تعیین خصوصیات آمیلوپلولاناز نوترکیب مقاوم به حرارت و غیر وابسته به Ca^{2+} از باکتری بومی *Cohnella* sp.A01

فائزه حسنی[۱و۲]، سعید امین زاده[۱]، ناصر فرخی[۲]، مجتبی ممرآبادی[۲]

۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرایند

۲- دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود

F.hasani26@yahoo.com

نویسنده مسوول: aminzade@nigeb.ac.ir

چکیده

آمیلوپلولاناز (EC. 3.2.1.41/1) از آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته و پلولان می‌باشد که دارای دو فعالیت آمیلازی و پلولانازی است و قادر به شکستن پیوندهای α(۱-۴) و α(۱-۶) در نشاسته می‌باشد. ویژگی‌های خاص این آنزیم سبب شده که به خصوص در صنعت هیدرولیز نشاسته مورد توجه قرار بگیرد. در این پژوهش یک آمیلوپلولاناز مقاوم به حرارت به نام Amy1136 از باکتری گرمادوست *Cohnella* sp. A01 و با استفاده از پرایمرهایی که بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن Amy1136 طراحی شد، تکثیر گردید، در باکتری *E. coli* DH5α همسانه سازی و در باکتری *E. coli* BL21 بیان شد. سپس خصوصیات بیوشیمیایی و کینتیکی آن بر روی دو سوبسترا نشاسته و پلولان مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهش نشان داد که آنزیم مورد نظر در دمای ۵۰ °C و pH=۸ بهترین فعالیت را دارد. همچنین نسبت به دمای بالا(۹۰ °C) پایدار بوده؛ که از مزایای استفاده از دمای بالا در صنعت، افزایش سرعت واکنش و همچنین کاهش آلودگی میکروبی آن می‌باشد. از ویژگی مقاوم به حرات بودن برای خالص سازی آنزیم استفاده شد (خالص سازی به روش شوک حرارتی). آنزیم نسبت به تغییرات pH نیز پایدار می‌باشد (پس از ۲ روز قرار گرفتن در pH اسیدی و قلیایی پایداری خود را حفظ کرد). Ag^{2+} باعث افزایش چند برابری فعالیت آنزیم شد در صورتیکه Co^{2+} فعالیت آنزیم را به صفر رساند. همچنین یون کلسیم تاثیری بر افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم نداشت. این نشان می‌دهد احتمالا فعالیت آنزیم غیر وابسته به Ca^{2+} می‌باشد؛ که در صنعت شست و شو می‌تواند به راحتی مورد استفاده قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: آمیلوپلولاناز، مقاوم به حرارت، صنعت هیدرولیز نشاسته، خالص سازی، غیر وابسته به Ca^{2+}

مقدمه

گلیکوزید هیدرولازها (GHs) عملکرد مهمی در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی از جمله بیوسنتز و تخریب گلوکان، سوخت و ساز دیواره سلولی و سیگنالینگ دارند. GHها تا به امروز به بیش از ۱۰۰ خانواده بر اساس ساختار کلی تقسیم شده‌اند (Guan et al., 2013). در میان آن‌ها پلولانازها (پلولان ۶ – گلوکانوهیدرولاز؛ EC 3.2.1.41) بر اساس سوبسترا به دو گروه، ۱- پلولاناز نوع I (که به طور ویژه پیوندهای α(۱و۴) را در نشاسته، آمیلوپکتین و گلیکوژن هیدرولیز می‌کند.) و ۲- پلولاناز نوع II یا آمیلوپلولاناز (EC 3.2.1.1/41) که پیوندهای گلیکوزیدی α(۱،۴) و α(۱،۶) را در نشاسته، پلولان، آمیلوپکتین و دیگر اولیگوساکاریدهای آزاد را هیدرولیز می‌کند، تقسیم می‌شوند. نشاسته در میان کربوهیدرات‌ها، فراوان‌ترین روی زمین می‌باشد.

