

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

بررسی خصوصیات کینتیکی آنزیم بتا گلوکاناز ایزوله شده از باکتری بومی

Cohnella.A01

نگارنده: سمانه بنائیان

اساتید راهنما

دکتر ناصر فرخی

دکتر سعید امینزاده

استاد مشاور

دکتر مجتبی ممرآبادی

شهریور ۱۳۹۵

شماره: ۲۵۸
تاریخ: ۱۳۹۵ / ۷ / ۱۷
ویرایش:



مدیریت تحصیلات تکمیلی
فرم شماره (۶)

بسمه تعالی

فرم صورت جلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) نتیجه ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم سمانه بنائیان... به شماره دانشجویی ۹۲۱۶۳۳۴ رشته بیوتکنولوژی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی ی
تحت عنوان بررسی خصوصیات کینتیکی آنزیم بنا-۳،۱ گلوکاناز از باکتری بومی *Cohnella.A01*
که در تاریخ ۹۵/۶/۱۸ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه بسیار خوب) امتیاز ۷۸.۹۶ دفاع مجدد مردود

۱- عالی (۲۰-۱۹)

۲- بسیار خوب (۹۹-۱۸)

۳- خوب (۹۹-۱۷)

۴- قابل قبول (۹۹-۱۵)

۵- نمره کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول

| عضو هیأت داوران | نام و نام خانوادگی | مرتبه علمی | امضاء |
|---------------------------------|----------------------|------------|-------|
| ۱- استادارهنما | دکتر ناصر فرخی | استادیار | |
| ۲- استاد مشاور | دکتر سعید امین زاده | دانشیار | |
| ۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی | دکتر پرویز حیدری | استادیار | |
| ۴- استاد ممتحن | دکتر محمدرضا عامریان | دانشیار | |
| ۵- استاد ممتحن | دکتر مهدیه پارسلیان | استادیار | |

رئیس دانشکده:

امضاء

۱۵۰ ✓
۱۵۰ ✓
۱۵۰ ✓
✓
✓
✓

تقدیم به:

پدر و مادر عزیز و مهربانم،

که ارزشمندترین دارایی‌های من در این جهانند

و جانم بسته به حضور سبزشان است و بس.

تقدیم به:

تمام آنانی که با نهایت مهر و اخلاص مرا علم آموختند

و روح تشنه‌ام را سیراب کردند.

مشکر و قدردانی

بارها تورا سپاس که در بطن محطی زیستنم همیشه در کنارم بودی و یاریم نمودی تا در مسیر علم و دانش قدم بگذارم و از مصاحبت با همراهنای بس دانشمند و نیکو کلام بهره مند گردم. از تومی خواهیم که با لطف و رحمت بیکرانت قطره‌ی دانشی که از پیش بخشیدی راه دریاهای وسیع و بی‌کران دانش لایتنایت متصل کردانی و یاریم نمایی تا بهره‌ی ساکنزار آنچه که بر من ارزانی داشته‌ای باشم و راه ناپاسی در پیش نکیرم.

در ابتدا از همراهنای همیشگی ام، پدر و مادر عزیزم، که در تمام مراحل زندگی حامی و پشتیبان من بودند و دعای خیرشان، همواره بدرقه‌ی راهم بوده و هست صمیمانه مشکر و قدردانی می‌نمایم. اگر چه بابتی و اثره‌ای نمی‌توان کسرتدی مبری که در این سالها نثارم کرده اند را به رشته‌ی تحریر آورد.

سپاسگزاری می‌کنم از زحمات بی‌شائبه و بی‌دریغ اساتید راهنمای ارجمند و بزرگوار، جناب آقای دکتر ناصر فرخی، که بی‌شک نه تنها در کسوت استادی، که به عنوان انسانی عالم و بزرگوار از محضر ایشان بسیار آموختم و شاید بی‌حضور ایشان هرگز در نمی‌یافتم که چگونه می‌توان در سلولی کوچک، عظمت بی‌بدیل خالق هستی بخش را به نظاره نشست و این امر تنها بواسطه‌ی علم بی‌بدیل ایشان محقق گشت و بس. بدون شک، لطف، همراهی و راهنمایی‌های دل‌سوزانه و همیشگی، صبر و افر و ایده‌های بسیار خلاقانه ایشان در تمامی مراحل تحقیق، تدوین و نگارش این پایان نامه، مراد گام برداشتن در این مسیر دشوار، استوار و ثابت قدم نمود. جناب آقای دکتر سعید امین زاده، که هرگز لطف و موبت حضور گرم و همراهی همیشگی-شان را از خاطر نخواهم برد. ایشان در تمام مراحل انجام این تحقیق، با حسن خلق و رویی گشاده، همواره پذیرای من و پرسش‌های فراوانم بودند و در این راه از بیچ کوششی فروگذار ننمودند. از ایشان به خاطر اینکه علیرغم وجود مشغله‌ی زیاد، همواره فرصت کافی برای راهنمایی اینجانب داشتند، قدردانی و سپاسگزاری می‌نمایم. بی‌شک بدون تلاش‌های این

بزرگواران، به شمر نشستن این تحقیق امری محال بود. همچنین از زحمات تمامی اساتید کرامتدارم، جناب آقایان دکتر شاهرخ قمرمجیک، دکتر محمد رضا عامریان و دکتر مجتبی ممرآبادی که از محضرات ایشان بسیار آموختم، کمال تشکر را دارم. از تمامی کارکنان و کارشناسان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و به ویژه کارشناس و کارکنان محترم آزمایشگاه دام و آبزیان و صنعت که نهایت مساعدت را جهت انجام این تحقیق نمودند، کمال تشکر را دارم. از دوستان ارجمند و کرامتدارم، سرکار خانم ها فائز حسنی، میترا شفیع، زهرا کریمی، رایان ساقیان، شیمامحمدی، یامدیری، زهره جواهری، سحر حیدری، آزاده محسنی، سحر قاسمی، حسیه کوئیک، پروین اکبری، آقایان سینا مهرپویان، حسین طراحی مفرد، سینا لاسمی، شهاب شهریار، نهایت تشکر را دارم.

تعهد نامه

اینجانب **سمانه بنائیان**، دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه **بررسی خصوصیات کینتیکی آنزیم بتا گلوکاناز ایزوله شده از باکتری بومی *Cohnella*** تحت راهنمایی آقایان دکتر ناصر فرخی و دکتر سعید امینزاده، متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا « University of Shahrood » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ:

مطالعه تئوری آنزیم بومی بتا ۳،۱ - ۴،۱ - گلوکاناز

سمانه بنائیان ، ناصر فرخی، سعید امین زاده

اولین کنگره بین المللی و سیزدهمین کنگره ژنتیک ایران - تهران (پوستر)

۳-۵ خردادماه ۱۳۹۳ کلید

Biochemical characterization of a recombinant thermophilic *Cohnella* A01 laminarinase

Samaneh Banaeian^{1,2}, Saeed Aminzadeh^{1*}, Naser Farrokhi³

1. Bioprocess Engineering Group, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

3. Department of Biotechnology Engineering, Faculty of New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

*Corresponding author: Saeed Aminzadeh (aminzade@nigeb.ac.ir)

چکیده

بتا-۳،۱ گلوکانازها، (EC3.1.2.39) به عنوان لامینارینازها نیز شناخته شده‌اند، خانواده‌ی متنوع آنزیمی هستند که در گروه گلیکوزیل هیدرولازها GH16 قرار دارند و پیوندهای *o*-گلیکوزیدی در بتا-۳،۱ گلوکان را هیدرولیز می‌کنند، بتا-۳،۱ گلوکانازها کاربردهای متنوعی در زمینه‌ی کشاورزی، تخمیر و صنایع داروسازی دارند. در این پژوهش ژن بتا-۳،۱ گلوکاناز (accession No. KX013442) از باکتری بومی *Cohnella*. A01 ایزوله گردید، کلون گردید و بیان هترولوگ این ژن در میزبان بیانی *E. coli* انجام گردید، پروتئین نوترکیب بتا-۳،۱ گلوکاناز با وزن مولکولی ۴۷ کیلودالتون، بهترین فعالیتش در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد (pH = ۶) است و با انکوباسیون در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت فعالیتش تا ۷۰ درصد پایدار می‌باشد. این آنزیم نوترکیب در حضور لامینارین دارای پارامترهای کینتیکی $k_{cat}/k_m = ۳۲۴۴۲۸$ و $K_{cat} = ۵۲۸۱۶/۹$ (s^{-1})، $V_{max} = ۱۱۲/۵$ (U/ml)، $k_m = ۰/۱۶۲۸$ (mg/ml) که نیمه‌ی عمر بتا-۳،۱ گلوکاناز ۱۷۳۲/۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد است. در حضور SDS 1% (w/v) آنزیم فعال بوده و در حضور حلال‌های آلی اتانول، متانول و استون کاملاً فعال است. آزمایش زیست‌سنجی بتا-۳،۱ گلوکاناز بیانگر کاهش رشد قارچ فیتوپاتوزن *Phytophthora* sp بود.

کلمات کلیدی : بتا-۳،۱ گلوکاناز، *Cohnella* A01، *Phytophthora* sp.

فهرست مطالب

فصل اول، مقدمه و کلیات

| | |
|--|----|
| ۱-۱. گلوکان | ۲ |
| ۱-۱-۱. منابع و خصوصیات بتا-۱،۳ گلوکان | ۳ |
| ۱-۱-۲. کاربرد بتا-۱،۳ گلوکانها | ۷ |
| ۱-۲-۱. بتا-۱،۳ گلوکاناز و نقش زیستی آنها | ۸ |
| ۱-۲-۱. فعالیت بتا-۱،۳ گلوکانازها در میکروارگانیسمهای مختلف | ۱۰ |
| ۱-۳-۱. ساختار سه بعدی بتا-۱،۳ گلوکاناز | ۱۴ |
| ۱-۴-۱. اهداف و ضرورت تحقیق | ۱۸ |

فصل دوم، مروری بر منابع

فصل سوم، مواد و روشها

| | |
|--|----|
| ۱-۳. مواد مورد استفاده در این پژوهش | ۲۸ |
| ۲-۳. روشها | ۲۸ |
| ۱-۲-۳. تکثیر و خالص سازی ژن بتا-۱،۳ گلوکاناز با پرایمرهای اختصاصی | ۲۸ |
| ۲-۲-۳. هضم محصول PCR و ناقل pET26b با استفاده از آنزیمهای برشی (<i>Sal I</i> و <i>Nde I</i>) | ۳۰ |
| ۳-۲-۳. الحاق | ۳۰ |
| ۴-۲-۳. مستعد کردن باکتری | ۳۰ |
| ۵-۲-۳. همسانه سازی محصول اتصال درون باکتری مستعد DH5 α با استفاده از روش شوک حرارتی | ۳۱ |
| ۶-۲-۳. انتقال حامل bgl-pET-26b به میزبان بیانی مستعد (<i>Escherichia coli Rosetta</i> (DE3)) | ۳۳ |
| ۷-۲-۳. فرایند بیان بتا-۱،۳ گلوکاناز و بررسی آن با استفاده از SDS-PAGE | ۳۳ |
| ۱-۷-۲-۳. بیان ژن بتا-۱،۳ گلوکاناز | ۳۳ |

| | |
|----|---|
| ۳۴ | تهیه ژل SDS-PAGE جهت تأیید بیان |
| ۳۶ | لیز باکتری با دستگاه اولتراسونیک |
| ۳۶ | تخلیص پروتئین |
| ۳۷ | دیالیز آنزیم |
| ۳۸ | طرز تهیهی محلول بردفورد |
| ۳۸ | بررسی فعالیت آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز |
| ۳۹ | منحنی استاندارد |
| ۴۰ | نحوه‌ی محاسبه‌ی نیمه‌عمر آنزیم ($T_{(1/2)}$) |
| ۴۰ | تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز نو ترکیب |
| ۴۰ | مطالعه‌ی فعالیت آنزیم بر سوبستراهای مختلف |
| ۴۱ | طرز تهیه‌ی کیتین کلونیدی |
| ۴۱ | تعیین پارامترها کینتیکی |
| ۴۲ | تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم |
| ۴۲ | تعیین دمای بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم خالص |
| ۴۲ | بررسی پایداری حرارتی آنزیم در دماهای مختلف |
| ۴۲ | سنجش پایداری آنزیم نسبت به دما در طول زمان |
| ۴۳ | تأثیر اسیدیته بر روی فعالیت آنزیم و تعیین pH بهینه |
| ۴۳ | بررسی پایداری آنزیم در pHهای مختلف |
| ۴۳ | بررسی پایداری آنزیم در pHهای مختلف در یک زمان و در زمان‌های مختلف |

- ۳-۲-۱۱-۷. اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم خالص ۴۴
- ۳-۲-۱۱-۸. اثر مهارکننده‌ها و دترجنت‌ها بر فعالیت آنزیم خالص ۴۴
- ۳-۲-۱۱-۹. اثر حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیم خالص ۴۴
- ۳-۲-۱۱-۱۰. رسم نمودار میکائلیس- منتن ۴۵
- ۳-۲-۱۱-۱۱. بررسی بازدارندگی آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز بر فعالیت قارچ‌های بیماری‌زا ۴۶
- ۳-۲-۱۲. مطالعات بیوانفورماتیکی ۴۶
- ۳-۲-۱۲-۱. بررسی توالی آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز ۴۷
- ۳-۲-۱۲-۲. آنالیز خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنزیم ۴۷
- ۳-۲-۱۲-۳. پیش‌بینی ساختمان دوم آنزیم و مدل‌سازی آن ۴۷

فصل چهارم، نتایج

- ۴-۱. هضم محصول PCR و وکتور بیانی pET26b ۵۰
- ۴-۲. بررسی بیان ژن بتا-۳،۱ گلوکاناز ۵۰
- ۴-۳. سنجش فعالیت آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز ۵۱
- ۴-۴. تاثیر سوبستراهای مختلف جهت تعیین اختصاصیت آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز ۵۱
- ۴-۵. تعیین واحد فعالیت آنزیمی با استفاده از رسم منحنی استاندارد و محاسبه پارامترهای V_{max} و K_m آنزیم ۵۲
- ۴-۶. تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز ۵۶
- ۴-۷. تاثیر یون‌های مختلف در فعالیت آنزیم خالص ۵۷
- ۴-۸. مطالعه‌ی فعالیت آنزیم در حضور مهارکننده‌ها و شوینده‌های مختلف ۵۷
- ۴-۹. تاثیر حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز ۵۷

۴-۱۰. تعیین نیمه عمر آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز ۵۸

۴-۱۱. بررسی بازدارندگی فعالیت قارچ‌ها در حضور آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز ۵۸

۴-۱۲. آنالیز بیوانفورماتیکی ۵۸

فصل پنجم، بحث و پیشنهادات

ضمائم ۸۵

منابع ۸۹

فهرست شکل ها

- شکل ۱-۱.** شکل ۱-۱. a. بتاگلوکان (لامینارین)، لامینارین از واحدهای گلوکزی تشکیل شده است که با پیوندهای بتا ۱-۳-۰- گلیکوزیدی β - 1,3 به هم متصل گردیده‌اند و انشعاباتی از پیوندهای β - 1,6 نیز در لامینارینهای مخمری مشاهده میشود، b. سلولز (1,4 - β گلوکان) c. لیکنان، پیوندهای 1,4 - β میباشند که در بین آنها پیوند β - 1,3 نیز حضور دارد. (کلوری و سویور، ۲۰۰۷)..... ۵
- شکل ۱-۲.** شکل ۲-۱. مراحلی که در طی بازسازی دیواره سلولی توسط کمپلکس گلوکان سنتاز در دیواره سلولی رخ میدهد شامل: انشعاب دار شدن بتا-۱,۳ گلوکان، طولیل شدن و تجزیه بتا-۱,۳ گلوکان است (مویانا و همکاران، ۲۰۱۳). ۷
- شکل ۱-۳.** شکل ۳-۱: مکانیسم عمل هیدرولازی بتا-۱,۳ گلوکاناز، الف اکسیژن پیوند گلیکوزیدی توسط پروتئین دهنده Asp، پروتونه میشود. ب) مولکول آب وارد و توسط اسیدآمین Glu فعال میگردد. ج) مولکول آب پیوند کووالان بین اکسیژن نوکلئوفیل و کربن ۱ باقیمانده قندی در موقعیت ۱- را هیدرولیز میکند (هاسان و همکاران، ۲۰۰۶). ۱۱
- شکل ۱-۴.** شکل ۴-۱. طرح کلی از نحوی تجزیه بتا-گلوکان موجود در دیواره سلولی مخمر و نقش بتا-۱,۳ گلوکاناز، این فرایند به طور کلی به دو روش هیدرولیز شیمیایی و هیدرولیز آنزیمی انجام میشود، در بخش آنزیمی همانطور که مشخص است، کیتیناز و اندو، اگزو بتا-۱,۳ گلوکاناز در مرحله اول به ترتیب N-acetylglucosamine از کیتین و گلوکز را از بتا-۱,۳ گلوکان، طی فرایند هیدرولیز آزاد میکنند (ونگ و همکاران، ۲۰۱۴). ۱۴
- ۱۷
- شکل ۱-۵.** a. ساختار کریستالوگرافی لامیناریناز *Pyrococcus furiosus* (pflamA)، از دو صفحه ناهمسوی β تشکیل شده است، که شامل ۷ زنجیره (β 2- β 5- β 14- β 7- β 8- β 9- β 10) به رنگ نارنجی و ۸ زنجیره (β 0- β 1- β 4- β 15- β 6- β 11- β 12- β 13) به رنگ سبز میباشد. در بتا-۱,۳ گلوکانازها صفحات بتا بیشترین بخش تشکیل دهنده ساختار دوم میباشد، (Ilari, et al., 2009) b. کریستالوگرافی بتا-۱,۳ گلوکاناز *Mycobacterium tuberculosis*، زنجیره‌های زرد رنگ به صورت دو صفحه ناهمسو میباشد، بخش سبز رنگ نیز شامل Turn میباشد، ناحیه قرمز رنگ نیز ماریپج α را نشان میدهد. یون کلسیم نیز به عنوان عامل پایدار کننده فعالیت این آنزیم در شکل مشخص شده است (Dong et al. 2015). ۱۷
- شکل ۱-۴.** بررسی الحاق ژن در وکتور بیانی pET26b و تأیید فرآیند کلونینگ بر روی ژل آگارز ۱٪ (w/v). چاهک ۱- کنترل منفی، چاهک ۲- قطعه DNA تکثیر شده توسط واکنش PCR با آغازگرهای F2511 و R2511، قطعه بتاگلوکاناز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بتاگلوکاناز قطعه با طول ۱۲۵۱ جفت باز تکثیر گردید. تأیید کلونینگ محصولات واکنش PCR از همسانه‌های مثبت حاصل از ترانسفورماسیون، با آغازگرهای ژن بتاگلوکاناز. چاهک ۳- قطعه DNA تکثیر شده با ۱۲۵۱ جفت باز توسط PCR از همسانه نوترکیب، آزمایش اختلاف حرکت چاهک ۴- pET26b نوترکیب، چاهک ۵- پلاسمید غیرنوترکیب ۵۳۶۰ جفت بازی pET26b به عنوان کنترل منفی. چاهک ۶- همسانه نوترکیب هضم شده با آنزیمهای برشی و مشاهده قطعه‌های با تقریباً طول ۱۲۵۱ جفت باز (طول ژن بتاگلوکاناز) و ۵۳۶۰ جفت باز (طول پلاسمید pET26b)، چاهک M- مارکر ... ۵۳
- شکل ۱-۴.** بیان ژن بتا-۱,۳ گلوکاناز، چاهک ۱: کلونی القا شده با IPTG ۱۶ ساعت، ۲: قبل القای IPTG کنترل منفی، M - مارکر: نشاندهنده خالصسازی پروتئین نوترکیب. ۳: محلول خروجی از نیکل سفارز که حاوی پروتئین نوترکیب بتا-۱,۳ گلوکاناز با وزن مولکولی تقریباً ۴۷ کیلودالتون است. ۵۴
- شکل ۱-۴.** - فعالیت آنزیم بتا-۱,۳ گلوکاناز. حاوی نمونه‌ی آنزیم بتاگلوکاناز به همراه مقداری از سوبسترای محلول که در دمای ۶۰ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شده و سپس جهت توقف به واکنش مورد نظر DNS اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده

میشود. ۲- شاهد. در نمونه‌ی شاهد به جای آنزیم از بافری که آنزیم در آن است، استفاده شده و تمامی شرایط مانند نمونه‌ی حاوی آنزیم می‌باشد. ۵۴.....

شکل ۴-۴. نمودار استاندارد به منظور تعیین واحد فعالیت آنزیم. با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز و اندازه‌گیری جذب آنها در طول موج ۵۴۰ نانومتر. ۵۵.....

شکل ۴-۵. منحنی Michaelis-Menten آنزیم بتاگلوکاناز خالص شده برای محاسبه پارامترهای کاتالیتیک. K_m محاسبه شده برای این آنزیم توسط سوپسترای لامینارین اندازه‌گیری شد. ۵۵.....

شکل ۴-۶. a. همانطور که در شکل نشان داده شده است، a. دمای بهینه‌ی آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز ایزوله شده از کوهنلا ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد می‌باشد، b. بررسی پایداری آنزیم نسبت به دما در طول زمان، فعالیت آنزیم در دماهای ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ دقیقه ۱۰۰ درصد بوده است. c. پایداری آنزیم در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بعد از ۹۰ دقیقه نیز ۱۰۰ درصد است، (مربع = ۷۰ درجه سانتیگراد، دایره = ۳۰ درجه سانتیگراد، مثلث = ۵۰ درجه سانتیگراد) d. فعالیت آنزیم در pH بهینه اش نیز مشخص گردید، آنزیم در pH برابر با ۵ دارای بهترین فعالیت می‌باشد، e. این آنزیم در pHهای اسیدی تا قلیایی به مدت ۹۰ دقیقه کاملاً پایدار است. f. بررسی پایداری آنزیم در سه pH ۵، ۷، ۹ در طول مدت زمان ۹۰ دقیقه، ۱۲۰ دقیقه، ۳۰۰ دقیقه نشان داد که بتاگلوکاناز ایزوله شده از کوهنلا قادر به حفظ ۹۰ درصد از فعالیت خود در pH بهینه‌اش بعد از ۳۶۰ دقیقه می‌باشد، این آنزیم در pH ۷ نیز تا ۷۰ درصد فعالیت خود را بعد از ۳۶۰ دقیقه حفظ کرده است (مربع، pH = ۹، مثلث، pH = ۷، دایره، pH = ۵۹.....

شکل ۴-۸. بررسی اثر مهاری قارچی توسط آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز. نشان می‌دهد که آنزیم بتا-۱، ۳ گلوکاناز، قادر به مهار بیماری قارچی *Phytophthora sp* است. در تمامی اشکال، ۰- نمونه‌ی شاهد (بافری که آنزیم داخل آن می‌باشد)، ۱- آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز، ۲- آنزیم جوشیده شده، همانطور که در شکل نیز مشاهده می‌گردد، a- *Phytophthora sp* اثر ضدقارچی آنزیم مشاهده گردید، b- قارچ *Fusarium.sp* هیچ مهار رشدی گزارش نشد است d- قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* هیچ مهار رشدی نداشته است، e- *Alternaria sp* نیز فعالیت مهاری مشاهده نگردید. ۶۲.....

شکل ۴-۹ درختچه‌ی فیلوژنتیک. درختچه‌ی فیلوژنی با استفاده از نرم افزار Mega6.06 با بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار رسم شد. براساس بیشترین شباهت‌های که در مورد مطالعات انجام شده بر حسب بررسی‌های کینتیکی و بیوشیمیایی بروی آنزیم بتاگلوکانازهای مشابه انجام شده است، بلاست پروتئینی توالی پروتئینی بتا-۱،۳ گلوکاناز ایزوله شده با سایر بتاگلوکانازهایی که از نظر توالی با پروتئین موجود در این تحقیق مشابهت داشته‌اند هم‌ردیفی گردید و مشخص شد که بیشترین شباهت را از نظر تکاملی به پروتئین‌های بتا-۱،۳ گلوکاناز دارد ولی به طور کاملاً مشخصی با بتا-۱،۴ گلوکاناز که به عنوان اوتوگروپ می‌باشد از نظر تکاملی متفاوت است. ۶۵.....

شکل ۴-۱۰ بررسی ساختار دوم بتا-۱،۳ گلوکاناز با استفاده از سایت Psipred. همانطور که در شکل نیز مشاهده گردید ۵۶ درصد از صفحات بتا، از ۲ درصد آلفا هلیکس و ۴۶ درصد نیز کوئل تشکیل شده است. ۶۷.....

فهرست جدول ها

- جدول ۱-۲. مشخصات تعدادی از میکروارگانیسمهای شناسایی و جداسازی آنزیم بتاگلوکاناز ۲۶
- جدول ۱-۴. مراحل خالص سازی بتاگلوکاناز ۵۶**
- جدول ۲-۴. تاثیر یونها و مواد معدنی بر فعالیت بتا-۱،۳ گلوکاناز ۶۰
- جدول ۳-۴. تاثیر دترجنت و مواد شوینده (2-ME: مرکاپتواتانول، سدیم دو دسیل سولفات) و حلالهای آلی Act (استون)، EtOH (اتانول)، MtoH (متانول)، IsOH (ایزوپروپانول) بر فعالیت بتا-۱،۳ گلوکاناز ۶۱

فصل اول، مقدمه و کلیات

بتا-۳،۱ گلوکانازها آنزیم‌های هیدرولیز کننده‌ی بتا-۳،۱ گلوکان‌ها می‌باشند، در صنایع تهیه‌ی آجیو جهت مالت‌گیری کاربرد دارند، کاربرد دیگر آنزیم در مقابله با بیماری‌های قارچی می‌باشد و منجر به تجزیه بتا-۳،۱ گلوکان دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها می‌گردد و به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک کاربرد مهمی در کشاورزی دارد، تا کنون ژن‌های بتا-۳،۱ گلوکاناز زیادی از منابع مختلف گیاهی، قارچی و باکتریایی جداسازی و همسانه‌سازی شده‌اند که با یکدیگر همولوژی اندکی نشان می‌دهند. در این پژوهش ژن بتا-۳،۱ گلوکاناز از باکتری بومی ترموفیل *Cohnella* sp.A01 مورد مطالعه قرار گرفت. در این فصل در ابتدا در خصوص بتا-۳،۱ گلوکان‌ها و تقسیم‌بندی انواع بتا-گلوکان‌ها و همچنین منابع بتا-۳،۱ گلوکان‌ها و کاربردهای آن‌ها به طور اختصاصی سخن گفته می‌شود. در ادامه به بررسی بتاگلوکانازها، خصوصیات و طبقه‌بندی آن‌ها براساس نوع سوبسترای مصرفی و ساختاری که دارند پرداخته می‌شود، همچنین کاربرد بتا-۱،۳ گلوکانازها در صنایع مختلف کشاورزی، تخمیری، درمان سرطان اشاره می‌گردد.

