مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره دوم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۱۱۰-۱۰۱

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 ده‌پهلوان[۱]، مریم موسیوند[۲]، مریم هاشمی[۲*] و جلیل خارا[۱]
Sholeh dahpahlevan[1], Maryam Mousivand[2], Maryam Hashemi[2*] and Jalil Khara[1]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد رشته فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم‌پایه 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: ۹۳/٤/۱۰)

چکیده

این پژوهش به منظور تعیین برخی ویژگی‌های کاتالیتیکی و خصوصیات مولکولی ژن کدکننده آنزیم بتا ۱و٤ 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 نرم‌افزار Vector NTI و Mega.4 انجام شد. براساس نتایج حاصله قطعه تعیین توالی‌شده شامل ۷۹٤ نوکلئوتید بود که یک رشته پپتیدی با ۲٦٤ اسیدآمینه را کد می‌کند. تجزیه توالی آمینواسیدی این ژن در سویه مورد بررسی نشان‌داد که آنزیم اندوبتاگلوکاناز تولیدشده توسط سویه مورد پژوهش چندبخشی بوده که قسمت باند شونده به سلولز (Cellulose Binding Domain, CBD) آن مربوط‌به خانواده گلیکوزیدهیدرولاز ۳ و قسمت کاتالیک (CD) آنزیم مورد بررسی متعلق به خانواده گلیکوزیدهیدرولاز ۵ است. همچنین فعالیت آنزیم بتا ۱و٤ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه B5d، در محدوده دمایی ۷۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH ٤/٦ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌داد که بیشترین فعالیت کاتالیتیک آنزیم بتا ۱و٤ اندوگلوکاناز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بوده که U/L ٤٦۱/۸۳ برآورد شد. بررسی پایداری آنزیم در شرایط دمایی و pHهای مختلف نشان‌داد که تا دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد و در محدوده pH ۱۰-۵ آنزیم پایداری بهتری دارد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه فیلوژنی
باسیلوس سابتیلیس
پایداری آنزیمی
ژن *بتا ۱و۴ اندوگلوکاناز*
سویه B5d

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]

مقدمه

سلولازها یا آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز به‌وسیله 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 دوگروه‌اندو و اگزو گلوکانازها تقسیم می‌شوند. اندوگلوکانازها پیوندهای درون زنجیره‌ای را به‌صورت تصادفی شکسته و الیگوساکاریدها را تولید می‌کنند در حالی‌که اگزوگلوکانازها پیوندهای انتهای غیراحیا کننده زنجیره پلیمری را هیدرولیز و منوساکارید تولید می‌کنند (Morallefi and Seligy, 1986). آنزیم‌های اندوبتاگلوکاناز براساس نحوه عمل، شباهت توالی اسیدهای آمینه، خصوصیات سوبسترا و ویژگی‌های فیزیک و شیمیایی در پانزده خانواده گلیکوزید هیدرولاز (GH) طبقه‌بندی می‌شوند. در بین این خانواده‌های آنزیمی، خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها یکی از بزرگترین خانواده‌ها محسوب شده و تعداد زیادی از اندوبتا ۱ و ٤ گلوکانازها در آن قرار می‌گیرند. این خانواده متشکل از ٤٦٧ عضو با فعالیت‌های مختلف شامل اندوگلیکوزیل‌سرامیداز (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)، گلوکان‌اندو ۱ و ٦ بتاگلوکوزیداز (EC 3.2.1.75)، مانان‌اندو ۱ و ٤ بتامانوزیداز (EC 3.2.1.58)، سلولز ۱ و ٤ بتاسلوبیوزیداز (EC 3.2.1.91)، اندو ۱ و ٦ بتاگالاکتاناز (EC 3.2.1.-)، ۱ و ۳ بتامانانаз (EC 3.2.1.-) و اندو ۱ و ٤ بتازایلاناز (EC 3.2.1.8) است (John *et al*. 2010). بررسی ساختارهای سه‌بعدی برای تعداد زیادی از آنزیم‌های خانواده ۵ نشان‌داده که قسمت کاتالیتیکی این آنزیم‌ها دارای تاخوردگی (α/β)8-barrel fold بوده و با نام TIM-barrel fold نیز شناخته می‌شوند. قسمت کاتالیکی 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 به‌همین دلیل هر دو خانواده ۵ و ۱۰ در دسته GH-A (گیلکوزید 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 شاخه‌دار وفق می‌دهند. در هیدرولیز هموبتاگلوکان‌هایی که در آن‌ها مخلوط دو پیوند بتا ۱ و ۳ و بتا ۱ و ٤ وجود دارد، تمام پیوندهای بتا ۱ و ۳ بین دو پیوند بتا ۱ و ٤ شکسته می‌شوند. همچنین پیوندهای بتا ۱ و ٤ که قبل از پیوند بتا ۱ و ۳ قرار دارند مورد حمله واقع می‌شوند در حالی‌که پیوند بتا ۱ و ٤ 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 به‌خصوص در *B. subtilis*، *B. latus* و *B. polymxa* به فراوانی انجام‌شده 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 مربوط‌به تعیین توالی این ژن در گونه *B. subtilis* نشان‌داده است که آنزیم اندوبتاگلوکاناز به‌صورت 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 ۵/٤ است و متعلق به خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولاز است (Mawadza *et al*. 2000). آنزیم بتاگلوکاناز در فرآوری موادغذایی، تهیه خوراک دام، صنایع آبجوسازی، منسوجات، آماده‌سازی 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 براساس ویژگی‌های مولکولی و کاتالیکی آنزیم مورد استفاده،

