'CCCAAGCTTTCACCTCCCGCGCGCCTCGAG5')

استفاده شد که به ترتیب دارای جایگاه برش برای آنزیم‌های محدودالایر *NdeI* و *HindIII* هستند (نوکلئوتیدهایی که زیر آن‌ها خط کشیده شده است، جایگاه برش آنزیم‌های محدودالایر را نشان می‌دهد). با استفاده از پرایمرهای فوق و وکتور pDEST17 حاوی ژن AaCel9A (این وکتور از گروه تحقیقاتی پروفیسور Moera [25] طی همکاری علمی تحویل گرفته شد)، ژن آنزیم از طریق PCR (Eppendorf) تکثیر یافت. بعد از تکثیر ژن، با استفاده از آنزیم‌های محدودالایر، محصول واکنش PCR و ناقل pET28a(+) (ناقل بیانی) مورد هضم قرار گرفتند. بعد از هضم آنزیمی واکنش الحاق ژن به وکتور انجام گرفت. انتقال ناقل‌های نوترکیب حاوی ژن آنزیم اندوگلوکاناز به باکتری اشرشیاکلی سویه TOP10 به روش الکتروپوراسیون به مدت 5 میلی ثانیه با ولتاژ 2500 میلی ولت (Eppendorf Multiporator Electroporation) انجام شد. در ادامه کلونی‌های حاوی ناقل‌های نوترکیب توسط کلونی PCR و با الکتروفورز ژل آگارز 1% مشخص شدند. ناقل‌های نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت بیونیر² (کره جنوبی) استخراج شده و هضم وکتور نوترکیب با آنزیم‌های محدودالایر و استخراج قطعه ژنی جهت تأیید همسانه سازی صورت گرفت. برای تأیید بیشتر همسانه سازی، پلاسمید حاوی

3. Luria-Bertani

4. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

5. Phenylmethylsulfonyl fluoride

6. Biocompare

7. Qiagen

8. Laemmli

1. Merck, Germany

2. Bioneer

2-3- سنجش فعالیت آنزیمی

برای تعیین فعالیت آنزیمی، 50 میکرولیتر سوبسترای CMC 1% (1 گرم CMC حل شده در 100 میلی لیتر بافر سدیم فسفات با pH 6/5) با 50 میکرولیتر آنزیم به مدت 3 دقیقه در دمای 65 درجه انکوبه شد. توقف واکنش آنزیمی با افزودن معرف 3، 5 دی نیترو سالیسیک اسید¹ (معرف برنیلید) و جوشاندن میکروتیوب واکنش به مدت 5 دقیقه در آبجوش صورت گرفت [27]. برای سنجش میزان سرهای احیاءکننده آزاد حاصل از واکنش آنزیمی بر روی سوبسترای CMC، جذب نمونه نسبت به بلانک آنزیمی در طول موج 540 نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر UV/VIS (GenWay) خوانش گردید. میزان سرهای آزاد حاصل از واکنش آنزیمی بر طبق منحنی استاندارد گلوکز تعیین گردید. واحد فعالیت آنزیمی به صورت مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول سر احیا کننده را در مدت زمان یک دقیقه در شرایط واکنش ایجاد کند، تعریف شد [28].

2-4- سنتز ماکروبیدهای کیتوزان

برای تهیه بستر کیتوزانی به فرم ماکروبیدها، 0/2 گرم پودر کیتوزان در 10 میلی لیتر استیک اسید 2 درصد به مدت 12 ساعت روی همزن، هم زده شد تا محلول شفاف و ویسکوز بدون حباب هوا تشکیل شود. سپس محلول کیتوزان توسط نیروی پمپ هوا و با سرعت 75 میکرولیتر در دقیقه درون محلول بازی حاوی سدیم هیدروکسید 10% و اتانول (به ترتیب به نسبت 4 به 1) بر روی همزن² با دور ملایم ریخته شد و ماکرو بیدهای ژله ای کیتوزان تشکیل گردید. محلول حاوی ماکروبیدها با کاغذ صافی فیلتر شده و چندین بار با آب مقطر به صورت کامل شستشو شدند تا غلظت مواد یونی در محیط به حداقل برسد. سپس در آب دوبار تقطیر در دمای 4 درجه

نگهداری شدند [29].

2-5- ارزیابی فرایند تثبیت

در ارزیابی فرایند تثبیت تأثیر چندین پارامتر از جمله غلظت مناسب گلو تار آلدئید و بافر مناسب مورد بررسی قرار گرفت.