محصولات حاصل از فرآیندهای نشاسته کاربردهای زیادی در صنایع مختلف از جمله نوشیدنی، شیرینی، کنسرو و بستنی سازی دارند. در صنعت نشاسته از آنزیم‌ها برای هیدرولیز نشاسته به محصولات مفید، استفاده زیادی می‌شود. پلولانازها به ویژه آمیلوپلونازها پتانسیل بالایی برای کاربردهای صنعتی، از جمله تولید قند مالتوز، گلوکز و فروکتوز با خلوص بالا، دارند. آمیلوپلولانازها با منشا میکروارگانیسم‌های مزوفیل[1] در خانواده GH13، و آمیلوپلولانازهای با منشا میکروارگانیسم‌های ترموفیل[2] در خانواده‌های GH13 و GH57 طبقه بندی می‌شوند (Nisha & Satyanarayana, 2015). آمیلوپلولانازهای متحمل به حرارت در هیدرولیز نشاسته مطلوب‌تر می‌باشند. دمای بالا معمولا موجب تسهیل در ژلاتینه شدن نشاسته، همچنین موجب سرعت بخشیدن به انجام واکنش و کاهش احتمالی آلودگی میکروبی می‌شود (Li & Li, 2015). در این گزارش، یک آمیلوپلولاناز متحمل به حرارت که منشا آن باکتری گرمادوست *Cohnella* sp. A01 و بومی ایران می‌باشد، کلون و بیان شد همچنین ویژگی‌های بیوشیمیایی و کینتیکی آن را بر روی دو سوبسترا (نشاسته و پلولان) مورد بررسی قرار گرفت و شرایط بهینه برای انجام واکنش را تعیین گردید؛ که با توجه به ویژگی‌های تعیین شده بتواند در صنایع مربوطه به طور بالقوه مورد استفاده قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در طول پژوهش

باکتری *Escherichia coli* DH5α به عنوان میزبان کلونینگ، باکتری *Escherichia coli* BL21 (DE3) به عنوان میزبان بیانی، باکتری گرما دوست *Cohnella* SP. A01 که بومی ایران می‌باشد به عنوان منبع ژن آمیلوپلولاناز ۱۱۳۶ (دمای بهینه رشد آن ۵۰ °C سانتیگرداد می‌باشد) مورد استفاده قرار گرفتند، پلاسمید pET26b به عنوان وکتور کلونینگ و بیان، آنزیم *pfu* جهت تکثیر ژن، آنزیم‌های محدود کننده *Nde* I و *Not* I جهت برش دو سر ژن و وکتور، آنزیم T4 DNA Ligase برای اتصال ژن به وکتور، IPTG جهت بیان ژن، آنتی بیوتیک کانامایسین، محیط NB[3] برای رشد باکتری *Cohnella* SP. A01، محیط LB[4] برای رشد باکتری *E. coli*، آنتی بیوتیک کانامایسین برای انتخاب باکتری‌های حاوی پلاسمید pET26b، القاگر IPTG، آگارز، آکریل آمید، بیس اکریل آمید، TEMED، ایمیدازول، پلولان، نشاسته، مارکر DNA و پروتئین، کیت های استخراج پلاسمید، استخراج DNA از ژل جهت خالص سازی محصول PCR و استخراج DNA ژنومی.

کلونینگ ژن Amy1136

باکتری *Cohnella* sp.A01 در محیط کشت NB کشت داده شد رسوب ۲ml از باکتری را برداشته و با استفاده از پروتوکل شرکت سازنده ژنوم باکتری استخراج گردید. از آن به عنوان الگوی ژن Amy1136 در واکنش PCR استفاده شد. دو پرایمر برای تکثیر آن طراحی و سنتز شد که جایگاه برش آن در بالادست و پایین دست پرایمرها خارج از ژن (توالی پرایمر بالا دست دارای جایگاه برش آنزیم *Nde* I، و توالی پرایمر پایین دست دارای جایگاه برش *Not* I) طراحی گردید. واکنش PCR با استفاده از آنزیم *pfu* به صورت سیکل ابتدایی دناتوراسیون با دمای ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه جهت باز نمودن پیوندهای

