

تعیین توالی و بررسی خصوصیات مولکولی ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

سویه *Bacillus subtilis* B5d

Nucleotide sequence and molecular characterization a of β -1, 4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* strain B5d

شعله ده پهلوان^۱، مریم موسیوند^۲، مریم هاشمی^{۲*} و جلیل خارا^۱

Sholeh dahpahlavan¹, Maryam Mousivand², Maryam Hashemi^{2*} and Jalil Khara¹

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه ارومیه

۲- بخش تحقیقاتی بیوتکنولوژی میکروبی و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران-

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی- کرج- ایران

1-M.Sc, Biology Department, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.

2- Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research

Institute of Iran(ABRII), Agricultural Research Education and Extension

Organization (AREO), Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hashemim@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۰)

چکیده

این پژوهش به منظور تعیین برخی ویژگی‌های کاتالیتیکی و خصوصیات مولکولی ژن کدکننده آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در سویه *Bacillus subtilis* B5d انجام شد. ژن کدکننده این آنزیم در سویه B5d توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر، تعیین توالی و در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد. تجزیه توالی حاصله و رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار Mega.4 و Vector NTI انجام شد. براساس نتایج حاصله قطعه تعیین توالی شده شامل ۷۹۴ نوکلئوتید بود که یک رشته پپتیدی با ۲۶۴ اسید آمینه را کد می کند. تجزیه توالی آمینواسیدی این ژن در سویه مورد بررسی نشان داد که آنزیم اندوبتاگلوکاناز تولیدشده توسط سویه مورد پژوهش چندبخشی بوده که قسمت باند شونده به سلولز (Cellulose Binding Domain, CBD) آن مربوط به خانواده گلیکوزید هیدرولاز ۳ و قسمت کاتالیک (CD) آنزیم مورد بررسی متعلق به خانواده گلیکوزید هیدرولاز ۵ است. همچنین فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه B5d، در محدوده دمایی ۳۰-۷۰ درجه سانتی گراد و pH ۴/۶ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت کاتالیتیک آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد بوده که ۴۱/۸۳ U/L برآورد شد. بررسی پایداری آنزیم در شرایط دمایی و pHهای مختلف نشان داد که تا دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و در محدوده pH ۱۰-۵ آنزیم پایداری بهتری دارد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه فیلوژنی
باسیلوس سابتیلیس
پایداری آنزیمی
ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز
سویه B5d

مقدمه

سلولازها یا آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز به وسیله میکروارگانیسم‌های مختلف شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و مخمرها تولید می‌شوند. در بین این آنزیم‌ها، بتاگلوکانازها به دلیل درجه بالای پایداری دارای کاربردهای صنعتی و کشاورزی زیادی هستند. (Furtado et al. 2011). گلوکانازها به دو گروه اندو و اگزو گلوکانازها تقسیم می‌شوند. اندوگلوکانازها پیوندهای درون زنجیره‌ای را به صورت تصادفی شکسته و الیگوساکاریدها را تولید می‌کنند در حالی که اگزوگلوکانازها پیوندهای انتهای غیر احیا کننده زنجیره پلیمری را هیدرولیز و منوساکارید تولید می‌کنند (Morallefi and Seligy, 1986). آنزیم‌های اندو بتاگلوکاناز بر اساس نحوه عمل، شباهت توالی اسیدهای آمینه، خصوصیات سوبسترا و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی در پانزده خانواده گلیکوزید هیدرولاز (GH) طبقه بندی می‌شوند. در بین این خانواده‌های آنزیمی، خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها یکی از بزرگترین خانواده‌ها محسوب شده و تعداد زیادی از اندو بتا ۱ و ۴ گلوکانازها در آن قرار می‌گیرند. این خانواده متشکل از ۶۷ عضو با فعالیت‌های مختلف شامل اندوگلیکوزیل سرامیداز (EC 3.2.1.123)، سلولاز (EC 3.2.1.4)، لیچنیناز (EC 3.2.1.73)، بتامانوزیداز (EC 3.2.1.25)، گلوکان ۱ و ۳ بتاگلوکوزیداز (EC 3.2.1.58)، گلوکان اندو ۱ و ۶ بتاگلوکوزیداز (EC 3.2.1.75)، مانان اندو ۱ و ۴ بتامانوزیداز (EC 3.2.1.58)، سلولز ۱ و ۴ بتاسلویوزیداز (EC 3.2.1.91)، اندو ۱ و ۶ بتاگلاکتاناز (EC 3.2.1.-)، ۱ و ۳ بتاماناناز (EC 3.2.1.-) و اندو ۱ و ۴ بتازیلائناز (EC 3.2.1.8) است (John et al. 2010). بررسی ساختارهای سه بعدی برای تعداد زیادی از آنزیم‌های خانواده ۵ نشان داده که قسمت کاتالیتیکی این آنزیم‌ها دارای تاخوردگی (α/β) 8-barrel fold بوده و با نام TIM-barrel fold نیز شناخته می‌شوند. قسمت کاتالیتیکی از نظر شکل ظاهری شبیه به یک کاسه سالاد است. این ساختار در این خانواده بسیار حفاظت شده است و تنها شکل آن بین دایره و بیضی کامل متغیر است. این نوع تاخوردگی پروتئین در آنزیم‌های خانواده ۱۰ نیز مشاهده می‌شود و به همین دلیل هر دو خانواده ۵ و ۱۰ در دسته GH-A (گلیکوزید هیدرولاز A) قرار می‌گیرند (Pollet et al. 2010). مشخصه بتاگلوکانازهای خانواده