۱-۱. گلوکان

گلوکان هموپلیمر خطی از واحدهای D-گلوکز است که با پیوند بتاگلیکوزیدی به یکدیگر متصل هستند و تنوع زیادی از لحاظ وزن مولکولی، حلالیت، ویسکوزیته و ساختار سه بعدی دارند که ناشی از تفاوت در فعالیت بیولوژی آن‌ها می‌باشد. بتا-۳،۱ گلوکان‌ها رایج‌ترین شکل بتا-گلوکان می‌باشند، بتا-۳،۱ گلوکان‌های باکتریایی از اتصال دی‌گلیکوزیدی بتا-۳،۱ گلوکزی تشکیل شده و فاقد انشعاب می‌باشد و به صورت محلول می‌باشند، بتا-۳،۱ گلوکان‌های قارچی و مخمیری دارای انشعابات بتا-۱،۶ گلوکزی کوتاه و بلند به ترتیب می‌باشند. بتا-۳،۱ گلوکان‌ها از پلی‌ساکاریدهای اصلی جلبک‌ها و دیواره سلولی قارچ‌ها می‌باشند (سان و ایتن، ۲۰۰۰)، بسیاری از بتاگلوکان‌ها در تغذیه انسان مفیدند مانند عوامل بافتی و مکمل فیبرهای محلول، اما در پروسه‌ی تخمیر بسیار مشکل ساز هستند. بر

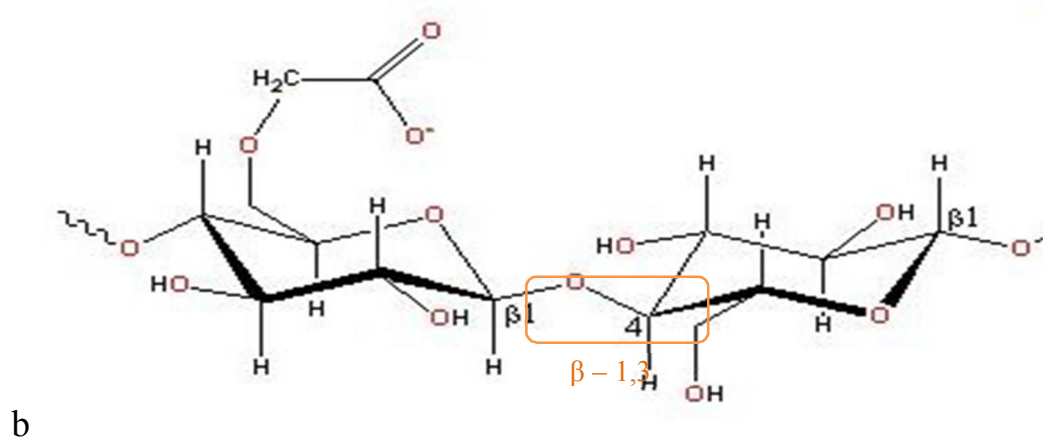
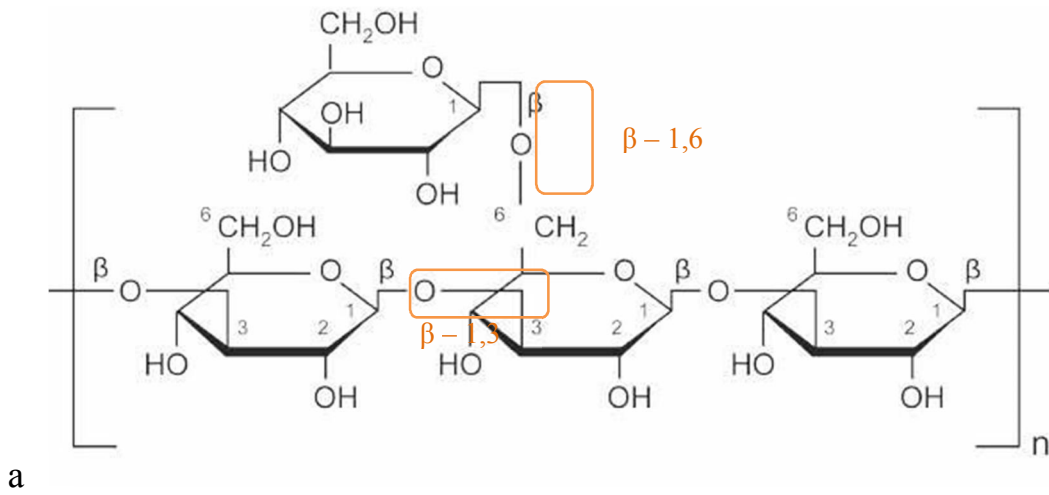
اساس نوع ارتباط گلیکوزیدی بتاگلوکانها^۱ را می‌توان به سه گروه عمده: بتا ۱-۳، ۱-۴-گلوکان (لیکنان)^۲، گلوکان‌هایی با پیوندهای مخلوط (Mixed-linked glucan)، بتا ۱-۴، گلوکان (سلولز)^۳، بتا-۱-۳ گلوکان (لامینارین یا کالوز) کالوز از واحدهای بتا گلوکز با اتصال بتا-۱-۳ تشکیل شده است و نام دیگر کالوز همان بتا-۱-۳ گلوکان می‌باشد (هنریسات و دیویس، ۱۹۹۷) تقسیم کرد. (شکل ۱-۱)

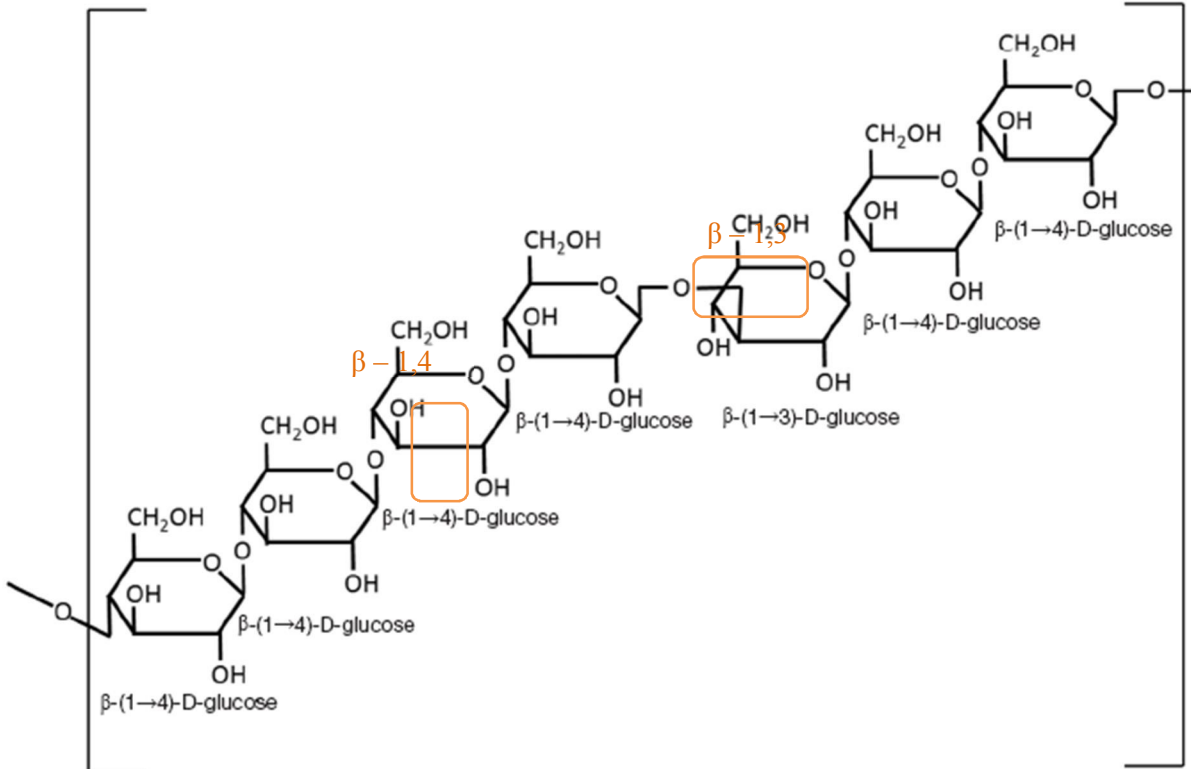
۱-۱-۱. منابع و خصوصیات بتا-۱-۳ گلوکان

میزان بتا-۱-۳ گلوکان در جو و یولاف (غلات خشن) در مقایسه با غلاتی مانند ذرت، برنج، گندم و ذرت خوشه‌ای مقدار قابل توجهی می‌باشد (امان و گراهام، ۱۹۸۷). منابع مهم بتا-۱-۳-D گلوکان می‌توان به حضور در دیواره‌ی سلولی مخمر اشاره کرد. بتا-۱-۳ گلوکان در مخمر به صورت محلول اما در سبوس دانه‌های غلات به شکل محلول و نا محلول است. این پلی‌ساکارید را می‌توان در انواع علف-های دریایی و همچنین گونه‌های متنوعی از قارچ‌های مانند تریکودرما^۴ و آسپرژیلوس^۵ و سایر قارچ‌ها، مخمرها و جلبک‌های دریایی یافت (هنگ و همکاران، ۲۰۱۶).

بتا-۱-۳ گلوکان قارچ *A.fumigatus* توسط کمپلکس گلوکان سنتاز موجود در غشای پلاسمایی، ساخته می‌شوند که از UDP^۶-Glucose به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و به صورت زنجیره‌های خطی بتا-۱، ۳ گلوکان، از طریق غشا به فضای پری‌پلاسمی تخلیه می‌شوند که مسئول سختی دیواره هست. اما گاهی این گلوکان‌های تازه سنتز شده دستخوش تغییراتی می‌شوند، مانند شاخه‌سازی (انشعابات)، طویل شدن شاخه و

1. Beta-glucan
2. Lichenin
3. Cellulose
4. *Trichoderma*
5. *Aspergillus*
6. Uridindiphosphat-Glucose



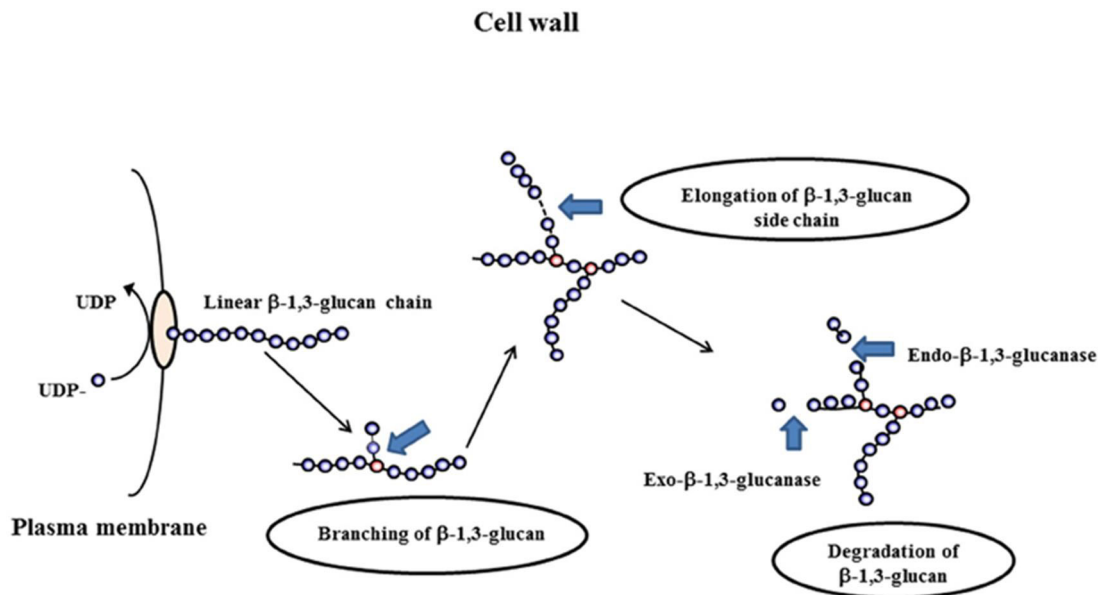


c

شکل ۱-۱. شکل ۱-۱.. a. بتاگلوکان (لامینارین)، لامینارین از واحدهای گلوکزی تشکیل شده است که با پیوندهای بتا-O- گلیکوزیدی 1,3- β به هم متصل گردیده‌اند و انشعاباتی از پیوندهای 1,6- β نیز در لامینارین‌های مخمری مشاهده می‌شود، b. سلولز (1,4- β گلوکان) c. لیکنان، پیوندهای 1,4- β می‌باشند که در بین آن‌ها پیوند 1,3- β نیز حضور دارد.. (کلوری و سویور، ۲۰۰۷)

تجزیه شدن شاخه‌ها و این باعث می‌شود که دیواره سلولی سختی‌اش کاهش پیدا کند و انعطاف پذیرتر شوند. یک نمونه از تغییراتی که در دیواره سلول رخ می‌دهد در شکل ۱-۲ نشان داده شده است. مراحل دخیل در فرایند تغییر شامل تغییرات ساختاری زنجیره‌های گلوکان خطی است که توسط کمپلکس گلوکان سنتاز انجام می‌شود، که با شاخه‌سازی، طویل شدن و تجزیه بتا-1,3 گلوکان (کالوز) در دیواره سلولی دنبال می‌شود. رویدادهای ریخت شناختی مانند تورم اسپور (فاز رشد

ایزودیامترال حین جوانه زنی، خروج لوله‌ی جنین و تولید هیف‌های جانبی در طول رشد میسلیموم نیازمند این است که دیواره سلول سختی اش را از دست بدهد و انعطاف پذیرتر شود (مویانا و همکاران، ۲۰۱۳). جوانه‌زنی با دو فرایند اتفاق می‌افتد، فرایند اول شامل: افزایش فشار اسمزی داخل سلول، و در فرایند دوم نرم شدن دیواره‌ی سلولی ناشی از فعالیت گلیکوزیل هیدرولازها می‌باشد. فشار اسمزی در اسپوره‌های کونیدیا^۱ خفته به دلیل مقدار بالای قند ترهالوز و پلی‌یول^۲ بالا می‌باشد. مولکول‌ها اگرچه طی متورم شدن اسپور کونیدیوم کاملاً تجزیه می‌شوند، طی این زمان رویداد اصلاح ساختاری - بیوشیمیایی پیشنهاد می‌شود به طوری که تغییر شکل دیواره سلولی طی جوانه‌زنی تسهیل می‌شود. گلیکوزیل هیدرولازها کاندیدهایی برای انجام این اصلاحات در دیواره سلولی هستند (انترف، ۱۹۹۷). کالوز نیز در فرآیندهای بیولوژی زیادی نقش دارند، کالوز به عنوان فاکتوری دخیل در فرایندهای متنوع زیستی در گیاهان شناخته می‌شود. به طور مثال، کالوز موقتا طی سیتوکینز سلول-های گیاهی، برداشته شده و سپس به عنوان دیواره‌های جدید بالغ، هیدرولیز می‌شود، که این پدیده در کامل شدن دانه گرده دخیل است و تجمع موقتی اش در پلاسمودتا، طویل‌سازی فیبر پنبه را به پیش می‌برد. در کنار فرایندهای تکاملی، تجزیه کالوز توسط استرس‌های زیستی و غیر زیستی متنوعی القا می‌شود که شامل در معرض قرار گرفتن با فلزات، حمله پاتوژن‌ها می‌باشد، پاسخ به مقاومت با پاتوژن‌ها نیز با تقویت و اصلاح مجدد دیواره‌ی سلولی گیاهی توسط کالوز انجام می‌شود (کوردیر و همکاران ۱۹۹۸).



شکل ۱-۲. شکل ۲-۱. مرحله‌ای که در طی بازسازی دیواره سلولی توسط کمپلکس گلوکان سنتاز در دیواره سلولی رخ می‌دهد شامل: انشعاب دار شدن بتا-۳،۱ گلوکان، طولی شدن و تجزیه بتا-۳،۱ گلوکان است (مویانا و همکاران، ۲۰۱۳).

۱-۲-۱. کاربرد بتا-۳،۱ گلوکان‌ها

بتا-۳،۱ گلوکان بخشی از دیواره سلولی مخمر است که از دیواره سلولی مخمر نان، غلات جو دوسر و قارچ‌ها سرچشمه می‌گیرد و کاربردهای بیولوژیکی متنوعی در حیوانات و گیاهان دارد (بایوسنس، ۲۰۰۳)، از جمله کمک‌کننده و آغازگر پاسخ سیستم ایمنی یک جانور می‌باشد و به مبارزه با بیماری کمک می‌کند. بتا-۳،۱ گلوکان یک تعدیل‌کننده ایمنی سلول است که گلبول‌های سفید و ماکروفاژها را در سیستم ایمنی جهت افزایش مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی، قارچی و انگلی و نیز رشد تومورها، فعال می‌کند. بنابراین بتا-۳،۱ گلوکان سیستم ایمنی بدن را برای مبارزه با بیماری‌ها فعال می‌کند و همیشه در حالت آماده‌باش می‌باشد. به این صورت که با گیرنده‌های سطح ماکروفاژ اتصال برقرار می‌کند و منجر به فعال شدن ماکروفاژها می‌گردد. بتا-۳،۱ گلوکان در فرآیند ایمنی زیستی و

تولید آنتی بیوتیک‌ها استفاده می‌گردد، مطالعات دهه های اخیر روی بتا گلوکان‌ها، نقش این پلی ساکاریدها را به عنوان مکمل‌های غذایی و دارویی در بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و نیز مبتلایان به سرطان بسیار پر اهمیت نشان داده است. از میان پلی ساکاریدهای دیواره سلولی قارچ‌ها، بتا-۳،۱ گلوکان فعالیت بالاتری دارد که به دو فرم محلول و نامحلول در آب قابل دستیابی است. طبق تحقیقات انجام شده فرم محلول بتا-۳،۱ گلوکان به دلیل فعالیت زیستی بالا و عملکردهای درمانی، به عنوان یک عامل مناسب و ایمن معرفی شده است. بتا-۳،۱ گلوکان علاوه بر کاربرد در مصارف تزریقی، به عنوان حامل دارورسان در پژوهش‌های مرتبط با ساخت سیستم‌های نوین دارورسانی مورد توجه قرار گرفته که برای درمان سرطان در شکل نانوذره آن استفاده شده است (چن و سویور، ۲۰۰۷). بتا-۳،۱ گلوکان به همراه مخمر، به عنوان مکمل غذایی در تغذیه گاو استفاده می‌شود، مخمر می‌تواند در نتیجه‌ی بالا بردن قابلیت گوارش پذیری اجزای غذایی، تولید شیر را افزایش دهد. افزودن بتاگلوکان در کنار مخمر، می‌تواند برای سلامتی گاو موثر باشد و شیر بیشتری تولید کند. همچنین می‌تواند جایگزینی برای آنتی بیوتیک‌ها باشد. در گذشته آنتی بیوتیک‌ها به گاوها به عنوان پیش برنده رشد خورنده می‌شدند تا آن‌ها سالم نگه داشته شوند، اما مصرف کنندگان نگران استفاده از این آنتی بیوتیک‌ها در چهارپایان اهلی شده‌اند. چالش بیشتر در سالم نگاه داشتن گاو این است که عملکرد این آنتی بیوتیک‌ها افزایش یافته است. یک جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها، بتاگلوکان است که زمان خروج، اثرات باقی مانده و یا جهش‌زایی میکروبی ندارند (کلارک و همکاران، ۲۰۰۱)

۲-۱. بتا-۳،۱ گلوکاناز و نقش زیستی آن‌ها

بتا-۳،۱ گلوکانازها^۱ خانواده متنوعی از آنزیم‌های گلیکوزید هیدرولاز^۲ هستند که پیوند بتاگلیکوزیدی را در بتاگلوکان‌ها، هیدرولیز می‌کنند. بتاگلوکانازها به مقدار بسیار وسیعی در بسیاری از گیاهان،

1. Beta-glucanase

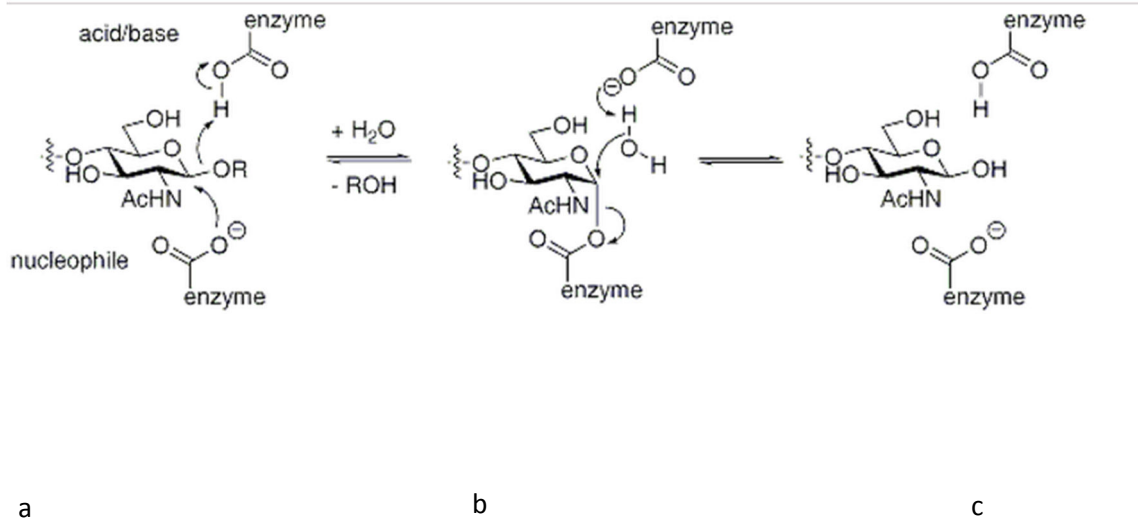
2. Glucoside hydrolase

حیوانات دریایی، باکتری‌ها، قارچ‌ها وجود دارند، در سایت Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) (<http://www.cazy.org>)، بتا-۳،۱ گلوکانازها به دو نوع اگزوبتا-۳،۱ گلوکاناز (EC.3.2.1.58) و اندوبتا-۳،۱ گلوکانازها (EC.3.2.1.6 و EC.3.2.1.39) که به ترتیب بخش انتهایی و داخلی پیوندهای گلیکوزیدی را تجزیه می‌کنند دسته‌بندی می‌شوند (کوتا و همکاران، ۲۰۱۱). مکانیسم عمل در بتا-۳،۱ گلوکانازهای خانواده‌ی گلیکوزیل به این صورت است که یک پیوند کوالان بین آنزیم و گلیکوزیل تشکیل می‌شود و سپس تجزیه می‌گردد، این فرآیند جابه‌جایی دوتایی است که نیازمند دو اسید آمینه‌ی ضروری است، یک نوکلئوفیل آنزیمی و یک اسید و باز کاتالیتیک است، در ابتدا به عنوان اسید عمل می‌کند و گروه ترک‌کننده را پروتونه می‌کند سپس به عنوان باز عمل کرده و آب نوکلئوفیل حاصل را دپروتونه می‌کند، نحوه‌ی فعالیت به این صورت است که از طریق جانشینی دوگانه و حفظ کنفیگوراسیون^۱ (آرایش اتم‌ها که مشخص کننده ایزومر فضایی ویژگی‌های می‌باشد) پیش می‌رود. مکانیسم پیشنهادی شامل سه مرحله است (شکل ۱-۳). در مرحله اول اکسیژن پیوند گلیکوزیدی توسط پروتون دهنده Asp، پروتونه می‌شود. این مرحله با حمله نوکلئوفیلی Asp دیگری به کربن شماره ۱ گلوکزی در موقعیت ۱- و تشکیل یک حدواسط کووالان ادامه می‌یابد. پس از جدا شدن و ترک این قسمت از سوبسترا (لامینارین) که گلوکز آن پروتون‌دار شده است، یک مولکول آب وارد و توسط یک اسید آمینه Glu که در مرحله قبل دپروتونه شده بود فعال می‌گردد، سپس مولکول آب فعال شده، پیوند کووالان بین اکسیژن نوکلئوفیل و کربن ۱ باقیمانده قندی در موقعیت ۱- را هیدرولیز می‌کند و بدین ترتیب چرخه کاتالیتیک کامل می‌گردد. (دومان و باردووکسی، ۲۰۰۴، آردی و روویرا، ۲۰۱۵). تمامی این اندوگلوکانازها دارای یک ماژول اتصال به کربوهیدرات هستند که این ماژول به قسمت انتهایی کربوکسیلی دومین کاتالیتیکی متصل شده است. این دومین قسمتی از جایگاه فعال را تشکیل می‌دهد و برای فعالیت آنزیم ضروری است (سارکن و همکاران، ۱۹۹۷)، آنزیم-

های GH16 از طریق وارونه کردن فضایی آنومری عمل می‌کنند. اسید آمینه‌ی حفاظت‌شده‌ی گلوتامیک اسید به عنوان اسید عمومی کاتالیتیکی و دو اسپارتیک اسید حفاظت‌شده که به آب متصل می‌شوند نقش باز عمومی کاتالیتیکی را در تجزیه‌ی بتا-۳،۱ گلوکان ایفا می‌کنند. براساس انشعابات توالی آمینواسیدی بتا-۳،۱ گلوکاناز در گیاهان به خانواده‌ی GH17 گروه‌بندی می‌شوند، در حالی که در باکتری‌ها این آنزیم‌ها به خانواده‌ی GH16 گروه‌بندی می‌شود (لومبارد، ۲۰۱۴)، بتا-۳،۱ گلوکاناز موجود در باکتری موجب تجزیه‌ی منابع معدنی می‌شود (چنگ و همکاران، ۲۰۱۳)، نام‌گذاری و طبقه‌بندی این آنزیم‌ها براساس پیوندی است که آن‌ها هیدرولیز می‌کنند. با توجه به این طبقه‌بندی لیکنازها هم جزئی از بتا گلوکانازها (اندوگلوکاناز) در نظر گرفته می‌شوند اگرچه به طور اختصاصی پیوندهای (۱-۳)- β را هیدرولیز نمی‌کنند ولی حضور این پیوندها در بین یک پیوند (۱-۴)- β ضروری است تا آنزیم شناخت لازم را انجام دهد و به کاتالیز پیوند (۱-۴)- β بپردازد (دیزدیولیا و سینیتین، ۲۰۰۶)، بتا گلوکانازی هم که پیوندهای بتا-۳،۱ را در ساختار بتا گلوکان می‌شکند لامیناریناز یا بتا-۳،۱ گلوکاناز می‌نامند.

۱-۲-۱. فعالیت بتا-۳،۱ گلوکانازها در میکروارگانیسم‌های مختلف

بتا-۳،۱ گلوکانازها در میکروارگانیسم‌های مختلف عملکردهای متفاوتی از خود نشان می‌دهند (ابدیو و همکاران، ۲۰۰۹، ایلاری و همکاران، ۲۰۰۹). EC 3.2.1.39 بتا-۳،۱ گلوکانازهای میکروبی آنزیم‌هایی مانند لامیناریناز (اندوبتا-۳،۱ گلوکاناز) دارای قابلیت شکستن پیوند گلیکوزیدی در گلوکان‌هایی غیر از سلولز هستند. بیشتر آنزیم‌هایی که مورد اشاره قرار گرفتند، باکتریایی بوده و در گونه‌های مختلف باسیلوس شناسایی شده‌اند.



شکل ۱-۳. مکانیسم عمل هیدرولازی بتا-۱،۳-گلوکاناز، الف اکسیژن پیوند گلیکوزیدی توسط پروتئین دهنده Asp، پروتونه می شود. ب) مولکول آب وارد و توسط اسید آمینه Glu فعال می گردد. ج) مولکول آب پیوند کووالان بین اکسیژن نوکلئوفیل و کربن ۱ باقیمانده قندی در موقعیت ۱- را هیدرولیز می کند (هاسان و همکاران، ۲۰۰۶).

باکتری‌ها نیز دو نوع اندوبتاگلوکاناز با توانایی تجزیه‌ی بالا شناسایی شده‌اند که شامل: اندوبتا-۱،۳-گلوکاناز (EC 3.2.1.39) و دیگری نیز اندوبتا-۱،۳:۴،۱-گلوکاناز (EC 3.2.1.73)، اندو بتا-۱،۳-گلوکاناز، بتا-۱،۳-گلوکان‌هایی از قبیل لامینارین را با بیشترین کارایی تجزیه و هیدرولیز می‌کند، در حالی که اندو بتا-۱،۳:۴،۱-گلوکاناز قادر به هیدرولیز بتا-۱،۴-گلوکان‌ها و بتا-۱،۳-گلوکان‌ها می‌باشند (ایلاری و همکاران، ۲۰۰۹). قارچ‌ها هم قادر به تولید آنزیم‌هایی با فعالیت بتا-۱،۳-گلوکانازی می‌باشند؛ گونه تریکودرما، از جمله گونه قارچی تولیدکننده‌ی آنزیم‌های با این فعالیت می‌باشد (بولر، ۱۹۸۸).

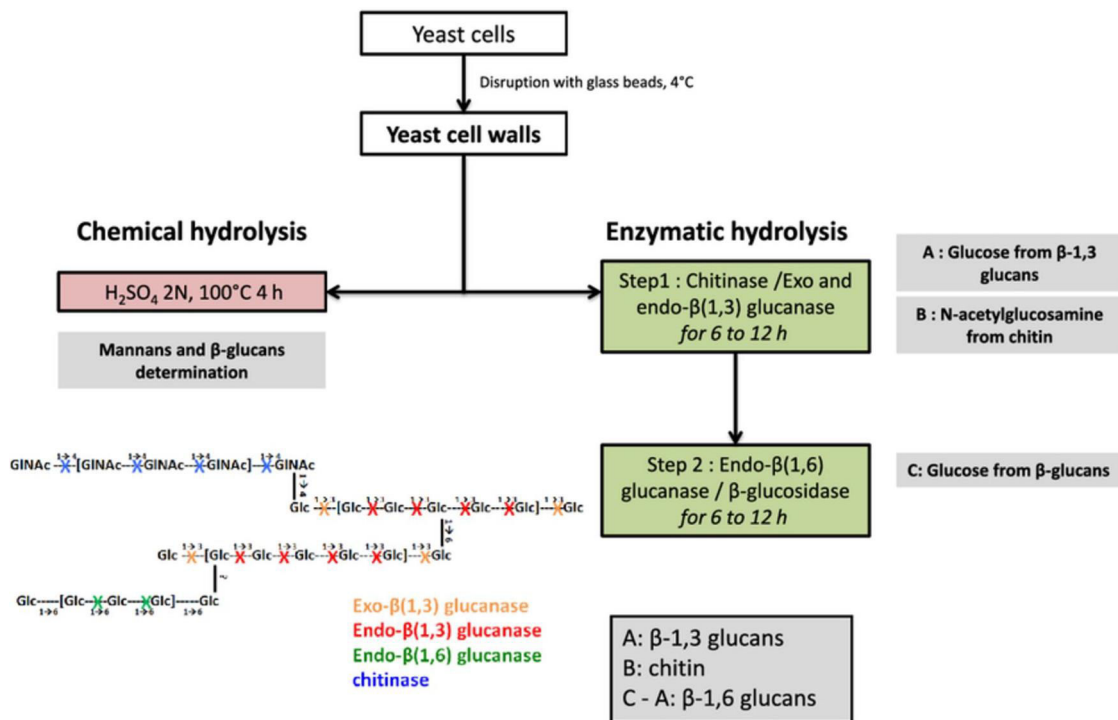
بتا-۱،۳-گلوکانازها در گیاهان در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی شامل جوانه‌زنی بذر، رشد محور زیر لپه، رشد کولتوپتیل و تغییرات دیواره‌ی سلولی نقش دارند (ابدیو و همکاران، ۲۰۰۹). بتا-۱،۳-گلوکانازها در گیاهان نقش محافظتی در برابر بیماری‌های قارچی از خود نشان می‌دهد چرا که دیواره-

ی سلولی قارچها از ترکیبات بتا-۳،۱ گلوکانی تشکیل شده است و دیواره‌ی قارچهای بیماری‌زا را تجزیه می‌کند. علاوه بر آن بیان این آنزیم در دانه‌ی گیاهان نقش تنظیمی مهمی در جوانه‌زنی و خواب بذر و در مقابله با بیماری‌های قارچی دارد (ایلاری و همکاران، ۲۰۰۹، رز و همکاران، ۲۰۰۶).

