

جداسازی و تخلیص آنزیم گزیلاناز (EC:3.2.1.8) از باکتری باسیلوس استناروترموفیلوس (ATCC12980) و مقایسه‌ی کارایی آن در هیدرولیز گزیلان درخت غان و جو دوسر

زهرة فائزى زاده^۱

امیر قریب^۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۲۲

تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۶

چکیده

ماده‌ی گزیلان یک پلی‌ساکارید ناهمگن است که بخش عمده‌ی همی سلولز دیواره‌ی سلولی گیاهان را تشکیل می‌دهد. گزیلانازها (EC 3.2.1.8) آنزیم‌هایی هستند که از گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها استخراج شده‌اند و می‌توانند پیوند گزیلوزیدی اسکلت گزیلان را تجزیه و گزیلوز و سایر مونوساکاریدها را تولید کنند.

در این تحقیق ابتدا آنزیم گزیلاناز از باکتری باسیلوس استناروترموفیلوس (ATCC 12980) به وسیله‌ی رسوب با سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G-100 و کروماتوگرافی تعویض یونی با دی اتیل آمینو اتیل- سلولز تخلیص شد و کارایی آن در هیدرولیز دو نوع گزیلان (گزیلان درخت غان و گزیلان جو دو سر) مطالعه شد. کروماتوگرافی ستونی دی اتیل آمینو اتیل- سلولز در سه پیک مجزا مشاهده شد که فقط یک پیک فعالیت گزیلانازی نشان داد و درجه‌ی تخلیص به دست آمده از فراکسیون‌های این پیک معادل ۶۳/۰۹ تعیین شد.

فعالیت ویژه‌ی آنزیم تخلیص شده برابر با ۸۷/۷ واحد بین‌المللی بر میلی‌گرم به دست آمد و بازده تخلیص آن ۱۷/۴۵ درصد تعیین شد. مقدار هیدرولیز گزیلان درخت غان و گزیلان جو دو سر با این آنزیم به ترتیب، ۱۰۰ و ۵۶/۸ درصد در مدت ۲۴ ساعت بود. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که استفاده از آنزیم گزیلاناز تخلیص شده در صنایعی که در آن‌ها از چوب درخت غان استفاده می‌شود، مناسب است.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس استناروترموفیلوس، گزیلاناز، تخلیص، گزیلان.

Faezizadeh@modares.ac.ir

۱. مربی گروه علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

۲. مربی گروه علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

مقدمه

همچنین یک منبع مناسب برای تولید آنزیم‌های مقاوم به گرما در کاربردهای صنعتی است (Jommuengbout et al. 2009).

در صنایع مختلف، مانند صنعت کاغذسازی و تغذیه‌ی دام، چوب درختان و سبوس غلات کاربردهای گوناگون دارد که برای تجزیه‌ی گزیلان موجود در ترکیبات ذکر شده از آنزیم گزیلاناز استفاده می‌شود (Collins et al. 2005). هدف از این کار تحقیقی بررسی میزان تأثیر آنزیم گزیلاناز تخلیص شده روی دو نوع گزیلان (گزیلان چوب درخت غان و گزیلان سبوس جو دو سر) است تا مشخص شود که این آنزیم در کدام صنعت (کاغذسازی یا تهیه‌ی غذای دام) کارایی بیشتری دارد. در این پروژه ابتدا آنزیم گزیلاناز از باکتری باسیلوس استناروترموفیلوس (ATCC 12980) تخلیص شد و سپس توانایی آن در تجزیه‌ی دو نوع گزیلان ذکر شده بررسی و با یکدیگر مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی 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 برای تولید بهینه‌ی آنزیم گزیلاناز کشت شد. برای تهیه‌ی یک لیتر از این محیط کشت در یک ارلن، ۱۰ گرم گزیلان، ۲۰ گرم پلی‌پپتون، ۲/۵ گرم عصاره‌ی مخمر، ۲ گرم نیتريت آمونیوم، ۲ گرم فسفات