۵، گستردگی عمل بر سوبستراهای مختلف است، به طوری که نه تنها سوبسترای خطی بتاگلوکان را مورد حمله قرار می‌دهند بلکه همچنین جایگاه فعالشان (Active-site) را با الیگوساکاریدهای شاخه دار وفق می‌دهند. در هیدرولیز همو بتاگلوکان‌هایی که در آن‌ها مخلوط دو پیوند بتا ۱ و ۳ و بتا ۱ و ۴ وجود دارد، تمام پیوندهای بتا ۱ و ۳ بین دو پیوند بتا ۱ و ۴ شکسته می‌شوند. همچنین پیوندهای بتا ۱ و ۴ که قبل از پیوند بتا ۱ و ۳ قرار دارند مورد حمله واقع می‌شوند در حالی که پیوند بتا ۱ و ۴ که بلافاصله پس از بتا ۱ و ۳ در انتهای برش خورده واقع شده، هیدرولیز نمی‌شوند (Rabinovich et al. 2002).

باکتری‌های متعلق به جنس *Bacillus* از جمله باکتری‌های تولید کننده آنزیم سلولاز هستند. تعیین توالی و بررسی خصوصیات مولکولی ژن‌های کد کننده آنزیم‌های اندوگلوکانازها و اگزوگلوکانازها در گونه‌های مختلف این جنس به خصوص در *B. subtilis*، *B. latus* و *B. polymxa* به فراوانی انجام شده است. همچنین در بررسی‌های متعددی جایگاه اتصال سلولز (CBD) و جایگاه کاتالیکی (CD) ژن سلولاز سویه‌های جنس باسیلوس بررسی شده است (Bischoff et al. 2007). پژوهش‌های مربوط به تعیین توالی این ژن در گونه *B. subtilis* نشان داده است که آنزیم اندو بتاگلوکاناز به صورت یک پروپروتئین (pro protein) با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون سنتز می‌شود که پس از جدا شدن یک قسمت پپتیدی از انتهای کربوکسیلی تبدیل به پروتئین فعال با وزن مولکولی ۳۵ کیلو دالتون می‌شود (Lindahl and Tronsmo 1994). نقطه ایزوالکتریک این آنزیم ۵/۴ است و متعلق به خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولاز است (Mawadza et al. 2000). آنزیم بتاگلوکاناز در فرآوری مواد غذایی، تهیه خوراک دام، صنایع آبجوسازی، منسوجات، آماده سازی پروتوپلاست مخمر، تهیه اسانس‌های روغنی و ... کاربرد وسیعی دارد (Song et al. 2010). شایان ذکر است که برای رفع هرکدام از نیازهای صنعتی خاص، بتاگلوکانازهای مورد استفاده بایستی ویژگی‌های خاصی مانند پایداری مناسب در برابر حرارت و pH و فعالیت اختصاصی بالا را دارا باشند (Rajoka, 2004; Beshay et al. 2003).

با توجه به کاربردهای متنوع بتاگلوکانازها در صنایع مختلف بر اساس ویژگی‌های مولکولی و کاتالیکی آنزیم مورد استفاده،

میکرولیتر، شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR(10x)، ۴ میکرولیتر $MgCl_2(25mM)$ ، ۱ میکرولیتر $dNTPs(10mM)$ ، ۵ میکرولیتر آغازگر پیش‌رو (5'-atgaacgggtcaatctctatctt-3')، ۵ میکرولیتر آغازگر پس‌رو (5'-actaattgtgtctgtcccaaa-3')، با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۴ میکرولیتر (حاوی ۲/۵ واحد) از آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲ میکرولیتر دی.ان.ا. الگو با غلظت ۳۵ نانوگرم بر میکرولیتر و ۲۸/۶ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه به صورت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۵۱ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول پی.سی.آر روی ژل آگارز ۱ درصد با بافر TAE (1x) و ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد. بازیافت و خالص‌سازی قطعه موردنظر از ژل با استفاده از کیت High pure PCR Product purification Kit (Roche, Cat. No. 11. 732. 668. 001) انجام شد. دی.ان.ا. بازیافت شده توسط شرکت TAG Copenhagen (Danmark) تعیین توالی و پس از انجام تجزیه توسط نرم‌افزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد.