بتا-۳،۱ گلوکانازهای ویروسی، دیواره سلول میزبان را چه در سلول‌هایی که ویروس در حال ورود است و چه در آن سلول‌هایی که ویروس در حال رها شدن است، تجزیه می‌کند. ویروسی به اسم کلورلا^۱ که ژنی به نام *A94L* دارد آنزیمی کد می‌کند که از لحاظ توالی آمینو اسیدی شباهت بالایی با آنزیم‌های خانواده گلیکوزید هیدرولاز ۱۶ بتا-۳،۱ گلوکانازها دارد. این آنزیم به ویروس کمک می‌کند که دیواره سلول رو هضم کرده و ویروس وارد سلول شود و به ذره‌های ویروسی تازه ساخته شده هم کمک می‌کند که دیواره سلول هضم شود و از سلول خارج شوند. ۲۷ نوع از ۴۲ نوع ویروس کلورلا ژن کد کننده‌ی بتا-۳،۱ گلوکاناز را دارند. (سان و همکاران، ۲۰۰۰، ایلاری و همکاران، ۲۰۰۹).

پیوندهای گلیکوزیدی بتا-۳،۱ گلوکان برای تولید و برای استفاده در صنعت لازم است که شکسته شوند و از بین بروند (شکل ۱-۴) از جمله این آنزیم‌ها در صنعت آبجو بسیار کاربرد دارند در صنعت تهیه‌ی آبجو به دنبال آماده‌سازی و تخمیر مخمر باید از جو مالت گیری صورت گیرد. اساسا فرایند مالت گیری به جوانه‌زنی بذر بستگی دارد و این فرایند با همکاری آمیلازها، کربوکسی پپتیدازها و بتا-۳،۱ گلوکانازها تحت شرایط بهینه‌سازی شده برای تولید مالت صورت می‌گیرد. بتا-۳،۱ گلوکانازها به عنوان بهبود دهنده‌ی کیفیت آبجو و همچنین در جهت شفاف‌سازی آبجو نیز استفاده می‌گردند. بتا-۳،۱ گلوکانازها در از بین بردن باقیمانده‌های میکروبی که در فرایند تخمیر نقش دارند موثر می‌باشند (ونگ و همکاران، ۲۰۱۴). در فرایند تخمیر مخمر و تجزیه‌ی دیواره‌ی سلولی مخمر به همراه کیتینازها نقش مهمی دارند. اندو بتا-۳،۱ گلوکاناز حاصل از گونه *Delftia tsuruhatensis* MV01 در شرایط تولید شراب فعال است. علاوه بر این، توانایی تجزیه اگزوپلی ساکاریدها از *Pediococcus parvulus*

(باکتری لاکتیک اسید، گرم مثبت، در تولید شراب و آبجو نقش دارد) را دارند. که منجر به کاهش ویسکوزیته می‌گردد، این آنزیم می‌تواند بر روی دیواره سلولی مخمرهای مختلف تاثیر بگذارد و در نتیجه می‌تواند در تمام مراحل فرآیند آب‌گیری از فساد جلوگیری کند. باتوجه به این که دمای مناسب در این صنایع حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد است، بتا-۱،۳ گلوکاناز مقاوم به حرارت کاربرد بیشتر دارد و می‌تواند برای تخریب گلیکان در صنعت مواد غذایی و سایر زمینه‌های صنعتی استفاده شود (چنگ و همکاران، ۲۰۱۳). بسیاری از قارچ‌های تجزیه‌کننده سلولز و بتاگلوکان مانند *Trichoderma* sp، *Geocladium* sp، *Chaetomium* sp. و *Penicillium* sp آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز دارند و می‌توان این آنزیم‌ها را از این قارچ‌ها جداسازی و خالص نمود و از آن‌ها به عنوان عامل کنترل بیولوژیک جهت از بین بردن بیماری‌های قارچی استفاده کرد، PR^۱ پروتئین‌های رایج، به ۷ خانواده گروه‌بندی می‌شوند. بتا-۱،۳ گلوکانازهای موجود در دیواره سلول‌های قارچی جزو خانواده ی PR-2 می‌باشند.



شکل ۱-۴. شکل ۱-۴. طرح کلی از نحوی تجزیه‌ی بتا-گلوکان موجود در دیواره‌ی سلولی مخمر و نقش بتا-۳،۱ گلوکاناز، این فرایند به طور کلی به دو روش هیدرولیز شیمیایی و هیدرولیز آنزیمی انجام می‌شود، در بخش آنزیمی همانطور که مشخص است، کیتیناز و اندو، اگزو بتا-۳،۱ گلوکاناز در مرحله‌ی اول به ترتیب *N*-acetylglucosamine از کیتین و گلوکز را از بتا-۳،۱ گلوکان، طی فرایند هیدرولیز آزاد می‌کنند (ونگ و همکاران، ۲۰۱۴).

کیتیناز (PR-3) و بتا-۳،۱ گلوکاناز قارچی (PR-2) به صورت سینرژیست با یکدیگر فعالیت ضدقارچی از خود نشان می‌دهند (یاسمین، ۲۰۱۲).

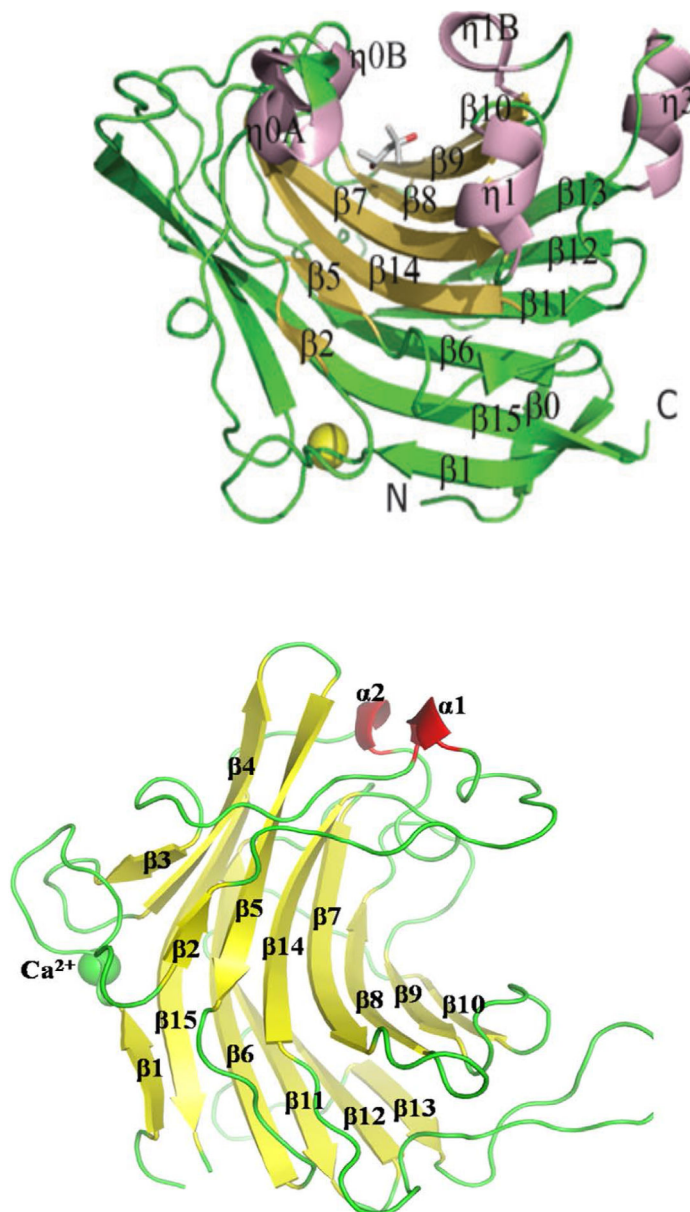
۱-۳. ساختار سه بعدی بتا-۳،۱ گلوکاناز

تا به امروز ساختارهای کریستالوگرافی از خانواده‌ی GH16 اندو-بتا-۳،۱ گلوکاناز (EC3.2.1.39) برای میکروارگانیسم‌های (ایلاری و همکاران، ۲۰۰۹) *Pyrococcus furiosus*، (بلیچر و همکاران، ۲۰۱۲) *Rhodothermus marinus* (مونویا و همکاران، ۲۰۱۳) *Streptomyces sioyaensis*، (کوتا و

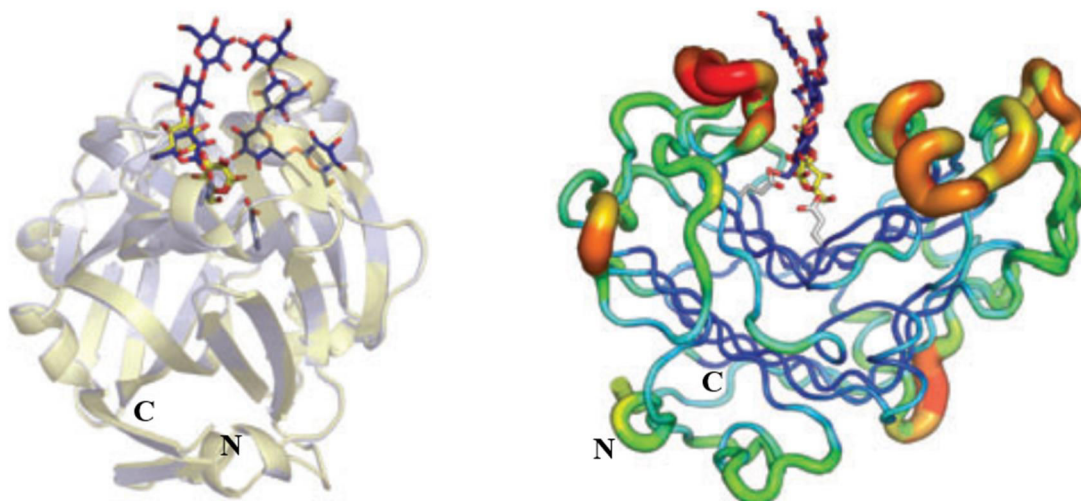
همکاران، ۲۰۱۱) *Nocardiopsis sp* (جم، ۲۰۱۶) *Zobellia galactanivorans* (دونگ و همکاران، ۲۰۱۵) *Mycobacterium tuberculosis*، تهیه شده است. طی بررسی‌های انجام شده مشخص گردید که ناحیه جایگاه فعال خانواده‌ی GH16 شامل سه اسید آمینه (دو گلوتامیک اسید و یک آسپارتیک اسید) است، که به عنوان نواحی حفاظت شده‌ای در این خانواده تکرار شده‌اند، همچنین دو اسید آمینه‌ی تریپتوفان نیز به صورت حفاظت شده‌ای وجود دارند که موجب اتصال بهتر سوبسترا و انتقال حالت پایدار می‌شوند (بلیچر و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین گزارش شد که یون‌های کلسیم نیز به عنوان مهمترین عامل پایداری پروتئین‌های خانواده‌ی GH16 می‌باشند (کوتا و همکاران، ۲۰۱۱). تاخوردگی صفحات این آنزیم به صورت شبه ساندویچی است که شامل صفحات ژله‌ای رول مانند می‌باشد و از دو صفحه‌ی بتا تشکیل شده است که یکی از ۷ و دیگری ۸ رشته تشکیل شده و این صفحات نسبت به یکدیگر به صورت غیر هم‌سو قرار گرفته‌اند (ایلاری و همکاران، ۲۰۱۱)، (شکل ۱-۵). هیدرولیز آنزیمی بتا-۳،۱ گلوکاناز به یک ماژول اتصال به کربوهیدرات (CBM) نیاز دارد که این ماژول به اجزای کاتالیتیکی در سطح سوبسترا اتصال می‌یابد. بتا-۳،۱ گلوکانازها دارای دو دومین ساختمانی‌اند، دومین کاتالیتیکی و دومین اتصال به بتا-۳،۱ گلوکان، که این دو دومین از طریق یک لینکر انعطاف پذیر به هم اتصال می‌یابند. با این حال، بتا-۳،۱ گلوکانازهایی که فاقد دومین اتصال به بتا-۳،۱ گلوکان‌اند هم وجود دارند (زو و ویلسون، ۲۰۰۴)، بررسی کینتیکی نشان داد وجود نواحی N - و C - ترمینال دومین در آنزیم منجر به افزایش میل سوبسترا و کارایی کاتالیتیکی می‌گردد (چنگ و همکاران، ۲۰۱۴). گزارش‌هایی در مورد علت پایداری حرارتی این طبقه از آنزیم‌ها حاکی بر آن است، مقاومت به حرارت در بسیاری از گلیکوزیل هیدرولازها به علت تعداد نسبتاً زیادی از پل‌های نمکی می‌باشد که به صورت تصادفی نیز توزیع نشده‌اند، در مقابل، این پل‌های نمکی به صورت گروه‌هایی در صفحات بتا دامنه‌ی (Domain) کاتالیزوری می‌باشد، نه همه‌ی پل‌های نمکی ولی به هر حال اکثر آن‌ها برای پایداری حرارتی پروتئین مفیدند. وجود واکنش بار- بار موجود در هسته‌ی آبگریز

موجب بی ثباتی ساختمان و تسهیل در نفوذ آب به ناحیه‌ی آبگریز می‌شود. علاوه بر این یک سری اسیدهای آمینه‌ی کناری موجب تحریک بخشی از اسیدهای آمینه‌ی ناحیه‌ی شکاف کاتالیزوری می‌شود که مانع از فعال بودن جایگاه فعال در دماهای بالا می‌شود، اما در مورد آنزیم‌های پایدار حرارتی این جایگاه فعال دارای انعطاف پذیری در حرارت‌های بالا می‌باشند و در حرارت‌های بالا قابل دسترس برای اتصال و قادر به شناسایی پلی‌ساکاریدها می‌باشد، این اطلاعات باتوجه به کریستالوگرافی پرتو ایکس گزارش شده است (بلیچر و همکاران، ۲۰۱۱).

بررسی همولوژی در اندوبتا-۳،۱ گلوکانازها نشان می‌دهد که بتا-۳،۱ گلوکانازهای خانواده‌ی گلیکوزیل هیدرولاز دارای ناحیه N ترمینال هستند که شامل دومین کاتالیتیک (CBM) می‌باشد و همچنین حاوی ناحیه‌ی C ترمینال هستند که این ناحیه C ترمینال، دومین شبه ایمونوگلوبولینی (IG - LIKE) نیز نامیده می‌شود، ناحیه‌ی (ig-like) نقش بسیار مهمی در بتا-۳،۱ گلوکانازها دارد، اما فعالیت بیوشیمیایی این بخش در بتا-۳،۱ گلوکانازهای باکتریایی خیلی کم شناخته شده است (چنگ و همکاران، ۲۰۱۳، وسور و همکاران، ۲۰۰۹)، (شکل ۱-۶). مطالعات کریستالوگرافی ZgLamCCBM6 نشان داده که CBM دارای دو شکاف جهت اتصال قندها دارند، آشکار است که فولد صفحات بتا در خانواده CBM کاملاً معمولی است (جم و همکاران، ۲۰۱۶).



شکل ۱-۵. a. ساختار کریستالوگرافی لامیناریناز *Pyrococcus furiosus* (pfLamA)، از دو صفحه‌ی ناهمسوی β تشکیل شده است، که شامل ۷ زنجیره $(\beta 0-\beta 10-\beta 9-\beta 8-\beta 7-\beta 14-\beta 5-\beta 2)$ به رنگ نارنجی و ۸ زنجیره $(\beta 0-\beta 13-\beta 12-\beta 11-\beta 6-\beta 15-\beta 4-\beta 1)$ به رنگ سبز می‌باشد. در بتا-۳،۱ گلوکانازها صفحات بتا بیشترین بخش تشکیل دهنده‌ی ساختار دوم می‌باشند، (Ilari, et al., 2009). b. کریستالوگرافی بتا-۳،۱ گلوکاناز *Mycobacterium tuberculosis*، زنجیره‌های زرد رنگ به صورت دو صفحه ناهمسو می‌باشند، بخش سبز رنگ نیز شامل Turn می‌باشند، ناحیه‌ی قرمز رنگ نیز مارپیچ α را نشان می‌دهد. یون کلسیم نیز به عنوان عامل پایدار کننده‌ی فعالیت این آنزیم در شکل مشخص شده است (Dong et al. 2015).



شکل ۱-۶ کریستالوگرافی لامیناریناز. بتا-۳،۱ گلوکاناز خانواده ی GH16 دارای ناحیه N ترمینال هستند که بخش کاتالیتیک دومین جایگاه اتصال سوبسترا است و ناحیه ی C ترمینال دومین شبه ایمونوگلوبولین (IG-LIKE) نامیده می شود هستند، همانطور که مشاهده می شود صفحات β بتا-۳،۱ گلوکاناز بخش اعظمی را تشکیل داده است و کمترین بخش نیز مارپیچ α است، تصویری از اتصال سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم نیز قابل مشاهده است (واسور و همکاران، ۲۰۰۹)، (<http://www.rcsb.org/pdb/results>).

۱-۴. اهداف و ضرورت تحقیق

باتوجه به اهمیت آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز در صنایع مختلف تخمیر جهت مالت گیری و صنایع نساجی جهت از بین بردن پرز لباس ها و روشن کردن رنگ لباس ها، در تصفیه ی پساب کارخانه ها و کاربرد آن در صنایع کشاورزی به عنوان عامل کنترل بیولوژیک و جلوگیری از رشد بیماری های قارچی (با توجه به این که بخش اعظم ترکیبات قارچی بتا-۳،۱ گلوکان است)، با توجه به استفاده روز افزون از آنزیمی مقاوم و پایدار به حرارت در صنایع مختلف، هدف از این تحقیق استفاده از سوبیه ی گرمادوست کوهنلا است که آنزیمی مقاوم به حرارت را به صورت نو ترکیب بتواند بیان کند ، با توجه به این که این آنزیم در شرایط دمایی بالا کاربردهای زیادی دارد، همچنین با توجه به کاربرد این آنزیم در حضور ترکیباتی

مانند^۱ SDS، اتانول و تریتون، بررسی پایداری آنزیمی مقاوم به حلال‌های آلی و شوینده‌ها از اهداف ما در این تحقیق می‌باشد. از طرفی خصوصیات ضد قارچی این آنزیم نیز یکی دیگر از اهداف تولید نو ترکیب آنزیم مربوطه است. در این تحقیق از باکتری ترموفیل بومی کوهنلا به عنوان منبع باکتریایی جهت استخراج بتا-۳،۱ گلوکاناز استفاده شد. از آنجایی که ترموفیل‌ها، میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت بقا در محیط‌هایی با دماهای بالا هستند، آنزیم‌های تولیدی توسط این میکروارگانیسم‌ها مقاومت قابل توجهی در دماهای بالا از خود نشان می‌دهند و گزینه‌های مناسبی جهت کاتالیز واکنش‌های صنعتی هستند که غالباً در دماهای بالا به انجام می‌رسند. آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز تولیدی توسط این باکتری می‌تواند به عنوان آنزیمی مناسب در صنایع تخمیری و تولید آبجو جهت مالت‌گیری در مراحل فرآیند تخمیر و تهیه آبجو جهت از بین بردن بقایای مواد بتاگلوکانی و همینطور شفاف‌سازی ترکیبات، برای از بین بردن مواد لزج و چسبناک موجود در فاضلاب و تصفیه آسانتر نیز استفاده شود. در فصل بعد مرور منابع در این پژوهش به منظور مروری بر فعالیت‌های انجام شده بر روی آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز

قرار خواهد گرفت.



فصل دوم، مروری بر منابع

تا کنون بتا-۳،۱ گلوکانازهای نو ترکیب به مقدار زیادی تولید شده‌اند، کلونینگ، بیان و خالص سازی ژن کد کننده بتا-۳،۱ گلوکاناز از *Bacillus.Subtlis* در میزبان بیانی *Ecoli* توسط رواتی ماسیلاتی و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد (مسیمالانی و همکاران، ۲۰۱۳)، در گزارشی مشابه نیز ژن کد کننده بتا-۳،۱ گلوکاناز از *Bacillus.Subtlis* کلون و بیان گردید و اندو بتا-۳،۱ گلوکانازی با وزن مولکولی ۲۴ کیلودالتون، دمای بهینه ی ۶۰ درجه سانتی گراد، pH بهینه ۸ گزارش شد (مسیمالانی و همکاران، ۲۰۱۳).

پروتئین بتا-۳،۱ گلوکاناز منابع قارچی و باکتریایی مختلفی دارد، که خالص سازی این آنزیم و بررسی خصوصیات سینتیکی و بررسی پارامترهای بیوشیمیایی آن بررسی شده است، بتا-۳،۱ گلوکاناز قارچی شامل *Aspergillus fumigatus* (مونود و همکاران، ۲۰۰۲)، *fumigatus*، *Streptomyces cavourensis* (یان و همکاران، ۲۰۱۲)، *Aspergillus aculanteatus* (لیونتی و همکاران، ۲۰۰۷)، *Trichoderma virnes*، *Trichoderma harzianum* Rifai (الانخی، ۲۰۰۱)، *Fusarium oxysporum* (یاسمین و همکاران، ۲۰۱۲)، می باشند.

مارکو و فلیکس (۲۰۰۷) بتا-۳،۱ گلوکاناز از قارچ *Trichoderma harzianum* را خالص سازی کردند. خصوصیات بیوشیمیایی و اثرات ضد قارچی آن گزارش گردید. بتا-۳،۱ گلوکاناز دارای وزن مولکولی ۳۷ کیلودالتون و دمای بهینه برابر با ۵۰ درجه سانتی گراد، و pH برابر با ۵، ثابت میکائیلیس منتن برای بتا-۳،۱ گلوکاناز (mg/ml) ۰/۰۹ و V_{max} برابر با ۰/۳ میکرومول در دقیقه گزارش گردید (دی-مارکو و فلیکس، ۲۰۰۷)، در گزارشی مشابه از بتا-۳،۱ گلوکانازهای قارچی تی هوآفام و همکارانش (۲۰۱۲)، با مطالعه خصوصیات بیوشیمیایی بتا-۳،۱ گلوکاناز از قارچ *Aspergillus niger* نشان دادند که دارای وزن مولکولی ۳۱ کیلودالتون، فعالیت ویژه اش (U/mg) ۱۴/۱۲۲ بوده، دمای بهینه برای فعالیتش برابر با ۵۵ درجه سانتی گراد و pH بهینه برابر با ۵ می باشد (فام و همکاران، ۲۰۱۲)، در

گزارشی بتا-۳،۱ گلوکاناز پایدار به دماهای بالا با فعالیت ضدقارچی از رشد قارچ‌های *Pyricularia grisea* جلوگیری می‌کند (لیلوسوپاکول، ۲۰۰۶).

بتا-۳،۱ گلوکانازهای باکتریایی گرمادوست اولین بار توسط گوگتن و همکاران (۱۹۹۷)، با وزن مولکولی ۳۱ کیلودالتون از *Pyrococcus furiosus* گزارش گردید که دارای، K_m برابر با (mg/ml) ۲/۸ و دمای بهینه ۱۰۰ و pH بهینه برابر با ۶ می‌باشد، این آنزیم به شدت در برابر گرما مقاوم و پایدار بوده است (گوئگون و همکاران، ۱۹۹۷)، در پژوهشی دیگر اندوبتا-۳،۱ گلوکاناز ایزوله شده از *Pyrococcus furiosus* با وزن مولکولی ۴۰ کیلودالتون، دمای بهینه ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH بهینه‌ی ۵ و K_m برابر با ۰/۰۲ گزارش شد (ایلاری و همکاران، ۲۰۰۹)، در گزارش‌های مشابه نیز چنگ و همکاران (۲۰۱۴) اندوبتا-۳،۱ گلوکانازی با وزن مولکولی ۷۰ کیلودالتون، دمای بهینه‌ی ۵۰ درجه-سانتی‌گراد، pH بهینه برابر با ۵/۵ و ثابت میکائیلیس (mg/ml) ۰/۹ را از *Paenibacillus sp. S09* ایزوله نمودند (چنگ و همکاران، ۲۰۱۴)، کوتا و همکاران (۲۰۱۱)، اندوبتا-۳،۱ گلوکانازی با وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتون، دمای بهینه‌ی ۹۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، pH بهینه برابر با ۶/۲ و ثابت میکائیلیس (mg/ml) ۳/۲ را از *Thermotoga petrophila* جداسازی نمودند (کوتا و همکاران، ۲۰۱۱). چنگ و همکاران، (۲۰۱۵) نیز اندوبتا-۳،۱ گلوکانازی با وزن مولکولی ۵۰ کیلودالتون، دمای بهینه‌ی ۶۵ درجه‌سانتی‌گراد، با pH بهینه برابر با ۵ و ثابت میکائیلیس (mg/ml) ۰/۵ را از *Clostridium thermocellum* شناسایی نمودند (چنگ و همکاران، ۲۰۱۵). جداسازی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی بتا-۳،۱ گلوکاناز از *Streptomyces* توسط تانگ یائو هونگ (۲۰۰۲) انجام گردید (هونگ و همکاران، ۲۰۰۲)، هانگ و چن (۲۰۰۲)، اندوبتا-۳،۱ گلوکانازی با وزن مولکولی ۴۹ کیلودالتون، دمای بهینه‌ی ۷۰ درجه‌سانتی‌گراد، pH بهینه برابر با ۵/۵ و ثابت میکائیلیس متن برابر با (mg/ml) ۹ را از *Streptomyces Sioyaensis* گزارش کردند (هونگ و همکاران، ۲۰۰۲). وانگ و همکاران (۲۰۱۴)، اندوبتا-۳،۱ گلوکانازی با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتون، دمای بهینه ۷۰ درجه‌سانتی‌گراد، pH

برابر با ۴/۵ و ثابت میکائلیس منتن برابر با ۴ (mg/ml) رادر *Thermophilic Talaromyces emersonii* گزارش کردند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۴).

مطالعات کریستالوگرافی بتا-۳،۱ گلوکانازهای گرمادوست به منظور بررسی و چگونگی ایجاد پایداری این آنزیم‌ها و بررسی خصوصیات ساختاری انجام شده‌است، لوکاس بلیچر و همکاران (۲۰۱۱)، کریستالوگرافی لامیناریناز شدیداً گرمادوست را از *Rhodothermus marinus* انجام دادند، گزارش‌ها نشان داد که، این لامیناریناز دارای جایگاه فعال با دو گلوتامات و یک آسپاراتات می‌باشد. همچنین گزارش شد که یون‌های کلسیم نیز به عنوان مهمترین عامل پایداری پروتئین‌های خانواده‌ی GH16 می‌باشند (کوتا و همکاران، ۲۰۱۱). تعیین ساختار کریستالی لامیناریناز و نواحی کاتالیتیکی از *Thermotoga maritima* توسط ون یی جنگ (۲۰۱۱)، انجام شد (جنگ و همکاران، ۲۰۱۱). در پژوهشی مشابه تعیین ساختار سوم لامیناریناز (اندوگلوکاناز خانواده‌ی GH16) از باکتری شدیداً گرمادوست، از *Pyrococcus furiosus* توسط اندرا یلاری (۲۰۰۸) انجام شد (ایلاری و همکاران، ۲۰۰۹).

سوتیروس کتسپولوس (۲۰۰۵) ترکیبات ساختاری بتا-۳،۱ گلوکاناز شدیداً گرمادوست را از میکروارگانیزم *Pyrococcus furiosus* با استفاده از دوررنگ نمایی دورانی گزارش نمودند (کتسپولوس و همکاران، ۲۰۰۵). در پژوهشی دیگر روبرتو چیولاروک و همکاران (۲۰۰۵) تغییرات ساختار سوم بتا-۳،۱ گلوکاناز در حضور گوانیدین کلراید توسط دوررنگ نمایی دورانی را بررسی نمودند. آماندا سنا و همکاران (۲۰۱۰)، خالص‌سازی و تعیین خصوصیات بتا-۳،۱ گلوکاناز مقاوم به گرما، تولید شده از *Moniliophthora perniciosa* را گزارش دادند، pH بهینه برای فعالیت اندوبتا-۳،۱ گلوکاناز برابر با ۵ و دمای بهینه‌اش ۴۰ درجه‌سانتی‌گراد بود. بلاتل و همکاران (۲۰۱۱)، بتا-۳،۱ گلوکاناز را با توجه به مصارفی که در صنایع تولید آب‌جو نیاز است، جهت فیلتراسیون بهتر و از بین

بردن بقایای میکروبی ناشی از رشد مخمرها در طی فرآیند تولید آب جو و تخمیر، از *Delftia tsuruhatensis Strain MV01* خالص سازی نمودند، و بتا-۳،۱ گلوکانازی با وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون، دمای بهینه ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، pH بهینه برابر با ۴ گزارش کردند، با توجه به فعالیت بتا-۳،۱ گلوکانازها در حضور یون‌های فلزی تحقیقات زیادی در این مورد انجام گردیده‌است، در پژوهشی بر روی آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز انجام شده نشان داد که آهن فعالیت آنزیم را کم کرده و کلسیم فعالیت را افزایش داده است (دی‌مارکو و فلیکس، ۲۰۰۷)، در تحقیقی دیگر بتا-۳،۱ گلوکاناز در حضور یون نیکل فعالیتش کاهش یافته است (فام و همکاران، ۲۰۱۲).

