Crop Biotech.
Spring and Summer (2014) 6: 95-105.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره ششم، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (۱۰۵-۹۵)

تعیین برخی ویژگی‌های کاتالیتیکی و آنالیز مولکولی ژن آنزیم اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه *Bacillus subtilis* A14h جدا شده از مزارع برنج

سمیه خسروجردی[۱]، مریم هاشمی[۲]*، مریم موسیوند[۳]
۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه آموزشی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
۲. استادیار پژوهشی بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
۳. مربی پژوهشی بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۲۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۳۰)

Catalytic Characterization and Molecular Analysis Endo1, 4-Beta Glucanase Gene of *Bacillus subtilis* Strain A14h Isolated from Rice Fields

S. KHOSROJERDI[1], M. HASHEMI[2]*, M. MOUSIVAND[3]
1. Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran.
2, 3. Microbial Biotechnology and Biosafety Departments. Biotechnology Research Institute of Iran. Karaj, Iran.
(Received: July. 16, 2014 - Accepted: Sep. 21, 2014)

Abstract

Cellulases can hydrolysis cellulose into glucose units which act in a synergistic manner of three enzymes endo-beta -1, 4-glucanase, cellobiohydrolase and beta-glucosidase. Nowadays, cellulases are used in various industries including animal feeds, textile, sewage treatment, brewery industries and biofuel production. Demand for cellulolytic enzymes with unique catalytic properties is growing more rapidly than ever before. In this study, *Bacillus subtilis* A14h with cellulase production potential was identified using biochemical and molecular (16SrDNA gene) methods.The optimum conditions of *B. subtilis* A14h cellulase activity was evaluated in the presence of two type of substrates (carboxymethyl cellulose and beta-glucan), temperatures range of 30-70°C,and pH 4.6. Also, *endo 1, 4-beta glucanase* gene amplified using specific primers, sequencing outcome was recorded in the NCBI database. Sequence analysis and construction of phylogenetic trees was performed using vector NTI and Mega.4 softwares.The results showed that the isolate belongs to the *Bacillus subtilis* species. The phylogenetic analysis and comparison of the amino acid sequence of endo -1, 4-beta glucanase gene showed that the enzyme catalytic region belongs to glycosyl hydrolases family 5 and the non catalytic region was placed in the CBM3 family. The *B. subtilis* A14h cellulase was most closely related to the cellulase of *B.subtilis* strains. The results showed that the highest enzyme activity equal to 1464.25 U/ml was obtained in the presence of beta-glucan substrate at 55° C.

Keywords: Endo -1, 4-beta glucanase gene, *B.subtilis*, 16s rDNA gene, Phylogeny, Catalytic characterization

چکیده

سلولازها با فعالیت همزمان سه آنزیم اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز، سلوبیوهیدرولاز و بتا-گلکوزیداز می‌توانند سلولز را به واحدهای گلوکز تجزیه کنند. در حال حاضر، سلولازها اغلب در صنایع خوراک دام، نساجی، تصفیه پساب، آبجوسازی و تولید سوخت‌های زیستی استفاده می‌شوند و تقاضا برای خرید این آنزیم‌ها با ویژگی‌های کاتالیتیکی خاص رشد فزاینده‌ای دارد. در این مطالعه سویه *Bacillus subtilis* A14h با قابلیت تولید آنزیم سلولاز با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی (ژن 16SrDNA) شناسایی شد. شرایط بهینه عملکرد آنزیم تولید شده توسط سویه مورد نظر در حضور دو نوع سوبسترا (کربوکسی متیل سلولز و بتا گلوکان) ودر محدوده دمایی ۳۰-۷۰°C و در pH ۴/۶ ارزیابی شد. همچنین ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز نیز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر، توالی یابی ونتیجه در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد. آنالیز توالی‌های به دست آمده و رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI و Mega.4 انجام شد. نتایج نشان داد که جدایه مورد بررسی متعلق به گونه *B. subtilis* است. همچنین نتایج آنالیز فیلوژنتیکی و مقایسه توالی آمینو اسیدی ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه مورد بررسی نشان داد که ناحیه کاتالیتیکی آنزیم مذکور متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها بوده و ناحیه غیرکاتالیتیکی آن در خانواده CBM۳ قرار گرفته و بیشترین شباهت را به آنزیم سلولاز سویه‌های *B. subtilis* دارند. هم‌چنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در حضور سوبسترای بتاگلوکان و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد معادل ۱۴۶۴ U/ml تخمین زده شد.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس سابتیلیس*، ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز، 16SrDNA، فیلوژنی، ویژگی کاتالیتیکی

* نویسنده مسئول: مریم هاشمی
E-mail: hashemim@abrii.ac.ir

مقدمه

سلولز فراوان‌ترین ماده آلی تجدیدپذیر و فراوان‌ترین پلیمر طبیعی در کره زمین است. این ترکیب یک هموپلی‌ساکارید خطی بدون شاخه است که استفاده از آن به عنوان منبع انرژی و مواد شیمیایی نیازمند تبدیل آن به اشکال قابل استفاده‌ای مانند گلوکز، اتانول و مواد شیمیایی دیگر می‌باشد. هیدرولیز آنزیمی سلولز با استفاده از سلولاز به دلیل انجام این تبدیل بدون آلودگی محیطی مورد توجه است (Izquierdo *et al.*, 2010).