تجزیه فیلوژنتیکی ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

توالی مربوط به ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d پس از تعیین چهارچوب قرائت پروتئین (Reading frame) توسط Blast X با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI (Invitrogen; www.invitrogen.com/VectorNTI) به آمینواسید ترجمه شد. توالی مورد بررسی با ۱۴ توالی ژن بتا اندوگلوکاناز از بانک ژن NCBI به منظور گروه‌بندی در خانواده‌های گلیکوزیل هیدرولاز مورد مقایسه قرار گرفت. پس از اعمال هم‌ردیفی با نرم‌افزار ClustalW (Thompson et al. 1994)، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار Mega.4 با روش neighbor-joining ترسیم شد. درجه اعتبار سنجی گروه‌بندی‌های ایجاد شده با روش Bootstrap و با ۱۰۰۰ تکرار تعیین شد (Saitou and Nei, 1986).

تولید آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

ابتدا سویه مذکور در محیط NBY به صورت خطی کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

هدف بررسی حاضر تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d جدا شده از فیلوسفر درخت سیب و بررسی برخی ویژگی‌های عملکردی آنزیم ذکر شده هستند.

مواد و روش‌ها

سویه باکتریایی و شرایط کشت

سویه باکتریایی *B. subtilis* B5d با پتانسیل تولید آنزیم بتاگلوکاناز از بانک میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه شد. سویه مذکور از فیلوسفر درخت سیب در باغ‌های استان کرمان جداسازی و براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی مبتنی بر 16S rDNA به عنوان گونه *B. subtilis* تشخیص داده شده بود (Mousivand et al. 2012). فعال‌سازی سویه مورد بررسی به منظور انجام بررسی‌های بعدی روی محیط کشت NBY در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. (Lindeman et al. 1984).

استخراج دی.ان.ای ژنومی

برای استخراج دی.ان.ا. سویه باکتریایی *B. subtilis* B5d در محیط NB کشت و در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۸ ساعت قرارداده شد. توده زیستی در محیط NB (حداکثر 2×10^9 سلول در میلی‌لیتر) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز روماند (supernatante) حذف و فاز ته‌نشست برای استخراج دی.ان.ا. استفاده شد. استخراج دی.ان.ای ژنومی با استفاده از کیت Blood&Tissue DNAeasy Kit (QIAGEN, Cat.No.69504) و با توجه به دستورالعمل مربوطه از سویه B5d صورت گرفت. کیفیت و غلظت دی.ان.ا. استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتر نانودراپ (Spectrophotometr) (Thermo Scientific 2000C) و درطول موج ۲۶۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

تکثیر ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی.سی.آر)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی.سی.آر) به منظور تکثیر ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (*Bs celup*) انجام شد (Jung et al, 2010). واکنش پی.سی.آر در حجم ۵۰

سویه *B. subtilis* B5d در دماهای ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه سانتی گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور آنزیم در دماهای مورد نظر قرارداد شده و پس از گذشت زمان‌های معین (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه) سنجش فعالیت آنزیمی بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز به روش دی نیتروسالیسیلیک اسید و در pH ۵/۷۵ و غلظت ۱ درصد از سوسترای لچنین انجام شد. درصد فعالیت باقی مانده آنزیم پس از گذشت زمان مربوطه در هر دما در مقایسه با کنترل محاسبه شد.

بررسی پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d در pH های مختلف

پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه *B. subtilis* B5d در pH های مختلف محاسبه شد. به این منظور ابتدا آنزیم به نسبت ۱:۱ با بافر مناسب (pH=۳-۱۰) رقیق و سپس آنزیم‌های رقیق شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرارداد شدند. سپس سنجش آنزیمی در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و غلظت ۱ درصد از سوسترای لچنین انجام شد. درصد فعالیت باقی مانده آنزیم بتاگلوکاناز در pH های مختلف در مقایسه با کنترل ارزیابی شد.

نتایج و بحث

تکثیر ژن اندو بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

ژن اندو بتاگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d با آغازگر Bs cel up تکثیر شد. محصول پی.سی.آر یک قطعه ۱۵۰۰bp بود که پس از خالص سازی، تعیین توالی و با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این مقایسه نشان داد که قطعه تکثیر شده از استرین B5d مربوط به ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز بوده که با توالی‌های ژن بتاگلوکاناز متعلق به گونه‌های باسیلوس از قبیل *B. megaterium* (accession N.: AGG91154.1)، *B. mojavensis* (accession N.: WP010334430)، *B. subtilis* (accession N.: AHD24502.1) و *B. subtilis* (accession N.: AHC02484.1) موجود در بانک ژن پایگاه اطلاعاتی NCBI بیش از ۹۹ درصد شباهت دارد (شکل ۱).