جهش در هر کدام از این اسیدآمینها به طور چشم‌گیری فعالیت بتا-۳،۱ گلوکاناز را روی تمامی پیش‌ماده‌ها کاهش می‌دهد. برای مثال جهش بر روی گلوتامیک اسید و تبدیل آن به گلی‌سین و یا گلوتامین فعالیت بتا-۳،۱ گلوکاناز را به کم‌تر از نیم درصد بر روی تمامی اشکال بتا-۳،۱ گلوکان کاهش می‌دهد (زو و همکاران، ۲۰۰۴)، در تحقیقی دیگر، در مورد بتا-۳،۱ گلوکاناز ایزوله شده از باسیلوس گزارش شد که با ایجاد جهشی در ناحیه جایگاه فعال، اسیدآمین گلوتامیک اسید (GLU 150) منجر به غیر فعال شدن بتا-۳،۱ گلوکاناز شد (کیتل و هینمان، ۱۹۹۳)، ژن کد کننده‌ی بتا-۳،۱ گلوکاناز ایزوله شده از قارچ *Cochliobolus* در اثر جهش در پرایمرها و تکثیر آن و تولید پروتئین بتا-۳،۱ گلوکاناز بعد از خالص سازی مشخص شد که تا ۹۸ درصد فعالیتش نسبت به حالت فاقد جهش کاهش پیدا کرده‌است (اسچافر و والتونل، ۱۹۹۴).



جدول ۱-۲. مشخصات تعدادی از میکروارگانیسم‌های شناسایی و جداسازی آنزیم بتاگلوکاناز

| نام میکروارگانیسم | نوع بتاگلوکاناز Bgl | وزن مولکولی (KDa) | دمای بهینه (سانتی- گراد) | pH بهینه | K_m (mg/ml) | منبع |
|---|------------------------|----------------------|--------------------------------|----------|------------------|-----------------------------|
| <i>Pyrococcus furiosus</i> | Endo1,3 | ۴۰ | ۴۵ | ۵ | ۰/۰۲ | Ilari et al., (2009) |
| <i>Thermotoga petrophila</i> | Endo1,3 | ۴۵ | ۹۱ | ۶/۲ | ۳/۲ | (Cota et al., 2011) |
| <i>Pyrococcus furiosus</i> | Endo1,3 | ۳۱ | ۱۰۰ | ۶ | ۲/۸ | Gueguen) (Vos., 1997) |
| <i>Paenibacillus</i> sp. S09 | Endo1,3 | ۷۰ | ۵۰ | ۵/۵ | ۰/۹ | (Cheng et al., 2013) |
| <i>Clostridium thermocellum</i> | Endo 1,3-1,4 | ۵۰ | ۶۵ | ۵ | ۰/۵ | (Chen et al., 2015) |
| <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Rifai</i> | Endo1,3 | ۷۴ | ۶۰ | ۵ | ۱/۱ | (Elnaghy., 2001) |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Endo1,3 | ۳۴/۵ | — | — | — | (Yasmin., 2012) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Endo 1,3-1,4 | ۲۴ | ۶۰ | ۸ | — | (Masilamani., 2013) |
| <i>Bacteroides succinogenes</i> | Endo 1,3-1,4 | — | ۵۰ | ۶ | ۰/۳ | Wood &) (Irvin ., 1988) |
| <i>Streptomyces</i> <i>Sioyaensis</i> | Endo1,3 | ۴۹ | ۷۰ | ۵/۵ | ۹ | Huang &) (Meng., 2002) |
| <i>Arthrobacter</i> sp | Endo1,3 | ۳۲ | ۵۰ | ۶/۵ | ۰/۱۲ | (Otake & Goto., 2004) |
| <i>Thermophilic Talaromyces</i> <i>emersonii</i> | Endo 1,3-1,4 | ۴۲ | ۷۰ | ۴/۵ | ۴ | (Wang et al., 2014) |

فصل سوم، مواد و روش ها

۳-۱. مواد مورد استفاده در این پژوهش

Master Mix 10 × از شرکت ویراژن (آمریکا) خریداری شد، آنزیم‌های برش‌دهنده محدود الاثر، *Sal I*، *Nde I*، نشانگر اندازه DNA (1Kb)، نشانگر پروتئینی، آنزیم DNA Ligase (5 Unit) T_4 ، بافر $T_4(2 \times)$ IPTG از شرکت fermentase (Burlington, Canada) خریداری شد، کیت High pure PCR Product Purification جهت خالص‌سازی محصول PCR و نیز خالص‌سازی قطعات DNA از روی ژل آگارز از شرکت GeneAll (سئول، کره جنوبی)، کیت استخراج پلاسمید GeneAll (سئول، کره جنوبی)، نیز خریداری گردید. 3, 5-Dinitrosalicylic acid، آنتی‌بیوتیک کانامایسین، کلرامفنیکل، آگارز، لامینارین، CMC^۱، نشاسته^۲، زایلان^۳، پوستانان^۴، پولولان^۵، Barley از شرکت sigma (Steinheim, USA) خریداری شد. تریپتون، عصاره‌ی مخمر، NaCl، آگار، $MgCl_2$ ، $FeCl_2$ ، KCl ، $CuCl_2$ ، $CoCl_2$ ، $MnCl_2$ ، $ZnCl_2$ ، بتامرکاپتواتانول، SDS، Tween، Triton $\times 100$ ، Ethanol، Methanol، سرنگ هامیلتون، الکل ۹۶ درصد مطلق، ایمیدازول^۶، رزین نیکل سفارز، آکریل آمید، بیس اکریل آمید^۷، APS و TEMED^۸ از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) تهیه شد.

۳-۲. روش‌ها

۳-۲-۱. تکثیر و خالص‌سازی ژن بتا-۱، ۳ گلوکاناز با پرایمرهای اختصاصی

تکثیر ژن بتا-۱، ۳ گلوکاناز با استفاده از DNA ژنومی کوهنلا ($40 \text{ ng } / \mu\text{l}$) توسط آنزیم تک پلیمرز، انجام گردید. مخلوط واکنش PCR، توسط آغازگرهای (۲۰ pmol) Forward, Reverse در یک میکروتیوب ۰/۲ استریل و روی یخ انکوبه شد، محلول Master Mix 10× به حجم $10 \mu\text{l}$ ، $1 \mu\text{l}$ هم

1. CarboxyMethyl Cellulose
2. Starch
3. Xylan
4. Pustalan
5. Pullulan
6. Imidazole
7. Ammonium Persulfate
8. Tetramethylethylenediamine

پرایمرهای Forward, Reverse با غلظت (۲۰ pmol) و ۱ μl هم نمونه‌ی DNA، سپس با اضافه کردن آب دیونیزه واکنش به حجم ۲۰ μl رسانده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت واسرشت سازی اولیه، و ۳۰ سیکل به صورت ۶۰ ثانیه ای در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی-گراد جهت فرآیند تکثیر تکرار گردید ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد نهایی جهت تکثیر نهایی برنامه‌ریزی شد و در نهایت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرد گردید. محصول حاصل از PCR به حجم ۱۰۰ μl بر روی ژل آگارز الکتروفورز ۱٪ بررسی گردید و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد، باند اختصاصی از ژل با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification مطابق با توصیه سازنده، تخلیص شد و برای انجام کلونینگ آماده گردید. به منظور سنجش میزان غلظت DNA تخلیص شده، ۲ μl از آن بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و بقیه به منظور آنالیزهای بعدی در دمای 20°C - قرار داده شد.

آگارز (w/v) ۱٪ در $1\times$ TBE (بافر تریس) (۰/۰۵M حاوی ۰/۰۹ M اسید بوریک و ۰/۰۵ M EDTA، pH = ۸ تهیه شد. جهت تعیین کیفیت DNA تکثیرشده و برای مشاهده کیفیت پلاسمید هضم شده (*Nde I*, *Sal I*) و نیز تأیید مراحل مختلف همسانه سازی، DNA تکثیری با استفاده از بافر بارگذاری ۶ \times (۰/۱۲۵ (w/v) بروموفنول بلو، ۰/۲۵ (w/v) گزیلین سیانول، ۰/۰۱۶۲۸ (w/v) SDS، ۰/۲۰ (w/v) فایکول ۴۰۰، گلیسرول ۰/۷۵ (w/v) و ۱۰۰ mM EDTA، pH = ۸) مخلوط شد و در چاهک ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE تخلیه شد و در ولتاژ ۹۵ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. ژل به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید یک درصد رنگ آمیزی و سپس با آب مقطر شستشو داده شد و در زیر نور ماوراء بنفش مشاهده و عکسبرداری انجام گردید.

۳-۲-۲. هضم محصول PCR و ناقل pET26b با استفاده از آنزیم‌های برشی (*Sal I* و *Nde I*)

(

ناقل pET26b با استفاده از انتقال داخل باکتری مستعد *E. coli* (DH5 α) تکثیر شد و سپس تخلیص پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید جهت انجام هضم آنزیمی انجام شد. مخلوط واکنش هضم آنزیمی شامل ۲۰ μ l درون میکروتیوب ۰/۵ ml استریل آماده گردید. پلاسمید pET26b به حجم ۶ μ l، ۲ μ l بافر Orange، ۱ μ l آنزیم *Nde I* (10 U/ μ l)، ۱ μ l آنزیم *Sal I* (10 U/ μ l)، را با اضافه کردن آب دیونیزه به حجم ۲۰ رسانیده شد و سپس در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی-گراد به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور گرفت. محصول وکتور هضم شده را روی ژل آگارز ۱٪ تفکیک و پس از بررسی باند مورد نظر جهت از بین رفتن قطعه‌ی اضافی از روی ژل، محصول هضم آنزیمی با استفاده از کیت تخلیص خالص شد. این فرآیند در مورد ژن هضم شده توسط دو آنزیم نیز انجام شد.

۳-۲-۳. الحاق

نمونه ژن بتا-۱، ۳، ۱ گلوکاناز و وکتور (pET26b) تخلیص شده به نسبت ۱ به ۳ از وکتور به ژن استفاده شد. ۳ μ l با غلظت ۷۸/۵ (ng/ μ l) از پلاسمید به همراه ۶ μ l ژن بتا، ۱، ۳ گلوکاناز با غلظت (ng/ μ l) ۹/۳۰، ۲ μ l بافر (\times 10 DNA T₄ Ligase و ۱/۰ آنزیم T₄ (10 U/ μ l) و با آب دیونیزه واکنش به حجم ۲۰ μ l رسید. واکنش در دمای ۱۶ درجه‌ی سانتی-گراد در بن‌ماری به مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید.

۳-۲-۴. مستعد کردن باکتری

باکتری‌های *E. coli* DH5 α و BL21(DE3) به ترتیب به منظور همسانه‌سازی و بیان پروتئین، مطابق روش زیر مستعد شدند.

یک کلونی از باکتری در ۱۰ ml محیط کشت^۱ LB (عصاره‌ی مخمر gr ۵/۰، تریپتون gr ۱، NaCl (در یک فالکون ۵۰ میلی لیتری) کشت داده و به مدت یک ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شد. یک ml از کشت تازه در ۱۰۰ ml محیط کشت LB (در ارلن ۵۰۰ میلی لیتری) تلقیح شد، بعد از رسیدن به $OD_{600} = 0.5$ ، محیط حاوی باکتری در چهار فالکون ۵۰ میلی لیتری تقسیم شد. (۲۵ ml محیط کشت در هر فالکون ریخته شد) و به مدت ۱۵ دقیقه در $500 \times g$ و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با اضافه کردن ۲۵ ml از $CaCl_2$ ۱۰۰ میلی‌مولار به هر کدام از فالکون‌ها و پیپت کردن آرام وارد مخلوط گردید به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ نگاه‌داری شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در $500 \times g$ سانتریفوژ شد و مایع رویی حذف شد. رسوب حاصل با اضافه کردن ۵ ml $CaCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) وارد مخلوط نسبتاً هموزن گردید و سپس محتویات ۴ فالکون به ۲ فالکون تبدیل شد و در نهایت حجم هر کدام از فالکون‌ها به ۲۵ ml رسید و ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در $500 \times g$ سانتریفوژ انجام شد و مایع رویی حذف شد، رسوب حاصل در ۱/۵ ml $CaCl_2$ حاوی گلیسرول ۱۵ درصد اتوکلاو شده، حل شد و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری استریل، ۱۰۰ μ l از آن ریخته شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، تست‌های زنده‌مانی، آلودگی و مستعد شدن بر روی نمونه‌ها انجام شد.

۳-۲-۵. همسانه‌سازی محصول اتصال^۲ درون باکتری مستعد DH5 α با استفاده از روش

شوک حرارتی

تراریخته کردن محصول الحاق، مطابق با دستورالعمل موجود در کتاب Russell و Sambrook با اندکی تغییر طبق روش زیر انجام شد. از محصول اتصال به میزان ۱۰ μ l به غلظت (۱۰ ng/ml) به ۱۰۰ از سلول‌های مستعد اضافه شد و ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. به میکروتیوب کنترل مثبت

1. Luria-Bertani
1. Ligation

نیز پلاسمید غیر نوترکیب افزوده شد و به میکروتیوب کنترل منفی هیچ نوع مولکول DNA اضافه نگردید. سلول‌ها به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در بن ماری گرماگذاری شد، سپس بلافاصله به مدت سه الی پنج دقیقه روی یخ قرار گرفت، یک ml از محیط کشت LB به سلول‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری انجام شد پس از گرماگذاری، ترکیب سلول و محیط کشت به مدت سه دقیقه در $7000 \times g$ سانتریفیوژ شد، سپس ۸۵۰ μl از مایع رویی دور ریخته شده و ۱۵۰ μl باقی مانده به همراه رسوب پیتاژ شده، بر روی محیط کشت جامد LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل و بعد از پخش بر روی پلیت به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شد. جهت اطمینان از صحت کار از کنترل منفی و کنترل مثبت نیز استفاده شد، کنترل منفی ۱۰ μl از باکتری *E. coli* DH5 α مستعد شده، بدون انتقال هیچ حاملی، روی پلیت LB آگار حاوی کانامایسین به صورت چمنی کشت داده شد و کنترل مثبت ۱۰ μl حامل pET-26B(+), به روش شوک حرارتی، به ۵۰ μl باکتری *E. coli* DH5 α مستعد شده، منتقل شد. نمونه باکتری روی پلیت LB آگار حاوی کانامایسین به صورت چمنی کشت داده شد.

از روش‌های اختلاف حرکت پلاسمید، هضم آنزیمی و تکثیر قطعه‌ی کلون شده جهت تعیین کلونی‌های نوترکیب استفاده شد. در نهایت جهت تایید نهایی توالی پروتئین نوترکیب تعیین توالی گردید. پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه‌ی مورد نظر به حجم ۵۰ μl و غلظت ۵۰ μg با استفاده از پرایمرهای جهانی وکتور (T7 promoter, T7 terminatore) که توسط شرکت مالزی که فرآیند توالی‌یابی را انجام می‌دهد تهیه گردیده است. به شرکت روبین طب فرستاده شد. پس از دریافت نتیجه تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Chromas (نسخه ۲/۱۳) توالی‌ها به صورت منظم چیده شد، توالی مورد نظر با استفاده از پایگاه BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI جهت اطمینان از وجود قطعه‌ی بتاگلوکاناز، مورد بررسی قرار گرفت.



۳-۲-۶. انتقال حامل *bgl-pET-26b* به میزبان بیانی مستعد *Escherichia coli*

Rosetta(DE3)

مقدار ۳ μ l حامل pET-26B، به روش شوک حرارتی، به ۱۰۰ μ l باکتری *E. coli Rosetta(DE3)* مستعد شده، منتقل شد. برای کشت باکتری از پلیت LB آگار حاوی کانامایسین و کلرامفنیکل استفاده شد. پلیت به صورت شبانه (۱۶ ساعت) در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۳-۲-۷. فرایند بیان بتاگلوکاناز و بررسی آن با استفاده از SDS-PAGE^۱

۳-۲-۷-۱ بیان ژن بتا-۱، ۳ گلوکاناز

یک کلنی از باکتری *E. coli Rosetta(DE3)* دارای حامل pET-26b، در ۵ ml محیط کشت LB مایع استریل، حاوی کانامایسین و کلرامفنیکل، کشت داده شد و به صورت شبانه در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ۱۸۰ rpm تکان داده شد.

محیط حاوی باکتری ۵ ml، به ۵۰ ml محیط کشت جدید حاوی کانامایسین (۳۰ mg/ml) و کلرامفنیکل (۳۴ mg/ml) اضافه گردید و تا رسیدن به کدورت ۰/۴ الی ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شیک ۱۸۰ rpm قرار گرفت.

قبل از القاء ۲ ml از کشت باکتری رسوب داده شد (سانتریفیوژ با $\times g$ ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه)، تا به عنوان محیط کشت القا شده مورد استفاده قرار گیرد. سپس، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار، به محیط اضافه شد و به صورت شبانه در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شیک ۱۵۰ rpm قرار گرفت. از کشت باکتری، ۲ و ۴ ساعت پس از القای بیان، نمونه پروتئینی تهیه، و از آن SDS-PAGE

1. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis
2. Expression

گذاشته شد. به منظور واسرشت سازی پروتئین نمونه‌ها، مقدار $30 \mu\text{l}$ از $2\times$ (loading buffer) ۴٪ SDS، 0.2% برومو فنل بلو، 20% گلیسرول و مرکاپتواتانول (200mM) به هریک رسوب‌ها ی (بعد از اتمام بیان پروتئین اقدام به تهیه رسوب شد) قبل از القا و $50 \mu\text{l}$ به رسوب‌های بعد القا اضافه شد و سپس به خوبی ورتکس شدند تا سوسپانسیونی به دست آید. نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه جوشانده شدند. موجب شکسته شدن دیواره‌ی باکتری‌ها شده و محتویات آن آزاد شدند. در مرحله ی بعد نمونه‌ها را سانتیفریوژ کرده و مایع رویی به مقدار $30-15 \mu\text{l}$ بررسی گردید.

۲-۷-۲-۳. تهیه ژل SDS-PAGE جهت تأیید بیان

جهت آماده کردن قالب مخصوص ژل، ابتدا شیشه‌های مربوط به آن با الکل (70% (v/v) و دستمال کاغذی کاملاً تمیز شد. پس از خشک شدن شیشه‌ها، spacerها بین دو شیشه قرار گرفت و دو شیشه به کمک چند گیره کاملاً بهم متصل شدند. همچنین در هنگام ریختن ژل، جهت بستن فاصله‌ی بین دو شیشه (seal) که از ریختن ژل به بیرون جلوگیری می‌کند، از آگارز (1% (w/v) استفاده شد. سپس برای اطمینان از seal شدن، مقداری آب مقطر در فضای بین دو قاب ریخته شد و در زیر قاب‌ها نیز دستمال کاغذی خشک گذاشته شد تا خیس شدن دستمال و seal نبودن مشخص گردد. پس از اطمینان از این موضوع، ابتدا Resolving Gel ($4/5 \text{ ml}$) Resolving buffer شامل Tris-base (M) $1/5$ و 0.4% SDS، $5/85 \text{ ml}$ محلول Stock 30% (w/v) آکریل آمید و $1/3\%$ (w/v) بیس آکریل آمید، $50 \mu\text{l}$ از محلول 10% (w/v) APS، $50 \mu\text{l}$ از محلول 10% (w/v) TEMED و $7/65$ آب دیونیزه را ریخته شد و سپس با استفاده از سمپلر، آب مقطر افزوده گردید تا از ورود هوا به درون ژل جلوگیری شود و همچنین سطح ژل کاملاً صاف گردد. ظرف مدت 10 الی 15 دقیقه ژل بسته شد و از طریق وارونه کردن قاب، آب دور ریخته شد.

Stacking Gel (۱/۲۵ ml) Stacking buffer شامل Tris-base (۰/۵ M) و SDS (۰/۴ w/v) ml، ۰/۸ محلول Stock (۰/۳۰ w/v) آکریل آمید و (۰/۱۳ w/v) بیس آکریل آمید، ۵۰ μl از محلول (w/v) ۰/۱۰ APS، ۷۵ μl از محلول (۰/۱۰ w/v) TEMED و ۲/۹ ml آب دیونیزه) ریخته شد و بلافاصله شانه در آن قرار داده شد. در هنگام بیرون کشیدن شانه از ژل، این عمل را به آرامی انجام شد تا حباب تشکیل نشود. در این تحقیق، Resolving Gel (۰/۱۰) با توجه به اندازه پروتئین نو ترکیب، تهیه شد و Stacking Gel (۰/۵) تهیه شد. در هنگام تهیه Stacking Gel و Resolving Gel، TEMED (تترا متیل اتیلن دی آمید) آخر از همه و قبل از آن APS (آمونیم پر سولفات) اضافه شد. به منظور واسرشت سازی پروتئین موجود، رسوب‌های پروتئینی هر کدام در ۱۰۰ μl بافر نمونه (Sample buffer) ۵ ml گلیسرول، ۱ گرم SDS، ۰/۵ ml برومو فنل بلو، ۱ ml ۲-مرکاپتواتانول، ۱۰ ml بافر ژل بالا، با آب مقطر به حجم ۲۰۰ ml رسانده شد) مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند (جهت شکسته شدن سلول‌های باکتری و آزاد شدن محتویات سلول باکتری). سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه با شتاب $12000 \times g$ صورت گرفت. الکتروفورز ژل در بافر تانک (Tris-base) (۰/۲۴ M)، SDS (۰/۱ w/v) و Glycine (۰/۱۹ M) با ولتاژ ۱۰۰ ولت، به مدت تقریبی ۲/۵ ساعت انجام گرفت. بعد از ۲/۵ ساعت جریان قطع شد و با زدن آب مقطر بین دو شیشه و جدا کردن شیشه‌ها، ژل به آرامی خارج گردید و درون ظرف رنگ آمیزی قرار داده شد. ژل توسط محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو (۰/۱ w/v) Comassie Blue R-250، (۰/۵۰ v/v) متانول، (۰/۱۰ v/v) اسید استیک و (۰/۴۰ v/v) آب مقطر) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و در نهایت توسط محلول رنگ بری (۰/۴۰ v/v) متانول، (۰/۱۰ v/v) اسید استیک و (۰/۵۰ v/v) آب مقطر، رنگ‌زدایی شد. بعد از رنگ بری کامل ژل، باندهای پروتئینی ظاهر شدند.

۳-۲-۷-۳. لیز باکتری با دستگاه اولتراسونیک ۱

پس از آماده شدن نمونه بیان، ۵۰ ml از محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۲۰ دقیقه با $8000 \times g$ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی، رسوب باکتری در ۵ ml بافر لیزکننده (NaH_2PO_4) با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، NaCl ۱۰۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار، توئین 20، ۰/۰۵ درصد و $\text{pH} = 8$ حل شد و به مدت ۴۵ دقیقه درون یخ قرار گرفت.

سپس سونیکاسیون با قدرت ۷۰ درصد و ۰/۵ پالس در دقیقه، در چهار چرخه زمانی، هر کدام شامل ۴۵ ثانیه سونیکاسیون و ۱ دقیقه استراحت، درون یخ انجام شد و سلول‌های باکتری از طریق نیروی امواج مافوق صوت شکسته شدند. محلول به دست آمده، بلافاصله به مدت ۲۰ دقیقه با $8000 \times g$ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی به منظور انجام مراحل بعدی، شامل خالص سازی و سنجش فعالیت پروتئین، در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. محلول رویی و رسوب حاصل از سونیکاسیون با استفاده از تکنیک SDS PAGE بررسی شد.

۳-۲-۷-۴. تخلیص پروتئین

ستون کروماتوگرافی نیکل-سفارز با هدف تسهیل خالص‌سازی پروتئین‌های نو ترکیب دارای دنباله پلی‌هسیتیدینی استفاده شد. تمام مراحل تخلیص در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد صورت گرفت. ابتدا ستون کروماتوگرافی نیکل به حجم ۱ ml آماده شد، دو بار با آب مقطر (به حجم کل ستون) شستشو داده شد و برای به تعادل رساندن ستون از بافر اتصال (NaH_2PO_4) (۵۰ mM)، کلرید سدیم (۵۰۰ mM)، ایمیدازول (۱۰ mM)، ۰/۰۵ Tween 20، $\text{pH} = 8$ استفاده شد و ستون ۳ بار در حجم ۱ ml شستشو داده شد. بعد از خروج بافر اول از ستون، محلول شفاف حاصل از مرحله قبل (سوپ پروتئینی) به ستون تزریق شد و ۳ بار از ستون رد شد و محلول خروجی آن (flow) در یک ظرف جمع‌آوری شد.

تکرار تزریق و افزایش زمان در این مرحله باعث برقراری اتصال بهتر پروتئین‌های نو ترکیب به ستون می‌شود. پروتئین‌های میزبان با تزریق ۵ ml بافر شستشو (NaH_2PO_4 ۵۰ mM)، کلرید سدیم (۵۰۰ mM)، ایمیدازول (۲۰ mM) و ۰.۵٪ Tween 20 (pH = ۸) به ستون از رزین شسته شد و محلول خروجی آن در یک ظرف مجزا جمع‌آوری شد (wash 1). پس از خروج بافر شستشو، دوباره ۵ ml بافر شستشو به ستون اضافه شد و محلول خروجی آن در یک فالكون دیگر جمع‌آوری شد (wash 2). برای بار سوم نیز ۵ ml بافر شستشو به ستون اضافه شد و محلول خروجی آن در یک فالكون دیگر جمع‌آوری شد (wash 3). با رسیدن سطح بالایی بافر قبلی به یک چهارم انتهایی ستون، بافر خارج کننده Elution Buffer (NaH_2PO_4 ۵۰ mM)، کلرید سدیم (۵۰۰ mM)، ایمیدازول (۲۵۰ mM) و ۰.۵٪ Tween (pH = ۸) در حجم ۵ ml به ستون تزریق شد. پروتئین‌های نو ترکیب در این مرحله در رقابت با غلظت بالای ایمیدازول از رزین‌ها جدا شدند و با جریان بافری به خارج هدایت شدند و محلول خروجی در حجم ۵۰۰ μl در ۱۰ میکروتیوب جمع‌آوری شد. در نهایت ستون با ۵ ml از بافر اتصال شستشو داده شده و در الکل ۲۰٪ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار ۸۰ μl از محلول‌های خروجی ستون، محلول قبل از تخلیص و قبل از بیان (به عنوان شاهد) برداشته شد تا پس از تیمار با سمپل بافر توسط SDS-PAGE ژل الکتروفورز بررسی شوند.

۳-۲-۷-۵. دیالیز آنزیم

کیسه دیالیز خشک را با دقت به یک بشر یک لیتری منتقل و سپس ۲۰۰ ml محلول NaHCO_3 ۱۰۰ mM و EDTA ۱۰ mM که pH = ۷ تنظیم شده است، به آن اضافه نمودیم، به مدت ۵-۱۰ دقیقه جوشانده شد و محلول درون بشر با آب مقطر تعویض شد و سه بار عمل شستشو انجام شد. هنگام کار با کیسه دیالیز از دستکش استفاده شد تا از آلودگی با پروتئین‌ها جلوگیری به عمل بیاید. انتهای کیسه با گره زدن به خوبی مسدود شد، به طوریکه هیچگونه نشتی نداشت. عصاره سلولی

مورد نظر به درون کیسه دیالیز ریخته شد و سر کیسه مسدود شد. کیسه دیالیز پر شد و در بافر دیالیز غوطه ور گردید. از ارلن یا بشر به عنوان ظرف حاوی بافر دیالیز استفاده شد. در این پژوهش یک لیتر بافر فسفات NaH_2PO_4 (۲۰ mM)، (pH = ۷/۵) به عنوان بافر دیالیز استفاده شد. برای تعیین غلظت پروتئین از بردفورد (۱۹۷۵) استفاده شد (بردفورد، ۱۹۷۵)

۳-۲-۸. طرز تهیه‌ی محلول بردفورد

پس از حل کردن ۱۰۰ mg از پودر کوماسی بلو G250 در ۵۰ ml اتانول ۹۶٪ به آن ۱۰۰ ml اسید فسفریک (W/V) ۸۵٪ اضافه گردید و حجم محلول حاصل به یک لیتر رسید و با کاغذ صافی صاف شد. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های (mg/ml) ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ از سرم آلبومین به عنوان غلظت‌های استاندارد تهیه و ۲/۵ ml معرف برادفورد اضافه شد. هم‌چنین ۵۰ μl از محلول پروتئینی در ۲/۵ ml معرف برادفورد حل شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر، توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. سپس، با استفاده از نرم‌افزار EXcell، منحنی استاندارد غلظت پروتئین BSA برحسب (mg/ml) در مقابل جذب رسم گردید.

۳-۲-۹. بررسی فعالیت آنزیم بتا-۱،۳-گلوکاناز

اندوگلوکانازها (EC3.2.1.4) به صورت تصادفی پیوندهای گلیکوزیدی را در نواحی نامنظم و قابل حل داخلی سلولز هیدرولیز می‌کنند و انتهاهای جدید تولید می‌کنند. این عملکرد منجر به کاهش سریع طول پلی‌مر و افزایش تدریجی غلظت قندهای احیایی می‌گردد. فعالیت اندوگلوکانازها از طریق کاهش چگالی سطحی پیش‌ماده و یا از طریق افزایش انتهاهای احیایی اندازه‌گیری می‌گردد. به این صورت که انتهای احیایی قندها (محصول حاصل از واکنش آنزیمی) با DNS پیوند برقرار کرده و DNS در طول

موج ۵۴۰ نانومتر جذب دارد بنابراین با روش‌هایی هم‌چون BCA^۱ و DNS^۲ مقدار قندهای احیایی را می‌توان به دست آورد (دنتز و همکاران، ۱۹۵۹)، لامینارین، الیگوساکاریدهای محلول از جمله پیش‌ماده‌ها برای سنجش فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند باشد. در این‌جا برای سنجش فعالیت اندوگلوکاناز از پیش‌ماده‌ی تجاری لامینارین^۳ استفاده شد. مخلوط واکنش آنزیمی (۱۲ μl) شامل ۱۲ پیش‌ماده (محلول یک درصد لامینارین در بافر پتاسیم فسفات pH = ۷) می‌باشد. از مخلوط واکنش بدون آنزیم، به عنوان کنترل، برای ارزیابی میزان قند احیایی تولید شده در عدم حضور آنزیم استفاده شد. همه نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، به منظور توقف واکنش، مقدار برابر حجم واکنش (۲۴ μl) محلول DNS به نمونه‌ها اضافه و به مدت ده دقیقه جوشانده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت و ثبت شد.