آنزیم گزیلاناز (EC:3.2.1.8) را باکتری‌ها و قارچ‌های ترموفیلیک گیاهی تولید می‌کنند (Collins et al., 2005). این آنزیم می‌تواند همی سلولز متعلق به کربوهیدرات‌های غیرنشاسته‌ای را هیدرولیز کند (Chanjuan et al., 2009). در سال‌های اخیر کاربرد صنعتی این آنزیم توجه بسیاری از محققین دنیا را به خود جلب کرده است و آنزیم فوق در صنایع مختلف، مانند صنعت کاغذسازی (در بی‌رنگ‌سازی کاغذ)، در شفاف کردن روغن‌های خوراکی و تبدیل سوخت‌های جامد به مایع استفاده شده است (Shrivastava et al. 2009; Lee et al. 2009). محققین این آنزیم را از منابع مختلف باکتریایی و قارچی جدا کردند و مشخص شد که میزان فعالیت این آنزیم و مقدار آن در منابع مختلف متفاوت است (Ohbuchi et al. 2009). گزیلانازهای استخراج شده از باکتری‌ها، کاتالیزورهای هیدرولیزکننده‌ی گزیلان، نسبت به سایر گزیلانازها به‌علت‌هایی نظیر عملکرد بسیار اختصاصی و تولید محصولات جانبی بیشتر اهمیت دارند. باسیلوس استناروترموفیلوس، یک باکتری گرم‌دوست است و یکی از عوامل فساد محصولات غذایی است (Rahman et al. 2009; German et al. 2009). سوش استاندارد ATCC 12980 این باکتری از نظر صنعتی منبعی برای تولید آنزیم اندونوکلئاز *BstPI* است (Parkkinen et al. 2004). این باکتری در نوارهای کاغذی، یک شناساگر بیولوژیکی است که برای عمل استریلیزاسیون به کار برده می‌شود،

کروماتوگرافی (۲/۷ × ۱۰۰ cm) حاوی سفادکس ۱۰۰-G در تعادل با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH=۷) اضافه شد، سپس ستون با بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH=۷) با سرعت جریان ۱۲۰ میلی لیتر در ساعت شست و شو داده شد و محلول خروجی به وسیله‌ی دستگاه نمونه بردار خودکار جمع آوری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی- ماورای بنفش برای بررسی وجود پروتئین خوانده شد و فراکسیون‌های با 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 اوپوراتور در شرایط خلأ تغلیظ شد (Roy et al. 2003).

کروماتوگرافی ستونی تعویض یونی: محلول آنزیمی تغلیظ شده از مرحله‌ی 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 شد، 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 دادن ۱۵۰۰ میلی لیتر از بافر مذکور از ستون، گرادیان ۰ تا ۰/۲۵ مولار NaCl به وسیله‌ی بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار با pH=۷) حاوی NaCl از ستون عبور داده شد و فراکسیون‌های خارج شده با دستگاه فراکشن کالکتور

مونوپتاسیک، ۱ گرم سولفات منیزیم آب دار و ۰/۰۵ گرم سولفات منگنز ریخته شد و حجم آن با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد و pH آن روی ۷ تنظیم شد (Nanmori et al. 1990).

استخراج و تخلیص آنزیم گزیلاناز: آنزیم گزیلاناز از محیط کشت باکتری مذکور به روش Roy et al. (2003) استخراج و تخلیص شد.

جداسازی آنزیم گزیلاناز از محیط کشت: به طور خلاصه در این روش محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه شد و در تمام این مدت، محیط کشت به وسیله‌ی دستگاه شیکر مخلوط شد. محیط کشت مذکور در دمای ۴°C با دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، سپس به محلول شفاف رویی به دست آمده سولفات آمونیوم اشباع اضافه شد و با دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب به دست آمده‌ی حاوی آنزیم گزیلاناز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار و pH=۷) حل شد و به ازای ۵ لیتر از همان بافر به مدت ۵ تا ۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی گراد دیالیز شد (Roy et al. 2003).

تخلیص آنزیم گزیلاناز: تخلیص آنزیم گزیلاناز در دو مرحله‌ی مجزای کروماتوگرافی ستونی ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد (Roy et al. 2003).

کروماتوگرافی ستونی ژل فیلتراسیون:

محلول دیالیز شده حاوی آنزیم، به ستون

مقدار آنزیمی که می‌تواند در مدت زمان یک دقیقه یک میکرومول قند D- گزیلوز را از سوپسترای گزیلان در شرایط استاندارد (دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷) آزاد کند.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین: مقدار پروتئین نمونه‌ها در تمام مراحل این کار تحقیقاتی بر اساس روش لاوری Lowry و همکارانش اندازه‌گیری شد (Lowry et al. 1951).

الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE): مراحل مختلف تخلیص آنزیم گزیلاناز با روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید بررسی شد. درصد ژل پایین ۱۲/۵ درصد انتخاب شد (Laemmli 1970; Mathlouthi et al. 2003).

اندازه‌گیری درصد هیدرولیز دو نوع گزیلان با گزیلاناز تخلیص‌شده: در این مرحله از پروژه تحقیقاتی از روش *Khasin* و همکارانش استفاده شد (Khasin et al. 1993). در یک لوله‌ی 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 چوب درخت غان اضافه شد. لوله‌ی آزمایش پس از به‌هم‌زدن محتویات آن به مدت دو ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس مقدار D- گزیلوز تولیدشده در آن، با استفاده از نمودار استاندارد برحسب میکرومول محاسبه شد، سپس با استفاده از معادله‌ی زیر درصد هیدرولیز گزیلان مذکور با آنزیم گزیلاناز در مدت یک ساعت اندازه‌گیری شد.

جمع‌آوری شد، سپس جذب فراکسیون‌های جداشده در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. در مرحله‌ی بعد فراکشن‌های حاوی جذب از نظر فعالیت آنزیمی بررسی شدند (Roy et al. 2003).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گزیلاناز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گزیلاناز در نمونه‌های به‌دست آمده از مراحل مختلف استخراج و تخلیص آنزیم از روش میلر استفاده شد (Miller. 1959). مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمونه در یک لوله‌ی آزمایش ریخته شد و ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون گزیلان در بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار با pH=۷) به آن اضافه شد، سپس محتویات لوله با هم‌زن برقی مخلوط شد و در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه انکوبه شد. این مخلوط به سرعت در آب سرد حاوی یخ قرار داده شد و بعد از آن با دور ۱۰۰۰۰ g برای مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. در این حالت گزیلان‌های تجزیه‌نشده با استفاده از آنزیم گزیلاناز رسوب کرد، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی درون یک لوله‌ی آزمایش ریخته شد و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد ۵- دی‌نیتروسالیسیلیک اسید اضافه شد. بعد از آن لوله‌ی مذکور به مدت ۵ دقیقه درون بن‌ماری آب جوش قرار داده شد و محتویات آن با جریان آب، سرد شد. سرانجام با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نوری آن در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از نمودار استاندارد، فعالیت آنزیم مذکور در نمونه اندازه‌گیری شد. طبق تعریف، یک واحد آنزیم گزیلاناز عبارت است از:

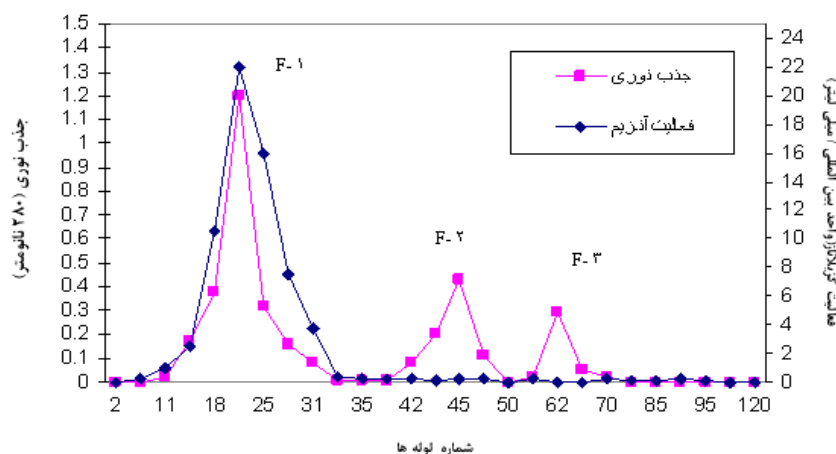
ساعت تکرار شد. در این تحقیق برای گزیلان جو دو سر نیز آزمایش فوق تکرار شد و نمودار تغییرات درصد هیدرولیز هر دو نوع گزیلان در ساعات مذکور رسم شد.

$$\text{درصد هیدرولیز گزیلان} = \frac{\text{D - گزیلوز تولید شده در یک ساعت}}{\text{وزن گزیلان اولیه (میلی گرم)}} \times 100 \times 0/9$$