[1] Mesophile
[2] Thermophile
[3] Nutrient Broth
[4] Luria Bertani

هیدروژنی DNA الگو، ۳۵ سیکل اصلی که هر سیکل شامل سه مرحله دناتوراسیون با دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال با دمای ۵۷°C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر با دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه و در انتها نیز یک سیکل نهایی با دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه منظور گردید. محصول PCR پس از تخلیص از روی ژل آگارز ۱٪ با آنزیم‌های *Nde* I و *Not* I جهت ایجاد دو انتهای چسبنده (در دمای ۳۷°C به مدت ۱۶ ساعت) هضم گردید. همزمان پلاسمید pET26b نیز با آنزیم‌های *Nde* I و *Not* I مورد هضم قرار گرفت. واکنش اتصال ژن و وکتور هضم شده به وسیله آنزیم T4 DNA Ligase در دمای ۲۲°C به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. حجم ۵µl محصول حاصل از اتصال آنزیمی به سلول‌های مستعد باکتری DH5α به روش شوک حرارتی ترنسفورم گردید. از آن‌جایی که پلاسمید pET26b دارای ژن مقاومت به کانامایسین است، از این ویژگی برای انتخاب کلنی‌های نوترکیب استفاده شد. کلنی‌های نوترکیب با ۳ روش اختلاف حرکت روی ژل آگارز، PCR و برش آنزیمی تایید شدند. نهایتا کلنی نوترکیب تایید شده جهت تعیین توالی به شرکت 1st BASE Sequencing INT فرستاده شد.

بیان و خالص سازی Amy1136

پلاسمید pET26b-Amy1136 به سلول‌های *E. coli* BL21 ترنسفورم گردید. باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط LB حاوی ۳۰mg/mL آنتی بیوتیک کانامایسین به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷°C و شیک ۱۸۰rpm کشت داده شدند. زمانی که OD_{600} برابر با ۰/۸ شد، ایزوپروپیل-β-D- تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) برای القا بیان Amy1136 به محیط اضافه گردید. باکتری‌ها در حضور IPTG در دمای ۲۵°C و شیک ۱۵۰rpmبه مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردیدند. رسوب باکتری‌ها در بافر پتاسیم-فسفات ۵۰mM (pH=۸) حل شده و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک، دیواره سلول شکسته و پروتئین‌ها آزاد شدند. مدت ۴۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰rpm (دمای ۴°C) سانتریفیوژ گردید. محلول رویی، به منظور خالص سازی به روش شوک حرارتی، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰°C قرار گرفت. پس از این مدت، ۱۵ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. در مراحل بیان و خالص سازی نمونه برداری انجام گرفت و برای بررسی روی ژل پلی اکریل آمید حاوی سدیم دو دسی سولفات (SDS-PAGE) ۱۲٪ الکتروفورز گردید.

سنجش فعالیت آنزیم Amy1136

فعالیت آنزیم آمیلوپلولاناز ۱۱۳۶ به وسیله دو محلول نشاسته ۱٪ و پلولان ۱٪ در بافر پتاسیم-فسفات ۵۰mM (pH=8) به عنوان سوبسترا، بررسی گردید. مخلوط واکنش شامل ۲۰µL محلول آنزیمی، ۲۰µL محلول سوبسترا، به مدت ۵ دقیقه (نشاسته) و ۲۰ دقیقه (برای پلولان) در دمای ۵۰°C انکوبه گردید. سپس برای توقف واکنش محلول(۱٪) ۳-۵-دی نیتروسالسیلیک اسید (DNS) به آن افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس جذب آن با دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۵۳۰nm خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم، مقداری از آنزیم می‌باشد که ۱µmol محصول تولید و یا سوبسترا مصرف می‌کند. برای تعیین اثر pH بر فعالیت آنزیم، همانند روش بالا، اما شامل چند مخلوط واکنش در بافر میکس ۵۰mM شامل پتاسیم فسفات، سدیم استات و گلایسین (pH برابر با ۴ تا ۱۱) بوده، تمامی نمونه‌ها در دمای بهینه (۵۰°C) انکوبه شدند. برای تعیین اثر دما نیز واکنش‌ها در دماهای ۱۰ تا ۹۰°C (در pH بهینه) انجام گرفت. برای سنجش پایداری نسبت به