۳-۲-۹-۱. منحنی استاندارد

به منظور به دست آوردن میزان فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول بر دقیقه، از منحنی استاندارد گلوکز استفاده شد. برای این کار رقت‌های متفاوتی از محلول گلوکز (۱ mg/ml) در پنج رقت (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱) mg/ml آماده گردید. سپس به مقدار برابر حجم واکنش به آن DNS اضافه شد و پس از ده دقیقه جوشاندن و سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و نمودار رسم گردید. Unit برابر است با مقداری از آنزیم که یک میکرومول از قندهای احیایی را در هر دقیقه در ۱ ml از حجم واکنش آزاد می‌کند.

به منظور به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی منحنی استاندارد رسم گردید، منحنی استاندارد را براساس غلظت‌های متفاوتی از گلوکز رسم گردید و به غلظت‌های مختلف معرف

1. 2,2- bichroninate
2. Dinitrosalicylic Acid
3. Laminarin

DNS اضافه کردید و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و سپس جذب آن در طول موج ۵۴۰ nm خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر واحد آنزیمی محاسبه گردید:

$$\text{Unit} = \mu\text{mol Glucose released} / \text{time (unit)}$$

۳-۲-۱۰. نحوه محاسبه‌ی نیمه عمر آنزیم ($T_{(1/2)}$)

برای محاسبه نیمه عمر آنزیم بتاگلوکاناز ایزوله شده از باکتری کوهنلا آنزیم در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (دمای بهینه)، در زمان‌های مختلف (بعد از ۱/۵ ساعت، ۲ ساعت، ۴ ساعت) نمونه‌برداری گردید و بعد از هر بار نمونه‌گیری، فعالیت آنزیم سنجیده شد و از درصد فعالیت که به دست آورده شده، لگاریتم گرفته و منحنی نیمه عمر به صورت خطی رسم گردیده شد. با استفاده از شیب خط (K_i) مقدار نیمه عمر با توجه به فرمول که ارائه شده است محاسبه شد.

$$T_{1/2} = -\ln 2 / K_i$$

$$-\ln 2 = 0.693$$

شیب خط منحنی رسم شده در زمان‌های مختلف $K_i =$

۳-۲-۱۱. تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز نو ترکیب

۳-۲-۱۱-۱. مطالعه‌ی فعالیت آنزیم بر سوبستراهای مختلف

فعالیت بتاگلوکانازی آنزیم خالص شده روی سوبستراهای مختلف شامل نشاسته (آلفا-۴،۱-۶،۱ گلوکز)، لامینارین (بتا-۳،۱ گلوکان)، پوستانان (بتا-۳،۱-۶،۱ گلوکان)، کاه (مقداری کاه به همراه بافری با pH بهینه)، پلوان، کیتین (آلفا-۴،۱)، زایلان (بتا-۴،۱ گلوکان)، کربوکسی متیل سلولز (بتا-۴،۱ گلوکز) بررسی شد. فعالیت سلولازی آنزیم با استفاده از روش استاندارد تعیین شد. ابتدا مخلوط

۳-۲-۱۱. تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم

۳-۲-۱۱-۱. تعیین دمای بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم خالص

برای تعیین دمای بهینه حداکثر فعالیت آنزیم ابتدا $12 \mu\text{l}$ از آنزیم خالص با غلظت $(\text{mg/ml}) 0.1$ را به همراه $12 \mu\text{l}$ محلول یک درصد لامینارین در بافر فسفات با $\text{pH} = 7$ به عنوان سوبسترا مخلوط گردیدند و به مدت ۵ دقیقه در دماهای مختلف (۱۰ تا ۱۰۰) درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت این زمان با اضافه کردن $24 \mu\text{l}$ محلول DNS مقدار جذب هر یک از نمونه‌ها در 540 nm خوانده شد. آزمایش برای هر دما سه بار تکرار شد. تجزیه آماری داده‌ها و رسم جدول با استفاده از نرم افزار prism انجام گرفت.

۳-۲-۱۱-۲. بررسی پایداری حرارتی آنزیم در دماهای مختلف

جهت تعیین میزان پایداری آنزیم در دماهای مختلف، ابتدا آنزیم را در حمام آب گرم با دماهای مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰) به مدت ۹۰ دقیقه تا یک ساعت گرماگذاری و $12 \mu\text{l}$ از آنزیم را با $12 \mu\text{l}$ لامینارین یک درصد در بافر فسفات با $\text{pH} = 5$ مخلوط گردید. سپس مخلوط واکنش را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد می گذاریم. پس از اتمام زمان واکنش، نمونه‌ها را با روش DNS با هم مقایسه می کنیم.

۳-۲-۱۱-۳. سنجش پایداری آنزیم نسبت به دما در طول زمان

جهت سنجش پایداری آنزیم نسبت به دما در طول زمان های مختلف با توجه به نتایج حاصل از ترسیم نمودار مربوط به Temp stability سه دمای ۳۰، ۵۰، ۷۰ درجه سانتی گراد به ترتیب، برای این مرحله در نظر گرفته شد (انتخاب از دمایی صورت گرفت که در آن میزان پایداری آنزیم روند رو به کاهشی را شروع کرد). ابتدا محلول های آنزیمی در بافر پتاسیم فسفات 5.0 mM و $\text{pH} = 5$ تهیه و در دماهای بین ۳۰، ۵۰، ۷۰ به مدت ۹۰، ۱۲۰، ۲۴۰ دقیقه انکوبه شد بعد از گذشت مدت زمان مورد

نظر سوبسترای آماده شده در pH بهینه به نمونه‌ها اضافه شد. آنکوباسیون در دمای بهینه به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت و از طریق سنجش فعالیت آنزیمی جذب هر کدام از نمونه‌ها را در ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

۳-۲-۱۱-۴. تاثیر اسیدیته بر روی فعالیت آنزیم و تعیین pH بهینه

ابتدا بافر مخلوط (فسفات سدیم، استات سدیم و گلیسین) ۵۰ Mm در pHهای (۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲) تهیه شد و از آن به منظور تهیه سوبسترای لامینارین ۱٪ با pH ۳ تا ۱۲ استفاده شد. با نسبت مساوی از محلول آنزیمی به سوبسترای آماده شده در pHهای مختلف اضافه گردید و pH مخلوط نهایی یکبار دیگر توسط کاغذ pH متر چک و در بن ماری آنکوبه شد. بعد از گذشت زمان تعیین شده سنجش فعالیت آنزیمی طبق روش ذکر شده صورت گرفت و جذب هر کدام از نمونه‌ها در ۵۴۰ nm خوانده شد.

۳-۲-۱۱-۵. بررسی پایداری آنزیم در pH های مختلف

برای به دست آوردن مناسب‌ترین pH بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم خالص از سه نوع بافر استفاده شد. بافر سیترات فسفات برای pHهای ۳ تا ۷، بافر فسفات برای pH ۶ تا ۹ و بافر گلیسین-NaOH برای pH ۹ تا ۱۱ استفاده شد. سپس محلول یک درصد لامینارین در هر یک از این بافرها تهیه شد و با اضافه کردن ۱۲ μ l از آنزیم در هر یک از بافرها سنجش فعالیت آنزیمی در طیف pHهای ۳ تا ۱۱ انجام شد. آزمایش برای هر pH سه بار تکرار شد.

۳-۲-۱۱-۶. بررسی پایداری آنزیم در pHهای مختلف در یک زمان و در زمان‌های مختلف

در بافرهایی با pHهای متفاوت سوبسترا اضافه گردید و سپس آنزیم اضافه شد و به مدت یک ساعت در این بافرها با pHهای متفاوت در دمای بهینه آنزیم قرار گرفت و فعالیت آنزیمی در pH بهینه سنجیده شد و منحنی مربوطه به آن رسم گردید. ابتدا بافر فسفات-سیترات و هم چنین بافر فسفات با

غلظت ۵۰ میلی مولار در pH های ۵، ۷، ۹/۵ تهیه شد. سپس مقدار ۵۰ μl آنزیم به ۵۰ μl بافر در pH های مختلف اضافه شد و pH نهایی با کاغذ pH متر چک شد. نمونه های آنزیمی به مدت ۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد، در pH های مورد نظر قرار گرفتند. سپس با نمونه های آنزیمی واکنش سنجش در pH بهینه انجام شد.

۳-۲-۱۱-۷. اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم خالص

غلظت های ۵ و ۱۰ میلی مولار از یون ها به همراه سوبسترا در بافر فسفات با pH معادل ۵ تهیه شد. سپس با اضافه کردن ۱۲ μl از آنزیم به ۱۲ μl از این سوبستراهای تهیه شده، فعالیت آنزیم در حضور یون ها سنجیده شد و با حالت کنترل (بدون حضور یون ها) مقایسه شد. یون های مختلف استفاده شده شامل NaCl ، HgCl_2 ، MnCl_2 ، FeCl_3 ، MgCl_2 ، KCl ، NiSO_4 ، CoCl_2 ، CaCl_2 ، CuSO_4 ، BaCl_2 و ZnCl_2 می باشند. آزمایش برای هر یون سه بار تکرار شد.

۳-۲-۱۱-۸. اثر مهارکننده ها و دترجنت ها بر فعالیت آنزیم خالص

ابتدا غلظت های مختلفی از مهارکننده ها و دترجنت ها به همراه سوبسترا در بافر فسفات با pH معادل ۵ تهیه شد. سپس با اضافه کردن ۱۲ μl از آنزیم به ۱۲ μl از این سوبستراهای تهیه شده، فعالیت آنزیم در حضور مهارکننده ها و دترجنت ها سنجیده شد و با حالت کنترل (بدون حضور مهارکننده ها و دترجنت ها) مقایسه شد. مهارکننده ها و دترجنت های که استفاده شد شامل Tween20، Tween80، Urea، Triton، PMSF بود.

۳-۲-۱۱-۹. اثر حلال های آلی بر فعالیت آنزیم خالص

ابتدا غلظت های مختلفی از حلال های آلی به همراه سوبسترا در بافر فسفات با pH = ۵ تهیه شد. سپس با اضافه کردن ۱۲ μl از آنزیم به ۱۲ μl از این سوبستراهای تهیه شده، فعالیت آنزیم در حلال های آلی سنجیده شد و با حالت کنترل (بدون حضور حلال های آلی) مقایسه شد. حلال های

آلی مختلف استفاده شده شامل متانول، اتانول، متانول، استن، n-هگزان، ایزوپروپانول و است. آزمایش برای هر حلال سه بار تکرار شد.

۳-۲-۱۱-۱۰. رسم نمودار میکائیلیس - منتن^۱

نمودار میکائیلیس - منتن شناخته‌ترین مدل در بیوشیمی برای محاسبه‌ی سرعت واکنش می‌باشد. این مدل از یک معادله که توسط سرعت واکنش آنزیمی توصیف می‌شود، بدست می‌آید.

$$V = V_{max}[S] / K_m + [S]$$

در این معادله V سرعت واکنش، $[S]$ غلظت سوبسترا، V_{max} حداکثر سرعت واکنش و K_m ثابت میکائیلیس - منتن است که نشان‌دهنده‌ی غلظت سوبسترا در زمانی است که سرعت واکنش نصف حداکثر سرعت می‌باشد. K_{cat} نیز با توجه به وزن مولکولی آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$K_{cat} = V_{max} / \mu\text{mol enzyme (s}^{-1}\text{)}$$

ابتدا غلظت‌های مختلفی از سوبسترا (۰/۱۶۲۸، ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۱۲۵ mg/ml از لامینارین) تهیه شد. به هر کدام از غلظت‌های سوبسترای ۱۲ μl آنزیم اضافه گردید و به مدت ده دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. جهت متوقف کردن واکنش، ۲۴ μl محلول DNS به هر نمونه اضافه شد و پس از ده دقیقه جوشاندن، جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

برای هر کدام از غلظت‌ها با استفاده از نمودار استاندارد گلوکز، میزان قند احیایی ایجاد شده بر حسب میکرومول بر دقیقه محاسبه و سپس با استفاده از نرم‌افزار نمودار رسم و میزان V_{max} و K_m محاسبه شد.

۳-۲-۱۱-۱۱. بررسی بازدارندگی آنزیم بتا-۳،۱-گلوکاناز بر فعالیت قارچ‌های بیماری زا

در این پژوهش از ایزوله‌های قارچی *Sclerotinia sclerotiorum*، *Phytophthora.sp*، *Alternaria. Sp*، *Fusarium. Sp* استفاده گردید، قارچ‌ها را بروی محیط PDA^۱ (از شرکت سیگما، آلمان خریداری گردید)، به صورت یک سانتی‌متر در یک سانتی‌متر برش داده شد و بر روی محیط قرار داده شد، از دیسک‌های اتوکلاو جهت اضافه نمودن آنزیم استفاده گردید، بروی دیسک‌ها نیز ۱۵ µl از غلظت (mg/ml) ۰/۱ آنزیم بتا-۳،۱-گلوکاناز اضافه گردید و این تلقیح آنزیم به همراه شاهد (بافری که آنزیم در آن وجود ندارد) انجام شد، عمل تلقیح آنزیم سه بار در روز و مقدار ۳۰ µl با غلظت (mg/ml) ۰/۱ انجام گردید و مهار قارچی توسط آنزیم بررسی گردید. در موردی دیگر به جای استفاده از دیسک چاهک‌گذاری انجام گردید و قارچ‌ها مطابق با روش معمول کشت گردیدند و ۳۰ µl از آنزیم با غلظت (mg/ml) ۰/۱ و نمونه‌ی کنترل در چاهک‌ها اضافه شده و بعد از چند روز مشاهدات گزارش شد.

۳-۲-۱۲. مطالعات بیوانفورماتیکی

در این مطالعه با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و با استفاده از نرم افزارهای آنلاین به پیشگویی برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم بتاگلوکاناز مورد نظر پرداختیم. درختچه فیلوژنتیک با روش maximum likelihood برای بتا-۳،۱-گلوکانازهای شناخته شده خانواده‌ی GH16 با بوت استرپ ۱۰۰۰ توسط Mega6.06 رسم شد. در پایگاه اطلاعاتی Prosite اطلاعات مربوط به دومین پروتئینی بتاگلوکاناز دریافت شد (<http://prosite.expasy.org>) و توالی این دومین مورد نظر توسط برنامه‌ی آنلاین clustalw با سایر توالی‌های بتاگلوکانازی که کریستالوگرافی شده‌اند هم‌ردیفی انجام گردید و نواحی حفاظت شده و اسیدهای آمینه‌ی مربوطه در این نواحی حفاظت شده را به عنوان جایگاه فعال آنزیم بتاگلوکاناز تعیین نمودیم.



۳-۲-۱۲-۱. بررسی توالی آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز

توالی بتا-۱،۳ گلوکاناز مورد مطالعه از باکتری بومی کوهنلا ایزوله شده است. توالی نوکلئوتیدی این آنزیم توسط نرم افزار آنالین (<http://web.expasy.org/translate>) Translate به توالی پروتئینی ترجمه گردید. سپس به کمک توالی پروتئینی این آنزیم از پایگاه داده ی NCBI جهت پیدا کردن توالی های مشابه استفاده گردید. براساس شباهت ها باتوالی های مشابه اقدام به تعیین نواحی جایگاه فعال نیز گردید.

۳-۲-۱۲-۲. آنالیز خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنزیم

ویژگی های مختلف فیزیکوشیمیایی بتا-۱،۳ گلوکاناز با استفاده از نرم افزار ExPASy ProtParam مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات ProtParam شامل وزن ملکولی، نقطه ی ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک و... می باشد.

۳-۲-۱۲-۳. پیش بینی ساختمان دوم آنزیم و مدل سازی آن

از نرم افزارهای Phyre2 برای مدل سازی پروتئین استفاده شد. این نرم افزار ساختار پروتئین ها را بر اساس مدل سازی مقایسه ای پیش بینی می کند. از برنامه ی Chimera هم بمنظور بررسی ساختمان پروتئین استفاده شد. جهت تعیین ساختار دوم پروتئین از برنامه ی آنالین (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipre>) استفاده شد.

فصل چہارم، نتائج

در این تحقیق ژن بتاگلوکاناز باکتری *Cohnella* A01 برای اولین بار از استخر پرورش میگو در آبادان جداسازی شد و در وکتور بیانی pET26b کلون شد (KX013442)، تعیین توالی گردید و در باکتری *E. coli* Rosetta بیان گردید. آنزیم بتاگلوکاناز خالص و خصوصیات بیوشیمیایی ترمودینامیک و سینتیک آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام PCR ژن بتا-۱، ۳ گلوکاناز و تکثیر ژنی با طول تقریباً ۱۲۵۱ جفت باز، الحاق این ژن خالص شده که دارای سایت برشی بود به وکتور بیانی 26b pET انجام شد. پلاسمید نو ترکیب به سلول‌های مستعد تهیه شده از باکتری *E. coli* (DH5 α) با استفاده از روش شوک حرارتی منتقل شده و کلونی‌های نو ترکیب انتخاب گردیدند. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید و همچنین PCR از پلاسمید های نو ترکیب و آزمایش هضم آنزیمی به منظور تایید مراحل همسانه سازی انجام گردید.

۴-۱. هضم محصول PCR و وکتور بیانی pET26b

با استفاده از آنزیم‌های *Nde* I و *Sal* I و بافر مشترک نارنجی (Orange 1x) به طور همزمان ژن بتاگلوکاناز و وکتور بیانی هضم شدند و با استفاده از High Pure PCR Product Purification Kit خالص سازی صورت گرفت و سپس واکنش الحاق انجام شد (شکل ۴-۱).

۴-۲. بررسی بیان ژن بتاگلوکاناز

از بین کلونی‌های دارای پلاسمید نو ترکیب یکی از آنها انتخاب شدند، وکتور نو ترکیب مورد نظر را به میزبان بیانی *Rosetta* ترانسفورم گردید و در محیط کشت مایع (کلرامفیکل، کانامایسین، LB) رشد داده شدند. پس از رسیدن به $OD_{600} = 0.7$ ، از 1mM IPTG برای بیان پروتئین نو ترکیب استفاده شدند. پس از زمان ۱۶ ساعت رسوب حاصل از کشت باکتری گرفته شد و آنالیز پروتئین مورد نظر با استفاده از SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. با مقایسه‌ی کنترل منفی (قبل از القا با IPTG) و نمونه‌ی پروتئینی بتاگلوکاناز باند مورد نظر حاصل از بیان مشاهده شد که تولید پروتئینی با وزن

مولکولی تقریباً ۴۷ کیلو دالتون تایید شد. پروتئین مورد نظر با استفاده از ستون نیکل سفارز تخلیص شد و الکتروفورز آن بر روی SDS-PAGE صورت گرفت (شکل ۴-۲).

۳-۴. سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز

بعد از بیان پروتئین و تخلیص آن، به منظور بررسی ویژگی‌های پروتئین به عنوان یک آنزیم، فعالیت آن بر روی سوبسترای لامینارین، مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم تخلیص شده قادر به فعالیت روی لامینارین بود. این نتیجه اثبات می‌کند پروتئین تخلیص شده در واقع یک نوع بتا-۱،۳ گلوکاناز است. آنزیم با شکستن پیوند بتای موجود بین گلوکزهای موجود در لامینارین، قادر به آزاد کردن گلوکز و انتهای احیایی بوده و در نتیجه تغییر رنگ در محیط واکنش ایجاد می‌گردد. محلول آنزیمی به حجم ۱۲ μl به ۱۲ μl از محلول لامینارین ۱٪ در بافر پتاسیم فسفات (K_2HPO_4) با $pH = 7$ ، افزوده گردید و ویال به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد روی هات پلیت قرار گرفت و سپس هم حجم واکنش DNS (۵ و ۳ دی نیتروسالسیلیک اسید) اضافه گردید و واکنش متوقف شد، در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشیده شد. سپس روی یخ قرار داده شد و پس از خنک شدن جذب نمونه در طول موج ۵۴۰ nm خوانده شد (شکل ۴-۳).

۴-۴. تاثیر سوبستراهای مختلف جهت تعیین اختصاصیت آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز

در این تحقیق فعالیت اندوبتا-۱،۳ گلوکاناز تخلیص شده با سوبستراهای مختلف به منظور فراهم کردن درک بهتر از فعالیت بتاگلوکانازی آنزیم بررسی شد. نمونه‌ی کنترل نیز در واقع همان واکنش آنزیمی با لامینارین است که از نظر فعالیت بیشترین فعالیت را دارا می‌باشد. نتایج نشان داد که این بتا-۱،۳ گلوکاناز بسیار روی لامینارین ۱۰۰ درصد فعال می‌باشد و دارای فعالیت ویژه ۱۱۲۵ U/mg است، اما فعالیت آنزیم بر سوبسترا کاه^۱ ۲۵ درصد بوده و دارای فعالیت ویژه ۲۸۱/۲ U/mg،

سوبسترای پوستالان توسط بتا-۳،۱ گلوکاناز تا ۸ درصد تجزیه شد، دارای فعالیت ویژه ی U/mg ۳۵/۸ بود، بروی کیتین^۱، زایلان^۲، نیز فعالیت نداشت.

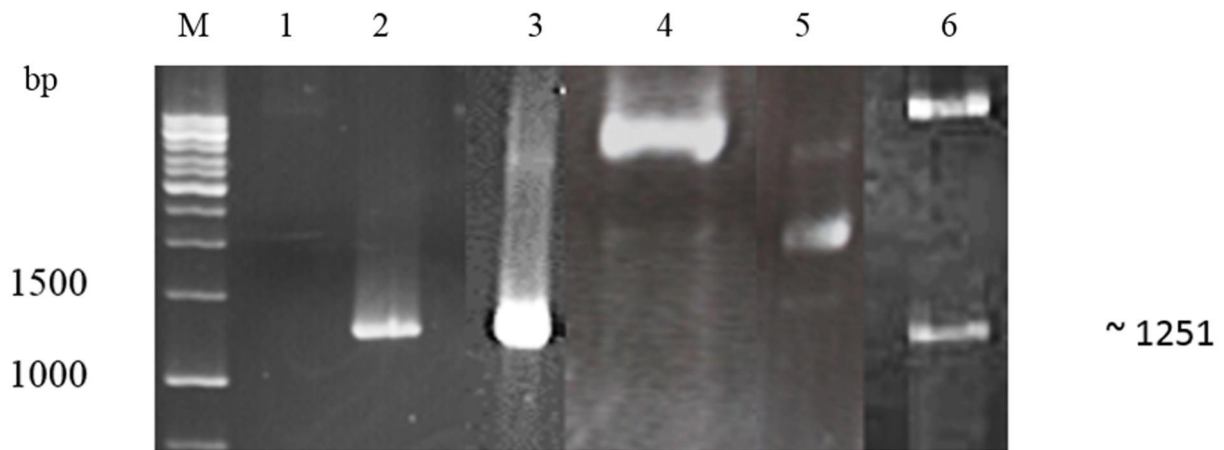
۴-۵ تعیین واحد فعالیت آنزیمی با استفاده از رسم منحنی استاندارد و محاسبه پارامترهای

V_{max} و K_m

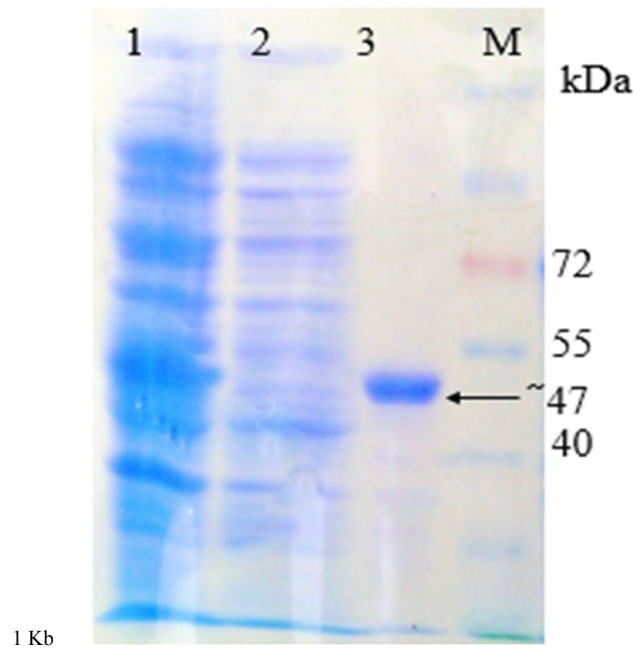
از آنجایی که آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز با تجزیه ی لامینارین تولید انتهاهای احیایی می کند که در طول موج ۵۴۰ نانومتر قابلیت جذب دارد، بنابراین برای تبدیل ODهای خوانده شده به فعالیت آنزیم بر حسب Unit از منحنی استاندارد گلوکز استفاده شد. این نمودار با استفاده از مقدار جذب غلظت های مختلف گلوکز در طول موج ۵۴۰ نانومتر با کمک برنامه ی Excel رسم شد و منحنی استاندارد بدست آمد (شکل ۴-۴). زمانیکه از لامینارین به عنوان سوبسترا استفاده می شود، سینتیک این آنزیم از نوع Michaelis-Menten است. (شکل ۴-۵). K_m محاسبه شده برای این آنزیم ۰/۱۶۲۸ mg/ml و $V_{max} = ۱۱۲/۵ \text{ Unit } (\mu\text{M}/\text{min.ml})$ می باشد. پارامترهای سینتیکی آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز با استفاده از فرمول های موجود در روش ها محاسبه گردید، این پارامترها شامل فعالیت بیشینه آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز ($V_{max} = ۱۱۲/۵ \mu\text{mol}/\text{min.ml}$)، ثابت میکائیلیس منتن ($K_m = ۰/۱۶۲۸ \text{ mg/ml}$)، فعالیت ویژه ی آنزیمی (U/mg) ۱۱۲۵، $K_{cat} = ۵۲۸۱۶/۹ \text{ (S}^{-1}\text{)}$ ، کارایی کاتالیتیکی (K_{cat}/K_m) برابر با ۳۲۴۴۲۸/۱ و نیمه ی عمر نیز ۱۷۲۵/۳ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی گراد است. مراحل خالص سازی آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز که شامل فعالیت ویژه ی آنزیمی، غلظت پروتئین، تاخوردگی پروتئین و درصد راندمان خالص سازی می باشد، نیز تعیین شد که در جدول (۴-۱) نشان داده شده است. همانطور که در جدول گزارش شده، بتا-۳،۱ گلوکاناز ایزوله شده از باکتری بومی کوهنلا، در طی خالص سازی فعالیتش از (U/ml) ۱۴۰/۵ تا (U/ml) ۱۱۲/۵ رسیده است و ۱۸ درصد کاهش فعالیت یافته است، کل

1. Chitin
2. Oat spelt xylane
3. Pustalan

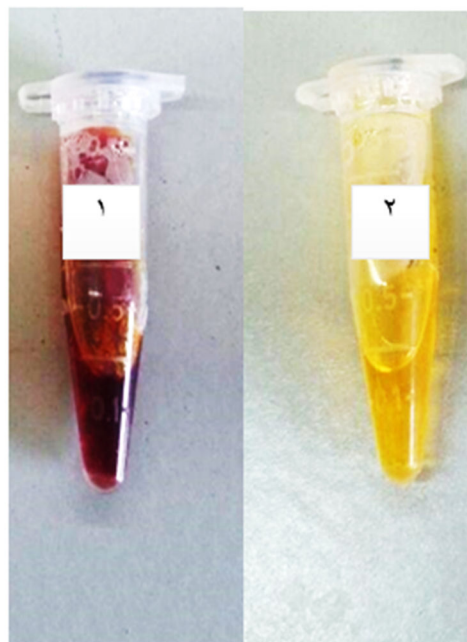
پروتئین نیز در مقایسه با غلظت پروتئین بتا-۱، ۳، ۱ گلوکاناز که در ابتدا ۰/۸ mg بوده تا ۰/۱ mg کاهش یافته است،



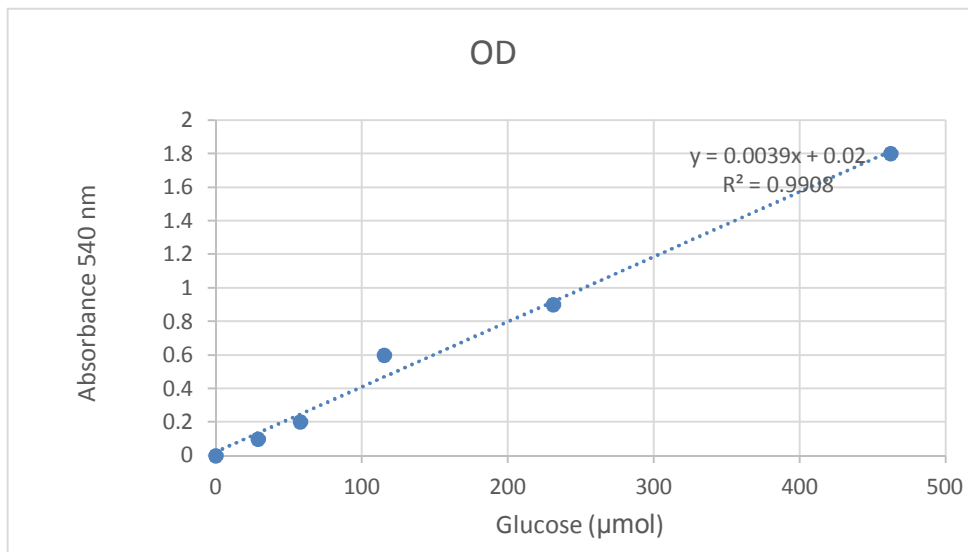
شکل ۴-۱. بررسی الحاق ژن در وکتور بیانی pET26b و تأیید فرآیند کلونینگ بر روی ژل آگارز (۱/v/w). چاهک ۱- کنترل منفی، چاهک ۲- قطعه DNA تکثیر شده توسط واکنش PCR با آغازگرهای F2511 و R2511، قطعه بتاگلوکاناز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بتاگلوکاناز، قطعه بتاگلوکاناز با طول ۱۲۵۱ جفت باز تکثیر گردید. تأیید کلونینگ محصولات واکنش PCR از همسانه‌های مثبت حاصل از ترانسفورماسیون، با آغازگرهای ژن بتاگلوکاناز. چاهک ۳- قطعه DNA تکثیر شده با ۱۲۵۱ جفت باز توسط PCR از همسانه نوترکیب، آزمایش اختلاف حرکت چاهک ۴- pET26b نوترکیب، چاهک ۵- پلاسمید غیرنوترکیب ۵۳۶۰ جفت باز توسط PCR از همسانه نوترکیب. چاهک ۶- همسانه نوترکیب هضم شده با آنزیم‌های برشی و مشاهده‌ی قطعه‌ای با تقریباً طول ۱۲۵۱ جفت باز (طول ژن بتاگلوکاناز) و ۵۳۶۰ جفت باز (طول پلاسمید pET26b)، چاهک M- مارکر



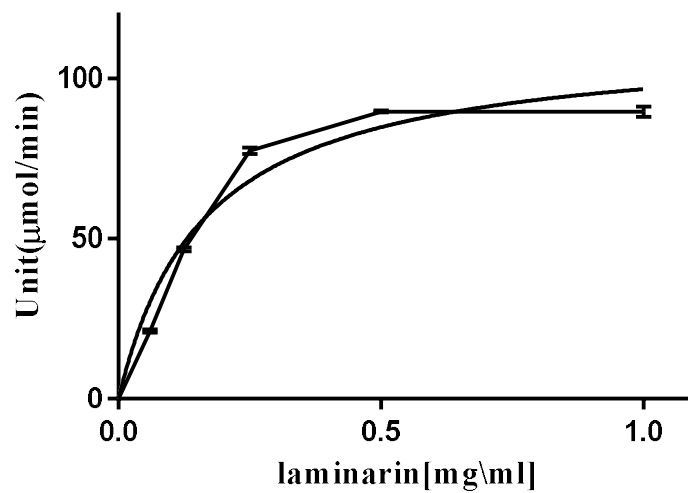
شکل ۴-۲. بیان ژن بتا-۳،۱-گلوکاناز، چاهک ۱: کلونی القا شده با IPTG ۱۶ ساعت، ۲: قبل القای IPTG کنترل منفی، M - مارکر: نشاندهنده خالص سازی پروتئین نو ترکیب. ۳: محلول خروجی از نیکل سفارز که حاوی پروتئین نو ترکیب بتا-۳،۱-گلوکاناز با وزن مولکولی تقریباً ۴۷ کیلو دالتون است.