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]

هدف بررسی حاضر تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d جدا شده از فیلوسفر درخت سیب و بررسی برخی ویژگی‌های عملکردی آنزیم ذکرشده 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 مبتنی‌بر 16S rDNA به‌عنوان 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.اِ، سویه باکتریایی *B. subtilis* B5d در محیط NB کشت و در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۸ ساعت قرارداده شد. توده زیستی در محیط NB (حداکثر ۱۰۹×۲ سلول در میلی‌لیتر) به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز روماند (supernatante) حذف و فاز ته‌نشست برای استخراج دی.ان.اِ استفاده شد. استخراج دی.ان.ای ژنومی با استفاده از کیت Kit DNeasy Blood&Tissue (QIAGEN,Cat.No.69504) و با توجه به‌دستورالعمل مربوطه از سویه B5d صورت‌گرفت. کیفیت و غلظت دی.ان.اِ استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتر نانودراپ (Spectrophotometr Thermo Scientific 2000C) و درطول موج ۲٦۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

تکثیر ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (پی.سی.آر)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (پی.سی.آر) به منظور تکثیر ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (Bs celup) انجام‌شد (Jung *et al*, 2010). واکنش پی.سی.آر در حجم ۵۰ میکرولیتر، شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR(10x)، ٤ میکرولیتر $MgCl_2$(25mM)، ۱ میکرولیتر dNTPs(10mM)، ۵ میکرولیتر آغازگر پیش‌رو (5′-atgaaacggtcaatctctatttttt-3′)، ۵ میکرولیتر آغازگر پس‌رو (5′-actaatttggttctgttccccaaa-3′). با غلظت ۱۰ پیکومول ، ۰/٤ میکرولیتر (حاوی ۲/۵ واحد) از آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲ میکرولیتر دی.ان.اِ الگو با غلظت ۳۵ نانوگرم بر میکرولیتر و ۲۸/٦ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه به‌صورت ۱ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و۳۰ ثانیه در ۵۱ درجه سانتی‌گراد،۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام‌شد. 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) انجام‌شد. دی.ان.اِ بازیافت شده توسط شرکت TAG Copenhagen (Danmark) تعیین توالی و پس از انجام تجزیه توسط نرم‌افزارBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد.