همچنین با بررسی ساختار اولیه حاصل از ترجمه این توالی مشخص شد که ناحیه کاتالیک آنزیم بتاگلوکاناز متعلق به خانواده

سپس محیط کشت NB با یک لوپ از باکتری رشد یافته روی محیط NBY تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. به منظور تولید آنزیم، ۲ درصد از مایه تلقیح آماده شده به محیط کشت تولید آنزیم (۱۰ گرم بر لیتر مالت، ۳ گرم بر لیتر عصاره گوشت، ۴ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۰/۵ گرم بر لیتر CaCl_2 ، H_2O ، ۰/۳ گرم بر لیتر $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و ۱ گرم/لیتر K_2HPO_4 برای ۱ لیتر) افزوده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با دور ۱۸۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. به منظور جداسازی آنزیم تولید شده، محیط‌های کشت تخمیر شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. بخش روماند (Supernatant) که حاوی آنزیم بتاگلوکاناز بود تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Hashemi et al., 2010).

بررسی ویژگی‌های عملکردی آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

تولیدی سویه *B. subtilis* B5d

به منظور تعیین ویژگی‌های عملکردی آنزیم تولید شده، فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در pH=۴/۶ دماهای ۳۰، ۵۵ و ۷۰ و غلظت ۱ درصد از سوسترای لچنین (یک درصد) اندازه گیری شد. به منظور سنجش فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه B5d از روش دی نیتروسالیسیلیک اسید استفاده شد (Bailey et al., 1992). ابتدا ۱۰۰ میکرو لیتر سوسترای لچنین (۱ درصد) به مدت ۵ دقیقه در دمای مورد نظر قرارداد شده. برای تهیه pH های مختلف نیز از بافرهای سیترات و فسفات با غلظت ۵۰ میلی مولار استفاده شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر آنزیم به سوسترای اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای مورد نظر قرارداد شده و در نهایت ۶۰۰ میکرو لیتر از معرف دی.ان.اس به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرارداد شده. قندهای آزاد شده از لچنین در طول موج ۵۴۰ نانومتر و با استفاده از معادله حاصل از منحنی استاندارد گلوکز اندازه گیری شد. واحد فعالیت آنزیم (Unit) برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند در یک دقیقه، در شرایط مطلوب، یک میکرومول سوسترای را به محصول تبدیل کند.

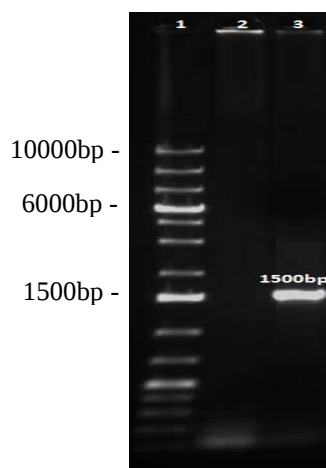
بررسی پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه

B. subtilis B5d در دماهای مختلف

پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط

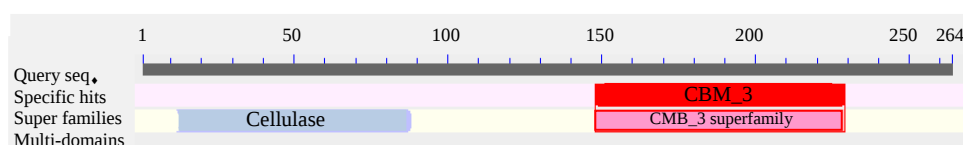
B5d ۸۱ آمینواسیدی بوده و در انتهای کربوکسیل واقع شده است این دو ناحیه توسط یک توالی اتصال دهنده ۵۹ آمینواسیدی به هم متصل می شوند (شکل ۲).

۵ گلیکوزیل هیدرولازها در انتهای ناحیه آمینی قرار گرفته و شامل ۶۷ اسید آمینه از شماره ۱۲ تا ۸۸ می شود. همچنین ناحیه CBD متعلق به خانواده ۳ در ناحیه کربوکسیل این پروتئین قرار گرفته و شامل اسیدهای آمینه ۱۴۸ تا ۲۲۹ می شود. ناحیه CBD در سویه



شکل ۱- محصول پی.سی.آر ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز استرین *Bacillus subtilis* B5d (1500 bp). چاهک شماره ۱: Ladder؛ چاهک شماره ۲ کنترل و چاهک شماره ۳ قطعه‌ی تکثیر شده از ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

Figure 1- PCR product of the beta 1 and 4 endoglucanase gene of the *Bacillus subtilis* strain B5d (1500 bp). Lane 1 (Ladder), Lane 2 (control) and Lane 3 (the PCR product of β -glucanase gene)



1 qdvndapdeq lkdanvmyal hfyagthgqf lrdkadyals kgapifvtew gtsdasgngg
61 vyldqsrewl nfldskkiw vwnlsdkqe sssalkpgas ktggwplsdl sasgtfvren
121 irgsqlsskd rsetpkqekp aqensisvqy rtgdgsvnsn qirplinvkn nskttvnlkn
181 vtvrwfyntk nkgqnfcdy akigcsnvth kfvthkpvk gadaflelgf kngtlspgas
241 tgniqirlln edwgnfsqtg dfsf

Catalytic. Domain

CBM

شکل ۲- توالی آمینواسیدی ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز استرین *Bacillus subtilis* B5d. ناحیه کاتالیکی آنزیم بتاگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها در انتهای N و ناحیه باند شونده با سلولز متعلق به خانواده ۳ در ناحیه C این ژن قرار گرفته است. این نواحی به ترتیب توسط آمینواسید ۱۲ تا ۸۸ و اسیدهای آمینه ۱۴۸ تا ۲۲۹ کد می شود.