آنزیم‌های سلولاز بر اساس شباهت توالی‌های اسید آمینه نواحی کاتالیتیکی خود در ۱۵ خانواده از ۸۶ خانواده گلیکوزیدهیدرولازها گروه‌بندی شده‌اند و متشکل از یک کمپلس آنزیمی هستند که به طور هم‌افزایی با هم همکاری می‌کنند و شامل (I) اندوگلوکوناز (EC 3.2.1.4)، (II) اگزوگلوکونازها که شامل: ۱و۴-بتا-D-گلوکان گلوکانوهیدرولاز (EC 3.2.1.74) و ۱و۴-بتا-D-سلوبیوهیدرولاز (EC 3.2.1.91) و (III) بتا-گلوکوزیداز (EC 3.2.1.21) هستند. اندوگلوکانازها به صورت تصادفی در مکان‌های غیرکریستالی زنجیره پلی‌ساکاریدی سلولز برش ایجاد می‌کنند و منجر به تولید الیگوساکاریدهایی با طول‌های مختلف و در نتیجه زنجیره‌هایی با پایانه‌های جدید می‌شوند (Lynd *et al.*, 2002). همچنین این آنزیم می‌تواند پیوند اندو ۱و۴-D-گلیکوزیدی در سلولز، لچینن و بتا-گلوکان را به صورت تصادفی هیدرولیز کند (Sadhu and Maiti, 2013). اگزوگلوکونازها با انجام فرآیند تجزیه بر پایانه کاهیده شده یا کاهیده نشده زنجیرهای پلی‌ساکاریدی سلولز منجر به تولید گلوکز و سلوبیوز می‌شود. بتا-گلوکوزیدازها محلول‌های سلودکسترین و سلوبیوز را به گلوکز هیدرولیز می‌کنند (Lynd *et al.*, 2002).

در اکثر خانواده‌های سلولازی این آنزیم دارای ۲ ناحیه بنام ناحیه کاتالیتیکی و ناحیه باند شونده بوده که توسط یک رابط (linker) به یکدیگر متصل شده اند. در ناحیه کاتالیتیکی جایگاه فعال آنزیم قرار داشته و فرآیند کاتالیزوری در آن انجام می‌گیرد و ناحیه باند شونده و یا همان CBM منجر به اتصال بهتر سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم شده و رابط هم نقش برقراری اتصال بین این دو ناحیه را بر عهده دارد. آنزیم سلولاز برای تجزیه سلولز به هر دو ناحیه نیاز دارد (Linder *et al.*, 1995).

تبدیل بیوتکنولوژیکی زیست‌توده سلولزی رویکردی سازگار با محیط زیست برای توسعه فرآیندهای زیستی و تولید محصولات جدید است. سلولازهای میکروبی با توجه به ماهیت پیچیده و کاربردهای صنعتی گسترده آنها به عنوان کاتالیزورهای زیستی به کانون توجه تبدیل شده‌اند (Kuhad *et al.*, 2011). در حال حاضر، سلولازها و آنزیم‌های مربوطه، به طور گسترده‌ای در کشاورزی و به منظور تحقیق و افزایش بهره‌وری در مواردی مانند غذا، آبجوسازی و نوشیدنی‌ها، خوراک دام و طیور، نساجی و شوینده‌ها، خمیر کاغذ و صنایع کاغذ استفاده می‌شوند. علیرغم افزایش تقاضا برای خرید این گروه از آنزیم‌ها فعالیت آنزیم سلولاز معمولاً پایدار نبوده و متأثر از منابع سلولزی و تنش‌های محیطی مانند دمای بالا است. به عنوان کاتالیست-های صنعتی، تحمل دماهای بالا یک ویژگی مطلوب برای آنزیم به شمار می‌آید (Li *et al.*, 2008).

در مقایسه با سلولازها قارچی، سلولازهای باکتریایی معمولاً ثبات حرارتی بیشتری دارند. همچنین باکتری‌ها سرعت رشد بیشتری داشته، قادر به استفاده از منابع ارزان قیمت کربن و نیتروژن به منظور رشد بوده و با تراکم سلولی بسیار بالا، قادر به ترشح میزان بالایی از آنزیم هستند. علاوه بر این سیستم بیان ژن و دست‌کاری ژنتیکی باکتری‌ها راحت‌تر بوده و افزایش بیان‌سلولاز در باکتری‌ها نسبت‌به سلولازهای قارچی عملی‌تر و ساده‌تر است (Li *et al.*, 2008).

بررسی آنزیم های ترشح شده توسط گونه‌های باسیلوس (مانند سلولاز، پروتئاز و آمیلاز) نشان داده است که گونه‌های باسیلوس: *B. cereus*، *B. licheniformis*، *B. subtilis*، *B. polymyxa*، *B. stearothermophilus* و *B. amyloliquefaciens* (Kyoung *et al*., 2012, Han *et al*.,1995)، توانایی تولید سلولاز را دارند. از آنجا که این سویه‌ها هر سه نوع سلولاز را تولید نمی‌کنند، بنابراین قادر به هیدرولیز کامل سلولز کریستالی نیستند. بررسی سویه‌های دیگر این گونه‌ها مشخص کرد که سویه *Bacillus subtilis* D40 توانایی تولید آنزیمی با ویژگی‌های هر سه نوع آنزیم سلولاز را دارا بوده و قادر به تجزیه کامل سلولز کریستالی می‌باشد (Han *et al*.,1995). در این مطالعه سویه *B. subtilis* A14h با قابلیت تولید آنزیم سلولاز به منظور تعیین برخی ویژگی‌های آنزیمی و آنالیز توالی ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز و تعیین خانواده آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

باکتری تولیدکننده آنزیم سلولاز و شرایط نگهداری

در این مطالعه سویه *B. subtilis* A14h با قابلیت تولید آنزیم سلولاز از بانک میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران مورد استفاده قرار گرفت (Mousivand *et al*., 2012). جدایه مذکور از فیلوسفر گیاه برنج در استان گیلان جداسازی و به صورت مقدماتی شناسایی شده بود. به منظور فعال‌سازی، باکتری در محیط کشت NBY شامل (K_2HPO_4: 8g/L، Nutrient Broth: 1g/L، KH_2PO_4: 0.25g/L، Yeast Extract: 1g/L، $MgSO_4$ (1M): 1ml/L، Glucose: 2g/l و Agar: 18g/L) کشت شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C نگهداری شد.