2-5-1- تعیین غلظت مناسب گلو تار آلدئید جهت تثبیت

برای ایجاد گروه های واکنش پذیر در بستر، ماکروبیدهای کیتوزان باید با گلو تار آلدئید فعال شوند. برای تعیین غلظت بهینه گلو تار آلدئید، بستری با غلظت های متفاوت از گلو تار آلدئید در pH 6/5 و دمای 25 درجه به مدت 3 ساعت انکوبه گردید و پس از تثبیت آنزیم بر روی آن، غلظت پروتئین در محلول رویی هر کدام از بسترها اندازه گیری شد. برای تأییدیه حذف گلو تار آلدئید اضافی در محیط، پس از شستشوی کامل، ماکروبیدها به مدت 15 دقیقه با دور 20000 g سانتریفیوژ شدند. سپس بستر به طور کامل با آب دیونیزه شستشو شد تا جذب گلو تار آلدئید موجود در محیط در طول موج 280 نانومتر به صفر برسد [30].

2-5-2- تأثیر نوع بافر روی فرایند تثبیت

برای ارزیابی تأثیر بافر روی فرایند تثبیت، محلول آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A با غلظت 10 میلی گرم بر میلی لیتر در بافرهای مختلف با 1 گرم از بیدهای فعال شده با گلو تار آلدئید به مدت 16 ساعت در 22 درجه انکوبه شدند. برای سنجش میزان تثبیت از محلول رویی قبل و بعد تثبیت سنجش برادفورد [31]، آنالیز SDS-PAGE و سنجش فعالیت آنزیمی به عمل آمد.

2-6- تثبیت آنزیم بر روی بستر

1 گرم بستر فعال شده با گلو تار آلدئید 0/7% با 10 میلی

1. 3,5 dinitrosalicylic acid

2. Stirrer

(1)

فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده (unit)

= فعالیت ویژه آنزیم (unit)

- فعالیت ویژه محلول رویی تثبیت (unit) -

(2)

3- نتایج

3-1- نتایج همسانه سازی، بیان و تخلیص آنزیم

همسانه سازی با هضم و کتور نوترکیب توسط آنزیم‌های محدودالثر و خروج قطعه ژنی از وکتور نوترکیب (شکل 1) و در نهایت تعیین توالی و کتور حامل قطعه ژنی توسط شرکت بیونیر تأیید گردید.

نتایج الکتروفورز SDS-PAGE بیان پروتئین تقریباً 60 کیلودالتونی AaCel9A را نسبت به نمونه حاوی وکتور فاقد ژن (کنترل منفی) نشان می‌دهد (شکل 2). تخلیص کامل آنزیم AaCel9A توسط ستون Ni-NTA با شستشوی ستون توسط بافر جدا کننده با غلظت 250 میلی‌مولار ایمیدازول (pH 8) صورت گرفت. همان‌طور که در شکل 2 (چاهک 5) مشاهده می‌شود، آنزیم تخلیص شده است. میزان تخلیص بر اساس نتایج دانسیتومتری حدود 85% تخمین زده شد (نتایج دانسیتومتری نشان داده نشده است). با توجه به اینکه در این تحقیق اساس بررسی فعالیت و تثبیت آنزیم بوده و نه مطالعه ساختاری، بنابراین میزان خلوص آنزیم مناسب می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیم در مجاورت سوبسترای 1% CMC و تغییر رنگ آجری واکنش آنزیمی نسبت به بلانک (با معرف برنفیلد) نشان‌دهنده فعال بودن آنزیم خالص شده بود (شکل 3) به طوری که سنجش میزان سرعت واکنش طبق منحنی استاندارد گلوکز نشان داد که 0/071 میکرومول سرآزاد در مدت زمان یک دقیقه در شرایط واکنش ایجاد می‌شود.

گرم بر میلی‌لیتر آنزیم تخلیص شده AaCel9A در بافر فسفات با pH 7 به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه انکوبه شد. پس از انجام تثبیت بیدها بطور کامل توسط بافر فسفات با pH 6 (pH ایزوالکتریک آنزیم AaCel9A) شسته شدند تا مولکول‌های آنزیمی که جذب سطحی بستر شده بودند جدا شده و تنها مولکول‌هایی که اتصال کوالان با بستر داشتند باقی بمانند [32].

2-7- تأیید تثبیت آنزیم بر روی بستر

برای تأیید فعال شدن بستر با گلوٹارآلدئید و تثبیت آنزیم بر روی آن، از آنزیم خالص، بیدهای کیتوزانی فعال شده با گلوٹارآلدئید و بستر حامل آنزیم طیف FTIR¹ گرفته شد. به منظور تهیه طیف FTIR نمونه‌ها در آن 120 درجه به مدت 1 ساعت خشک شدند و پس از مخلوط کردن با نمک KBr برای آنالیز توسط دستگاه FT-IR (Bruker Tensor 27) مورد استفاده قرار گرفتند.