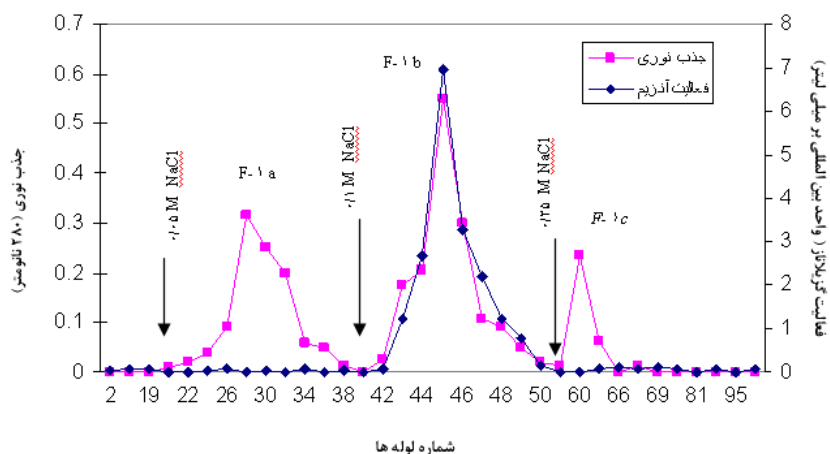
در این معادله عدد ۰/۹ فاکتوری ناشی از افزایش مولکول‌های آب به سوبسترا در واکنش هیدرولیز است. همین عمل برای مدت زمان‌های ۰ تا ۲۴

جدول شماره ۱. نتایج به‌دست آمده از مراحل مختلف استخراج و تخلیص آنزیم گزیلاناز

مراحل	حجم نهایی (ml)	توتال پروتئین (mg/ml)	فعالیت ویژه (u/mg)	فعالیت کل (units)	بازده تخلیص (درصد)	مرتب‌سازی خالص سازی
مرحله‌ی جداسازی سلول‌های باکتری از محیط کشت	۹۳۲/۸	۴۷۰	۱/۳۹	۶۵۳	۱۰۰	۱
مرحله‌ی 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

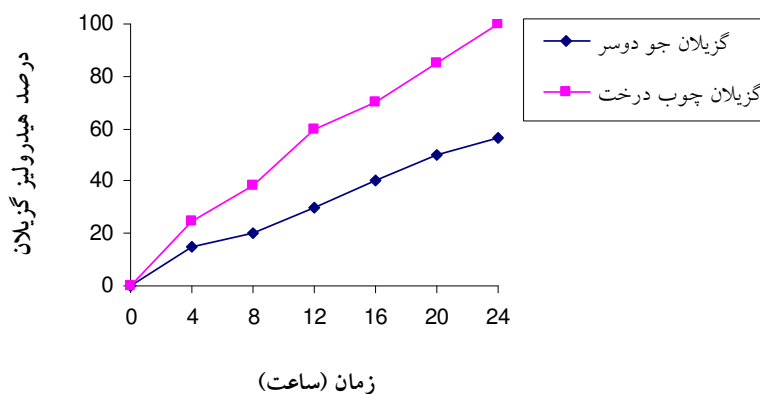


نمودار شماره ۱. کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۱۲۵ میلی گرم پروتئین به‌دست آمده از مرحله‌ی رسوبات با سولفات آمونیوم روی ستون سفادکس G-100 به ابعاد ۲/۵×۱۰۲ سانتی‌متر در تعادل با بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار با pH=۷ و سرعت جریان ۱۲۰ میلی لیتر در ساعت.



نمودار شماره ۲. کروماتوگرافی تعویض یونی پیک F-۱ حاصل از مرحله یل فیلتراسیون روی ستون DEAE- سلولز به ابعاد (۴۰×۵×۱

سانتی متر) در تعادل با بافر فسفات پتاسیم و گرادیان نمکی ۰/۲۵-۰ مولار NaCl و سرعت جریان ۳۰ میلی لیتر در ساعت.