Figure 2- The amino acids sequences of β 1, 4 endo-glucanase gene from the *Bacillus subtilis* strain B5d. The amino acids of 12 to 88 is the catalytic domain in N terminal and the amino acids of 148 to 229 is cellulose binding domain (CBM3) in C terminal of β 1, 4 endo-glucanase.

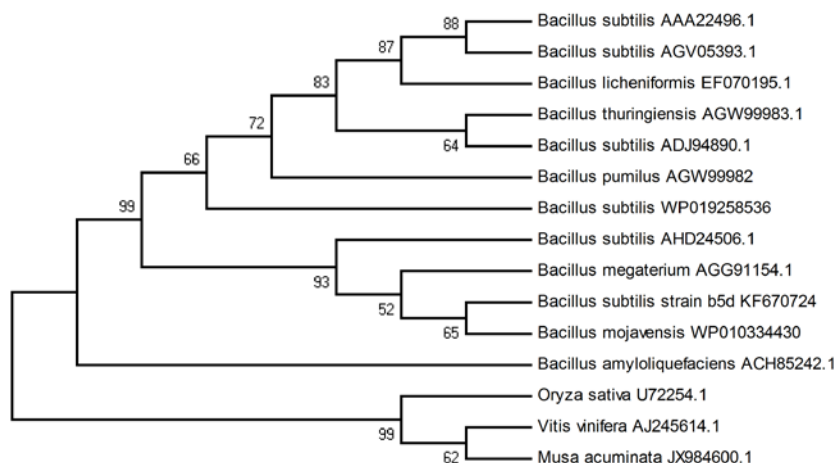
subtilis (accession N.: AAA22496.1), *B. subtilis* (accession N.: AGV05393.1), *B. thuringiensis* (accession N.: AGW99983.1), *B. pumilus* (accession N.: AGW99982), *B. megaterium* (accession N.: AGG91154.1), *B. mojavensis* (accession N.: WP010334430), *B. subtilis* (accession N.: ADJ94890.1), *B. subtilis* (accession N.: WPO19258536), *B. subtilis* (accession N.: AHD24502.1), *B. subtilis* (accession N.: AHC02484.1), *B. licheniformis*, *Oryza active* (accession N.: U72254.1), *Vitis vinifera* (accession N.: AJ245614.1), *Musa acuminata* (accession N.: JX984600.1). نشان داد که ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d بیشترین شباهت را با درجه بالای اعتبار به ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولاز (E. C. N: 3.2.1.4) گونه‌های *Bacillus* دارد. پژوهش‌های متعددی حضور ژن بتا ۱ و ۴ گلوکاناز در سویه‌های باسیلوس و تعلق آن را به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها تأیید می‌کند (شکل ۳).

پژوهش‌های انجام شده نشان داده است اغلب سلولازها و زیلانازها چند ناحیه‌ای (Multi domain) بوده و دارای نواحی کاتالیک (Catalytic Domain) و ناحیه باند شونده به سلولز (Cellulase) (Bindind Domain (CBD) هستند. در اغلب باکتری‌ها ناحیه باند شونده با سلولز در انتهای کربوکسیلی یا آمینی واقع شده و ۱۰۰ آمینواسیدی است. ناحیه کاتالیکی و ناحیه باند شونده به سلولز به وسیله توالی‌های اتصال دهنده (Linker sequence) به هم متصل می‌شوند. این توالی‌ها غنی از آمینواسید سرین بوده و در اغلب باکتری‌های جنس *Pseudomonas* یافت می‌شود. طول این ناحیه بین ۶ تا ۵۹ آمینواسید متغیر است (Ferreira et al. 1991).

تجزیه فیلوژنتیک ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه

B. subtilis B5d

پس از ترجمه ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز B5d با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI توالی ژن ذکر شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد (Accession NO. KF670724). قطعه تعیین توالی شده ژن ذکر شده شامل ۷۹۴ نوکلئوتید است که یک رشته پپتیدی شامل ۲۶۴ اسید آمینه را کد می‌کند. تجزیه فیلوژنی این توالی با ۱۴ توالی مرجع در پایگاه اطلاعاتی NCBI شامل *B.*



شکل ۳- آزمون فیلوژنی براساس توالی آمینواسید ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز استرین *Bacillus subtilis* B5d و برخی توالی‌های مرجع ثبت شده در پایگاه NCBI. اعداد پشت شاخه‌های درجه اعتبارسنجی گروه‌بندی‌ها را براساس روش Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد.