شناسایی مولکولی سویه *B. subtilis* A14h

استخراج DNA سویه مورد بررسی به منظور شناسایی مولکولی مبتنی بر ژن ۱۶S rDNA با استفاده از کیت DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN. Cat.No.69504) انجام شد. تکثیر ژن ۱۶S rDNA با استفاده از پرایمرهای پیش‌رو paf (5́-agagtttgatcctggctcag-3́) و پس‌رو par (5́-aaggaggtgatccagccgca-3́) انجام پذیرفت (Zakaria *et al*., 2010). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۲/۵ میکرولیتر ($MgCl_2$ (25mM، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش‌رو، ۱ میکرولیتر آغازگر پس‌رو، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۱۶/۳ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. این واکنش در دستگاه ترموسایکل با برنامه زمانی-دمایی، به صورت واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C، به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در ۵۸°C به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C صورت گرفت. قطعه موردنظر با استفاده از کیت High pure PCR Product purification Kit (Roche. Cat. No. 11. 732. 668. 001) بازیافت و تعیین توالی شد. آنالیز نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI انجام شد. نتایج مربوط به توالی‌یابی در بانک ژن پایگاه NCBI ثبت شد.

ردیابی ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز در سویه A14h

به منظور بررسی حضور ژن اندو-بتا-۱و۴ گلوکاناز، ابتدا DNA ژنومی با استفاده از کیت DNeasy Blood & Tissue Kit استخراج شد. تکثیر ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز با استفاده از پرایمرهای Bs celup r (5́-actaatttggttctgttccccaaa-3́) و Bs celup f (5́-atgaaacggtcaatctctattttt-3́) در دستگاه ترموسایکلر با برنامه زمانی- دمایی، واسرشت‌سازی

اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در ۵۱°C به مدت ۱دقیقه، تکثیر در ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C صورت گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (25mM)، ۰/۵میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش‌رو، ۱ میکرولیتر آغازگر پس‌رو، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۱۶/۳ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود پس از بازیافت و تعیین توالی قطعه مورد نظر، آنالیز نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارBLAST و پس از مقایسه با توالی‌های رفرنس در سایت NCBI انجام شد. نتایج مربوط به توالی‌یابی در بانک ژن پایگاه NCBI ثبت گردید.

آنالیز فیلوژنتیکی ژن اندو -بتا-۱و۴-گلوکاناز

ترجمه توالی نوکلئوتیدی ژن مورد بررسی به توالی اسید آمینه‌ای با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI و تعیین قاب‌خوانش پروتئین توسط BLAST X انجام شد تعیین جایگاه خانواده آنزیمی سویه مورد بررسی بر اساس نتایج BLAST و مقایسه با ۱۵ توالی رفرنس در GeneBank NCBI انجام شد. پس از اعمال همردیفی با کلاستر W، درخت فیلوژنی با روش neighbor-joining و به کمک نرم‌افزار MEGA 4.0 ترسیم شد. درجه اعتبارسنجی گروه‌بندی‌های ایجاد شده با بوت استرپ و با ۱۰۰۰ تکرار تعیین شد (Saitou and Nei, 1987).

ترازبندی و مقایسه توالی اسید آمینه پروتئین حاصل از ترجمه ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه A14h با ۳ توالی رفرنس اسید آمینه ژن بتا اندوگلوکاناز جنس باسیلوس با استفاده از نرم‌افزار COBALT در سایت NCBI انجام شد.

تولید آنزیم اندو-بتا-۱و۴- گلوکاناز

به منظور تولید آنزیم ابتدا سویه مورد بررسی در محیط کشت NBY به صورت خطی کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. به منظور تهیه مایه تلقیح، کلنی‌های باکتری از محیط کشت جامد به محیط کشت NB منتقل و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ rpm به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. مایه تلقیح آماده شده به میزان ۴٪ به محیط کشت تولید آنزیم (شامل ۱۰ گرم مالت، ۳ گرم عصاره گوشت، ۴ گرم عصاره مخمر، ۰/۵ گرم $CaCl_2$, H_2O، ۰/۳ گرم $MgSO_4,7H_2O$ و ۱ گرم K_2HPO_4 برای ۱ لیتر) اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۵۰ rpm گرم‌خانه‌گذاری شد. به منظور جداسازی آنزیم، محیط کشت تخمیر شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. فاز روماند به عنوان منبع آنزیم خام تا زمان انجام آزمون‌های مربوطه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی برخی ویژگی‌های عملکردی آنزیم اندو-بتا-۱و۴-اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* A14h