شکل ۴-۳. - فعالیت آنزیم بتا-۳،۱-گلوکاناز. حاوی نمونه‌ی آنزیم بتاگلوکاناز به همراه مقداری از سوبسترای محلول که در دمای ۶۰ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شده و سپس جهت توقف به واکنش مورد نظر DNS اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده می‌شود. ۲- شاهد. در نمونه‌ی شاهد به جای آنزیم از بافری که آنزیم در آن است، استفاده شده و تمامی شرایط مانند نمونه‌ی حاوی آنزیم می‌باشد.



شکل ۴-۴. نمودار استاندارد به منظور تعیین واحد فعالیت آنزیم. با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز و اندازه‌گیری جذب آن‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر.



شکل ۴-۵. منحنی Michaelis-Menten آنزیم بتاگلوکاناز خالص شده برای محاسبه پارامترهای کاتالیتیک. K_m محاسبه شده برای این آنزیم توسط سوبسترای لامینارین اندازه‌گیری شد.

فعالیت ویژه پروتئین در انتهای خالص سازی (U/mg) ۱۱۲۵ می باشد، در مقایسه با فعالیت ویژه سوپرناتانت که ۱۷۵/۶ می باشد، افزایش یافته است. فولد خالص سازی نیز ۶/۴ با بیش از ۸۰ درصد راندمان خالص سازی می باشد.

۶-۴. تعیین ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز

تاثیر دماهای مختلف بر روی فعالیت آنزیم بررسی شد. دمای ۴۰ تا ۶۰ درجه ی سانتی گراد بهترین دما برای فعالیت بهینه ی آنزیم می باشد. این آنزیم در دمای نزدیک به ۷۰ درجه ی سانتی گراد هم تا ۴۰ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد. (شکل ۴-۶ (A))، پایداری دمایی آنزیم در دماهای مختلف (۱۰ تا ۱۰۰ درجه ی سانتی گراد) به مدت ۹۰ دقیقه و زمان های مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۳۶۰ دقیقه) بررسی شد. (شکل ۴-۶ (B,C)). فعالیت آنزیم در pH های ۲/۵ تا ۱۱/۵ سنجیده شد. بر این اساس بهترین فعالیت آنزیمی در pH برابر با ۵ به دست آمد و در pH های بالاتر و پایین تر از pH بهینه، فعالیت آنزیم تا مقدار خیلی کمی کاهش یافت (شکل ۴-۶ (D)). فعالیت بتا-۱،۳ گلوکاناز نو ترکیب تخلیص شده بعد از قرار گرفتن آنزیم در pH های مختلف به مدت ۹۰ دقیقه بررسی شد و

جدول ۴-۱. مراحل خالص سازی بتا گلوکاناز

| Purification step | Activity (unit) | Specific activity (u.mg ⁻¹) | Protein (mg.ml ⁻¹) | Purification (Fold) | Recovery (%) |
|-------------------|--------------------|--|-----------------------------------|------------------------|-----------------|
| مایع رویی | ۱۴۰/۵ | ۱۷۵/۶ | ۰/۸ | ۱ | ۱۰۰ |
| نیکل سفارز | ۱۱۲/۵ | ۱۱۲۵ | ۰/۱ | ۶/۴ | ۸۰/۰۷ |

سپس نمودار مورد مربوطه رسم گردید. همانطور که در شکل ۴-۶ (E) دیده شد که آنزیم از pH ۴ تا حدود ۸ دارای ۹۰ درصد فعالیت است، بعد از ۵ ساعت انکوبه شدن در pH های مختلف نیز این

موضوع نشان داده که این آنزیم دارای پایداری مناسبی در محیط‌های اسیدی تا خنثی می‌باشد و در pHهای قلیایی نیز تا حدی پایدار می‌باشد. (شکل ۴-۶ (F))

۴-۷. تاثیر یون‌های مختلف در فعالیت آنزیم خالص

از عوامل اصلی تاثیرگذار بر فعالیت آنزیم، کوفاکتورها هستند که به صورت طبیعی در ساختمان آنزیم و یا در محیط وجود دارند که می‌توانند اثر فعال‌کننده و یا بازدارنده را بر روی فعالیت آنزیم داشته باشند. با تعیین اثر بازدارنده‌ها و فعال‌کننده‌های مختلف آنزیمی می‌توان دریافت که آنزیم در حضور این مواد در صنعت چه میزان از فعالیت خود را می‌تواند حفظ نماید. به همین منظور سنجش فعالیت آنزیم با یون‌های فلزی با غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌مولار بررسی شد. با توجه به جدول (۴-۲)؛ فعالیت بتا-۳،۱ گلوکاناز توسط یون‌ها تغییر چندانی نداشته است، یون‌هایی مانند مس فعالیت آنزیم را تا ۳۵ درصد کاهش داده است، غلظت ۵ میلی‌مولار پتاسیم نیز فعالیت آنزیم را ۱۰ درصد کاهش داد، اوره تا غلظت ۵۰ میلی‌مولار نتوانست فعالیت آنزیم را کاهش دهد و سایر یون‌ها نیز تاثیری نداشت.

۴-۸. مطالعه ی فعالیت آنزیم در حضور مهارکننده‌ها و شوینده‌های مختلف

فعالیت بتا-۳،۱ گلوکاناز در حضور مهارکننده‌ها و دترجنت‌های مختلف در غلظت‌های مختلف از این مواد مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول (۴-۳) هم دیده می‌شود، اغلب شوینده‌ها و سورفاکتانت‌ها اثر منفی بر فعالیت آنزیم ندارند.

۴-۹. تاثیر حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز

اثر حلال‌های آلی در غلظت‌های مختلف بر فعالیت آنزیم نوترکیب بررسی شد. بر اساس شکل حلال-های آلی قطبی فعالیت آنزیم را خیلی کاهش نمی‌دهند و حلال‌های آلی آب‌گریز مانند هگزان نیز فعالیت آنزیم را تغییر چشمگیری نمی‌دهد (جدول ۴-۳)

۴-۱۰. تعیین نیمه عمر آنزیم بتا-۱،۳-گلوکاناز

همانطور که در مواد و روش‌ها نیز توضیح داده شد، نمودار مربوط به نیمه عمر آنزیم بتا-۱،۳-گلوکاناز نیز در شکل (۴-۷) با استفاده از فرمول‌ها ذکر شده در مواد و روش‌ها با استفاده از شیب خط محاسبه گردیده، $1725/3$ دقیقه طول میکشد تا فعالیت آنزیم در دمای 50 درجه‌ی سانتی‌گراد به نصف برسد.

۴-۱۱. بررسی بازدارندگی فعالیت قارچ‌ها در حضور آنزیم بتا-۱،۳-گلوکاناز ایزوله شده از باکتری گرمادوست

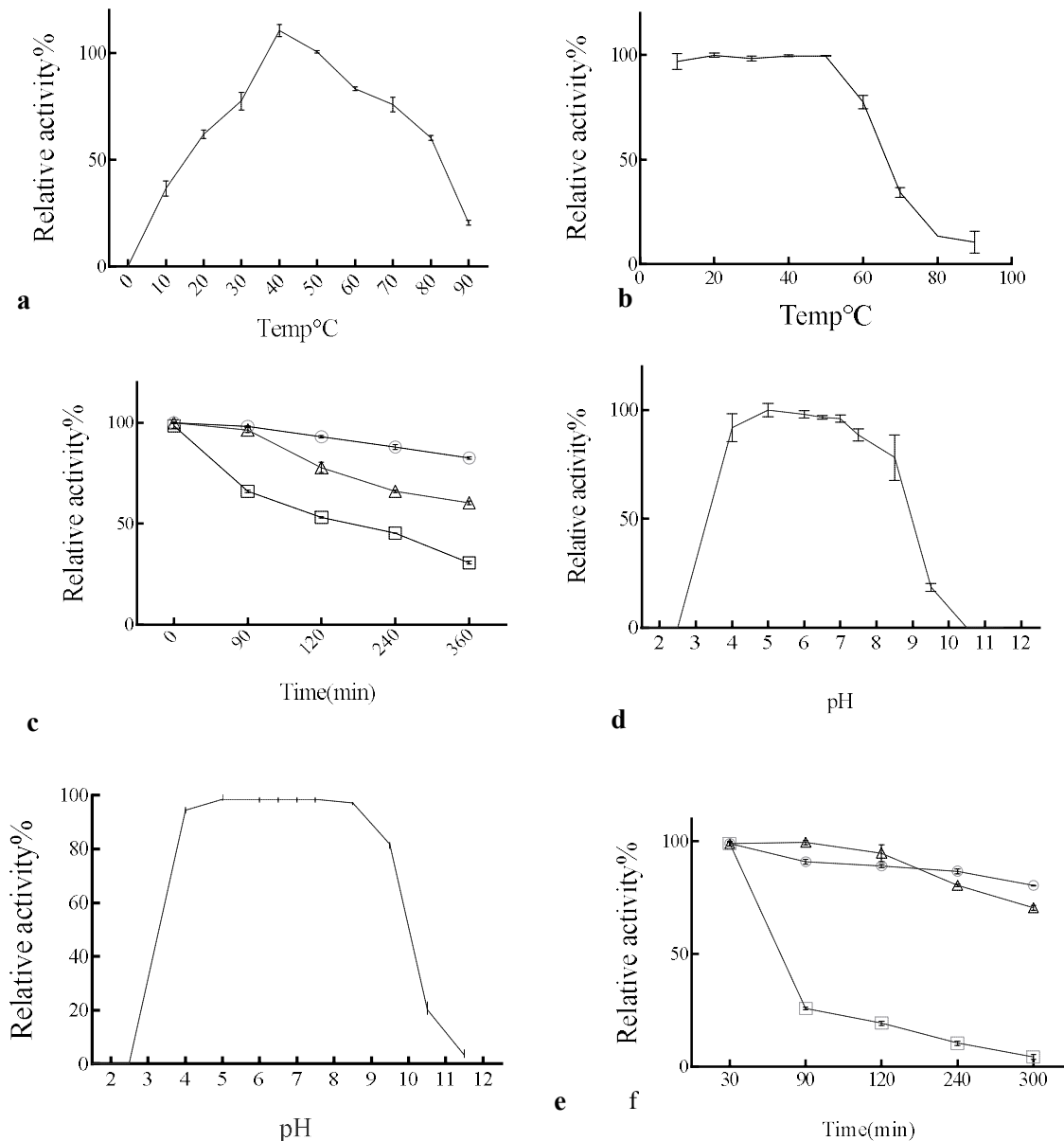
باتوجه به آن که بتا-۱،۳-گلوکانازها از طبقه‌بندی PR-2 ها می‌باشد و باتوجه به این که دیواره‌ی سلولی بسیاری از قارچ‌ها از بتا- گلوکان تشکیل شده است، بتا-۱،۳-گلوکاناز، می‌تواند فعالیت‌های بیماری‌های قارچی را تا حدی کنترل کند، بتا-۱،۳-گلوکاناز ایزوله شده از باکتری بومی کوهنلا قادر به مهار رشدی قارچ *Phytophthora sp.* می‌باشد در حالی که قادر به مهار قارچ *Alternaria sp.* ، *fusarium.sp* و *Sclerotinia sclerotiorum* نمی‌باشد (شکل ۴-۸).

۴-۱۲. آنالیز بیوانفورماتیکی

نتایج بررسی حاصل از هم‌ردیفی توالی آنزیم بتا-۱،۳-گلوکاناز در NCBI نشان داد که این آنزیم ۹۹ درصد شباهت را با توالی بتا-۱،۳-گلوکاناز حاصل از باکتری *Cohnella laeviribosi* دارا می‌باشد. نتایجی که از بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی بتا-۱،۳-گلوکاناز مورد مطالعه گزارش شد شامل، نقطه‌ی ایزوالکتریک ($pI = 5/65$) که به منظور تعیین سیستم‌های بافری مناسب برای تخلیص کاربرد دارد. شاخص ناپایداری تخمینی از میزان پایداری پروتئین‌ها را نشان می‌دهد. پیش بینی می‌شود پروتئین‌هایی با شاخص ناپایداری کمتر از ۴۰ پایدار باشند و مقادیر بالای ۴۰ این شاخص نشان دهنده‌ی غیرپایدار بودن پروتئین است. شاخص آلیفاتیک یک پروتئین به عنوان میزان نسبی زنجیره‌های آلیفاتیک اشغال شده یعنی آمینواسیدهای آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین تعریف می‌گردد. این عامل می‌تواند به عنوان عاملی مثبت برای افزایش پایداری حرارتی در پروتئین‌های کروی



در نظر گرفته شود. در این مطالعه بار خالص بتا-۱،۳ گلوکاناز مورد مطالعه ۰/۳- می باشد؛ بنابراین در کروماتوگرافی تعویض یونی برای تخلیص پروتئین باید از نوع آنیونی استفاده شود.

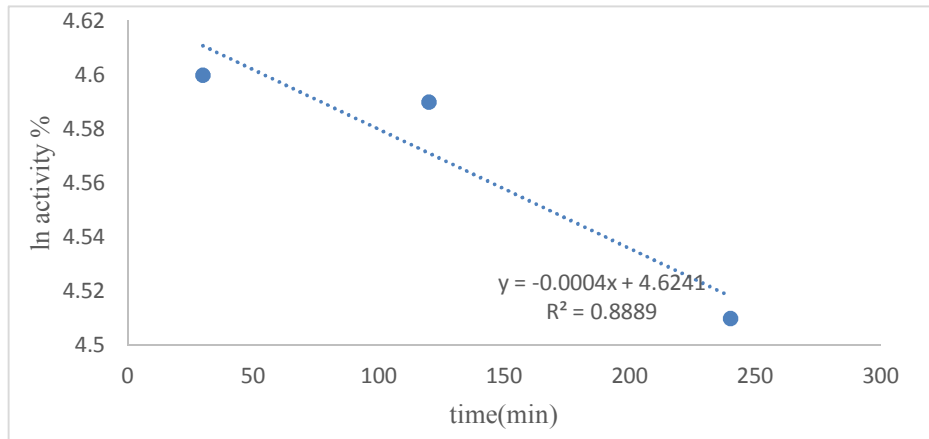


شکل ۴-۶. a. همانطور که در شکل نشان داده شده است، دمای بهینه آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز ایزوله شده از کوهنلا ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد می باشد، b. بررسی پایداری آنزیم نسبت به دما در طول زمان، فعالیت آنزیم در دماهای ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ دقیقه ۱۰۰ درصد بوده است. c. پایداری آنزیم در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بعد از ۹۰ دقیقه نیز ۱۰۰ درصد است، (مربع = ۷۰ درجه سانتیگراد، دایره = ۳۰ درجه سانتیگراد، مثلث = ۵۰ درجه سانتیگراد). d. فعالیت آنزیم در pH بهینه اش نیز مشخص گردید، آنزیم در pH برابر با ۵ دارای بهترین فعالیت می باشد، e. این آنزیم در pH های اسیدی تا قلیایی به مدت ۹۰ دقیقه کاملاً پایدار است. f. بررسی پایداری آنزیم در سه

pH ۵، ۷، ۹ در طول مدت زمان ۹۰ دقیقه، ۱۲۰ دقیقه، ۳۰۰ دقیقه نشان داد که بتاگلوکاناز ایزوله شده از کوهنلا قادر به حفظ ۹۰ درصد از فعالیت خود در pH بهینه‌اش بعد از ۳۶۰ دقیقه می‌باشد، این آنزیم در pH ۷ نیز تا ۷۰ درصد فعالیت خود را بعد از ۳۶۰ دقیقه حفظ کرده است (مربع، pH = ۹، مثلث، pH = ۷، دایره، pH = ۵).

جدول ۴-۲. تاثیر یونها و مواد معدنی بر فعالیت بتا-۱،۳ گلوکاناز

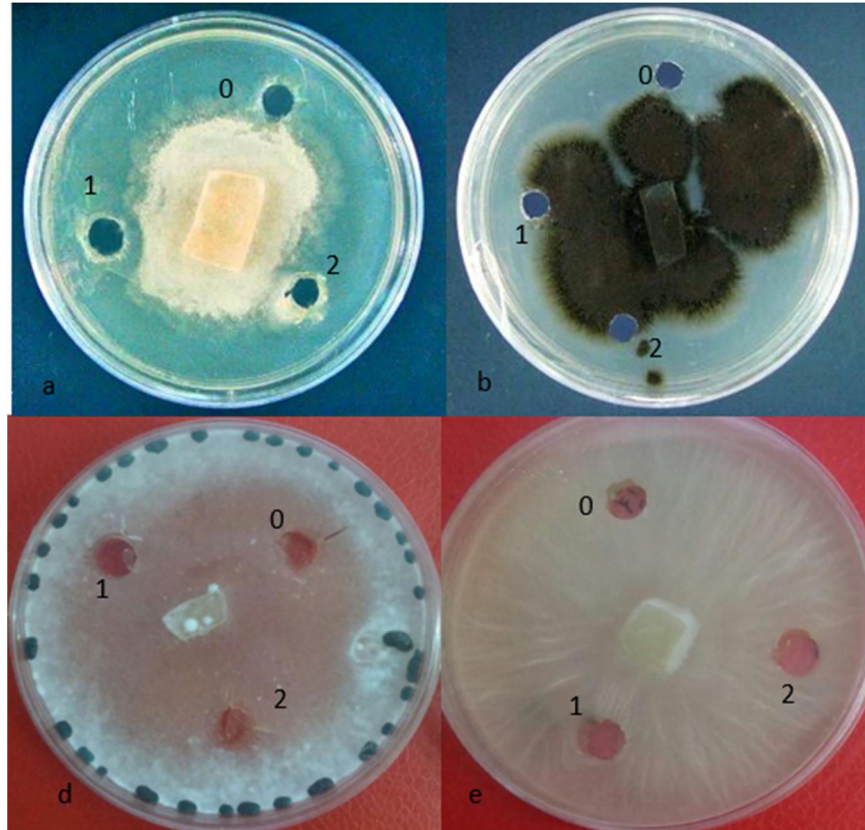
| ترکیبات | غلظت (mM) | فعالیت نسبی (%) |
|-------------------------|-----------|-----------------|
| Control | | 100 ± 4.5 |
| ZnCl₂ | 5 | 101.16 ± 4.3 |
| FeSO₄ | 5 | 95.75 ± 4.1 |
| CuCl₂ | 10 | 87.33 ± 2.5 |
| NaCl₂ | 5 | 107.33 ± 1.4 |
| MnCl₂ | 5 | 106.08 ± 5.2 |
| BaCl₂ | 5 | 99.58 ± 4.6 |
| MgCl₂ | 5 | 109.77 ± 1.8 |
| KCl | 5 | 93.33 ± 3.8 |
| NiSO₄ | 5 | 103.08 ± 4.32 |
| CoCl₂ | 5 | 110.25 ± 4.2 |
| CaCl₂ | 5 | 105.91 ± 1.37 |
| AgSO₄ | 5 | 100.50 ± 4.5 |
| HgSO₄ | 5 | 77.37 ± 0.9 |
| Iodoacetic acid | 5 | 100.50 ± 4.5 |
| PMSF | 10 | 100.84 ± 0.7 |
| NaN₃ | 10 | 100.34 ± 0.8 |
| Urea | 50 | 100.43 ± 1.7 |
| EDTA | 10 | 103.83 ± 2.02 |



شکل ۴-۷. نمودار مربوط به نیمه عمر آنزیم بتا-۱،۳ گلوکاناز

جدول ۴-۳. تاثیر دترجنت و مواد شوینده (۲-ME: مرکاپتواتانول، سدیم دو دسیل سولفات) و حلال های آلی Act (استون)، Et OH (اتانول)، MtOH (متانول)، IsCH (ایزوپروپانول) بر فعالیت بتا-۱،۳ گلوکاناز

| | Relative activity (%) | | | | |
|--------------|-----------------------|-----------------|---------------|--------------|--------------|
| | 1% | 5% | 10% | 20% | 50% |
| Control | 100 | - | - | - | - |
| Triton X-100 | - | - | 100.36 ± 0.59 | 74.45 ± 0.87 | - |
| SDS | 99.71 ± 1.092 | 1.531531 ± 0.31 | - | - | - |
| 2-ME | 82.18 ± 0.22 | - | 10.27 ± 4.58 | - | - |
| Tween 20 | - | - | 27.90 ± 4.80 | 21.74 ± 3.17 | - |
| Act | - | - | 97.52 ± 3.33 | 76.46 ± 0.25 | 75.34 ± 0.25 |
| Et OH | - | - | 99.97 ± 0.03 | - | 99.95 ± 0.09 |
| MtOH | - | - | 99.40 ± 0.09 | 76.42 ± 0.87 | 76.04 ± 1.3 |
| IsOH | - | - | 95.63 ± 4.81 | 83.98 ± 2.51 | - |
| N-hexan | - | - | 99.57 ± 1.42 | 97.52 ± 3.33 | - |
| Glycine | - | - | 62.57 ± 6.26 | 46.23 ± 3.49 | - |



شکل ۴-۸. بررسی اثر مھاری قارچی توسط آنزیم بتا-۱، ۳ گلوکاناز. نشان می‌دهد که آنزیم بتا-۱، ۳ گلوکاناز، قادر به مھار بیماری قارچی *Phytophthora sp* است. در تمامی اشکال، ۰- نمونه‌ی شاهد (بافری که آنزیم داخل آن می‌باشد)، ۱- آنزیم بتا-۱، ۳ گلوکاناز، ۲- آنزیم جوشیده شده، همانطور که در شکل نیز مشاهده می‌گردد، *a-Phytophthora sp.* اثر ضدقارچی آنزیم مشاهده گردید، *b-قارچ Fusarium.sp* هیچ مھار رشدی گزارش نشد است *d- قارچ Sclerotinia sclerotiorum* هیچ مھار رشدی نداشته است، *e- Alternaria . sp* نیز فعالیت مھاری مشاهده نگردید.

شاخص ناپایداری این آنزیم ۳۱/۸۵ می‌باشد و در نتیجه این آنزیم در گروه پروتئین‌های پایدار قرار می‌گیرد. ضریب آلیفاتیک این آنزیم برابر با ۷۳/۳ می‌باشد که می‌توان فهمید این آنزیم تقریباً دارای پایداری حرارتی است. مدت زمانی که طول می‌کشد تا نیمی از پروتئین تولید شده از بین برود نیمه عمر پروتئین می‌گویند. وزن مولکولی این آنزیم نیز ۴۷ کیلودالتون پیش بینی شد، نرم افزار (ProtParam) با در نظر گرفتن آمینواسیدهایی که در N-ترمینال پروتئین وجود دارد می‌تواند نیمه عمر پروتئین را پیش بینی کند.

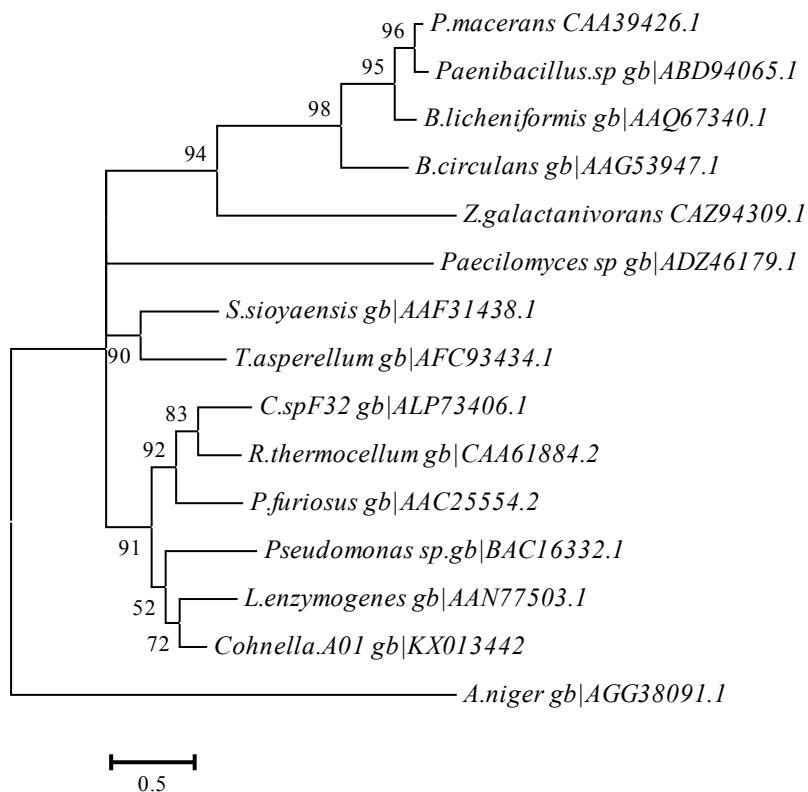
بررسی وجود سیگنال پپتید. برای مشخص نمودن پپتید نشانه از signalp 4.1 استفاده شد، برای وجود پپتید نشانه باید نمره D بالاتر از ۰/۴۵ درصد باشد. نمره پیش بینی شده برابر با ۰/۵ بود و وجود سیگنال پپتید را تایید کرد. در پروتئین بتا-۳،۱ گلوکاناز بیان ترشحی به مقدار کمی دیده شده است، چرا که در وکتور بیانی نیز قسمت سیگنال پپتید حذف گردیده است.

در این مطالعه پس از این که توالی‌های حاصل از بلاست با استفاده از برنامه‌ی Clustal W هم‌ردیف^۱ شدند و درخت فیلوژنتیکی^۲ به کمک نرم افزار MEGA 6.06 ترسیم گردید. همانطور که در شکل (۴-۹) مشخص است؛ بتاگلوکاناز مورد بررسی بیش‌ترین رابطه‌ی خویشاوندی را با بتا-۳،۱ گلوکانازها دارد، از نظر تکاملی توالی پروتئین بتا-۳،۱ گلوکاناز در باکتری بومی *CohnellaA01* با توالی پروتئین مذکور در NCBI و توالی‌هایی که بررسی‌های بیوشیمیایی و کریستالوگرافی آن‌ها نیز انجام شده بود مورد بررسی قرار گرفت.