pH، نمونه‌های آنزیمی ۱۲۰ دقیقه در pHهای مختلف (۴ تا ۱۱) قرار گرفتند. همچنین پایداری آنزیم نسبت به pHهای ۴، ۸ و ۱۱ در طول زمان سنجیده شد. برای سنجش پایداری آنزیم نسبت به دما نیز، نمونه‌های آنزیمی در دماهای ۱۰ تا ۹۰ °C به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پایداری آنزیم به دماهای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ در طول زمان هم سنجیده شد. اثر یون‌های فلزی، محلول‌های آلی، دترجنت‌ها، مواد شیمیایی و مهارکننده‌ها بر فعالیت آمیلازی و پلولانازی بررسی گردید. برای بررسی مطالعات کینتیکی، فعالیت آنزیمی در غلظت‌های مختلف (۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰) سوبسترا (نشاسته و پلولان) در شرایط بهینه اندازه گیری و نمودار میکائیلیس–منتن رسم شد. پارامترهای کینتیکی از جمله V_{max}، K_m، k_{cat} و اندازه گیری شدند.

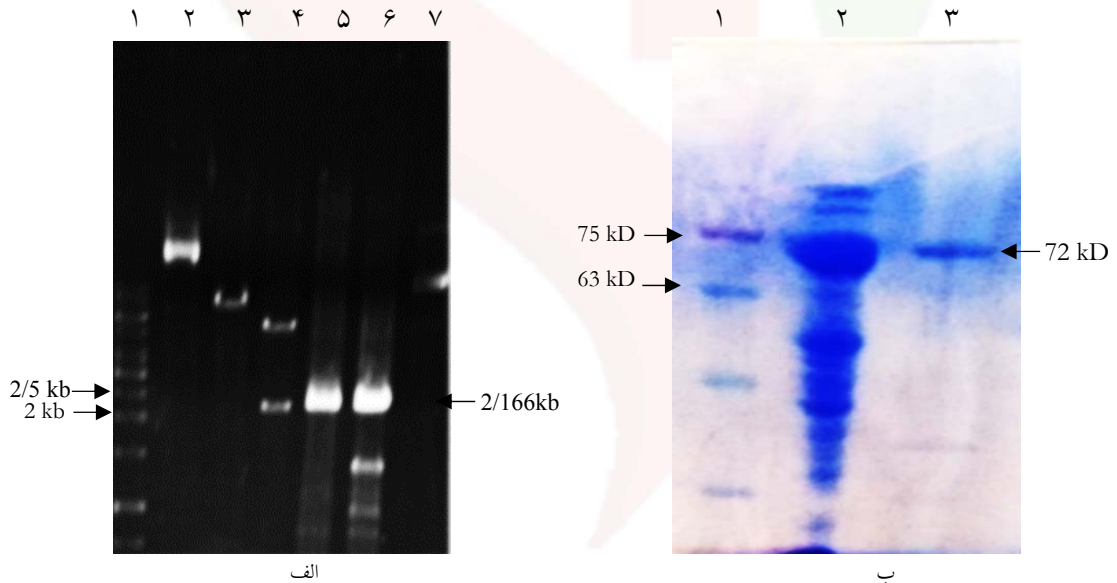
نتایج و بحث

کلونینگ ژن Amy1136

مراحل کلونینگ در شکل ۱– الف نشان داده شده است.

بیان و خالص سازی Amy1136

پس از القای پروموتور در حضور IPTG ۰/۵mM، پروتئین Amy1136 بیان شد و باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود kD ۷۶ روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد. در شکل ۱–ب باند پروتئینی نشان داده شده است. به علت پایداری آنزیم به دمای بالا، برای خالص سازی آن از بین تمامی پروتئین‌های باکتری به جای استفاده از روش‌های دیگر (ستون کروماتوگرافی)، از روش شوک حرارتی استفاده گردید؛ به طوری که بعد از ۱۵ دقیقه تمامی پروتئین‌های باکتری به غیر از پروتئین مورد نظر رسوب کرده و پس از سانتریفیوژ، پروتئین Amy1136 در محلول باقی ماند. باند پروتئین خالص شده در شکل ۱–ب نشان داده شده است.