Figure 3- Fig. 3 Phylogenetic analysis based on the partial amino acid sequences of β 1, 4 endo-glucanase genes from the *Bacillus subtilis* strain B5d and some reference sequences retrieved from NCBI GenBank. The numbers at the nodes indicate bootstrap values based on 1.000 replications.

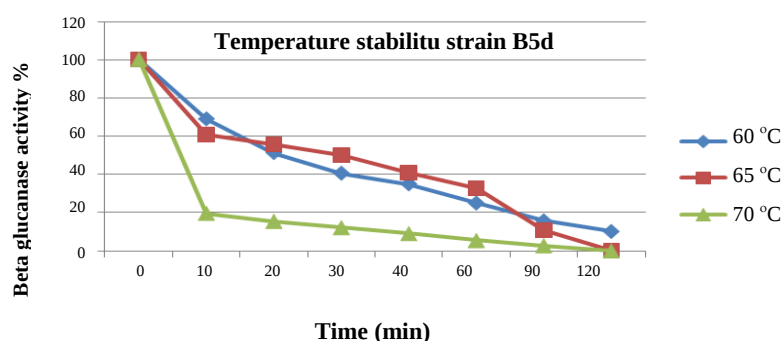
قرار گرفتن در خانواده ۱۶ گلیکوزید هیدرولازها از ژن بتاگلوکاناز گیاهان در خانواده ۱۶ گلیکوزید هیدرولازها به شدت متفاوت است. براساس یک قاعده کلی توالی مربوط به خانواده های مشابه بیشتر به هم مرتبط بوده و شباهت بیشتری دارد. چنین دیدگاهی باعث شده که توالی های مشابه در خانواده های مشابه قرار بگیرند (Diaz et al. 1997). همچنین براساس نتایج حاصل از درخت فیلوژنی مشخص شد که اگرچه جدایه B5d دارای آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولاز است و با گونه های مختلف باسیلوس در یک گروه قرار می گیرد اما تنوع در دورن خانواده آنزیمی بین گونه های مختلف باسیلوس و حتی سویه های متفاوت یک گونه مشهود است.

ویژگی های بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولیدی توسط سویه *B. subtilis* B5d

فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه B5d در محدوده دمایی ۷۰-۳۰ درجه سانتی گراد و pH ۴/۶ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این ارزیابی نشان داد که آنزیم ذکر شده در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد با فعالیتی معادل ۴۶۱/۸۳ U/L بیشترین فعالیت کاتالیتیک را دارا است. فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه ذکر شده در دماهای ۳۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد به شدت کاهش یافت. میزان فعالیت آنزیم در دماهای ۳۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد به ترتیب ۱۱۲/۹۸ و ۱۸۶/۴۸ U/L برآورد شد.

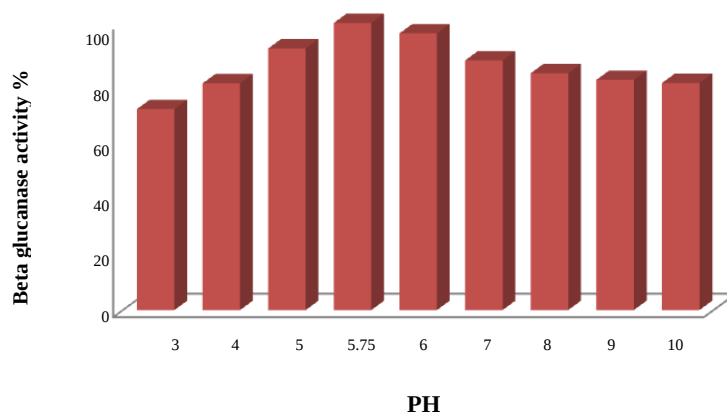
بررسی ساختار و توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در دو سویه HR68 و *Bacillus* CH43 نشان داد که این آنزیم دارای تاخوردگی $(\alpha/\beta)_8$ است و با اندوگلوکانازهای خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولاز *B. subtilis* دارای همولوژی کامل است (Mawadza et al. 2000). همچنین بررسی توالی ژن بتا ۱ و ۳-۱ و ۴ گلوکاناز *B. subtilis* A8 نشان داد که آنزیم ذکر شده متعلق به خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها است. این آنزیم پروتئینی با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون سنتز می کند و شامل ۲۵۶ آمینواسید در ناحیه کاتالیک و ۸۲ آمینواسید در ناحیه اتصال به سلولز (CBD) است (Jung et al. 2010). بتا ۱ و ۴ گلوکاناز *B. cereus* بیشترین شباهت را به ژن بتاگلوکاناز گونه های *Bacillus* خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولاز دارد که پروتئینی با وزن مولکولی ۵۰ کیلودالتون سنتز می کند و دارای تاخوردگی $(\alpha/\beta)_8$ است (Yan et al. 2012).