تجزیه فیلوژنتیکی ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز

توالی مربوط‌به ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d پس از تعیین چهارچوب قرائت پروتئین (Reading frame) توسط Blast X با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI (Invitrogene; www.invitrogen.com/VectorNTI) به آمینواسید ترجمه شد. توالی مورد بررسی با ۱٤ توالی ژن بتااندوگلوکاناز 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 نرم‌افزارMega.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 ٤ اندوگلوکاناز

ابتدا سویه مذکور در محیط NBY به‌صورت خطی کشت و به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]

سپس محیط کشت NB با یک لوپ از باکتری رشدیافته روی محیط NBY تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. به منظور تولید آنزیم، ۲ درصد از مایه تلقیح آماده شده به‌محیط کشت تولید آنزیم (۱۰ گرم بر لیتر مالت، ۳ گرم بر لیتر عصاره گوشت، ٤ گرم بر لیترعصاره مخمر، ۰/۵ گرم بر لیتر H_2O, $CaCl_2$، ۰/۳ گرم بر لیتر $MgSO_4,7H_2O$ و ۱ گرم/لیتر K_2HPO_4 برای ۱ لیتر) افزوده و به‌مدت ٤۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. به منظور جداسازی آنزیم تولید شده، محیط‌های کشت تخمیر شده به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. بخش روماند (Supernatanet) که حاوی آنزیم بتاگلوکاناز بود تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Hashemi *et al.*, 2010).

بررسی ویژگی‌های عملکردی آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز تولیدی سویه *B. subtilis* B5d

به‌منظور تعیین ویژگی‌های عملکردی آنزیم تولید شده، فعالیت آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در pH=٤/٦ دماهای ۳۰، ۵۵ و ۷۰ و غلظت ۱ درصد ازسوبسترا (لچینن یک درصد) اندازه‌گیری شد. به منظور سنجش فعالیت آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز سویه B5d از روش دی نیتروسالیسیلیک‌اسید استفاده‌شد (Bailey *et al.* 1992). ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا (لچینین ۱ درصد) به‌مدت ۵ دقیقه در دمای موردنظر قرارداده شد. برای تهیه pHهای مختلف نیز از بافرهای سیترات و فسفات با غلظت ۵۰ میلی‌مولار استفاده‌شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم به سوبسترا اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای موردنظر قرارداده شد و در نهایت ٦۰۰ میکرولیتر از معرف دی.ان.اس به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرارداده شد . قندهای آزاد شده از لچینن درطول موج ۵٤۰ نانومتر و با استفاده از معادله حاصل از منحنی استاندارد گلوکز اندازه‌گیری 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.

بررسی پایداری آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d در دماهای مختلف

پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز تولیدشده توسط سویه *B. subtilis* B5d در دماهای ٦۰، ٦۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور آنزیم در دماهای مورد نظر قرارداده شد و پس از گذشت زمان‌های معین (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه) سنجش فعالیت آنزیمی بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز به‌روش دی نیتروسالیسیلیک‌اسید و در pH ۵/۷۵ و غلظت ۱ درصد از سوبسترای لچینن انجام‌شد . درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم پس از گذشت زمان مربوطه در هر دما در مقایسه با کنترل محاسبه شد.

بررسی پایداری آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d در pHهای مختلف

پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز تولیدشده توسط سویه *B. subtilis* B5d در pHهای مختلف محاسبه شد. به‌این منظور ابتدا آنزیم به‌نسبت ۱:۱ با بافر مناسب (pH=۱۰-۳) رقیق و سپس آنزیم‌های رقیق شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرارداده شدند. سپس سنجش آنزیمی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱ درصد از سوبسترای لچینن انجام‌شد. درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم بتاگلوکاناز در pHهای مختلف در مقایسه با کنترل ارزیابی شد.

نتایج و بحث

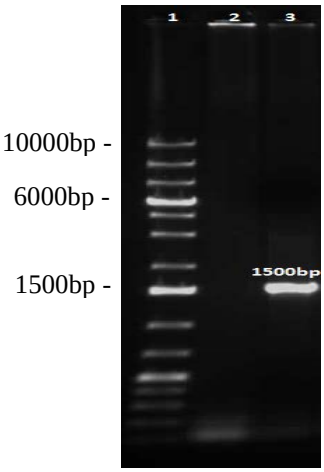
تکثیر ژن اندو بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز

ژن اندوبتاگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d با آغازگر Bs cel up تکثیر شد. محصول پی.سی.آر یک قطعه ۱۵۰۰bp بود که پس از خالص‌سازی، تعیین توالی و با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این مقایسه نشان‌داد که قطعه تکثیر شده از استرین B5d مربوط‌به ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز بوده که با توالی‌های ژن بتاگلوکاناز متعلق به گونه‌های باسیلوس از قبیل *B. megiaterium* (accession N.: AGG91154.1), *B. mojavesis* (accession N.: WP010334430), *B. subtilis* (accession N.: AHD24502.1) و *B.subtilis* (accession N.: AHC02484.1) موجود در بانک ژن پایگاه‌اطلاعاتی 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

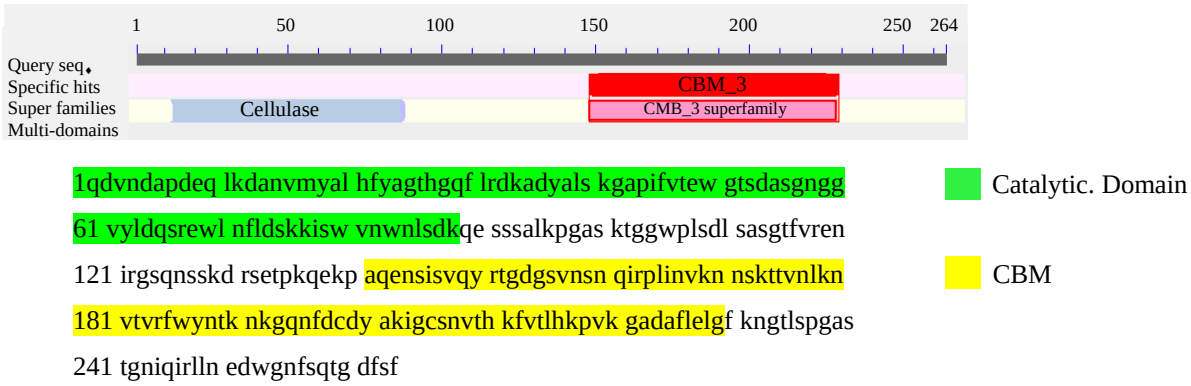
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]

۵ گلیکوزیل هیدرولازها در انتهای ناحیه آمینی قرارگرفته و شامل ٦٧ اسید آمینه از شماره ۱۲ تا ۸۸ می‌شود. همچنین ناحیه CBD متعلق به خانوده ۳ در ناحیه کربوکسیل این پروتئین قرارگرفته و شامل اسیدهای آمینه ۱٤۸ تا ۲۲۹ می‌شود. ناحیه CBD در سویه B5d ۸۱ آمینواسیدی بوده و در انتهای کربوکسیل واقع شده است این دو ناحیه توسط یک توالی اتصال دهنده ۵۹ آمینواسیدی به‌هم متصل می‌شوند (شکل ۲).



شکل ۱- محصول پی.سی.آر ژن بتا ۱ و ٤ 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 ٤ 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)



شکل ۲- توالی آمینواسیدی ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز استرین *Bacillus subtilis* B5d. ناحیه‌کاتالیکی آنزیم بتاگلوکاناز متعلق به خانوده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها در انتهای N و ناحیه باند شونده با سلولز متعلق به خانوده ۳ در ناحیه C این ژن قرار گرفته است. این نواحی به‌ترتیب توسط آمینواسید ۱۲ تا ۸۸ و اسیدهای آمینه ۱٤۸ تا ۲۲۹ کد می‌شود.