شکل ۱: الف– تست کلونینگ،۱: نشانگر DNA ۲–پلاسمید نوترکیب ۳– برش تک آنزیمی پلاسمید نوترکیب با *Nde* I ۴– هضم دو آنزیمی با *Nde* I و *Not* I ۵– تکثیر ژن Amy1136 از منبع اصلی (*Cohnella* sp. A01) ۶– تکثیر ژن Amy1136 از پلاسمید نوترکیب ۷– پلاسمید غیر نوترکیب.

ب– ۱–نشانگر پروتئین ۲–بیان پروتئین Amy1136 ۳–Amy1136 خالص شده با شوک حرارتی (۹۰ °C)

اثرات pH و دما بر فعالیت آنزیم و پایداری Amy1136

اثرات pH بر فعالیت آمیلازی و پلولانازی Amy1136 در شکل ۲–الف نشان داده شده است. بیشترین فعالیت آنزیم در pH برابر با ۸ بود (هم فعالیت آمیلازی و پلولانازی)، ٪۶۰ فعالیت آمیلازی بین pH ۵ تا ۱۱ مشاهده شد، اما فعالیت پلولانازی در pH =۶ تنها ٪۲۰ بود. با توجه به شکل۲–ب، آنزیم پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه در pHهای ۴ تا ۷ حدود ٪۵۰، در pH =۸ (pH بهینه)، ٪۱۰۰ و در pHهای ۹ تا ۱۱ حدود ٪۸۰ فعالیت آمیلازی خود را حفظ کرد. فعالیت پلولانازی آنزیم پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه در pH =۴، ٪۲۰، در pHهای ۵ و ۶ حدود ٪۶۰، در pHهای ۷ و ۹ حدود ٪۸۰ ، در pH =۸ ٪۱۰۰ و در pHهای ۱۰ و ۱۱ حدود ٪۵۰ حفظ شد، همچنین پس از گذشت ۴۸ ساعت حدود ٪۴۰ و ٪۷۰ فعالیت آمیلازی به ترتیب در pH =۴ و pH =۱۱ حفظ شد (شکل ۲–ج).