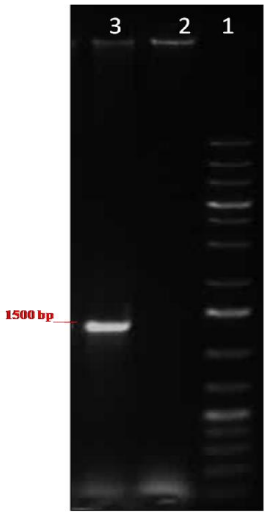
عملکرد آنزیم اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز تولید شده توسط سویه *B. subtilis* A14h، درحضور دو سوبسترا (کربوکسی متیل سلولز و بتا گلوکان (۱٪))، دماهای متفاوت (۳۰، ۵۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد) و pH ۴/۶ بررسی شد. به منظور سنجش فعالیت آنزیمی از روش دی نیتروسالیسیلیک اسید و بافر سیترات ۱۰۰ میلی مولار استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم به ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای مورد نظر گرم‌خانه‌گذاری و در مرحله بعد ۶۰۰ میکرولیتر از معرف DNS به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرار داده شد. فعالیت آنزیمی با تعیین میزان جذب قندهای آزاد شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر و معادله حاصل از منحنی استاندارد گلوکز محاسبه شد. واحد فعالیت آنزیم (Unit) برابر است با مقدار آنزیمی که

بتواند در یک دقیقه، در شرایط مطلوب، یک میکرومول سوبسترا را به محصول تبدیل کند (Iqbal *et al.*, 2011).

نتایج و بحث

ردیابی ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز در سویه A14h

ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و حضور ژن مذکور در سویه مورد تایید قرار گرفت. اندازه قطعه تکثیر شده ۱۵۰۰bp برآورد شد (شکل ۱). قطعه تکثیر شده پس از تعیین توالی، آنالیز با نرم‌افزار Vector NTI و مقایسه با سایر توالی‌های رفرنس موجود در پایگاه NCBI در بانک ژن این پایگاه ثبت شد (Accession no. KF487125). بر اساس نتایج آنالیز توالی ژن مورد مطالعه مشخص شد که توالی مذکور ۹۹٪ با ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه *Bacillus* sp. NK-2 (Accession no. ADO85705.1) شباهت دارد.



شکل ۱- تکثیر ژن اندو -بتا-۱و۴ -گلوکاناز *Bacillus subtilis* A14h (۱۵۰۰bp) چاهک ۱ Ladder (1kb, Fermentas)، چاهک ۲ کنترل منفی، چاهک۳ محصول PCR ژن اندو-بتا-۱و۴- گلوکاناز سویه مورد بررسی.

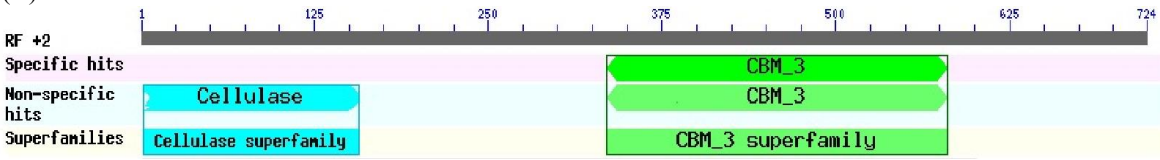
پس از تعیین قاب‌خوانش قطعه تعیین توالی شده (۷۲۴ bp) با استفاده از BLAST X مشخص شد که قطعه مذکور یک رشته پپتیدی شامل ۲۴۱ اسید آمینه را کد می‌کند. نتایج آنالیزها نشان داد که قسمت کاتالیتیکی آنزیم مذکور به خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها و قسمت غیرکاتالیتیکی آن به خانواده CBM 3 تعلق دارد. هم‌چنین در رشته پپتیدی حاصل از ترجمه قطعه تعیین توالی شده، اسیدهای آمینه شماره ۱-۵۲ واقع در پایانه آمینی بخشی از قسمت کاتالیتیکی این آنزیم و اسیدهای آمینه شماره ۱۱۲-۱۹۳ واقع در پایانه کربوکسیلی ناحیه غیرکاتالیتیکی (CBM) را تشکیل می‌دهند. اتصال این دو ناحیه نیز توسط یک قسمت ۵۳ آمینواسیدی به نام رابط (linker) صورت گرفته است (شکل ۲). اکثر آنزیم‌های سلولولیتیک پروتئین‌های چند قسمتی هستند که شامل حداقل سه عنصر ساختاری مجزا با عملکردهای مختلف می‌باشند که شامل ناحیه کاتالیزوری (CD)، ناحیه متصل‌شونده به سلولز (CBM) و رابط (linker) یا ناحیه اتصال‌دهنده دو ناحیه کاتالیتیکی و CBM می‌باشد. در حال حاضر، ناحیه کاتالیتیکی این آنزیم‌ها حداقل در ۱۵ خانواده از ۸۰ خانواده گلیکوزیدهیدرولازهای شناخته شده گروه‌بندی می‌شوند، در حالی که CBMها حداقل در ۱۳ خانواده قرار می‌گیرند (Rabinovich *et al.*, 2002).

در یک بررسی پس از خالص‌سازی و تعیین ویژگی آنزیمی سلولاز تولید شده توسط سویه *B. amyloliquefaciens* DL-3 مشخص شد که این آنزیم با وزن مولکولی ۵۳ کیلودالتون دارای دو قسمت کاتالیتیکی متعلق به خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها و غیر کاتالیتیکی خانواده ۳ CBMها است و با ژن سلولاز سویه *B. subtilis* DLG (gi:143007) ۹۱ درصد شباهت دارد (Lee *et al.*, 2008). هم‌چنین توالی ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز در جدایه‌های *B. subtilis* مورد مقایسه قرار گرفته و نتایج بدست آمده نشان داد که سه سویه *B. subtilis* PAP115، *B. subtilis* DLG و

B. subtilis C-36 ۹۷ درصد شباهت در ساختار غیرکاتالیتیکی و همولوژی بالایی درسطح کاتالیتیکی دارند. همچنین بخش‌های کاتالیتیکی به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها و بخش‌های غیرکاتالیتیکی به خانواده CBM ۳ Aها تعلق دارند (Kyoung *et al*., 2012).