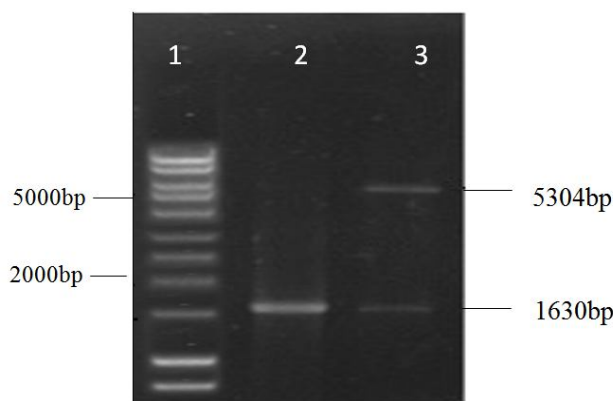
2-8- بررسی کارایی تثبیت

برای ارزیابی کارایی تثبیت و تعیین غلظت آنزیم تثبیت شده بر روی بستر، تست برادفورد و سنجش فعالیت آنزیمی از محلول رویی قبل و بعد از تثبیت به عمل آمد. تست برادفورد با افزودن 1 میلی‌لیتر معرف برادفورد به 25 میکرولیتر از آنزیم قبل و محلول رویی بعد از واکنش تثبیت صورت گرفت. خوانش جذب در طول موج 590 نانومتر انجام و طبق منحنی استاندارد ترسیم شده برای BSA، غلظت آنزیم تثبیت شده بر روی بستر تخمین زده شد. برای ارزیابی کارایی تثبیت از فرمول‌های زیر استفاده شد [33].

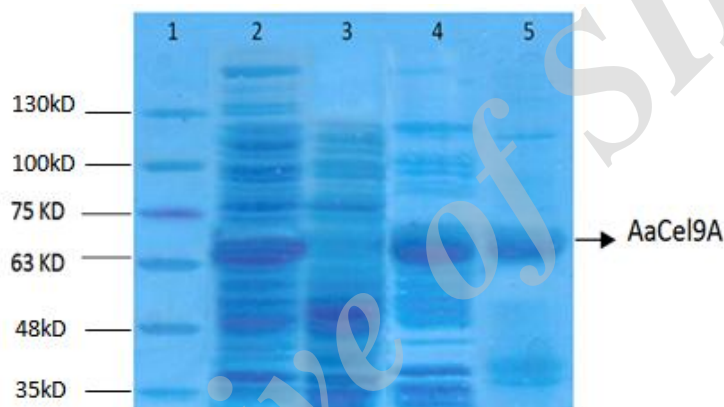
(immobilization efficiency %) کارایی تثبیت

$$= \frac{\text{فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده (unit)}}{\text{فعالیت ویژه آنزیم (unit)}}$$

1. Fourier transform infrared spectroscopy



شکل 1 هضم وکتور نو ترکیب با آنزیم های محدودالایتر، چاهک 1 اندازه نمای DNA، چاهک 2 قطعه ژنی تخلیص شده AaCel9A چاهک 3 وکتور pET28a(+) نو ترکیب هضم شده با *NdeI* و *HindIII*



شکل 2 ژل SDS-PAGE، چاهک 1 اندازه نمای پروتئین، چاهک 2 نمونه القاء شده حاوی وکتور pET28a(+) دارای ژن، چاهک 3 نمونه القاء شده حاوی وکتور pET28a(+) فاقد ژن، چاهک 4 محصول تخلیص با شوک حرارتی (تخلیص نسبی)، چاهک 6 محصول تخلیص با ستون نیکل NTA- (تقریباً کامل)

3-2- سنتز و آماده سازی بستر کیتوزانی و تثبیت آنزیم

بر روی آن

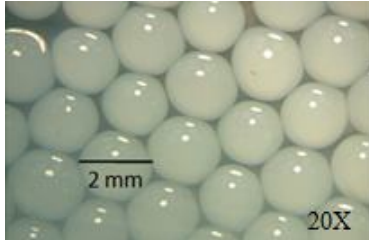
تشکیل ماکروبیدهای ژله ای کیتوزان به صورت هم اندازه و یکدست با ورود محلول کیتوزان به صورت کنترل شده در محلول سدیم هیدروکسید و اتانول صورت گرفت. همان طور که در شکل 4 مشخص شده، اندازه ی ماکروبیدهای ژله ای در زیر لوپ SZM-2 Optika حدود 2 میلی متر تخمین زده شد.