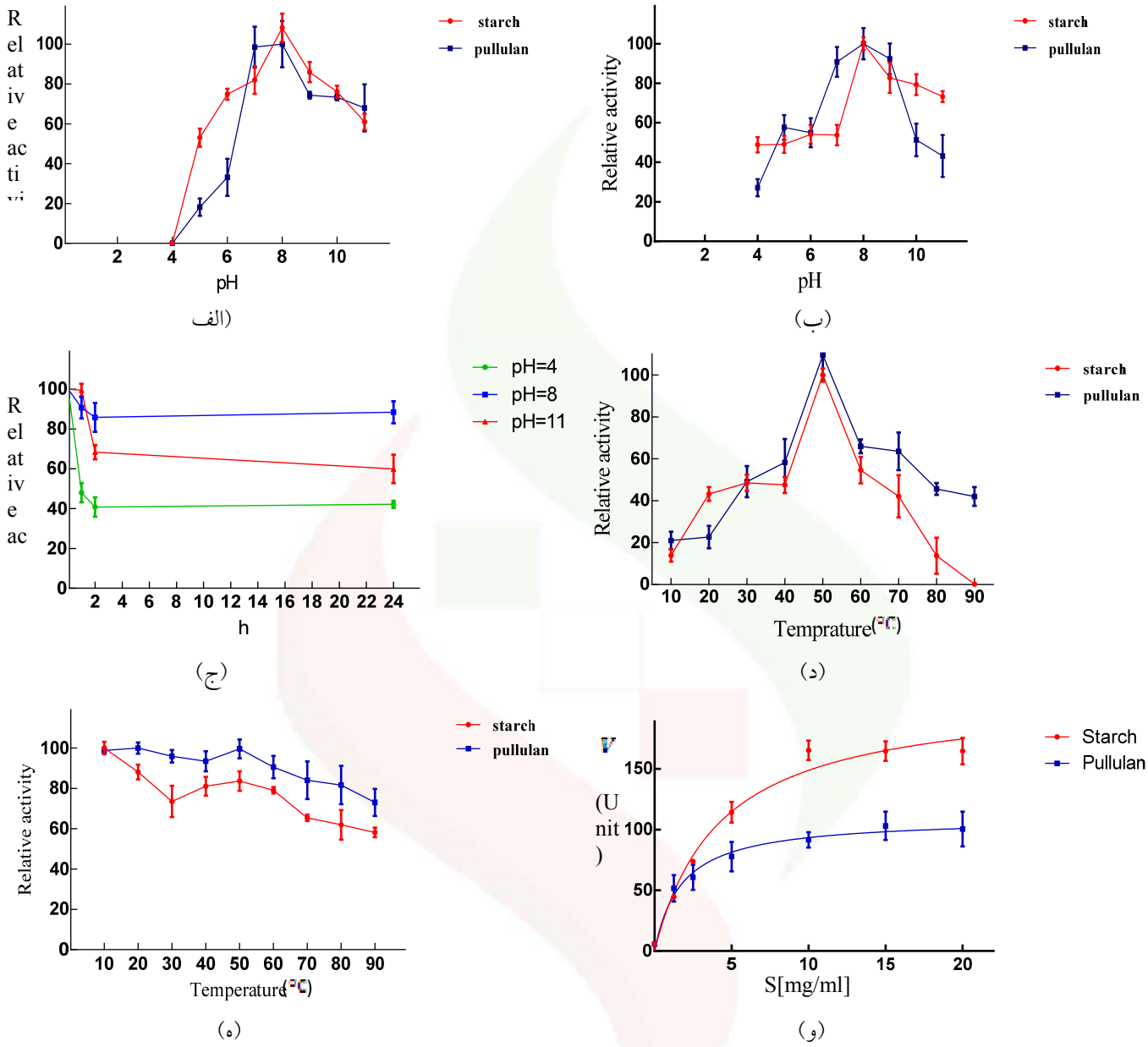
اثرات دما بر فعالیت آمیلازی و پلولانازی Amy1136 در شکل ۲–د نشان داده شده است. دمای بهینه آنزیم ۵۰ بوده (هم فعالیت آمیلازی و پلولانازی)، حدود ٪۵۰ فعالیت آمیلازی آنزیم بین دمای ۴۰ تا ۶۰ °C بوده؛ در صورتی که حدود ٪۵۰ فعالیت پلولانازی آن تا دمای ۹۰ °C حفظ شد. همچنین حدود ٪۶۰ فعالیت آنزیم (هم آمیلازی و هم پلولانازی) پس از قرار گرفتن آنزیم در دمای ۹۰ °C به مدت ۲ ساعت پایدار ماند. داده‌های به دست آمده نشان می‌دهد که آنزیم نوترکیب Amy1136 نسبت به تغییرات دمایی و pH پایدار بوده و می‌تواند فعالیت خود را در pHهای اسیدی و بازی و همچنین در دماهای بالا حفظ کند. مزیت استفاده از آنزیم‌ها در دمای بالا در صنعت، افزایش سرعت واکنش و همچنین کاهش آلودگی میکروبی آن می‌باشد.

اثر یون‌های فلزی، مواد آلی، دترجنت‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت و پایداری آنزیم

تاثیر یون‌های فلزی، حلال‌های آلی و دیگر مواد شیمیایی، تحت شرایط بهینه واکنش آنزیمی انجام گرفت و نتایج آن در جدول ۱ نشان داده شده است. در میان یون‌های فلزی، Mg^{2+}، Li^{2+}، Ba^{2+} و Co^{2+} موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آمیلازی شدند، به طوری که Co^{2+} فعالیت را به صفر رساند. Ag^{2+} فعالیت آمیلازی و پلولانازی را چند برابر کرد. با توجه به اینکه Ca^{2+} تاثیری بر فعالیت آنزیم نداشته می‌توان گفت احتمالا آمیلاز مورد نظر غیر وابسته به وجود Ca^{2+} برای فعالیت بوده و به راحتی در صنایع شست و شو می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد.