(A)
1 yalskgapif vtewgtsdas gnggifldqs rewlnyldsk kiswvnwnls dkqesssalk
61 pgasktggwp lsdltasgtf vrenirgtkd stkdgpetpa qdnptqekgv svqykagdgl
121 vnsnqirpql hiknngnatv dlkdvtaryw ynvknkgqnf dcdyaqmgcg nlthkfvtlh
181 kpkqgadtyl elgfktgtls pgastgniql rlhnddwsny aqsgdysffq sntfkttkki
241 t

(B)



شکل ۲- (A) توالی اسیدآمینه‌ای ژن اندو-بتا-۱و۴- گلوکاناز سویه *Bacillus subtilis* A14h - ناحیه کاتالیتیکی (اسیدآمینه شماره ۱-۵۲) در پایانه آمینی و ناحیه غیر کاتالیتیکی (اسیدآمینه شماره ۱۱۲-۱۹۳) در پایانه کربنی که توسط رابط به هم متصل شده‌اند، (B) تپولوژی و شمایی از دامنه‌های کاتالیتیکی و غیر کاتالیتیکی ژن اندو-بتا-۱و۴- گلوکاناز سویه *B. subtilis* A14h

خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها یکی از بزرگترین خانواده‌ها در گلیکوزید هیدرولازهاست. قبلاً این خانواده به عنوان خانواده سلولاز A شناخته می‌شد. از جمله آنزیم‌های این خانواده می‌توان به مهمترین آنها اندوگلوکانازها و اندومانانازها و همچنین اگزوگلوکانازها، اگزومانانزها، β-گلیکوزیدها و β-مانانازها اشاره نمود (St John *et al*. 2010). ساختار سه بعدی اکثر آنزیم‌های خانواده ۵، یک ساختار بشکه‌ای $(\alpha/\beta)_8$ است.این خانواده شامل ۵۳ زیرگروه است و آنزیم‌های اندو-بتا-۱و۴-گلوکانازها در ۱۱ زیرگروه ۱، ۲، ۴، ۵، ۲۲، ۲۵، ۲۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹ و ۴۶ قرار می‌گیرند (Aspeborg *et al*., 2012).

آنالیز فیلوژنتیکی

به منظور تعیین خانواده آنزیمی، توالی آمینواسیدی آنزیم اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه مورد بررسی با ۱۵ توالی رفرنس متعلق به خانواده‌های ۵، ۸، ۹، ۴۴ و ۶۱ گلیکوزید هیدرولاز در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه شد (جدول ۱).

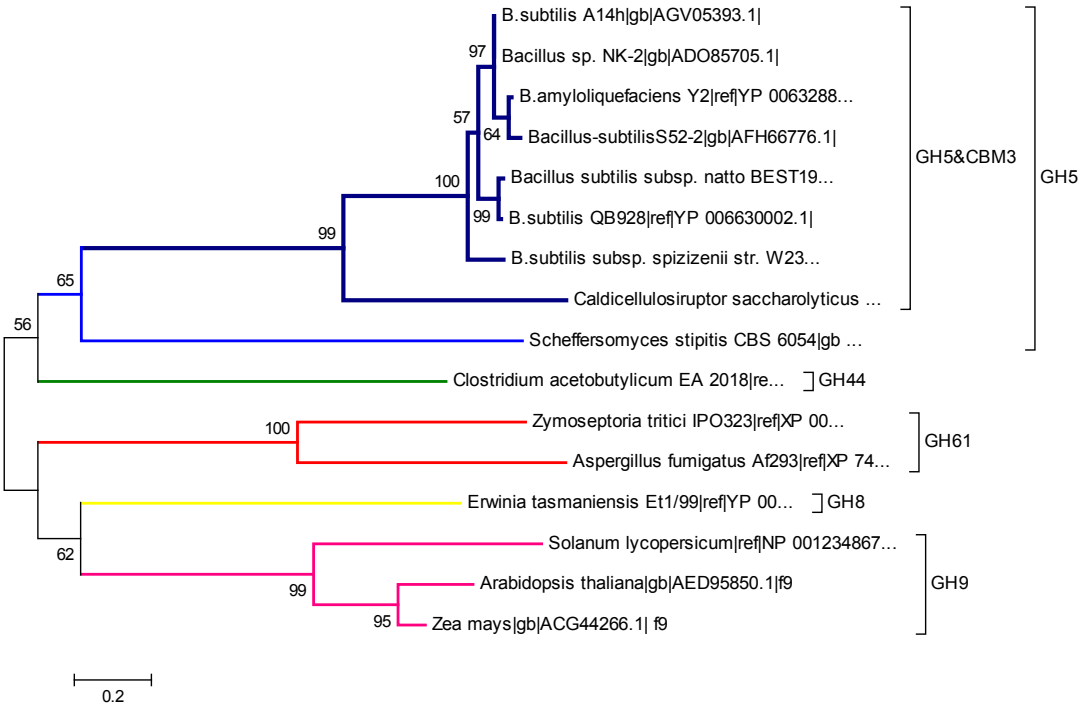
جدول ۱- ۱۵ سویه رفرنس مورد استفاده دارای توالی آمینواسیدی آنزیم اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز به منظور ترسیم درخت فیلوژنی