برای بررسی تأثیر غلظت گلو تار آلدئید بر روی فرایند تثبیت آنزیم، بستر ماکروبیدهای با غلظت های مختلف از



شکل 3 فعالیت آنزیمی اندوگلوکاناز AaCel9A در حضور معرف برنقیلد، میکروتیوب شماره 1 مربوط به میکروتیوب بدون آنزیم (بلانک) و میکروتیوب شماره 2 مربوط به میکروتیوب حاوی آنزیم

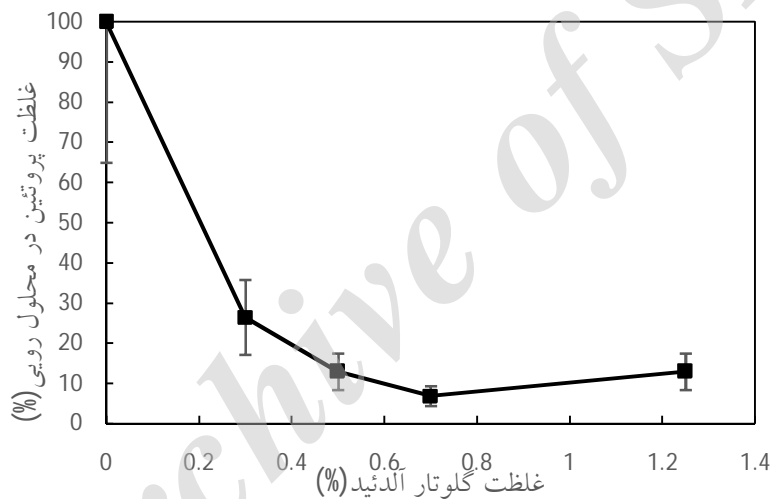
کروی) در برابر فرم تقریباً له شده بیدهای معمولی بعد از 48 ساعت نشان دهنده تأثیر گلو تار آلدهید بر استحکام بستر کیتوزانی می باشد.



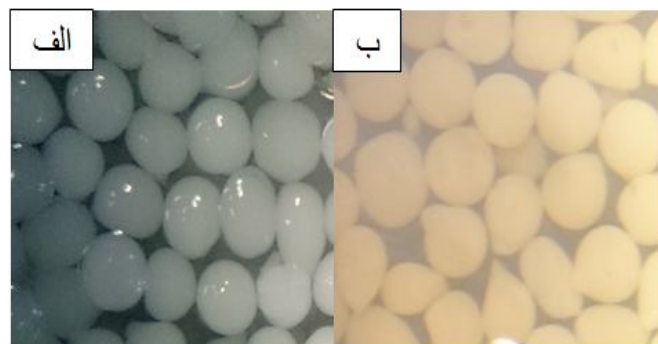
شکل 4 ماکروبیدهای کیتوزان

گلو تار آلدهید فعال شده، سپس آنزیم تثبیت شد. همان طور که در شکل 5 نشان داده شده است، غلظت 0/7% از گلو تار آلدهید غلظت بهینه برای فعال کردن بستر و تثبیت آنزیم است (شکل 5). همان طور که در شکل نمایان است در این غلظت از گلو تار آلدهید غلظت پروتئین در محلول رویی به حداقل خود رسیده است.

همچنین برای بررسی تأثیر تثبیت بر روی استحکام بیدها، بیدهای فعال شده و فعال نشده با گلو تار آلدهید همزمان به مدت 48 ساعت در استیک اسید 2/5% قرار داده شدند. همان طور که در شکل 6 نیز مشخص است حفظ قوام و استحکام بیدهای فعال شده (شکل های یکدست و تقریباً

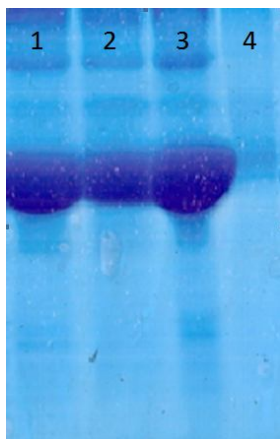


شکل 5 بررسی تأثیر غلظت گلو تار آلدهید روی فرایند تثبیت آنزیم



شکل 6 ماکروبیدهای کیتوزان، (الف) فعال نشده با گلو تار آلدهید و (ب) فعال شده با گلو تار آلدهید

کربونیل در عدد موج 1650 cm^{-1} رخ داده است (شکل 8). این تغییر را می‌توان به اضافه شدن گروه کربونیل به بستر کیتوزانی و تشکیل پیوند ایمینی نسبت داد [34].