همچنین براساس نتایج حاصل از تجزیه فیلوژنی مشخص شد که توالی ژن بتاگلوکاناز سویه مورد بررسی و سایر سویه های مرجع که آنزیم اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها را تولید می کنند از ژن بتاگلوکاناز گونه *B. amiloliquefaciens* (accession N: ACH85242.1) که متعلق به خانواده ۱۶ گلیکوزید هیدرولازها هستند و آنزیم بتا ۱ و ۳-۱ و ۴ اندوگلوکاناز را سنتز می کند به طور کامل متمایز است. قابل ذکر است که آنزیم بتاگلوکاناز باکتری *B. amiloliquefaciens* با وجود



شکل ۴- پایداری حرارتی آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d

Figure 4- Temperature stability of *Bacillus subtilis* B5d β 1, 4 endo-glucanase



شکل ۵- پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d در pH های مختلف

Figure 5- pH stability of *Bacillus subtilis* B5d β 1, 4 endo-glucanase

آنزیم بتاگلوکاناز گونه‌های باسیلوس تا محدوده دمایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد است و با افزایش دما فعالیت آنزیم به سرعت کاهش می‌یابد. آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز سویه *B. subtilis* NSRS89-24 ۱۰۰ درصد از فعالیت خود را در دامنه دمایی ۴۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد حفظ کرده، افزایش دما تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد منجر به کاهش ۵۰ درصد از فعالیت آنزیمی شد و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم به صفر رسید (Leelasuphakul et al. 2006). همچنین در بررسی دیگری پایداری دمایی آنزیم بتا گلوکاناز دوسویه *Bacillus* HR43 و *Bacillus* HR68 نشان داد که هر دو آنزیم تا محدوده دمایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت داشته و با افزایش دما فعالیت آنزیمی به شدت کاهش می‌یابد (Mavadza et al. 2000).

بررسی پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه B5d در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و محدوده pH ۳-۱۰ نشان داد که بیشترین پایداری آنزیم در pH ۵-۶ است. براساس نتایج به دست آمده آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه B5d توانایی حفظ ۷۰ درصد، ۷۹ درصد، ۹۱ درصد، ۹۶ درصد، ۸۷ درصد، ۸۲ درصد، ۸۰ درصد و ۷۹ درصد از فعالیت خود را به ترتیب در pH های ۳ تا ۱۰ دارا است. براساس نتایج حاصله مشخص شد که آنزیم اندوگلوکاناز سویه B5d در محدوده pH ۵ تا ۱۰ پایدار است. نتایج به صورت درصد فعالیت باقیمانده در (شکل ۵) ارایه

پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز *B. subtilis* B5d در دماها و pH های مختلف

پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d در دماهای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه ۶۸ درصد از فعالیت آنزیمی حفظ می‌شود. در ادامه و با گذشت زمان روند کاهشی فعالیت آنزیمی مشاهده شد. به طوری که پس از گذشت زمان‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه، آنزیم به ترتیب ۵۱ درصد، ۴۰ درصد، ۳۴ درصد، ۲۴ درصد و ۱۵ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد و در زمان ۱۲۰ دقیقه به ۱۰ درصد رسید. بررسی پایداری آنزیم در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد که با گذشت زمان فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد، به طوری که بعد از ۱۰ دقیقه ۶۰ درصد از فعالیت کاتالیتیک آنزیم حفظ شود. با گذشت زمان‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه، آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه B5d به ترتیب ۵۵ درصد، ۵۰ درصد، ۴۰ درصد، ۳۲ درصد، ۱۰ درصد و ۰/۲ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد. در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان فعالیت آنزیمی به طور قابل توجهی کاهش یافت و با گذشت ۱۰ دقیقه تنها ۱۹ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد و در ۶۰ دقیقه فعالیت آنزیم به ۹ درصد رسید و پس از ۱۲۰ دقیقه به صفر رسید (شکل ۴). در بررسی‌های مشابه نیز پایداری دمایی

(Jung *et al.* 2010). همان‌طور که در نتایج این بررسی نیز مشخص شد پایداری در محدوده گسترده‌ای از pH از خصوصیات آنزیم بتاگلوکاناز جنس باسیلوس است (Hakamada *et al.* 2002). با توجه به دما و pH بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز سویه B5d به نظر می‌رسد این آنزیم گزینه مناسبی برای استفاده در خوراک دام و طیور باشد. بدین‌منظور ارزیابی شرایط تولید آنزیم با استفاده از پسماندهای کشاورزی، تعیین شرایط بهینه و محیط کشت اقتصادی برای تولید در فاز بعدی انجام خواهد شد.

منابع

Beshay U, Enshasy HE, Ismail I, Moawad H, Wojciechowska E, Ghany SA. 2003. β -glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli*: Effect of growth substrates and development of a culture Murmedium in shake flasks and stirred tank bioreactor. *Process Biochem* 39: 307-313.

Bailey M, Biely P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol* 23:257-70.