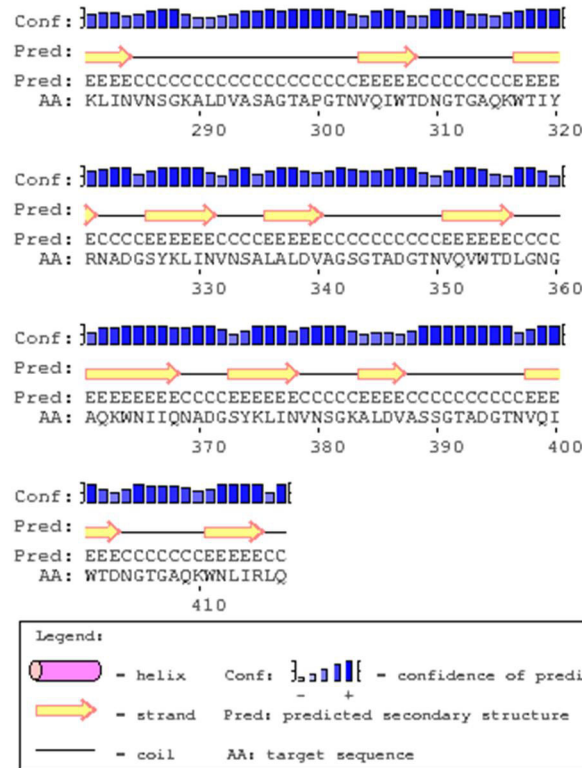
پیش بینی ساختار دوم پروتئین نیز با استفاده از سایت Psipred بررسی گردید، همانطور که در شکل (۴-۱۰) نشان داده شده‌است، مطالعات انجام شده حاکی از آن است که بتا-۳،۱ گلوکاناز از ۵۶ درصد از صفحات β -sheet تشکیل گردید، از ۲ درصد α -H و ۴۶ درصد نیز Coil تشکیل شده است.

با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Prosite توالی دومین مربوط به بتاگلوکاناز دریافت و با توجه به هم‌ردیفی با سایر پروتئین‌های بتاگلوکاناز موجود که کریستالوگرافی آن‌ها انجام شده‌بود، ناحیه‌ی مربوط به جایگاه فعال نیز شناسایی شد. این ناحیه شامل سه اسید آمینه گلوتامیک، آسپاراتیک اسید و گلوتامیک بوده که این اسیدهای آمینه در تمامی بتاگلوکانازها به صورت حفاظت شده‌ای تکرار شده- است.

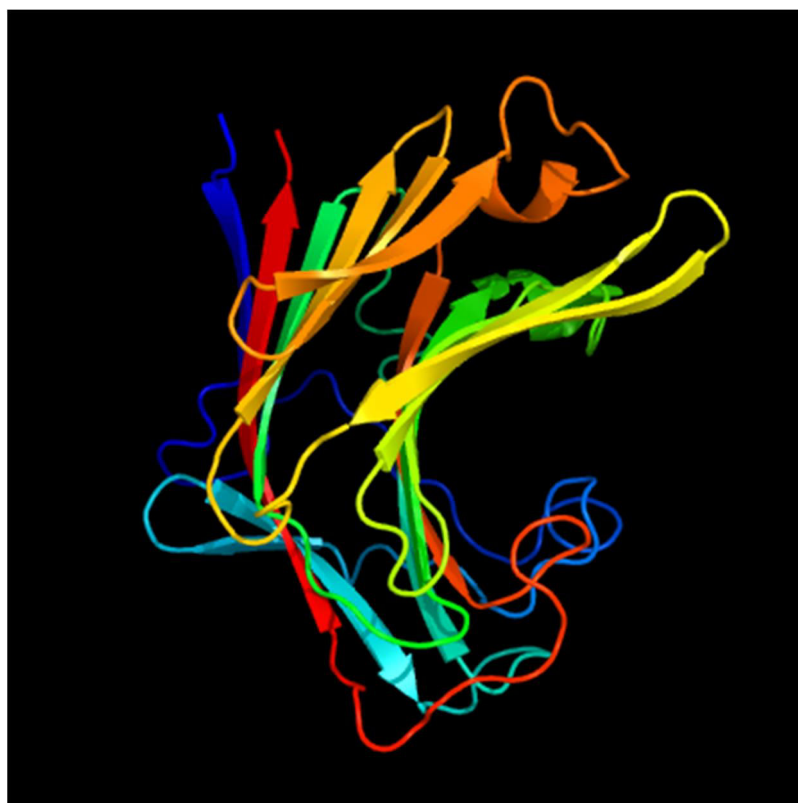
ساختار سه بعدی بتا-۱،۳ گلوکاناز با توجه به توالی‌هایی که کریستالوگرافی شده‌اند، مدلینگ گردید. این توالی‌ها حدوداً با توالی پروتئینی موجود در این تحقیق تا ۶۴ درصد تشابه دارند، در شکل زیر ساختمان سوم پیشنهاد شده براساس توالی کریستالوگرافی شده با لامیناریاز حاصل از ZgLamCGH16 from *Zobellia galactanivorans* گزارش شده‌است شکل (۴-۱۱).



شکل ۴-۹ درختچه ی فیلوژنتیک. درختچه ی فیلوژنی با استفاده از نرم افزار Mega6.06 با بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار رسم شد. براساس بیشترین شباهت های که در مورد مطالعات انجام شده بر حسب بررسی های کینتیکی و بیوشیمیایی بروی آنزیم بتاگلوکانازهای مشابه انجام شده است، بلاست پروتئینی توالی پروتئینی بتا-۳،۱ گلوکاناز ایزوله شده با سایر بتاگلوکانازهایی که از نظر توالی با پروتئین موجود در این تحقیق مشابهت داشته اند هم ردیفی گردید و مشخص شد که بیشترین شباهت را از نظر تکاملی به پروتئین های بتا-۳،۱ گلوکاناز دارد ولی به طور کاملا مشخصی با بتا-۴،۱ گلوکاناز که به عنوان اوتوگروپ می باشد از نظر تکاملی متفاوت است.



شکل ۴-۱۰ بررسی ساختار دوم بتا-۱،۳ گلوکاناز با استفاده از سایت Psipred. همانطور که در شکل نیز مشاهده گردید ۵۶ درصد از صفحات بتا، از ۲ درصد آلفا هلیکس و ۴۶ درصد نیز کوئل تشکیل شده است.



شکل ۴-۱۱. پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین بتا-۳،۱-گلوکاناز، از دو دومین تشکیل شده است. این دو دومین مربوطه به دومین کاتالیتیکی و دومین باندشونده می‌باشد که در اکثر بتا-گلوکانازها این دومین‌ها گزارش شده‌است. دومین باندشونده دارای بخشی به نام (ig-like) است که این ناحیه از نظر عملکردی جهت اتصال بهتر سوبسترای پلی‌ساکاریدی می‌باشد. این توالی با توالی بتا-۳،۱-گلوکاناز این تحقیق تا ۶۴ درصد شباهت توالی با ZgLamCGH16 from *Zobellia galactanivorans* دارد و بنابراین می‌توان مدل مناسبی باشد (چن و همکاران، ۲۰۱۳)

فصل پنجم، بحث و پیشنهادات

آنزیم‌ها، ابزار مهمی در پزشکی، صنعت، شیمی، داروسازی و کشاورزی می‌باشند که در چند دهه‌ی اخیر به عنوان بیوپلی‌مرهای مناسب در تغییر و تبدیل ترکیبات در صنایع مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پیشرفت‌های به دست آمده در زمینه‌ی تکنولوژی DNA نوترکیب و فرآیندهای تولید سوخت زیستی، امکان تولید آنزیم‌های خالص با ساختاری تغییر نیافته در مقیاس گسترده را فراهم آورده است. این امر موجب کاربرد گسترده‌ی آنزیم‌ها در محصولات صنعتی متنوعی مانند صنایع شیمیایی شوینده، کاغذسازی، غذایی و منسوجات شده است. پیشرفت‌های اخیر در مهندسی پروتئین محققان را قادر ساخته است تا به تولید آنزیم‌هایی مناسب با فعالیت‌های جدید و یا برای استفاده در شرایط جدید بپردازند. اغلب آنزیم‌های صنعتی امروز توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و تعداد زیادی از فرآیندهای آنزیمی نوین هم‌اکنون با فرآیندهای شیمیایی متداول و مرسوم تولید آنزیم جایگزین شده است. به‌علاوه امروزه، آنزیم‌های میکروبی به طور گسترده‌ای جایگزین آنزیم‌های مرسوم حاصله از منابع گیاهی و جانوری شده‌اند و غالباً به صورت نوترکیب تولید می‌شوند (سایا و همکاران، ۲۰۱۰).

در سال‌های اخیر، با توجه به کاربردهای صنعتی فراوان آنزیم تجزیه‌کننده‌ی دیواره‌ی سلولی گیاهان و مخصوصاً سلولز، تولید و بررسی آن رشد چشمگیری داشته است. اندوبتا-۳،۱ گلوکانازها توسط طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌ها شامل آرکی‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان تولید می‌گردند. امروزه جداسازی و تعیین ویژگی‌های اندوبتا-۳،۱ گلوکانازهای جدید از باکتری‌ها به طور گسترده‌ای در حال انجام است که دلایل آن از جمله موارد زیر می‌باشند، باکتری‌ها اغلب نسبت به قارچ‌ها دارای سرعت رشد بیشتری هستند و در نتیجه تولید نوترکیب بیشتر این آنزیم‌ها را به دنبال دارند، باکتری‌ها توانایی سکونت در طیف گسترده‌ای از محیط‌های زیستی و صنعتی را دارا می‌باشند مانند باکتری‌های گرمادوست، سرمادوست، قلیادوست، اسیددوست، نمک‌دوست که این باکتری‌ها می‌توانند سویه‌های سلولیتیکی با مقاومت زیاد در برابر این استرس‌های محیطی باشند (مارکی و همکاران، ۲۰۰۹).

در اواخر دهه‌ی ۱۹۸۰ اولین آنزیم‌های ترموفیل خالص‌سازی و مشخص شدند که در دامنه‌ی دمایی بالا نسبت به دماهای پایین فعالیت بیشتری داشته‌اند. محققان دریافتند که این آنزیم‌ها می‌توانند در میزبان‌های مزوفیل با حفظ فرم فضایی فعال و قابلیت تحمل حرارت کلون و بیان شوند.

باکتری‌های ترموفیل به طور متداول در خاک‌های آتشفشانی به عنوان زیستگاه وجود دارند، همچنین این باکتری‌ها محدود می‌باشد، دمای بهینه‌ی رشد باکتری‌های ترموفیل دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد. باکتری‌های گرمادوست در مقابل با باکتری‌های مزوفیل مشابه، نرخ بالایی از تولید آنزیم‌هایی با ثبات و پایداری با بازدهی محصول نهایی را دارند. فرآیندهای گرمادوست با ثبات‌تر، سریع و ارزان، به نظر می‌رسند و همچنین به‌عنوان تسهیل‌دهنده‌ی فعالیت‌های واکنشی و بازیابی محصول می‌باشد. باکتری‌های گرمادوست در تولید مواد خام شیمیایی، تولید سوخت، تبدیل سوخت زیستی از ضایعات کاربرد دارد، با توجه به اهمیت و کاربرد باکتری‌های ترموفیل در این طرح از باکتری‌های گرمادوست جداسازی شده از استخر پرورش میگوی آبادان استفاده شد و به بررسی و تکثیر ژن مورد نظر و بیان و خالص‌سازی ژن بتا-۳،۱ گلوکاناز در میزبان بیانی *E. coli* پرداخته شد. باکتری کوهنلا در گروه باکتری‌های ترموفیل (گرمادوست) قرار گرفته است. سویه‌های مختلفی از این باکتری‌ها شناسایی شده است که خصوصیت کلی همه‌ی این سویه‌ها میله‌ای شکل بودن آن‌ها می‌باشد همچنین اغلب آن‌ها گرم مثبت و بی‌هوازی هستند. این باکتری از نواحی مختلفی مانند خاک، آب و نواحی آتشفشانی جداسازی شده است. برخی از گونه‌های معروف باکتری کوهنلا شامل: گونه‌ی کوهنلا ترموتولرانس از نوعی نشاسته صنعتی در سوئد استخراج شده و میله‌ای شکل، گرم مثبت و دارای اندوسپور است. در این پژوهش باکتری کوهنلا از دریاچه‌ی آب گرم آبادان توسط تیم گروهی دکتر سعید امین زاده و همکاران ایزوله گردید.

در سال‌های اخیر تلاش‌هایی به منظور به دست آوردن آنزیم‌های خالص از پروتئین‌هایی که توسط ژن‌های خاص کد می‌شوند یا از میکروارگانیسم‌های مناسب برای افزایش فعالیت آنزیم نسبت به انواع به

دست آمده از منابع طبیعی، صورت گرفته است. باکتری *E. coli* معمول‌ترین میزبانی است که برای بیان بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب چه در مقیاس صنعتی و چه در مقیاس‌های دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد و دلیل این امر شاخصه‌های مثبت این باکتری از جمله قابلیت بالا در پذیرش ژن‌های خارجی، تکثیر سریع و آسان میزان بیان بالای پروتئین نوترکیب در زمانی کوتاه می‌باشد (فرخی و همکاران، ۲۰۰۹)، از طرف دیگر وجود دانش زیاد در مورد ویژگی‌های ژنتیکی و بیولوژی مولکولی، در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل‌های همسانه‌سازی و گونه‌های میزبانی جهش یافته این باکتری منجر به کاربردی بودن آن شده است (بنیکس، ۱۹۹۹)، از این باکتری در نخستین آزمایش‌های همسانه‌سازی برای تولید انسولین به عنوان یک پروتئین دارویی، توسط Lilly و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (کاندولفی و همکاران، ۲۰۰۹). *Escherichia coli* متداول‌ترین میزبانی است که برای بیان بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد (لایو و همکاران، ۲۰۱۴). امروزه بیش از ۵۰۰ نوع پروتئین نوترکیب که اکثراً دارای کاربردهای دارویی هستند در *Escherichia coli* تولید شده اند (گوتای و روتبوم، ۱۹۹۹).

تاکنون اندوبتاگلوکانازهای ترموفیل زیادی از منابع گوناگونی مثل باکتری متحمل به حرارت *Clostridium thermocellum* (چن و همکاران، ۲۰۱۵)، *Pyrococcus furiosus* (گوئگون و همکاران، ۱۹۹۷)، *Thermotoga maritima* (جنگ و همکاران، ۲۰۱۱)، جداسازی شده‌است. آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز به‌طور گسترده‌ای در میان باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان توزیع شده‌اند و به طور کلی به دو دسته‌ی اندوبتا-۳،۱ گلوکاناز (EC3.2.1.6) و اگزوبتا-۳،۱ گلوکاناز (EC 3.2.1.39) که به ترتیب داخلی و قسمت انتهایی پیوندهای گلیکوزیدی را هیدرولیز می‌کند تقسیم می‌شوند. آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز همانطور که در مطالب فصل اول ذکر شد جزو خانواده‌ی GH16 است و شامل ۳ اسیدآمین (۲) اسید آمینه گلوتامیک اسید و یک اسپاراتیک اسید) در ناحیه جایگاه فعال خود می‌باشد که به صورت حفاظت شده‌ای تکرار شده‌است (کوتا و همکاران، ۲۰۱۱).

جست‌وجوی شباهت براساس توالی پروتئینی با استفاده از بلاست پروتئینی در سایت NCBI انجام شد. با توجه به شباهت این پروتئین با پروتئین‌های بتاگلوکاناز دیگر، این پروتئین بتاگلوکاناز نام گرفت زیرا بیشترین شباهت را با گلیکوزیدهیدرولازهای خانواده‌ی ۱۶ داشت. همچنین با توجه به اطلاعاتی که در NCBI یافت شد، بررسی همولوژی مربوط به اندوبتا-۳،۱ گلوکانازها نشان می‌دهد که بتاگلوکانازهای خانواده‌ی گلیکوزیل هیدرولازها دارای ناحیه N ترمینال هستند که شامل کاتالیتیک دومین و ناحیه‌ی C ترمینال که دومین شبه ایمونوگلوبولین (IG-LIKE) نامیده می‌شود هستند، که ناحیه‌ی (ig-like) نقش بسیار مهمی در بتا-۳،۱ گلوکانازها دارد، اما فعالیت بیوشیمیایی این بخش در بتا-۳،۱ گلوکانازهای باکتریایی خیلی کم شناخته شده است (چنگ و همکاران، ۲۰۱۴)، برای بیان پروتئین نوترکیب، چه در مقیاس آزمایشگاهی و چه در مقیاس صنعتی؛ بیشتر از سیستم بیانی پروکاریوتی و معمولاً *E. coli* استفاده می‌شود. سیستم پروکاریوتی اجازه بیان بالای پروتئین نوترکیب را در زمان کوتاهی می‌دهد، تهیه‌ی محیط کشت آن آسان و ارزان است، مکانیسم رونویسی و ترجمه-ی آن به خوبی شناخته شده می‌باشد و پروتئین‌های مضر با دستکاری ژنتیکی غیرفعال شده‌است. قطعه‌ی ۱۲۵۱ bp در پلاسمید pET-26b (+) همسانه‌سازی و به صورت موفقیت‌آمیزی ژن بتاگلوکاناز در باکتری بیان شد و بررسی‌های ژل SDS-PAGE نشان می‌دهد که بتا-۳،۱ گلوکاناز تولید شده اغلب در داخل سلول انباشته می‌شود، بنابراین به منظور خالص‌سازی پروتئین، سلول‌ها شکسته شدند و ترکیبات حاصل برای کروماتوگرافی میل‌ترکیبی استفاده شد. همچنین فعالیت اندوگلوکانازی با استفاده واکنش آنزیمی بررسی و تعیین گردید. حداکثر فعالیت آنزیم تخلیص شده در دمای ۴۰ تا ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد، نتایج به دست آمده عنوان می‌کند که این آنزیم می‌تواند یک آنزیم گرمادوست باشد. همچنین نتایج به دست آمده نشان داد که این اندوبتا-۳،۱ گلوکاناز حتی در دماهای بالاتر از دمای بهینه نیز به میزان بالایی فعال است. مطالعات پایداری حرارتی نشان می‌دهد که آنزیم در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه نیز پایدار می‌باشد.

اولین بار خصوصیات مولکولی آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز گرمادوست از *Archaeon. Pyrococcus furiosu* (۱۹۹۷) گزارش داده شد، این بتاگلوکاناز از باکتری شدیداً گرمادوست *Archaeon* که بیشترین فعالیتش در دماهای بالا می‌باشد ایزوله شده‌است، که بیشترین فعالیتش در دماهای ۱۰۰ تا ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد بوده (گوئگون و همکاران، ۱۹۹۷)، بتا-۳،۱ گلوکاناز گرمادوست ایزوله شده از *Clostridium Thermocellum* (CtLic16A) نیز دارای بهترین فعالیت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد، ۸۰ درصد از فعالیتش را در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه حفظ می‌کند و سرعت نسبی‌اش ۲۵ درصد در دمای ۸۵ درجه به مدت ۵ دقیقه کاهش پیدا می‌کند، این آنزیم همچنین در دمای ۹۰ درجه ۴۰ درصد فعال می‌باشد (چنگ و همکاران، ۲۰۱۵)، بتا-۳،۱ گلوکاناز حاصل از باکتری *Bacillus subtilis* بهترین فعالیتش در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و ۵۴ درصد از فعالیتش را در مدت ۶۰ دقیقه نگه‌می‌دارد (مسیمالانی و همکاران، ۲۰۱۳)، بتا-۳،۱ گلوکاناز حاصل از *Bacteroides succinogenes* بهترین فعالیتش در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و آنزیم بعد از ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۵۰ درصد از پایداری خودش را از دست می‌دهد (ارفتن و همکاران، ۱۹۸۸)، همچنین آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز از *Streptomyces sioyaensis* جداسازی و در میزبان بیانی *E. coli* بیان گردید این آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه دارای بهترین فعالیت بود (هونگ و همکاران، ۲۰۰۲)، آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز خالص‌شده از *Streptomyces sioyaensis* دارای بهترین فعالیت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز خالص شده از *Arthrobacter sp* دارای بهترین فعالیت در دمای ۵۰ درجه می‌باشد، با این حال این آنزیم قادر به حفظ پایداری در دمای ۵۰ درجه بعد از دو ساعت نمی‌باشد (پنگ و همکاران، ۲۰۰۴)، این در حالی است که آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز ایزوله شده در این تحقیق (CohLam) قادر به حفظ پایداری و فعالیت در دمای ۵۰ درجه بعد از ۵ ساعت نیز می‌باشد.

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، نشان می‌دهد که آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز ایزوله شده از باکتری گرمادوست کوهنلا در دمای ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد از بیشترین فعالیت نسبی برخوردار می‌باشد این آنزیم می‌تواند ۵۰ درصد از فعالیتش را بعد از ۵ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حفظ کند، همچنین این آنزیم پایداری‌اش در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه به ۲۵ درصد می‌رسد. بنابراین با توجه به پایداری این آنزیم در دماهای بالا و همچنین کاربرد این آنزیم در صنایع تخمیر و تهیه‌ی تغذیه‌ی دام و طیور، می‌توان از این آنزیم در صنایع تهیه‌ی تغذیه‌ی دام و طیور نیز که نیاز به فشار بالا و دمای بالا است استفاده کرد. اگرچه بهترین دما برای بتا-۳،۱ گلوکانازها محدوده‌ی دمایی ۴۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در تحقیق حاضر مشخص شد که بتاگلوکاناز در دمای بیشتر از ۵۰ نیز فعال است، اما این آنزیم در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد پایدارتر است، مشابه با چنین موردی در تحقیقی دیگر نیز گزارش شده است (لیلاسوپاکول و همکاران، ۲۰۰۶).

از اوایل دهه‌ی ۱۹۹۰، سلولازها به منظور اهداف شست‌شو، جزئی از شوینده‌ها شده‌اند. همچنین سلولازها به عنوان عوامل روشن‌کننده و نرم‌کننده نیز در این صنایع استفاده می‌شوند. از این رو برای استفاده از سلولازها به عنوان عوامل شوینده، تغذیه‌ی دام و طیور، صنایع کشاورزی (کنترل بیولوژیک) آنزیم باید بتواند در دمای بالا فعال، تحت شرایط قلیایی پایدار و به عوامل دنا توره‌کننده و اکسیدکننده و حلال‌های آلی مقاوم باشد. اثر pH روی فعالیت آنزیم در محدوده‌ی ۱/۵ تا ۱۲/۵ بررسی گردید. پروفایل فعالیت آنزیم نشان می‌دهد که آنزیم در pH برابر با ۵ دارای بیشترین میزان فعالیت می‌باشد. این بتا-۳،۱ گلوکاناز توانایی نگه داشتن فعالیتش در بالای ۹۰ درصد را از pH ۴ تا ۸/۵ بعد از ۹۰ دقیقه را دارا می‌باشد. این آنزیم در pH برابر با ۹/۵ بعد از ۹۰ دقیقه ۷۰ درصد فعالیت خود را حفظ می‌کند و در pH های ۱۰/۵، ۱۱/۵ به ترتیب ۲۰ درصد و ۱ درصد پایدار می‌باشد، این آنزیم در pH برابر با ۵ بعد از ۵ ساعت نیز ۱۰۰ درصد فعال می‌باشد، همچنین در pH برابر با ۷ بعد از ۴ ساعت تا

۸۰ درصد فعال می‌باشد. اندوبتا-۳،۱ گلوکاناز حاصل از *Arthrobacter sp* دارای pH بهینه برابر با ۶/۵ و پایداری بین pH ۵ تا ۸ می‌باشد (پنگ و همکاران، ۲۰۰۴)، آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز حاصل از *Trichoderma harzianum* در pH برابر با ۵ دارای بیشینه فعالیت خود می‌باشد، بهینه‌ی دمای این آنزیم ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد (دی‌مارکو و فلیکس، ۲۰۰۷)، در تحقیقی دیگر روی اندوبتا-۳،۱ گلوکاناز نو ترکیب حاصل از *Lysobacter enzymogenes* نشان داده شد که بهترین فعالیت در pH برابر با ۴/۵ و دمای ۴۵ درجه‌سانتی‌گراد می‌باشد (پائولو و کوبایاشی، ۲۰۰۳)، در گزارشی مشابه نیز اندوبتا گلوکاناز حاصل از *Aspergillus niger* بهترین فعالیتش در دما و pH برابر با ۵۰ درجه-سانتی‌گراد و ۵ می‌باشد، این آنزیم قادر به حفظ پایداری‌اش در دمای بالاتر از ۵۰ و pH برابر با ۵-۶ به ترتیب تا ۸۰ و ۶۰ درصد است (فام و همکاران، ۲۰۱۲).

بتا گلوکاناز ایزوله شده از *Thermophilic Talaromyces emersonii* بیشترین فعالیت را در pH برابر با ۴/۵ دارد همچنین بهترین فعالیتش در دمای ۷۰ درجه‌سانتی‌گراد می‌باشد (ونگ و همکاران، ۲۰۱۴)، در واقع تا یک حدی مشابه به آنزیم مورد بررسی در این تحقیق است، در واقع بیشتر اندوبتا-۳،۱ گلوکانازها دارای فعالیت بهینه در pH برابر با خنثی و اسیدی می‌باشند همینطور گزارش شده-است که بتا گلوکانازها بیشترین فعالیت را در pH اسیدی دارند (لیلاسوپاکول، ۲۰۰۶).

به طور کلی خصوصیات بیوشیمیایی بتا-۳،۱ گلوکاناز گرمادوست این پژوهش نسبت به سایر بتا-۳،۱ گلوکانازهایی که گزارش شده‌است تفاوتی چندانی ندارد و در دمای ۴۰-۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بهترین فعالیت را دارد همچنین نسبت به سایر بتا-۳،۱ گلوکانازها پایداری بالایی در دماهای بالا دارد به طوری که در دمای ۷۰ درجه‌سانتی‌گراد تا ۵ ساعت نیز فعال است، این آنزیم مانند سایر بتا-۳،۱ گلوکاناز بخش اعظمی از فعالیتش در pH برابر ۴-۶ می‌باشد لازم به ذکر است مزیت بتا-۳،۱ گلوکاناز این تحقیق قادر به انجام فعالیت در pHهای قلیایی نیز است و این امر یک امتیاز برتر این آنزیم است.