سویه	شماره ثبت در پایگاه اطلاعاتی NCBI
B. subtilis subsp. natto BEST195	YP_005561204.1
Bacillus sp. NK-2	ADO85705.1
B.subtilis subsp. spizizenii str. W23	YP_003866220.1
B. amyloliquefaciens Y2	YP_006328845.1
B.subtilis S52-2	AFH66776.1
B.subtilis QB928	YP_00663002.1
Caldicellulosiruptor saccharolyticus	YP_001179882.1
Scheffersomyces stipitis CBS 6054	XP_001387765.1
Zymoseptoria tritici IPO323	XP_003856492.1
Aspergillus ellulose Af293	XP_748707.1
Erwinia tasmaniensis Et1/99	YP_001909294.1
Clostridium acetobutylicum EA 2018	YP_005670061.1
Zea mays	ACG44266.1
Arabidopsis thaliana	AED95850.1
Solanum lycopersicum	NP_001234867.1

نتایج آنالیز فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار Mega 4 نشان داد (شکل ۳) که توالی ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه مورد بررسی بیشترین شباهت را به ژن بتا-۱ و ۴ اندو گلوکاناز خانواده ۵ گلیکوهیدرولازها و CBM۳ گونه‌های *Bacillus* دارد. همچنین نتایج نشان داد که اگرچه ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه باکتریایی مورد بررسی متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها می‌باشد. اما ژن مذکور بیشترین شباهت را با ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز در جنس باسیلوس داشته و با آنزیم اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز خانواده ۵ سویه‌های باکتریایی *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 و *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 قرابت کمتری دارد. هم‌چنین مقایسه توالی ژن مذکور با ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز خانواده‌های ۵، ۸، ۹، ۴۴ و ۶۱ برخی گیاهان و سویه‌های باکتریایی و قارچی نشان داد که ژن آنزیم مورد بررسی کاملاً متمایز از خانواده‌های دیگر بوده و متعلق به خانوده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها می‌باشد. لازم به ذکر است که اساس طبقه‌بندی این آنزیم‌ها در خانواده‌های مختلف توالی‌های حفظ شده آمینو اسیدی در نواحی کاتالیتیکی می‌باشد (Henrissat and Coutinho, 2001).

ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز

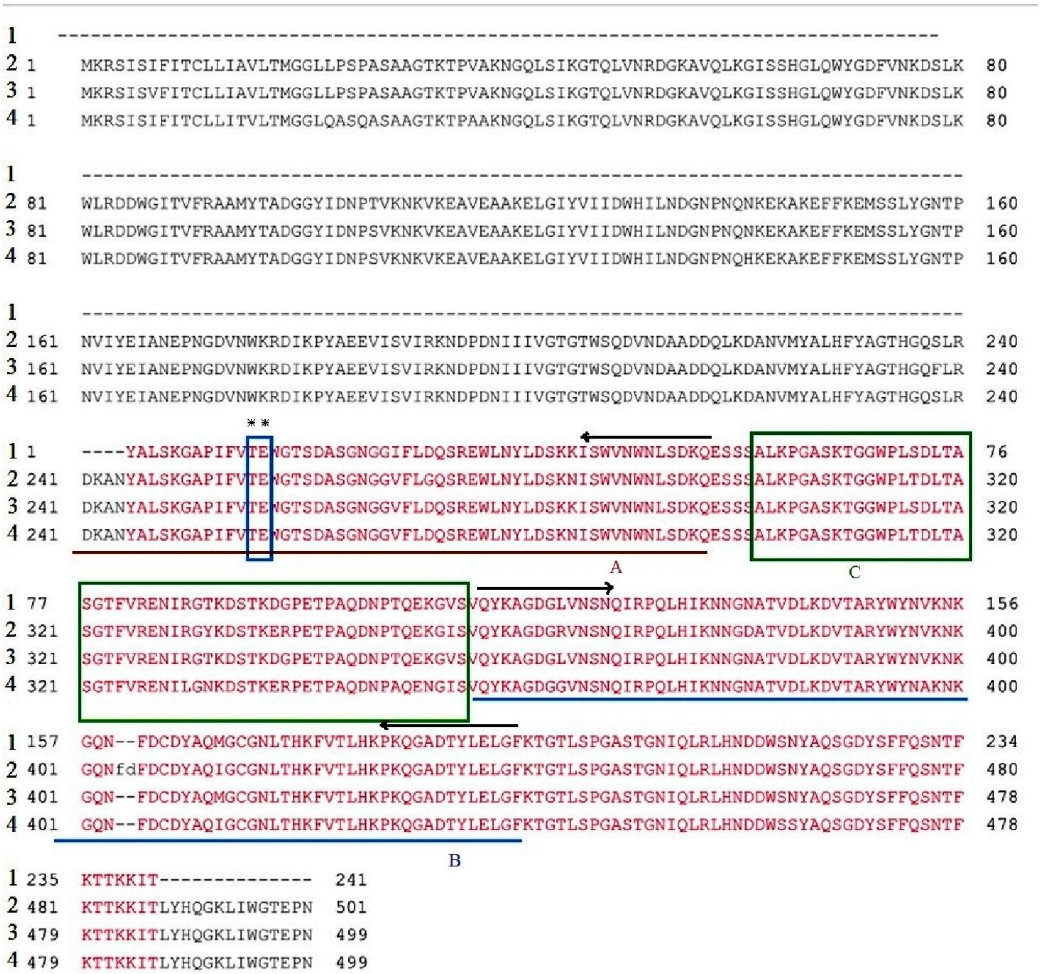
ترازبندی و مقایسه توالی اسید آمینه پروتئین حاصل از ترجمه ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه *B. subtilis* A14h با توالی اسید آمینه ژن بتا اندوگلوکوناز سویه‌های *Bacillus* sp. NK-2، *B.subtilis* S52-2 و *B. amyloliquefaciens* با استفاده از نرم افزار COBALT نشان داد که دو جایگاه فعال حفظ شده در ناحیه کاتالیتیکی توالی اسید آمینه اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز *B. subtilis* A14h و سویه‌های رفرنس مشاهده می‌شود (شکل ۴).