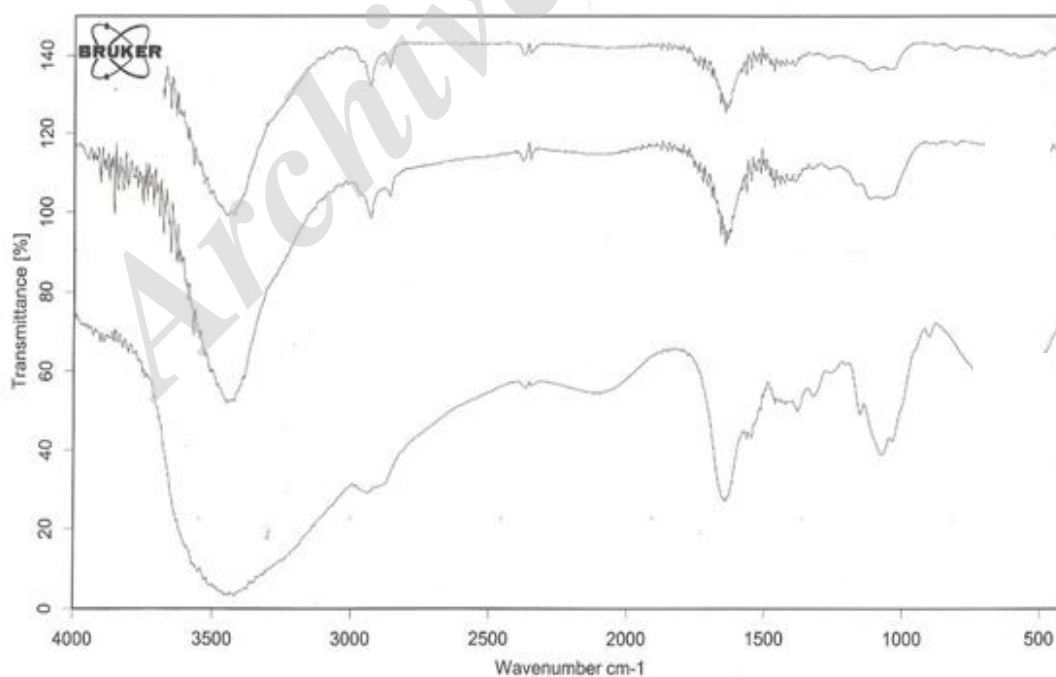
شکل 7 الکتروفورز SDS-PAGE از محلول رویی مربوط به فرایند تثبیت، چاهک 1 و 2 به ترتیب محلول رویی قبل و بعد از تثبیت مربوط به بافر تریس، چاهک 3 و 4 به ترتیب محلول رویی قبل و بعد از تثبیت مربوط به بافر فسفات

در سنجش تأثیر بافر روی فرایند تثبیت، تأثیر بافر تریس و بافر فسفات در تثبیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول سنجش برادفورد (جدول 1) و الکتروفورز SDS-PAGE (شکل 7) مشاهده می‌شود، بافر فسفات بافر مناسب‌تری نسبت به بافر تریس برای تثبیت آنزیم می‌باشد.

جدول 1 تأثیر نوع بافر روی فرایند تثبیت

غلظت آنزیم در محلول غلظت آنزیم در محلول	غلظت آنزیم در محلول غلظت آنزیم در محلول	غلظت آنزیم در محلول غلظت آنزیم در محلول
بافر انتخابی برای تثبیت	رویی قبل از تثبیت (mg/ml)	رویی بعد از تثبیت (mg/ml)
بافر فسفات 50 میلی‌مولار (pH 7)	0/256	0/06
بافر تریس 50 میلی‌مولار (pH 7)	0/382	0/3

در بررسی طیف FTIR کیتوزان و بستر فعال شده با گلوکارآلدئید نشان داد که تغییری در شدت فرکانس گروه

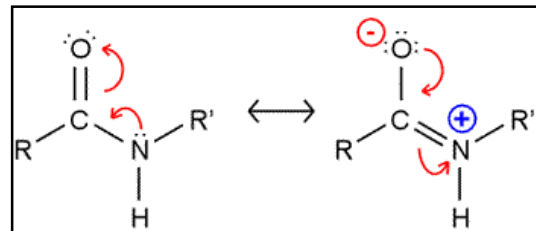


شکل 8 آنالیز FTIR، طیف‌ها از بالا به پایین به ترتیب متعلق به کیتوزان، بستر کیتوزانی فعال شده با گلوکارآلدئید و آنزیم تثبیت شده، است