بیشترین pH گزارش شده در مورد بتا-۳،۱ گلوکانازها در باکتری‌های گرمادوست نیز pH برابر با ۴-۶ می‌باشد و باتوجه به پایداری در pH های قلیایی می‌توان از این آنزیم در صنایع تهیهی آبجو و مالت گیری و فرآیندهای تخمیری استفاده نمود، چنانچه در بررسی‌های مربوط به بتا-۳،۱ گلوکاناز در این تحقیق نیز این‌گونه بوده است. بنابراین آنزیم ایزوله شده در این تحقیق مشابه با تحقیقات دیگری که گزارش شده است می‌باشد. برای استفاده‌ی صنعتی از آنزیم نیاز به مطالعات روی فعالیت و پایداری آنزیم در حضور یون‌های فلزی، مهارکننده‌ها، سورفاکتانت‌ها و حلال‌های مختلف است. تغییرات ساختمانی که روی ساختمان پروتئین در حضور یون‌ها اتفاق می‌افتد ممکن است به علت تغییرات جایگاه فعال آنزیم باشد. فعالیت در برخی از آنزیم‌ها به حضور یون‌های فلزی محیط واکنش وابسته است. در این آنزیم‌ها یون در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و باعث فعالیت کاتالیتیکی آنزیم می‌شود. به این نوع از آنزیم‌ها، متالوآنزیم^۱ گفته می‌شود. در این تحقیق تاثیر کاتیون‌ها در غلظت ۵ و ۱۰ میلی-مولار روی فعالیت آنزیم بررسی شد. یون‌های کلسیم، کبالت، منگنز، منیزیم، سدیم و روی تاثیر زیاد و فزاینده‌ای روی فعالیت آنزیم نداشتند ولی تا حدود ۲۰ درصدی افزایش فعالیت را باعث شدند، در حالی که یون‌های مس، آهن، پتاسیم و جیوه باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌گردند. در تحقیق دیگر روی آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز انجام شده نشان داد که آهن فعالیت آنزیم را کم کرده و کلسیم فعالیت را افزایش داده است (دی‌مارکو و فلیکس، ۲۰۰۷)، همچنین در تحقیقی دیگر یون نیکل موجب کاهش فعالیت آنزیم شده است در حالی که در تحقیق حاضر یون نیکل تاثیری بر فعالیت آنزیم نگذاشته است (فام و همکاران، ۲۰۱۲)، می‌توان گفت که فعالیت آنزیم در حضور یون‌های نیکل، باریم، نقره، تفاوت خاصی نمی‌کند، این نشان می‌دهد که یون‌ها در جایگاه فعال آنزیم نقشی ندارند. مشابه با این تحقیق یون‌های کلسیم و منیزیم فعالیت اندوگلوکاناز از *Ganoderma lucidum* را افزایش می‌دهند، که می‌توان گفت یون‌های دوقطبی کلسیم و منیزیم جهت افزایش فعالیت آنزیم ضروری هستند. در گزارشی دیگر نیکل فعالیت آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز را تا حدی افزایش داده است، این افزایش فعالیت ممکن است

به علت ثبات ساختار آنزیم که ناشی از تغییرات در اتصال الکترواستاتیکی در حضور این یون‌ها است باشد. این یون‌ها احتمالاً با ایجاد ثبات در جایگاه فعال، تمایل سوبسترا را به آنزیم افزایش می‌دهند. فلزاتی مانند آهن و جیوه فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهند که موارد مشابه با آن نیز در پژوهش‌های قبلی دیده شده‌است. این مهار فعالیت ممکن است به علت اختلال در جایگاه کاتالیزوری آنزیم با تشکیل پیوندهای کووالانت قوی با زنجیره‌های جانبی اسیدآمینه‌های جایگاه فعال باشد. چنگ و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کرده‌اند که فعالیت آنزیم اندوبتا گلوکاناز با اضافه کردن آهن افزایش می‌یابد همچنین کبالت و منگنز نیز موجب افزایش فعالیت آنزیم می‌شود و از طرفی دیگر غلظت‌های بالای جیوه باعث کاهش ۵۰ درصدی فعالیت آنزیم می‌شود، در گزارشی دیگر در مورد اثر فلز جیوه بر فعالیت آنزیم نشان داد که جیوه قدرت مهار کنندگی زیادی بر فعالیت آنزیم داشته که علت این بازدارندگی یون‌های جیوه دار ناشی از اهمیت گروه‌های سولفیدریل موجود در فعالیت آنزیم می‌باشد (نودونها و اولهوا، ۲۰۰۰)، فعالیت اندوگلوکاناز با EDTA نه تنها مهار نمی‌شود بلکه افزایش هم می‌یابد، این به این موضوع اشاره می‌کند که احتمالاً این اندوبتا-۳،۱ گلوکاناز موجود در این تحقیق یک متالوآنزیم نیست، در این پژوهش دو غلظت مختلف EDTA نتوانست فعالیت آنزیم را مهار کند و به صورتی که غلظت ۵ میلی‌مولار آن قادر به افزایش اندکی حدود ۲۰ درصدی از فعالیت آنزیم شده و غلظت ۱۰ میلی‌مولارش فعالیت آنزیم را تغییر نداده‌است که مشابه این فعالیت در مورد اندوبتاگلوکاناز حاصل از *Aspergillus niger* دیده شده‌است که EDTA با غلظت ۵ میلی‌مولار فعالیت آنزیم را تا ۳۵ درصد افزایش داده است ولی غلظت بالاتر (۱۵ میلی‌مولار) فعالیت آنزیم را تا ۱۲ درصد کاهش داده‌است. ۱ درصد بتامرکاپتواتانول تاثیری بر فعالیت این آنزیم ندارد، ۵ درصد فعالیت آنزیم را به شدت کاهش داد علت این کاهش فعالیت هنوز مشخص نشده است چرا که بتامرکاپتواتانول پیوندهای دی-سولفیدی موجود در پروتئین‌ها را از بین می‌برد و منجر به از بین رفتن ساختار تاحدی می‌گردد. در این تحقیق از دترجنت‌های قطبی و غیر قطبی نیز استفاده گردید، از دترجنت‌ها برای دناتوره کردن

گلیکوپروتئین‌ها نیز استفاده می‌گردد. دترجنت‌ها بخشی از سورفاکتانت‌ها هستند که در واقع از آن‌ها برای تولید شوینده‌ها استفاده می‌گردد، غلظت‌های ۱۰ درصد و ۲۰ درصد (دترجنت غیر یونی) Tween 20 به ترتیب فعالیت آنزیم را ۷۵ درصد و ۹۰ درصد کاهش داده، غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد Triton x-100 (غیر یونی) به ترتیب فعالیت آنزیم را صفر درصد و ۲۵ درصد کاهش داد، که مشابه این فعالیت در مورد بتا-۳،۱ گلوکاناز حاصل از *Aspergillus niger* گزارش شده است. دترجنت یونی (SDS) ۱ درصد تاثیری بر فعالیت نداشت در حالی که ۵ درصدش فعالیت آنزیم را کاهش داد، ترنپه و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که SDS آنزیم را بلوکه می‌کند. فعالیت آنزیم در حضور حلال‌های آلی (آبگریز قطبی) خیلی کاهش نمی‌یابد؛ با این حال حلال‌های آب‌گریز غیرقطبی روی فعالیت آنزیم تاثیر آنچنانی ندارند. رفتاری مشابه با این آنزیم در گوتو و نایر گزارش دادند که حلال‌های آلی اثری ناچیز یا قابل صرف نظر کردن روی اندوگلوکاناز از *P. myriotylum* دارند. فعالیت در حضور حلال‌های قطبی معمولا برای حل کردن سوبسترای آبگریز در واکنش‌های آنزیمی استفاده می‌شوند، بنابراین ما از حلال‌های قطبی در این تحقیق استفاده می‌کنیم (فام و همکاران، ۲۰۱۲)، در گزارشی دیگر نیز اندو بتا گلوکانازها در برابر با حلال‌های آلی و دترجنت‌ها مقاومت بالایی دارند (ترینهه و همکاران، ۲۰۱۳)، غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد گلیسرول نیز فعالیت آنزیم را به ترتیب تا ۴۰ درصد و ۶۰ درصد کاهش داده است. متانول و استون ۱۰ درصد تاثیری بر فعالیت آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز نداشت اما غلظت‌های ۲۰، ۵۰ درصد هر دو ۲۵ درصد از فعالیت آنزیم را کاهش دادند، غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ درصد اتانول هیچ تاثیری بر فعالیت آنزیمی نداشتند، ایزوپروپانول نیز در غلظت ۱۰ و ۲۰ درصد به ترتیب ۱۰ و ۲۰ درصد فعالیت را کاهش دادند. و مشابه این کاهش فعالیت در اندوگلوکاناز از *Ganoderma lucidum* دیده می‌شود (ماناوالان و همکاران، ۲۰۱۵)، احتمالا دلیل این کاهش فعالیت این موضوع است که این حلال‌ها لایه‌ی آبی اتصال آنزیم که برای فعالیتش ضروری است، از آنزیم سلب می‌کنند. در تحقیقی مشابه متانول و اتانول در غلظت‌های ۱۰ تا ۲۰ درصد ۱۰ درصد از فعالیت آنزیم را کاهش

داده‌است، همچنین در گزارشی دیگر بتاگلوکانازی از *awamori VTCC-F099* نشان داده شده‌است بتا-۳،۱ گلوکاناز این پژوهش در غلظت‌های ۱۰ درصد متانول، استون و ایزوپروپانول بسیار مقاوم بوده است. تمامی این خصوصیات جهت فعالیت بهینه و موثر آنزیم مناسب‌اند. این گزارشات حاکی از این است که آنزیم‌ها ممکن است برای ترانسگلیکولاسیون در مواد دارای حلال‌های آلی استفاده شوند (فام و همکاران، ۲۰۱۲). در این تحقیق، بتا-۳،۱ گلوکاناز تخلیص شده توسط سوبستراهای مختلف به منظور فراهم شدن درک بهتر از فعالیت بتاگلوکانازی آنزیم، مورد آزمایش قرار گرفت. آزمایش‌ها نشان داد که بتا-۳،۱ گلوکاناز روی لامینارین بسیار فعال است، در حضور سوبسترای طبیعی کاه جو نیز تا حدود ۲۵ درصد فعالیت دارد و حتی روی برخی از سوبستراها بدون تاثیر است. در تحقیقی مشابه نیز اندوبتا-۳،۱ گلوکاناز دارای بیشترین فعالیت در حضور لامینارین بوده، در حضور *Pustalan*، *CMC*، *Chitin* فعالیت آنزیم صفر می‌باشد (پنگ و همکاران، ۲۰۰۵)، بنابراین با توجه به کاربرد اندو بتا گلوکاناز در زمینه تجزیه توده‌های زیستی جهت تولید سوخت‌های زیستی و تولید اتانول از طریق تخمیر توسط مخمرها، می‌توان از آنزیم موجود در این تحقیق استفاده کرد. آنزیم ایزوله شده در این تحقیق تا حدودی می‌توان سوبسترای طبیعی خودش را تجزیه کند بنابراین با استفاده از یک فرآیند اقتصادی و مناسب می‌توان سلولز موجود در ضایعات گیاهی و کاه و کلش را به گلوکز و گلوکز موجود را توسط مخمرها به اتانول تبدیل کرد، که این خود به نوبه تحولی شگرف در صنایع غذایی و تولید سوخت‌های طبیعی خواهد داشت. چه بسا طبق گزارشاتی که شده است در مهندسی پروتئین سعی بر تولید آنزیم‌های نو ترکیب گرمادوست که تحمل گرمای زیادی را دارند جهت استفاده در این فرآیند می‌باشد، در این تحقیق نیز آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز به نوعی دارای پایداری حرارتی می‌باشد و کاربرد زیادی در تولید سوخت‌های زیستی خواهد داشت.

بررسی‌های سینتیکی آنزیم با سوبسترای لامینارین نشان می‌دهد که K_m برای این آنزیم مورد بررسی برابر با 0.1628 mg/ml و نیز V_{max} حدود $112/5 \text{ } \mu\text{mol/min. ml}$ می‌باشد. همچنین میزان فعالیت

ویژه‌ی آنزیم برابر با 1125 U/mg می‌باشد. نسبت K_{cat}/K_m که به نام شاخص اختصاصیت نیز شناخته می‌شود؛ شاخصی مفید برای مقایسه‌ی عملکرد دو آنزیم روی یک سوبسترا است. K_{cat} بتا-۱، ۳، گاوکاناز موجود در این تحقیق برابر با $52816/9 \text{ (S}^{-1}\text{)}$ و نسبت K_{cat}/K_m برای آن، $324428/1$ می‌باشد. اندوگلوکانازی از *Clostridium Thermocellum* که یک آنزیم موثر در تخریب مواد گیاهی از خانواده- ای مشابه با آنزیم مورد تحقیق (یعنی گلیکوزید هیدرولاز ۹) دارای ویژگی‌های سینتیکی چون K_m ، V_m ، K_{cat} و K_{cat}/K_m به ترتیب $7/14$ میلی‌مولار، $52/4 \mu \text{ mol/min/mg}$ ، $632/85$ بر ثانیه، $7/34$ بر دقیقه و $88/63$ می‌باشد (حاق و همکاران، ۲۰۱۵). ویژگی‌های بدست آمده از این آنزیم نشان داد که این آنزیم، آنزیمی جالب برای کاربردهای زیست‌فناوری می‌باشد. همچنین در گزارشی که از یک سویه‌ی گرمادوست *Pyrococcus furiosus* به دست آمده است، نشان داده‌است که مقدار K_m ، $2/8$ و مقدار فعالیت ویژه‌ی این آنزیم نیز 1037 می‌باشد که مقدار ثابت میکائیلیس این آنزیم در مقایسه با آنزیم موجود در این تحقیق خیلی کمتر است ($0/1628$) که از ویژگی‌های مناسبی برای آنزیم در صنعت می‌باشد چرا که هر چقدر میزان این ثابت کمتر باشد میل آنزیم به تجزیه سوبسترا بیشتر است، چرا که هر چه مقدار ثابت میکائیلیس متن کمتر باشد میل ترکیبی آنزیم جهت اتصال به سوبسترا بیشتر خواهد بود. در مقایسه‌ای دیگر مقدار K_m برابر با $0/9$ و مقدار K_{cat} برابر با $3/56$ ، نسبت K_{cat}/K_m نیز برابر با $3/39$ می‌باشد. در مورد عدد Turn over number نیز این گونه گزارش شده است که هرچه قدر بیشتر باشد آنزیم در ۱ ثانیه می‌تواند مقدار زیادی از محصول سوبسترا را به محصول تبدیل کند که این عدد در آنزیم این پژوهش $52816/9$ در گزارشی مشابه به تحقیق ما که ال‌خاتانی و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند مقدار K_m برابر با $3/8$ ، مقدار K_{cat} نیز برابر با $0/71628$ می‌باشد (الناقی و همکاران، ۲۰۰۱)، ولی در مقایسه با این تحقیق مقدار K_{cat} عدد بسیار زیادی است و مزیت بالای این آنزیم را گزارش می‌کند، ثابت میکائیلیس متن آنزیم ایزوله شده در این تحقیق برابر با $0/1628$ می‌باشد خیلی مناسب است زیرا آنزیم در کمترین مقدار ممکن سوبسترا نیز

قادر به هیدرولیز و فعالیت خوب می‌باشد. نیمه‌ی عمر آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز موجود در این تحقیق برابر با ۱۷۲۵/۳ دقیقه در دمای ۴۰ درجه‌سانتی‌گراد می‌باشد، این آنزیم بعد از ۱۷۲۵/۳ دقیقه در دمای ۴۰ درجه‌سانتی‌گراد فعالیتش نصف می‌شود. در تحقیقی مشابه جونبو کوتا و همکاران (۲۰۱۱) گزارش که شد که نیمه‌عمر این آنزیم در دمای ۹۰ درجه برابر با ۵۷۷ می‌باشد (کوتا و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین میزان فعالیت ویژه آنزیم ایزوله شده در این تحقیق برابر با (U/mg) ۱۱۲۵ در مقایسه با بتاگلوکاناز خالص شده از قارچ تریکودرما توسط نوشین بهرامسرای (۱۳۸۴) برابر با U/mg ۲۲/۰۷، این مقدار بسیار زیاد است.

بتا-۳،۱ گلوکاناز ایزوله شده از باکتری بومی کوهنلا موجود در این پژوهش نسبت به سایر بتا-۳،۱ گلوکانازها دارای مزیت‌هایی می‌باشد، مقاومت و پایداری در دمای بهینه و پایداری در شرایط pH قلیایی نیز مزیت این آنزیم می‌باشد، پایداری صد درصدی این آنزیم در برابر حلال‌های آلی و همچنین پایداری نسبی آن و عدم کاهش فعالیت آن در حضور مواد شوینده، دترجنت‌ها و یون‌ها منجر به مزیت بالای این آنزیم در صنایع فوق ذکر می‌گردد.

پیشنهادات

تعیین ساختار سوم آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز با استفاده از کریستالوگرافی اشعه ایکس، تولید انبوه این آنزیم در سیستم‌های فرمانتور، انجام مطالعات مولکولی و ایجاد جهش در جایگاه فعال و دستیابی به آنزیمی با قابلیت‌های بهتر در صنعت، کپسوله کردن این آنزیم جهت پایداری بیشتر آن و محلول‌پاشی آن، جهت استفاده از آن به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک در گیاهان آلوده به بیماری‌های قارچی، بررسی و انجام مطالعات بیوانفورماتیکی گسترده‌تر بر روی آنزیم و مقایسه‌ی آن با سایر بتا-۳،۱ گلوکانازهای گرمادوست باکتریایی، بررسی گسترده‌تر ساختار دوم آنزیم بتا-۳،۱ گلوکاناز در حضور ترکیبات دنا توره کننده و شرایط محیطی که باعث تغییراتی در ساختار ثانویه و ساختار سوم

آنزیم می‌شود، تثبیت آنزیم بر روی بسترهایی نانو ذره و سیلیکا، که منجر به استفاده‌ی بیشتر از آنزیم، پایداری، کاهش هزینه در تولید و مصرف آنزیم می‌گردد.



ضمان



داده‌های خام مربوط به محاسبه‌ی پارامترهای بیوشیمیایی و سینتیکی بتا-۱-گلوکاناز که در مواد و روش‌ها گزارش شد در جداول زیر ذکر شده است.

ضمیمه ۱.

جدول ۱. بررسی اثر pH بر روی فعالیت آنزیم و بدست آوردن pH بهینه (pH profile)

| pH | میزان جذب در OD 540 nm (سه تکرار) | | | % activity |
|------|-----------------------------------|-------|-------|------------|
| 1.5 | 0 | 0 | 0.05 | 2.810568 |
| 2.5 | 0.03 | 0 | 0.3 | 16.86341 |
| 4 | 1.7 | 1.7 | 1.5 | 84.31703 |
| 5 | 1.751 | 1.841 | 1.745 | 98.08881 |
| 6 | 1.777 | 1.73 | 1.72 | 96.68353 |
| 6.5 | 1.7 | 1.733 | 1.72 | 96.68353 |
| 7 | 1.741 | 1.704 | 1.682 | 94.5475 |
| 7.5 | 1.432 | 1.543 | 1.633 | 91.79314 |
| 8.5 | 1.572 | 0.9 | 0.8 | 44.96908 |
| 9.5 | 0.369 | 0.317 | 0.194 | 10.905 |
| 10.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1.5 | 0 | 0 | 0.05 | 2.810568 |

ضمیمه ۲.

جدول ۲. تأثیر دما روی فعالیت آنزیم (Temperature Profile) و بدست آوردن دمای اپتیمم

| دما (°C) | میزان جذب در OD 540 nm (سه تکرار) | | | % activity |
|----------|-----------------------------------|-------|-------|------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0.497 | 0.574 | 0.731 | 36.53916 |
| 20 | 0.955 | 0.969 | 0.811 | 61.98179 |
| 30 | 1.222 | 1.111 | 1.315 | 77.57377 |
| 40 | 1.669 | 1.732 | 1.139 | 107.4171 |
| 50 | 1.543 | 1.533 | 1.499 | 100.5683 |
| 60 | 1.258 | 1.284 | 1.263 | 83.28597 |
| 70 | 1.211 | 1.111 | 1.11 | 75.75956 |
| 80 | 0.932 | 0.899 | 0.932 | 60.15301 |
| 90 | 0 | 0.3 | 0.7 | 13.84335 |

ضمیمه ۳.

جدول ۳. بررسی پایداری آنزیم در دماهای مختلف (Temperature Stability) در طول زمان

| دما (°C) | میزان جذب در 540 nm OD (سه تکرار) | | | % activity |
|----------|-----------------------------------|-------|-------|------------|
| 10 | 1.589 | 1.695 | 1.711 | 96.93381 |
| 20 | 1.731 | 1.727 | 1.695 | 99.99998 |
| 30 | 1.694 | 1.67 | 1.709 | 98.44749 |
| 40 | 1.72 | 1.714 | 1.702 | 99.67008 |
| 50 | 1.717 | 1.711 | 1.709 | 99.68948 |
| 60 | 1.392 | 1.317 | 1.287 | 77.54704 |
| 70 | 0.622 | 0.547 | 0.6 | 34.32951 |
| 80 | 0.233 | 0.233 | 0.233 | 13.56491 |
| 90 | 0.077 | 0.234 | 0.235 | 10.59577 |

ضمیمه ۴.

جدول ۴. بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سوبسترا بر سرعت واکنش جهت محاسبه پارامترهای کینتیکی V_{max} و k_m

| غلظت‌های مختلف سوبسترای لامینارین (mg/ml) | میزان جذب در 540 nm OD (سه تکرار) | | |
|---|-----------------------------------|-------|-------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.06 | 0.444 | 0.433 | 0.423 |
| 0.125 | 0.92 | 0.945 | 0.93 |
| 0.25 | 1.535 | 1.511 | 1.55 |
| 0.5 | 1.77 | 1.775 | 1.764 |
| 1 | 1.768 | 1.741 | 1.803 |



جدول ۵. بررسی اختصاصیت سوبسترای بی آنزیم بتا-۱-۳ گلوکاناز

| سوبسترا | میزان جذب در 540 nm OD (سه تکرار) | | | % activity |
|----------------------|-----------------------------------|--------|-------|------------|
| Laminarin | 1.541 | 1.583 | 1.551 | 100 |
| Pullulan | 0 | 0 | 0.0 | 0 |
| xylan | 0.1 | 0 | 0.0 | 0 |
| chitin | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 1 |
| Pustallan | 0.1 | 0.0307 | 0.156 | 6.132622 |
| polygalactronic acid | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Barley straw | 0.399 | 0.4 | 0.403 | 25.71124 |
| CMC(high viscosity) | 0.21 | 0.11 | 0.13 | 0.3 |

منابع



- Ardèvol, A., & Rovira, C. (2015). Reaction mechanisms in carbohydrate-active enzymes: glycoside hydrolases and glycosyltransferases. insights from ab initio quantum mechanics/molecular mechanics dynamic simulations. *Journal of the American Chemical Society*.
- Aaman, P., & Graham, H. (1987). Analysis of total and insoluble mixed-linked beta.-D-glucans in barley and oats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Abdeev, R. M., Abdeeva, I. A., Bruskin, S. S., Musiychuk, K. A., Goldenkova-Pavlova, I. V., & Piruzian, E. S. (2009). Bacterial thermostable β -glucanases as a tool for plant functional genomics. *Gene*
- 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*.
- Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. (1999) *Curr Opin Biotechnol*.
- Bleicher, L., Prates, E. T., Gomes, T. C., Silveira, R. L., Nascimento, A. S., Rojas, A. L., ... & Polikarpov, I. (2011). Molecular basis of the thermostability and thermophilicity of laminarinases: X-ray structure of the hyperthermostable laminarinase from *Rhodothermus marinus* and molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry*.
- Cota, J., Alvarez, T. M., Citadini, A. P., Santos, C. R., de Oliveira Neto, M., Oliveira, R. R., & Squina, F. M. (2011). Mode of operation and low-resolution structure of a multi-domain and hyperthermophilic endo- β -1,3-glucanase from *Thermotoga petrophila*. *Biochemical And Biophysical Research Communications*.
- Candolfi, M., Kroeger, K. M., Muhammad, A. K. M. G., Yagiz, K., Farrokhi, C., Pechnick, R. N., & Castro, M. G. (2009). Gene therapy for brain cancer: combination therapies provide enhanced efficacy and safety. *Current Gene Therapy*.
- Chen, J., & Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological Research*
- Cheng, R., Chen, J., Yu, X., Wang, Y., Wang, S., & Zhang, J. (2013). Recombinant production and characterization of full-length and truncated β -1,3-glucanase PglA from *Paenibacillus* sp. S09. *BMC Biotechnology*.
- Chen, C. C., Huang, J. W., Zhao, P., Ko, T. P., Huang, C. H., Chan, H. C., ... & Guo, R. T. (2015). Structural analyses and yeast production of the β -1,3-1,4-glucanase catalytic module encoded by the licB gene of *Clostridium thermocellum*. *Enzyme And Microbial*



Technology.

Doman-Pytka, M., & Bardowski, J. (2004). Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Critical Reviews In Microbiology*.

Dong, W., Huang, J., Li, Y., Tan, Y., Shen, Z., Song, Y., ... & Peng, G. (2015). Crystal structural basis for Rv0315, an immunostimulatory antigen and inactive beta-1,3-glucanase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific*.

Erfle, J. D., Teather, R. M., Wood, P. J., & Irvin, J. E. (1988). Purification and properties of a 1,3-1,4-β-D-glucanase (lichenase, 1,3-1,4-β-D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2. 1.73) from *Bacteroides succinogenes* cloned in *Escherichia coli*. *Biochemical journal*.

El-Katatny, M., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M., & Gübitz, G. (2001). Characterization of a chitinase and an endo-β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Farrokhi, N., Hrmova, M., Burton, R. A., & Fincher, G. B. (2009). Heterologous and cell-free protein expression systems. *Plant Genomics: Methods and Protocols*.

Gueguen, Y., Voorhorst, W. G., van der Oost, J., & de Vos, W. M. (1997). Molecular and Biochemical Characterization of an Endo-β-1,3-glucanase of the Hyperthermophilic *Archaeon Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*.

Gooday, A. J., & Rathburn, A. E. (1999). Temporal variability in living deep-sea benthic foraminifera. *Earth-Science Reviews*.

Grishutin, S. G., Gusakov, A. V., Dzedzyulya, E. I., & Sinitsyn, A. P. (2006). A lichenase-like family 12 endo-(1→4)-β-glucanase from *Aspergillus japonicus*: study of the substrate specificity and mode of action on β-glucans in comparison with other glycoside hydrolases. *Carbohydrate Research*.

Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion In Structural Biology*

Hong, T. Y., Cheng, C. W., Huang, J. W., & Meng, M. (2002). Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3-β-glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3-β-glucan. *Microbiology*

Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme And Microbial Technology*.

Hong, T. Y., Cheng, C. W., Huang, J. W., & Meng, M. (2002). Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3-β-glucanase from *Streptomyces sioyaensis*



containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- β -glucan. *Microbiology*.

Ilari, A., Fiorillo, A., Angelaccio, S., Florio, R., Chiaraluce, R., van der Oost, J., & Consalvi, V. (2009). Crystal structure of a family 16 endoglucanase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*—structural basis of substrate recognition. *FEBS Journal*.

Ilari, A., Fiorillo, A., Angelaccio, S., Florio, R., Chiaraluce, R., van der Oost, J., & Consalvi, V. (2009). Crystal structure of a family 16 endoglucanase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*—structural basis of substrate recognition. *FEBS*.

Jam, M., Ficko-Blean, E., Labourel, A., Larocque, R., Czjzek, M., & Michel, G. (2016). Unraveling the multivalent binding of a marine family 6 carbohydrate-binding module with its native laminarin ligand. *FEBS Journal*.

Jeng, W. Y., Wang, N. C., Lin, C. T., Shyur, L. F., & Wang, A. H. J. (2011). Crystal structures of the laminarinase catalytic domain from *Thermotoga maritima* MSB8 in complex with inhibitors essential residues for β -1,3- and β -1,4-glucan selection. *Journal of Biological Chemistry*.

Koutsopoulos, S., van der Oost, J., & Norde, W. (2005). Structural features of a hyperthermostable endo- β -1,3-glucanase in solution and adsorbed on “invisible” particles. *Biophysical journal*.

Lombard, V., Ramulu, H. G., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*.

Lopez-Casado, G., Urbanowicz, B. R., Damasceno, C. M., & Rose, J. K. (2008). Plant glycosyl hydrolases and biofuels: a natural marriage. *Current Opinion In Plant Biology*

Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., ... & Bellincampi, D. (2007). Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis restricts* fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*.

Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P., & Phongpaichit, S. (2006). Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme and Microbial Technology*.

Liao, W., Ji, L., Wang, J., Chen, Z., Ye, M., Ma, H., & An, X. (2014). Identification of glutathione S-transferase genes responding to pathogen infestation in *Populus tomentosa*. *Functional & Integrative Genomics*.

Martin, K., McDougall, B. M., McIlroy, S., Chen, J., & Seviour, R. J. (2007). Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS*



- Mouyna, I., Hartl, L., & Latgé, J. P. (2013). β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers In Microbiology*
- Miyaniishi, N., Iwamoto, Y., Watanabe, E., & Odaz, T. (2003). Induction of TNF- α production from human peripheral blood monocytes with β -1, 3-glucan oligomer prepared from laminarin with β -1,3-glucanase from *Bacillus clausii* NM-1. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., & Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology*.
- Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., & Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology*.
- Marco, J. L. D., & Felix, C. R. (2007). Purification and characterization of a beta-Glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- Masilamani, R., Sharma, O. P., Muthuvel, S. K., & Natarajan, S. (2013). Cloning, expression of beta-1,3-1,4 glucanase from *Bacillus subtilis* SU40 and the effect of calcium ion on the stability of recombinant enzyme: in vitro and in silico analysis. *Bioinformation*.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K. P., & Heese, K. (2015). Characterization of a novel endoglucanase from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Basic Microbiology*.
- Noronha, E. F., & Ulhoa, C. J. (2000). Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*.
- Pham, T. H., Quyen, D. T., & Nghiem, N. M. (2012). Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021. *Turkish Journal of Biology*.
- Pang, Z., Otaka, K., Suzuki, Y., Goto, K., & Ohnishi, M. (2004). Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Arthrobacter* sp. *J. Biol. Macromol*.
- Palumbo, J. D., Sullivan, R. F., & Kobayashi, D. Y. (2003). Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of three β -1,3-glucanase genes from *Lysobacter enzymogenes* strain N4-7. *Journal of Bacteriology*.
- Sun, L., Gurnon, J. R., Adams, B. J., Graves, M. V., & Van Etten, J. L. (2000).



Characterization of a β -1,3-glucanase encoded by chlorella virus PBCV-1. *Virology*

Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal Of Food Science And Technology*.

Trinh, D. K., Quyen, D. T., Do, T. T., & Nghiem, N. M. (2013). Purification and characterization of a novel detergent-and organic solvent-resistant endo-beta-1,4-glucanase from a newly isolated *basidiomycete Peniophora* sp. NDVN01. *Turkish Journal of Biology*.

Vasur, J., Kawai, R., Andersson, E., Igarashi, K., Sandgren, M. (2009). X-ray crystal structures of *Phanerochaete chrysosporium* Laminarinase 16A in complex with products from lichenin and laminarin hydrolysis. *Febs Journal*.

Wang, K., Luo, H., Shi, P., Huang, H., Bai, Y., & Yao, B. (2014). A highly-active endo-1,3-1,4- β -glucanase from thermophilic *Talaromyces emersonii* CBS394. 64 with application potential in the brewing and feed industries. *Process Biochemistry*.

Yasmin, N., Saleem, M., & Chaudhry, Z. I. (2012). Purification and characterization of pathogenesis-related antifungal Beta-1,3 glucanase from *Basrai banana fruit*. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol*.

Yun, Y. H., Lee, K. S., Kim, Y. W., Park, S. Y., Lee, E. S., Noh, D. Y., ... & Lee, Y. J. (2012). Web-based tailored education program for disease-free cancer survivors with cancer-related fatigue: a randomized controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*.

Zhou, W., Irwin, D. C., Escovar-Kousen, J., & Wilson, D. B. (2004). Kinetic studies of *Thermobifida fusca* Cel9A active site mutant enzymes. *Biochemistry*.

Abstract

Beta-(1→3)-glucanases (EC3.1.2.39), also known as laminarinases, are diverse family of enzymes that are involved in hydrolysis (GH16) of *O*-glycoside linkages in β-(1→3) glucans with diverse range of applications from agriculture to pharmaceutical industries. Here, a CohLam gene (accession No. KX013442) was isolated from *Cohnella* A01, cloned and heterologously expressed in *E. coli*. The recombinant laminarin degrading enzyme (~ 47 kDa) had its highest activity at 50 °C (pH = 6) and sustained 70% of its activity following incubation at 50 °C for 5 h. The recombinant enzyme had K_m , V_{max} , k_{cat} , and k_{cat}/k_m values of 0.1628 mg/ml, 112.5 U.ml⁻¹, 52816.9 S⁻¹, and 324428 in the presence of laminarin, respectively. The enzyme half-life was 1725.3 min at 50 °C. The enzyme remained active in 1% (w/v) SDS and kept up to 50% of its activity in ethanol, methanol, and acetone. In vitro bioassay of enzyme was illustrative of growth retardation of *Phytophthora* sp., a phytopathogen.

Keyword: Beta-(1→3)-glucanase, *Cohnella* A01, *Phytophthora* sp.



Shahrood University of Technology
Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

Characterization of thermophilic Beta1,3 glucanase isolated from
***Cohnella* sp.A01**

By : Samaneh Banaeian

Supervisors:
Dr. Naser Farrokhi
Dr. Saeed Aminzade

Advisor:
Dr. Mojtaba Mamarabadi

September 2016