Bischoff K, Liu S, Hughes SR. 2007. Cloning and characterization of a recombinant family 5 endo glucanase from *Bacillus licheniformis* strain B-41361. *Process Biochem* 42: 1150-1154.

Coughlan MP, Hazlewood GP. 1993. 1, 4- β -Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem* 17: 259-289.

Diaz R, Sapag A, Peirano A, Steiner J, Eyzaguirre J. 1997. Cloning sequencing and expression of the DNA of endoxylanase B from *Penicillium purpurogenum* Gene. 187:247-257.

Ferreiral MA, Hazlewood P, Barker J, Gilbert HJ. 1991. The celloextrinase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* consists of multiple functional domains. *Biochem J.* 279: 793-799.

Furtado GP, Ribeiro LF, Santos CR, Tonoli CC, de Souza AR, Oliveira RR, Murakami MT, Ward RG. 2011. Biochemical and structural characterization of a β -1, 3-1, 4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochem* 46: 1202-1206.

Hashemi M, Shojasadati SA, Razavi SH, Mousavi SM. 2011. The potential of brewer's spent grain to improve the production of α -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system. *New Biotechnol.* 28(2), 165-172.

Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G. 1996. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *PNAS* 92(15):

شده‌است. بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز سویه *B. cereus* در محدوده pH ۲-۱۰ نشان داد که آنزیم ذکر شده حدود ۹۰ درصد از فعالیت خود را در دامنه pH ۵-۹ حفظ کرد و در ۸۳ pH درصد از فعالیت خود را حفظ می‌کند (Yan *et al.* 2012). همچنین بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳-۱ و ۴ گلوکاناز *B. subtilis* A8-8 نشان داد که آنزیم ذکر شده مشابه با آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز جدایه مورد بررسی در این پژوهش قادر است حدود ۸۰ درصد از فعالیت خود را در دامنه pH ۲-۸ حفظ کند. اگرچه بیشترین فعالیت آنزیمی در pH = ۸ مشاهده شد

7090-7094.

Hakamada Y, Endo K, Takizawa S. 2002. Enzyme properties, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1570: 174-180.

Jenkins J, Lo Leggio L, Harris G, Pickersgill R. 1995. Beta-glucosidase, beta-galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold beta/alpha architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of beta-strands four and seven. *FEBS Lett* 362(3): 281-285.

John FJ, González JM, Pozharski E. 2010. Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: a dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups. *FEBS Lett* 584(21): 4435-4441.

Jung YJ, Lee YS, Park IH, Chandra MS, Kim KK, Choi YL. 2010. Molecular cloning, purification and characterization of thermostable β -1, 3-1, 4 glucanase of *Bacillus subtilis* A8-8. *Indian J. Biochem. Biophys* 47:203-210.

Lindahl V, Tronsmo A. 1994. Nucleotide sequence of an endo-1, 4-glucanase gene from *Bacillus subtilis* CK-2. *Antonie van Leeuwenhoek.* 66, 327-332.

Lindemann J, Arny DC, and Upper CD. 1984. Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on snap bean and nonhost plants and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. *Phytopathol.* 74: 1329-1333.

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 Microb. Technol* 38: 990-997.

Mawadza C, Hatti-Kaul R, Zvaunya R, Mattiasson B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *J. Biotechnol.* 83: 177-87.

- Moranelli M, Seligy V. 1986.** Structure of a *Bacillus subtilis* endo-p-1, Cglucanase gene. *Nucleic Acids Res* 14: 9159-9170.
- Mousivand M, Hashemi M, Makhdumi MA. 2011.** Enzyme production for animal and poultry feed by some biofilm forming *Bacillus subtilis* strains. IV international conference on environmental, Ind. Appl. Microbiol Spain.
- Pollet A, Delcour JA, Courtin CM. 2010.** Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit. Rev. Biotechnol* 30(3): 176-191.
- Rajoka MI. 2004.** Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas flavigena*. *Electronic J. Biotechnol* 0717-3458.
- Rabinovich ML, Melnick MS, Bolobova AV. 2002.** The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochem* 67(8): 850-871.
- Saitou N and Nei M. 1986.** The number of nucleotides required to determine the branching order of three species with special reference to the human-chimpanzee-gorilla divergence. *J. Mol. Evol* 24: 189-204.
- Song J, Nam K, Sun YU, Kang M, Kim CH, Kwon SK, Lee J, Lee YH. 2010.** Molecular and biochemical characterization of a novel arthropod endo- β -1, 3-glucanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus* horizontally acquired from bacteria. *Comp. Biochem. Physiol* 155: 403-412.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994.** CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Vijayendra S, Kashiwagi Y. 2009.** Characterization of new acid stable polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol* 44: 92-97.
- Yan H, Dai Y, Zhang Y, Yan L, Liu D. 2012.** Purification and characterization of an endo-1, 4- β -glucanase from *Bacillus cereus*. *Afr. J. Biotechnol* 10(72): 16277-16285.