کاربردهای فراوانی داشته باشد. همچنین با تثبیت آنزیم‌ها امکان استفاده چند باره از آنزیم تثبیت شده وجود دارد. - به علت استفاده گسترده آنزیم‌های اندوگلوکاناز در صنایع مختلف، تثبیت این آنزیم‌ها بر روی بسترهای مختلف می‌تواند از دید زیست فناوری بسیار مهم باشد. در این تحقیق ابتدا ژن اندوگلوکاناز AaCel9A در وکتور بیانی (+) pET28a همسانه سازی گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی مؤید قرارگیری صحیح قالب ژنی در وکتور بود. تخلیص آنزیم با استفاده از ستون تمایلی نیکل آگارز و سنجش فعالیت آنزیم تخلیص شده در مجاورت سوبسترای CMC موید بیان و فعال بودن مولکول آنزیم تولید شده بود. در این تحقیق با فراهم نمودن ریز محیط مناسب، تثبیت آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A بر روی ماکروبیدهای کیتوزان مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اتصال مولکول آنزیم به بستر بایستی حمله نوکلئوفیلی مناسبی بین بستر فعال با آمین آزاد آمینواسیدهای نوکلئوفیل روی سطح آنزیم صورت گیرد. نوع بافر، pH و غلظت یونی بافر عوامل تعیین کننده‌ای برای حمله نوکلئوفیلی مناسب و انجام فرایند تثبیت می‌باشند. در ابتدا با سنتز ذرات کیتوزان بصورت هم اندازه، احتمال توزیع یکنواخت مولکول‌های آنزیم بر روی بستر فراهم گردید [36]. مولکول‌های آنزیم با استفاده از لینکرهای گلوتارآلدئیدی به صورت کووالان به بستر متصل شدند. در سنجش تأثیر غلظت گلوتارآلدئید بر روی فرایند تثبیت، حداکثر تثبیت مولکول‌های آنزیم در غلظت 0/7% از گلوتارآلدئید بر روی بستر مشاهده گردید. در مطالعات انجام شده توسط Ambasht و همکاران در سال 2014 [33] در تثبیت آنزیم اسید فسفاتاز بر روی بستر کیتوزانی با غلظت 1% گلوتارآلدئیدی و Emese در سال 2012 [37] با تثبیت کووالان آنزیم بتا گالاکتوزیداز در غلظت 5% از گلوتارآلدئید بر روی ماکروبیدهای کیتوزانی، کارایی تثبیت به ترتیب 80% و 42% گزارش شد. در واقع گلوتار

پس از اتصال آنزیم به بستر کیتوزانی از طریق نیتروژن‌های آمینی و آمیدی رزونانس کاهش یافته، لذا شدت پیک گروه کربونیلی افزایش می‌یابد، از طرف دیگر، این اتصال موجب افزایش (به دلیل حضور گروه‌های کشنده کیتوزانی) قطبیت گروه کربونیل شده که این نیز به نوبه خود باعث افزایش شدت پیک گروه کربونیل می‌شود (شکل 9).

تغییر شدت فرکانس در محدوده عدد موج 2500cm^{-1} -3400 نیز مشاهده می‌شود که مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای O-H و C-H است که در بستر کیتوزانی حاوی آنزیم نیز این حالت مشاهده می‌شود [35]. طبق غلظت‌های گزارش شده جدول 2، میزان تثبیت 2/79 میلی گرم آنزیم به ازای 1 گرم از ماکروبیدهای کیتوزانی صورت گرفته است و کارایی تثبیت با توجه به فرمول 1 (قسمت 8-2) تقریباً معادل 85% می‌باشد.



شکل 9 رزونانس گروه کربونیل در پیوند پپتیدی

جدول 2 بررسی غلظت و فعالیت آنزیم قبل و بعد از تثبیت

نوع سنجش انجام شده	محلول آنزیمی قبل از تثبیت	محلول رویی بعد از تثبیت
تعیین فعالیت آنزیمی ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	0/071	0/011
غلظت پروتئین به روش برادفورد (میلی گرم بر میلی لیتر)	5/08	2/29