نمودار شماره ۳. تغییرات درصد هیدرولیز دو نوع گزیلان با آنزیم گزیلاناز در مدت ۲۴ ساعت

جداسازی در ۲۸۰ نانومتر نشان داد که هر سه پیک مذکور پروتئین است؛ ولی فقط فراکسیون های موجود در پیک F-۱ فعالیت گزیلانازی بودند. فراکسیون های جمع آوری شده ی پیک F-۱، حجمی معادل ۴۲ میلی لیتر داشتند که روی هم ریخته شدند و تا حجم ۱۰ میلی لیتر تغلیظ شدند و برای انجام کروماتوگرافی تعویض یونی در مرحله ی بعد از

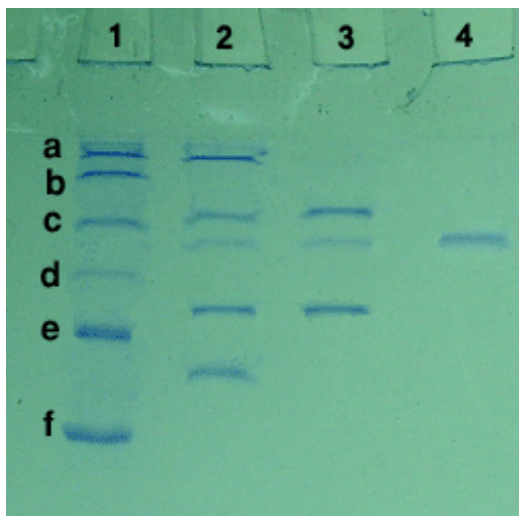
نتایج

نتایج به دست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون: نتایج حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G-100 در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود، این نمودار سه پیک F-۱، F-۲ و F-۳ را نشان می دهد. بررسی جذب فراکسیون های

فراکسیون با حجم نهایی معادل ۱۶ میلی لیتر بود. فراکسیون‌های پیک F-۱b پس از تغلیظ با الکتروفورز SDS-PAGE ارزیابی شد. ایجاد یک باند پروتئینی روی ژل مذکور نشان‌دهنده‌ی تخلیص آنزیم مذکور بود (شکل شماره ۱). مقدار فعالیت ویژه و فعالیت کل آنزیم خالص‌شده در تمام مراحل خالص کردن آنزیم در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود.

آن‌ها استفاده شد. مقدار پروتئین تمام در فراکسیون‌های پیک F-۱ برابر با ۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود (جدول شماره ۱).

نتایج به دست آمده از کروماتوگرافی تعویض یونی: نتایج کروماتوگرافی تعویض یونی ژل DEAE- سلولز در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، سه پیک مجزا، F-۱a، F-۱b و F-۱c ایجاد شد که در ۲۸۰ نانومتر جذب داشتند؛ ولی فقط فراکسیون‌های پیک F-۱b فعالیت گزیلانازی داشتند. این پیک، شامل ۸



شکل شماره 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 است. ستون ۲ نشان‌دهنده‌ی پروتئین‌های موجود در رسوب به دست آمده با استفاده از سولفات آمونیوم است. ستون ۳ نشان‌دهنده‌ی پروتئین‌های موجود در پیک F-۱ به دست آمده از عمل کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون است و در پایان، ستون ۴ نشان‌دهنده‌ی آنزیم گزیلاناز تخلیص و تغلیظ شده (پیک F-۱b) ناشی از عمل کروماتوگرافی تعویض یونی روی ستون DEAE- سلولز است. در ستون 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 ایندراز با وزن مولکولی ۲۹KD؛ e = مهارکننده‌ی 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 کیلوالتون تعیین شد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری درصد هیدرولیز گزیلان چوب درخت گان و جو دو سر با آنزیم گزیلاناز: با اثر دادن آنزیم گزیلاناز تخلیص شده بر دو نوع گزیلان مذکور در ساعات مختلف، درصد هیدرولیز هر دو نوع گزیلان تعیین شد. نمودار شماره ۳ نشان‌دهنده تغییرات درصد هیدرولیز گزیلان در زمان‌های ۰ تا ۲۴ ساعت است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشترین درصد هیدرولیز گزیلان (۱۰۰ درصد) مربوط به گزیلان چوب درخت گان در ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون است. درصد هیدرولیز برای گزیلان جو دو سر در همین زمان معادل ۵۶/۸ درصد است.