شکل ۳- آنالیز فیلوژنی بر اساس توالی اسیدآمینه ژن اندو-بتا-۱و۴- گلوکاناز سویه *Bacillus sutilis* A14h و برخی توالی‌های رفرنس ثبت شده در پایگاه NCBI. اعداد پشت شاخه‌های درجه اعتبار سنجی گروه بندی‌ها را بر اساس روش بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد.

وجود دو ناحیه مذکور در مکان‌های ژنی Glu169 به عنوان دهنده پروتون و دیگری در مکان ژنی Glu257 به عنوان یک نوکلئوفیل در ناحیه کاتالیتیکی اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز بدست آمده از سویه‌های مختلف *B. subtilis* در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Robson and Chambliss, 1987).

همچنین مطابق مطالعات انجام شده، ۸۲ توالی اسیدآمینه تشکیل‌دهنده ناحیه CBM به همراه ۴۸ توالی بعد آن تشکیل ساختار صفحات بتا را می‌دهند. در این ناحیه سه جایگاه حفاظت‌شده ژنی Asn13-Asp52-Tyr53 دیده می‌شود که این توالی‌ها معادل توالی‌های Asn20-Asp60-His61 حفظ شده در ژن اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز *Clostridium cellulolyticum* (PDB no. 1G43) می‌باشند (Shimon *et al.*, 2000). نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که قطعه رابط بدست آمده از *B. subtilis* A14h ۵۸ اسید آمینه و غنی از اسید آمینه‌های پرولین (P)، گلایسین (G)، سرین (S)، ترئونین (T) و لیزین (K) می‌باشد (شکل ۴).



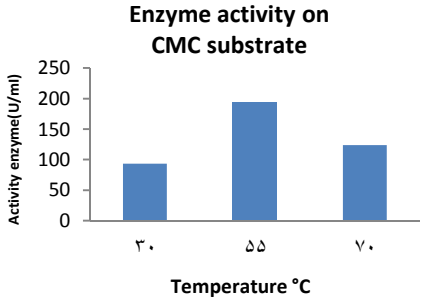
شکل ۴- نتیجه هم‌ترازی توالی اسید آمینه ژن اندو-بتا-۱و۴- گلوکاناز سویه *Bacillus subtilis* A14h (1) با توالی اسیدآمینه آنزیم اندو-بتا-۱و۴- گلوکاناز سویه‌های *B.amyloliquefaciens* Y2 (Accetion no. YP_006328845.1) (2) ، *Bacillus sp.* NK-2 (Accession no.ADO85705.1) (3) و*B.subtilis* S52-2 (Accetion no.AFH66776.1) (4). (A) ناحیه کاتالیتیکی (۱-۵۲)، (B) ناحیه اتصال به سوبسترا (CBM) (۱۱۲-۱۹۳)، (C) رابط (linker) (۵۳-۱۱۱) و (**) جایگاه فعال Glu12 را نشان می‌دهند.

انعطاف رابطها و غنی بودن آنها از اسیدآمینه‌های پرولین، هیدروکسی آمینو اسیدهای سرین و ترئونین، گلایسین و والین در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است. همچنین براساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که طول این زنجیره‌ها از ۵۹-۶ و گاها تا ۱۰۰ اسید آمینه متغیر می‌باشد. اما اکثر رابطها از ۲۰-۵۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند. اعتقاد بر این است که این ناحیه برای تفکیک دو ناحیه کاتالیتیکی و غیرکاتالیتیکی CBM و همچنین انعطاف‌پذیری این دو ناحیه در انجام عملکرد مستقل آنها بر سطح سوبستراهای نامحلول است (Gilkes *et al.*, 1991).

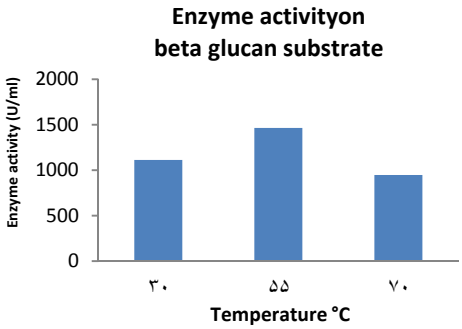
اگرچه عملکرد هم‌افزایی پایانه آمینی و پایانه کربوکسیلی اندوگلوکاناز تولیدشده توسط *C. cellulovorans* برای هیدرولیز کریستالی سلولز ضروری است (Hamamoto *et al.*, 1992). اما توانایی عملکرد ناحیه CBM اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز *B. subtilis* در هیدرولیز CMC مستقل از فعالیت ناحیه کاتالیتیکی آن گزارش شده و بر این اساس جهش در ناحیه CD (ناحیه کاتالیتیکی) تأثیری بر فعالیت ناحیه CBM ندارد (Park *et al.*, 1993).