4- بحث

تثبیت آنزیم‌ها بر روی بسترهای مختلف می‌تواند

- nanoparticles as support for cellulase immobilization*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2014. **53**(9): p. 3448-3454.
- [3] Kuhad, R.C., R. Gupta, and A. Singh, *Microbial cellulases and their industrial applications*. Enzyme research, 2011. **2011**.
- [4] Sadhu, S. and T.K. Maiti, *Cellulase production by bacteria: a review*. British Microbiology Research Journal, 2013. **3**(3): p. 235-258.
- [5] Vuong, T.V. and D.B. Wilson, *Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity*. Biotechnology and bioengineering, 2010. **107**(2): p. 195-205.
- [6] Komarova, K., *Strategy For Cellulase Immobilization And Its Partial Purification And Characterization*. 2008.
- [7] Liu, H., Pereira, J. H., Adams, P. D., Sapra, R., Simmons, B. A., & Sale, K. L., *Molecular simulations provide new insights into the role of the accessory immunoglobulin-like domain of Cel9A*. FEBS letters, 2010. **584**(15): p. 3431-3435.
- [8] Eckert, K., Zielinski, F., Leggio, L. L., & Schneider, E., *Gene cloning, sequencing, and characterization of a family 9 endoglucanase (CelA) with an unusual pattern of activity from the thermoacidophile Alicyclobacillus acidocaldarius ATCC27009*. Applied microbiology and biotechnology, 2002. **60**(4): p. 428-436.
- [9] Iyer, P.V. and L. Ananthanarayan, *Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment*. Process Biochemistry, 2008. **43**(10): p. 1019-1032.
- [10] Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, Z., Chaloupkova, R., & Damborsky, J., *Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents*. Acs Catalysis, 2013. **3**(12): p. 2823-2836.
- [11] Elnashar, M.M., *Review article: immobilized molecules using biomaterials and nanobiotechnology*. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2010. **1**(01): p. 61-77.
- [12] Cui, J.D. and S.R. Jia, *Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges*. Critical reviews in biotechnology, 2013. **35**(1): p. 15-28.
- [13] Datta, S., R. Christena, and Y.R. Sriramulu Rajaram, *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials*. 3 Biotech, 2013. **3**: p. 1-9.
- آلدئید با فعال کردن آمین‌های آزاد سطح کیتوزان اتصال آنزیم به کیتوزان را ممکن می‌سازد [38]. در مطالعه حاضر با استفاده از غلظت 0/7% از این عامل فعال کننده اتصال 85% از مولکول‌های آنزیم به بستر فراهم گردید. استفاده از غلظت‌های بالای گلو تار آلدئید می‌تواند منجر به فعال شدن تمام آمین‌های آزاد سطح بستر کیتوزان، اتصال چندگانه آنزیم با بستر و سایر مولکول‌های آنزیمی شود که این امر نیز به نوبه خود می‌تواند منجر به سخت شدن فوق العاده ساختار آنزیم و نیز تغییر کنفورماسیون آنزیم شود و جایگاه فعال آنزیم و توانایی کاتالیتیکی آنزیم را متاثر سازد؛ در نتیجه باعث کاهش فعالیت آنزیمی و کاهش کارایی تثبیت می‌گردد [39]. در سنجش تأثیر نوع بافر، مشاهده گردید که بافر سدیم فسفات بافری مناسب‌تری نسبت به بافر تریس جهت تثبیت می‌باشد. این امر می‌تواند به علت حضور گروه‌های آمین آزاد موجود در بافر تریس باشد که این گروه‌ها آمین مانع حمله نوکلئوفیلی مناسب بین گروه آمینی باقیمانده‌های آرژنین و لیزین سطح مولکول‌های آنزیم با نیمه فعال گلو تار آلدئید سطح بستر می‌شود [40-42]. در نهایت نتایج نشان داد که بهترین شرایط برای تثبیت کوالان آنزیم سلولاز بر روی بستر کیتوزان در غلظت گلو تار آلدئید 0/7% و بافر سدیم فسفات (pH 7) می‌باشد.

5- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

- [1] Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B., *Biomass pretreatment: fundamentals toward application*. Biotechnology advances, 2011. **29**(6): p. 675-685.
- [2] Zang, L., Qiu, J., Wu, X., Zhang, W., Sakai, E., & Wei, Y., *Preparation of magnetic chitosan*