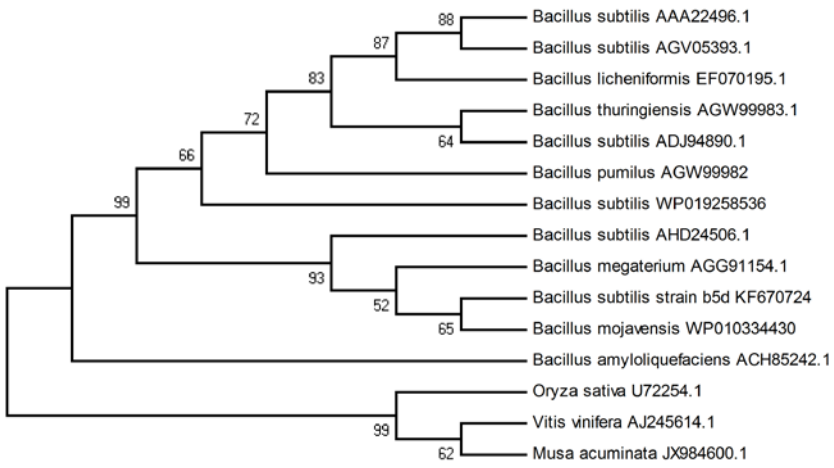
Figure 2- The amino acids sequences of β 1, 4 endo-glucanase gene from the *Bacillus subtilis* strain B5d. The amino acids of 12 to 88 is the catalytic domain in N terminal and the amino acids of 148 to 229 is cellulose binding domain (CBM3) in C terminal of β 1, 4 endo-glucanase.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]

پژوهش‌های انجام‌شده نشان‌داده است اغلب سلولازها و زایلانازها 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 ناحیه‌باند شونده با سلولز در انتهای کربوکسیلی یا آمینی واقع شده و ۱۰۰ آمینواسیدی است. ناحیه‌کاتالیکی و ناحیه‌باند شونده به سلولز به‌وسیله توالی‌های اتصال دهنده (Linker sequence) به‌هم متصل می‌شوند. این توالی‌ها غنی از آمینواسید سرین بوده و در اغلب باکتری‌های جنس *Pseudomonas* یافت می‌شود. طول این ناحیه بین ٦ تا ٥٩ آمینواسید متغیر است (Ferreira *et al*. 1991).

تجزیه فیلوژنتیک ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d

پس از ترجمه ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز B5d با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI توالی ژن ذکرشده در پایگاه‌اطلاعاتی NCBI ثبت شد (Accession NO. KF670724). قطعه تعیین توالی شده ژن ذکر شده شامل ۷۹٤ نوکلئوتید است که یک رشته پپتیدی شامل ۲٦٤ اسیدآمینه را کد می‌کند. تجزیه فیلوژنی این توالی با ١٤ توالی مرجع در پایگاه اطلاعاتی NCBI شامل *B. 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. mojavesis* (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 acuminate* (accession N.: JX984600.1). نشان داد که ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d بیشترین شباهت را با درجه بالای اعتباربه ژن بتاگلوکاناز خانواده ٥ گلیکوزیل هیدرولاز (E. C. N: 3.2.1.4) گونه‌های *Bacillus* دارد. پژوهش‌های متعددی حضور ژن بتا ۱ و ٤ گلوکاناز در سویه‌های باسیلوس و تعلق آن را به خانوده ٥ گلیکوزیل هیدرولازها تأیید می‌کند (شکل ۳).



شکل ۳- آزمون فیلوژنی براساس توالی آمینواسید ژن بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز استرین *Bacillus sutilis* B5d و برخی توالی‌های مرجع ثبت‌شده 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.

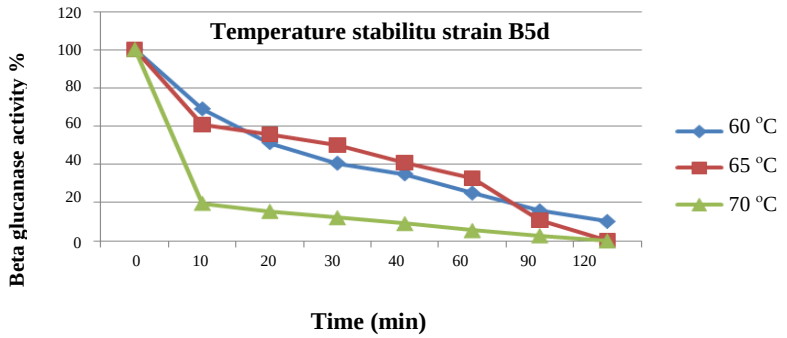
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]