کینتیک آنزیم

پارامترهای کینتیکی برای هیدرولیز نشاسته و پلولان با استفاده از غلظت‌های مختلف نشاسته و پلولان تعیین گردید. آنزیم از رفتار میکائیلیس منتنی تبعیت کرده؛ به طوری با افزایش غلظت سوبسترا (نشاسته و پلولان) تا ۱۰mg/mL سرعت آنزیم افزایش یافته و بعد از آن افزایش در غلظت سوبسترا، با اشباع جایگاه فعال آنزیم، افزایش سرعتی رخ نداد. K_{cat} ،K_m ،V_{max} برای نشاسته به ترتیب ۲۱۱/۶µmol min^{-1}، ۴/۲۱۹mg ml^{-1}، ۱/۲۴۸e+۰۱۲min^{-1}و برای پلولان به ترتیب ۱۰۹/۶µmol min^{-1}، ۱/۷۴۰mg ml^{-1}، ۶/۴۶۷e+۰۱۱min^{-1} محاسبه شد.



شکل ۲: الف- تاثیر pHهای مختلف بر فعالیت آنزیم ب- پایداری آنزیم در pHها ی مختلف (سنجش فعالیت پس از قرار دادن آنزیم در pHهای مختلف به مدت ۲ ساعت) ج- پایداری آنزیم در pHهای ۴، ۸، ۱۱د- تاثیر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم ه- بررسی پایداری آنزیم نسبت به دماهای مختلف (سنجش فعالیت آنزیم پس از قرار گرفتن در دماهای مختلف به مدت ۹۰ دقیقه) و- رسم نمودار میکائیلیس منتن به منظور بررسی تاثیر غلظت سوبسترا بر سرعت فعالیت آنزیم (Relative activity در تمامی نمودارها بر حسب ٪ می‌باشد)

جدول ۱: اثر یون‌های فلزی،مهارکننده‌ها و حلال‌های آلی در تمامی موارد کنترل (بدون هیچ افزودنده) ۱۰۰ در نظر گرفته شد به جز تاثیر یون‌های فلزی بر فعالیت پلولانازی که کنترل (بدون یون) صفر در نظر گرفته شد.

افزونده	غلظت نهایی	فعالیت نسبی (٪)	
		آمیلاز	پلولاناز
کنترل	-	۱۰۰	۰
های فلزی‌یون			
Ca^{2+}	۳mM	۹۴/۵۶ ± ۲/۵۹	۰
Li^{2+}	۳Mm	۳۲/۵۲ ± ۹/۵۱	۰
Na^{+}	۳mM	۷۸/۲۵ ± ۱۳/۴۷	۳۹/۷۷ ± ۱/۴۶
Co^{2+}	۳mM	۰	۲۹/۵۳ ± ۳/۳۷
Mg^{2+}	۳mM	۵۷/۷۲ ± ۱۳/۵۶	۰
Ba^{2+}	۳mM	۱۴/۰۲ ± ۷/۳۸	۵۷/۳۱ ± ۳/۵۹
Ag^{2+}	۳mM	۴۱۱/۱۸ ± ۷/۳۹	۰
Fe^{2+}	۳mM	۷۰/۸۳ ± ۱/۶۲	۲۰/۴۷ ± ۲/۵۵
Fe^{3+}	۳mM	۷۷/۲۲ ± ۱/۹۸	۱۲/۸۶ ± ۰/۵۸
Cu^{2+}	۳mM	۸۹/۹۸ ± ۱/۳۳	۰
Zn^{2+}	۳mM	۹۴/۵۶ ± ۲/۳۴	۱۳/۷۴ ± ۵/۸۷
Mn^{2+}	۳mM	۸۹/۴۶ ± ۱/۳۸	۱۰۰ ± ۱۴/۱۶
هامهارکننده			
EDTA	۱mM	۶۳/۰۹ ± ۴/۱۲	۶۰/۵۵ ± ۳/۱۳
PMSF	۱Mm	۹۰/۷۲ ± ۴/۴۵	۶۴/۴۴ ± ۴/۳۱
SDS	۱mM	۷۵/۱۹ ± ۲/۷۱	۵۶/۱۱ ± ۴/۸۴
Guanidin HCl	۱mM	۴۴/۹۸ ± ۶/۷۸	۶۳/۳۳ ± ۴/۸۸
NaN_3	۱mM	۱۰۱/۴۵ ± ۲/۹۱	۷۳/۲۹ ± ۵/۱
CTAB	۱mM	۵۹/۸۶ ± ۳/۲۲	۵۱/۶۵ ± ۴/۰۹
یدو استیک اسید	۱mM	۷۶/۱۶ ± ۲/۴۸	۵۸/۲۰ ± ۴/۱۶
اوره	۱mM		
دی تیوتریتول	۱mM	۳۸/۲۳ ± ۰/۵۹	۱۰۱/۹۸ ± ۶/۴۵
بتامرکاپتواتانول	۱mM	۳۷/۴۷ ± ۰/۶	۱۱۴/۱۶ ± ۳/۶۸
های آلی‌حلال			
گلیسرول	۱٪	۶۴/۵۸± ۵/۴۳	۸۷/۸۸ ± ۳/۷۶
ایزوپروپانول	۱٪	۶۱ ± ۱/۰۸	۴۸/۹۸ ± ۳/۷۵
متانول	۱٪	۴۶/۹۹ ± ۳/۹۴	۸۲/۵۹ ± ۰/۹۷
اتانول	۱٪	۵۰/۵۷ ± ۷/۳۳	۶۸/۹۴ ± ۵/۸
ایزوبوتانول	۱٪	۳۷/۶۹ ± ۰/۶	۷۵/۷۷ ± ۱/۶۴
استون	۱٪	۵۰/۸۷ ± ۸/۵۶	۷۹/۱۸ ± ۴/۸۹