- [25] Eckert, K., Vigouroux, A., Leggio, L. L., & Moréra, S., *Crystal structures of A. acidocaldarius endoglucanase Cel9A in complex with cello-oligosaccharides: strong -1 and -2 subsites mimic cellobiohydrolase activity*. J Mol Biol, 2009. **394**(1): p. 61-70.
- [26] Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- [27] Miller, G.L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical chemistry, 1959. **31**(3): p. 426-428.
- [28] Ghose, T., *Measurement of cellulase activities*. Pure and applied Chemistry, 1987. **59**(2): p. 257-268.
- [29] Kamburov, M. and I. Lalov, *Preparation of chitosan beads for trypsin immobilization*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2012. **26**(sup1): p. 156-163.
- [30] Chen, H., Zhang, Q., Dang, Y., & Shu, G., *The Effect of Glutaraldehyde Cross-Linking on the Enzyme Activity of Immobilized β -Galactosidase on Chitosan Bead*. Advance Journal of Food Science and Technology 2013. **5**(7): p. 932-935.
- [31] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1): p. 248-254.
- [32] Kamburov, M. and I. Lalov, *preparation of chitosan beads for trypsin immobilization*. pharmaceutical biotechnology, 2011. **26**: p. 156-163.
- [33] Belho, K., S. Nongpiur, and P. Ambasht, *immobilization of acid phosphatase (type i) from wheat germ on glutaraldehyde activated chitosan beads: optimization and characterization*. Journal of Proteins & Proteomics, 2014. **5**(4).
- [34] Altun, G.D. and S.A. Cetinus, *Immobilization of pepsin on chitosan beads*. Food Chemistry, 2007. **100**(3): p. 964-971.
- [35] Reis, E. F. D., Campos, F. S., Lage, A. P., Leite, R. C., Heneine, L. G., Vasconcelos, W. L., ... & Mansur, H. S., *Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption*. Materials Research, 2006. **9**(2): p. 185-191.
- [36] Biró, E., Németh, Á. S., Sisak, C., Feczko, T., & Gyenis, J., *Preparation of chitosan particles*
- [14] Tischer, W. and F. Wedekind, *Immobilized enzymes: methods and applications*, in *Biocatalysis-from discovery to application*. 1999, Springer. p. 95-126.
- [15] Tripathi, P., Kumari, A., Rath, P., & Kayastha, A. M., *Immobilization of α -amylase from mung beans (Vigna radiata) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007. **49**(1): p. 69-74.
- [16] Acevedo, F., Pizzul, L., González, M. E., Cea, M., Gianfreda, L., & Diez, M. C., *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from Anthracophyllum discolor*. Chemosphere, 2010. **80**(3): p. 271-278.
- [17] Wu, L., X. Yuan, and J. Sheng, *Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning*. Journal of Membrane Science, 2005. **250**(1): p. 167-173.
- [18] Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R., & Stone, M. O., *Enzyme immobilization in a biomimetic silica support*. Nature biotechnology, 2004. **22**(2): p. 211-213.
- [19] Kurita, K., *Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans*. Marine Biotechnology, 2006. **8**(3): p. 203-226.
- [20] Kumari, A. and A.M. Kayastha, *Immobilization of soybean (Glycine max) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: optimization and characterization*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011. **69**(1): p. 8-14.
- [21] Dutta, P.K., J. Dutta, and V. Tripathi, *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications*. Journal of Scientific and Industrial Research, 2004. **63**(1): p. 20-31.
- [22] Krajewska, B., *Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review*. Enzyme and microbial technology, 2004. **35**(2): p. 126-139.
- [23] Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C., *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. Biotechniques, 2004. **37**(5): p. 790-806.
- [24] Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R., *Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization*. RSC Advances, 2014. **4**(4): p. 1583-1600.

- Journal of microbiology and biotechnology, 2012. **22**(5): p. 628-636.
- [40] Yewale, T., R.S. Singhal, and A.A. Vaidya., *Immobilization of inulinase from Aspergillus niger NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013. **2**(2): p. 96-101.
- [41] Kuo, C. H., Liu, Y. C., Chang, C. M. J., Chen, J. H., Chang, C., & Shieh, C. J., *Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles*. Carbohydrate Polymers, 2012. **87**(4): p. 2538-2545.
- [42] Ren, Y., Rivera, J. G., He, L., Kulkarni, H., Lee, D. K., & Messersmith, P. B., *Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating*. BMC biotechnology, 2011. **11**(1): p. 63.
- suitable for enzyme immobilization*. Journal of biochemical and biophysical methods, 2008. **70**(6): p. 1240-1246.
- [37] EMESE, B., *Immobilization of Bgalactosidase on nanostructured carrier and characterization of obtained biocatalysts*, in *Doctoral School of Molecular and Nanotechnologies*. 2012, thesis and dissertation, Pannonia.
- [38] Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, G. D. O. C., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M., *Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions*. Enzyme and microbial technology, 2006. **39**(4): p. 877-882.
- [39] Nwagu, T.N., B.N. Okolo, and H. Aoyagi., *Stabilization of a Raw-Starch-Digesting Amylase by Multipoint Covalent Attachment on Glutaraldehyde-Activated Amberlite Beads*.