مقایسه عملکرد آنزیم اندو-بتا-۱و۴-گلوکاناز سویه *B. subtilis* A14h بر روی دو سوبسترای بتاگلوکان و کربوکسی متیل سلولاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سویه مورد بررسی در غلظت ۱ درصد از کربوکسی متیل‌سلولز و بتا گلوکان در دماهای ۳۰، ۵۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در حضور سوبسترای بتاگلوکان در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده می‌شود. بالاترین میزان فعالیت آنزیمی در حضور سوبسترای بتاگلوکان و کربوکسی متیل سلولز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد حاصل و به ترتیب معادل ۱۴۶۴ U/ml و ۱۹۴ U/ml تخمین زده شد. همچنین در حضور سوبسترای کربوکسی متیل سلولز و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کمترین فعالیت آنزیمی بدست آمد که معادل ۹۳ U/ml تخمین زده شد (شکل ۵). کمترین میزان فعالیت این آنزیم در حضور سوبسترای بتاگلوکان در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و با فعالیت ۹۴۶ U/ml تخمین شد (شکل۶). این نتایج نشان داد علیرغم اینکه دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد دمای مطلوب‌تری برای فعالیت آنزیمی است اما نوع سوبسترا بر نحوه و میزان فعالیت آنزیم در دماهای مختلف اثر قابل توجهی داشته است.



شکل ۵- فعالیت آنزیم اندو-بتا-۱و۴- گلوکاناز *Bacillus subtilis* A14h بر سوبسترای کربوکسی متیل سلولز در دماهای مختلف



شکل ۶- فعالیت آنزیم اندو-بتا-۱و۴- گلوکاناز *Bacillus subtilis* A14h بر سوبسترای بتا گلوکان در دماهای مختلف

شناسایی سویه باکتریایی A14h

شناسایی مقدماتی باکتری مورد مطالعه نشان داده بود که سویه باکتریایی مورد بررسی گرم مثبت، هوازی اجباری، دارای اندوسپور با موقعیت مرکزی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و سیترات مثبت می‌باشد. آنالیز نتایج حاصل از شناسایی مولکولی مبتنی بر ژن ۱۶S rDNA نیز نشان داد که سویه

A14h با ۹۷ درصد همولوژی متعلق به گونه *B. subtilis* می‌باشد. توالی ژن مذکور در بانک ژن پایگاه اطلاعاتی NCBI (Accesion NO. JX198311) ثبت شد.

REFERENCES

Aspeborg H, Coutinho PM, Wang Y, Brumer H, Henrissat B (2012) Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). BMC Evol. Biol. 12:186-171.

Gilkes NR, Henrissat B, Kilburn DG, Miller Jr RC, Warren RA (1991) Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. Microbiol. Rev. 55(2): 303–315.

Hamamoto T, Foong F, Shoseyov O, Doi RH (1992) Analysis of functional domains of endoglucanases from *Clostridium cellulovorans* by gene cloning, nucleotide sequencing and chimeric protein construction. Mol. Gen. Genet. 231(3):472–479.

Han SJ, Yoo YJ, Kangs HS (1995) Characterization of a Bifunctional Cellulase and Its Structural Gene. The cel gene of *Bacillus SP*. D04 has exo and endoglucanase activity. J. Biol. Chem. 270(43): 26012-9.

Iqbal HMN, Ahmed I, Zia MA, Irfan M (2011) Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulose produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. Adv. Bioscience Biotechnol. 2:149-156.

Izquierdo JA, Sizova MV, Lynd LR (2010) Diversity of Bacteria and Glycosyl Hydrolase Family 48 Genes in Cellulolytic Consortia Enriched from Thermophilic Biocompost . Appl. Environ. Microbiol. 76(11): 3545–3553.

Kuhad RC, Gupta R, Singh A (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. SAGE-Hindawi access to research, Enzyme Research. Review Article. doi: 10.4061/2011/280696.

Kyoung KY, Jeong OH, Hwan KY (2012) Comparison of nucleotide sequences of endo-β-1,4-glucanase genes from *Bacillus subtilis* strains. Int. J. Biotechnol. Appl. 4:130-133.

Lee YJ, Kim BK, Lee BH, Jo KI, Lee NK, Chung CH, Lee YC, Lee JW (2008) Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresource Technol. 99:378–386.

Li W, Zhang WW, Yang MM, Chen YL (2008) Cloning of the Thermostable Cellulase Gene from Newly Isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. Mol. Biotechnol. 40:195–201.

Linder M, Lindeberg G, Reinikainen T, Teeri TT, Pettersson G (1995) The difference in affinity between two fungal cellose-bindings domainated by a single amino acid substitution. FEBS Lett. 372:96-98.

Lynd LR, Weimer PJ, Van Zy WH, Pretorius IS (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66(3): 506–577.

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, industrial and applied microbiology, Spain.

Park JS, Nakamura A, Horinouchi S, Beppu T (1993) Identification of the cellulose-binding domain of a *Bacillus subtilis* endoglucanase distinct from its catalytic domain. Biosci. Biotechnol. Biochem. **57**(2): 260–264.

Rabinovich ML, Melnick MS, Bolobova AV (2002) The structure and mechanism of action of cellulolytic

enzymes. Biochem. 67(8): 850-871.

Robson LM, Chambliss GH (1987) Endo-beta-1,4-glucanase gene of *Bacillus subtilis* DLG. J Bacteriol. 169(5): 2017–2025.

Sadhu S, Maiti TK (2013) Cellulase Production by Bacteria: A Review. Brit. Microbiol. Res. J. 3(3):235-258.

Shimon LJW, Pagès S, Belaich A, Belaich JP, Lamed R, Shoham Y, Frolow F (2000) Structure of a family IIIa scaffolding CBD from the Cellulosome of *Clostridium cellulolyticum* at 2.2 A resolution. Acta Cryst. 56: 1560-1568.

Zakaria MR, Tabatabaei M, Mohamad Ghazali F, Abd-Aziz S, Shirai Y, Hassan MA (2010) Polyhydroxyalkanoate production from anaerobically treated palm oil mill effluent by new bacterial strain *Comamonas* sp.EB172. World J. Microbiol. Biotechnol. 26: 767-774.