Characterization of thermostable and Ca^{2+} independent amylopullulanase from Indigenous bacteria *Cohnella* sp. A01

Faeze hasani[1,2], Saeed aminzadeh[1], naser farokhi[2], Mojtaba mamarabadi[2]
1- National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology
2- University shahrood

F.hasani26@yahoo.com

Abstract
Amylopullulanase (EC.3.2.1.41/1) of enzyme that break down starch and pullulan which has two different activities (pullulanase and amylase). Amylopullulanase is able to hydrolysis of α(1-4) and α(1-6) linkages in starch. Special features of the enzymatic hydrolysis of starch industry was especially taken into consideration. In this study, a thermostable amylopullulanase that called Amy1136 was amplified thermophilic bacterium *Cohnella* sp. A01 and using primers that were designed based on the nucleotide sequence Amy1136 gene, cloned in E. coli DH5α bacteria was expressed in *E. coli* BL21 bacteria. The biochemical and kinetic characterization on the substrate starch and pullulan was measured. This research showed that the enzyme has the best activity in 50ºC and pH=8. In addition this enzyme is stable in high temperature (90ºC) ; that the advantages of high temperatures in the industry, it is the increase in reaction speed and reduce microbial contamination. Thermostable feature of the enzyme was used for purification (purification of heat shock method). The enzyme is stable to pH changes (after 2 days of exposure to acidic and alkaline pH maintained its stability). Ag^{2+} increased the enzyme activity was several times but CO^{2+} decreased the enzyme activity to 0. The Ca^{2+} had no effect on increasing or decreasing enzyme activity. This shows likely hence this amylase is considered Ca^{2+} independent enzyme, which can be easily used in the washed industry.
Keywords: Amylopullulanase, Thermostable, Hydrolysis of starch industry, Purification, Ca^{2+} independent

Reference

1.**Guan, Q., Guo, X., Han, T., Wei, M., Jin, M., Zeng, F., . . . Cheong, G.-W. (2013).** Cloning, purification and biochemical characterisation of an organic solvent-, detergent-, and thermo-stable amylopullulanase from Thermococcus kodakarensis KOD1. *Process Biochemistry, 48*(5), 878-884 .

2.**Li, X., & Li, D. (2015)**. Preparation of linear maltodextrins using a hyperthermophilic amylopullulanase with cyclodextrin-and starch-hydrolysing activities. *Carbohydrate polymers, 119*, 134-141 .

3.**Nisha, M., & Satyanarayana, T** .(۲۰۱۵) .The role of N1 domain on the activity, stability, substrate specificity and raw starch binding of amylopullulanase of the extreme thermophile Geobacillus thermoleovorans. *Applied microbiology and biotechnology, 99*(13), 5461-5474 .