بحث

در این تحقیق محیط کشت اختصاصی طبق روش نانموری (Nanmori) و همکارانش تهیه شد (Nanmori et al. 1990). این محیط کشت حاوی ترکیباتی نظیر گزیلان، عصاره‌ی مخمر، پلی‌پپتون و غیره بود و به ترتیب در سال‌های ۱۹۹۳ و ۱۹۹۸، Khasin و Mandeva و همکارانشان از آن برای تولید بهینه‌ی آنزیم گزیلاناز استفاده کرده‌اند (Khasin et al. 1993; Mandeva et al. 1998). با استفاده از این محیط کشت اختصاصی، تولید آنزیم گزیلاناز به وسیله‌ی باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس به بیشترین مقدار می‌رسد (Collins et al. 2005; He et al. 2009; Meng et al. 2009). در این پروژه آنزیم گزیلاناز با روش روی (Roy) و همکارانش (Roy et al. 2003)، استخراج و تخلیص شد. بازده عمل در این روش حدود ۱۷/۴۵ درصد بود که

بیشتر از مقدار گزارش کرده‌ی نانموری و همکارانش (۱۱/۳ درصد) است. آن‌ها این آنزیم را از سوش جدیدی از باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس استخراج کرده‌اند (Nanmori et al. 1990). همچنین بازده مذکور (۱۷/۴۵ درصد) بیشتر از بازده گزارش کرده‌ی گوپتا (Gupta) و همکارانش (۵ درصد) است که آنزیم گزیلاناز را از سوش خاصی از باکتری استافیلوکوکوس (SG-B) جدا کرده‌اند (Gupta et al. 2000). این توجیه‌کننده‌ی چگونگی استفاده‌ی بیشتر از باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس نسبت به سایر باکتری‌ها برای تولید آنزیم گزیلاناز است. در ادامه‌ی این تحقیق وزن مولکولی آنزیم گزیلاناز تخلیص شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آکریل آمید و مارکرهای تعیین‌کننده‌ی وزن مولکولی به طور تقریبی معادل ۴۰ کیلودالتون به دست آمد. این وزن تقریباً معادل وزن مولکولی آنزیم گزیلاناز تخلیص کرده‌ی نانموری (۳۹/۵ کیلودالتون) و همچنین خاسین (Khasin) و همکاران (۴۳ کیلودالتون) است (Nanmori et al. 1993; Khasin et al. 1993). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که وزن مولکولی آنزیم‌های گزیلاناز جدا شده از سوش‌های مختلف باکتری باسیلوس استئاروترموفیلوس تقریباً یکسان است؛ در حالی که وزن مولکولی این آنزیم در سوش‌های باکتری‌های دیگر، نظیر آیروموناس کالویه و باسیلوس (Sp.) متفاوت است و به ترتیب معادل ۲۲ و ۳۶ کیلودالتون تعیین شده است (Gupta et al. 2000; Ratanakhanok et al. 1999).

منابع

- Arora N., Banerjee A.K., Mutyala S. Murty U.S. (2009) "Comparative characterization of commercially important *xylanase enzymes*" *Bioinformation*. 3(10): 446-53.
- Chanjuan L., Hong Y., Shao Z., Lin L., Huang X., Liu P., Wu G., Meng X., Liu Z. (2009) "Novel Alkali-Stable, Cellulase-Free *Xylanase* from Deep-Sea *Kocuria* sp. Mn 22" *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(9): 873-80.
- Collins T., Gerday C., Feller G. (2005) "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases" *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 3-23.
- German D.P., Bittong R. A. (2009) "Digestive enzyme activities and gastrointestinal fermentation in wood-eating *catfishes*" *J. Comp. Physiol.* 179(8):1025-42.
- 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.
- He J., Yu B., Zhang K., Ding X., Chen D. (2009) "Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme" *BMC Biotechnol.* 9:56-61.

گزیرلان‌ها که سوبسترای آنزیم گزیرلاناز هستند، انواع مختلفی نظیر گزیرلان چوب درخت غان و گزیرلان جو دو سر دارند (Collins et al. 2005). مشخص شده است که درصد گزیرلوز موجود در این نوع گزیرلان‌ها با هم متفاوت است؛ مثلاً درصد این ماده در گزیرلان چوب درخت غان بیش از ۹۰٪ و در گزیرلان جو دو سر تقریباً معادل ۷۰٪ است. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که درصد هیدرولیز گزیرلان چوب درخت غان در مدت ۲۴ ساعت بیشتر از گزیرلان جو دو سر است که علت آن با توجه به یافته‌های سایر محققان می‌تواند تفاوت در ساختمان بیوشیمیایی این دو نوع گزیرلان و محتوی گزیرلوز موجود در آن‌ها باشد (Collins et al. 2005, Arora et al. 2009).

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه آنزیم تخلیص شده توانست گزیرلان چوب درخت غان را در مدت ۲۴ ساعت به طور ۱۰۰ درصد هیدرولیز کند، پیشنهاد می‌شود که در صنایع مختلف، مانند صنعت کاغذسازی که در آن‌ها از چوب درخت غان استفاده می‌شود، از این آنزیم برای بالا بردن بازده و بهینه‌سازی محصول استفاده شود.

سپاس‌گزاری

اجرای این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام شده است. از زحمات‌های یاریگران به اجرای تحقیق در این معاونت تشکر و قدردانی می‌کنم.

- Jommuengbout P., Pinitglang S., Kyu K.L., Ratanakhanokchai K. (2009) "Substrate-binding site of family 11 *xylanase* from *Bacillus firmus* K-1 by molecular docking" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(4): 833-9.
- Kar S., Mandal A., Mohapatra K. (2006) "Production of cellulose-free *xylanase* by *trichoderma reesei* SAF3" *Brazilian Journal of Microbiology.* 37: 462-464.
- Khasin A., Alchanati I., Shoham Y. (1993) "Purification and characterization of a thermostable *xylanase* from *Bacillus stearothermophilus* T-6" *Appl. Environment. Microbiol.* 1725-1730.
- Laemmler U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4" *Nature.* 227: 680 – 685.
- Lee J.M., Shin J.W., Nam J.K., Choi J.Y., Jeong C.S., Han I.S., Nam S.W., Choi Y.J., Chung D.K. (2009) "Molecular cloning and expression of the *trichoderma harzianum* C4 endo-beta-1, 4-*Xylanase* Gene in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(8): 823-8.
- Lowry H.H., Rosenbrough N.J. (1951) "Protein measurement with the folin Phenol reagent" *J. Biol. Chem.* 193: 265 – 275.
- 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.
- Mathlouthi N., Mohamed M.A., Larbier M. (2003) "Effect of enzyme preparation containing *xylanase* and *beta* glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean meal-based diets" *Br. Poultry Sci.* 44:60– 66.
- Meng X., Shao Z., Hong Y., Lin L., Li C., Liu Z. (2009) "A Novel pH-Stable, Bifunctional *Xylanase* Isolated from a Deep-Sea Microorganism, *Demequina* sp. JK4" *J. Microbiol. Biotechnol.* 19 (10): 1077-84.
- Miller G.L. (1959) "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar" *Anal. Chem.* 31: 238 – 44.
- Nanmori T., Watanabe T., Shinke, R., Kohno A., Kawamura Y. (1990) "Purification and properties of thermostable *Xylanase* and β -*Xylase* produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain" *Journal of Bacteriology.* 6669-6672.
- Ohbuchi T., Takahashi T., Azumi N., Sakaino, M. (2009) "Structural analysis of neutral and acidic xylooligosaccharides from hardwood kraft pulp and their utilization by intestinal bacteria in vitro" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(9): 2070-6.
- Parkkinen T., Hakulinen N., Tenkanen M., Siika-aho M., 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
- Rahman Z., Shida Y., Furukawa T., Suzuki Y., Okada H., Ogasawara W., Morikawa Y. (2009) “ Appli-ation of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular beta-glucosidase I” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(5): 1083-9.
- Ratanakhanok C.K., Kyu K.L., Tanticharoen M. (1999) “ Purification and properties of a Xylan-binding end oxylanse from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain k-1” *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2), 694-697.
- Roy N., Rana M., Uddin S. (2003) “Isolation and some properties of new xylanase from the intestine of herbivorous insects (*Samia cynthia pryeri*)” *J.Biol.Sci.*4(1): 27-33.
- Shrivastava S., Poddar R., Shukla P., Mukhopadhyay K.(2009) “ Study of codon bias perspective of fungal xylanase gene by multivariate analysis” *Bioinformation.* 27;3(10): 425-9.