بررسی ساختار و توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در دو سویه HR68 و *Bacillus* CH43 نشان‌داد 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 ٤ گلوکاناز *B. subtilis* A8 نشان‌داد که آنزیم ذکر شده متعلق به خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها است. این آنزیم پروتئینی با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون سنتز می‌کند و شامل ۲۵٦ آمینواسید در ناحیه‌کاتالیک و۸۲ آمینواسید در ناحیه اتصال به سلولز (CBD) است (Jung *et al*. 2010). بتا ۱ و ٤ گلوکاناز *B. cereus* بیشترین شباهت را به ژن بتاگلوکاناز گونه‌های *Bacillus* خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولاز دارد که پروتئینی با وزن مولکولی ۵۰ کیلودالتون سنتز می‌کند و دارای تاخوردگی $(\alpha/\beta)_8$ است (Yan *et al*. 2012).

همچنین براساس نتایج‌حاصل از تجزیه فیلوژنی مشخص شد که توالی ژن بتاگلوکاناز سویه مورد بررسی و سایر سویه‌های مرجع که آنزیم اندوبتاگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها را تولید می‌کنند از ژن بتاگلوکاناز گونه *B. amiloliquefaciens* (accession N: ACH85242.1) که متعلق به خانواده ۱٦ گلیکوزیدهیدرولازها هستند و آنزیم بتا ۱ و ۳-۱ و ٤ اندوگلوکاناز را سنتز می‌کند به طور کامل متمایز است. قابل ذکر است که آنزیم بتاگلوکاناز باکتری *B. amiloliquefaciens* با وجود قرار گرفتن در خانواده ۱٦ گلیکوزیدهیدرولازها از ژن بتاگلوکاناز گیاهان در خانواده ۱٦ گلیکوزیدهیدرولازها به‌شدت متفاوت است. براساس یک قاعده کلی توالی مربوط به خانواده‌های مشابه بیشتر به‌هم مرتبط بوده و شباهت بیشتری دارد. چنین دیدگاهی باعث شده که توالی‌های مشابه در خانواده‌های 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 ٤ اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل‌هیدرولاز است و با گونه‌های مختلف باسیلوس در یک گروه قرار می‌گیرد اما تنوع در دورن خانوده آنزیمی بین گونه‌های مختلف باسیلوس و حتی سویه‌های متفاوت یک گونه مشهود است.

ویژگی‌های بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز تولیدی توسط سویه *B. subtilis* B5d

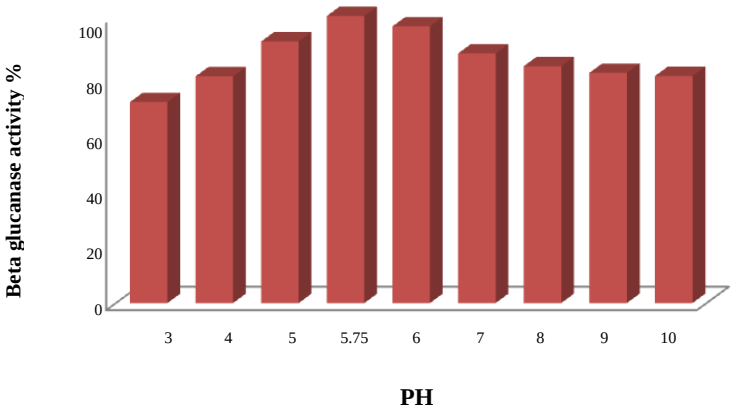
فعالیت آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز تولیدشده توسط سویه B5d در محدوده دمایی ۷۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH ٤/٦ مورد بررسی قرارگرفت. نتایج این ارزیابی نشان‌داد که آنزیم ذکرشده در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با فعالیتی معادل ٤٦۱/۸۳ U/L بیشترین فعالیت کاتالیتیک را دارا است. فعالیت آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز سویه ذکرشده در دماهای ۳۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌شدت کاهش یافت. میزان فعالیت آنزیم در دماهای ۳۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ۱۱۲/۹۸ و ۱۸٦/٤۸U/L برآورد شد.



شکل ٤- پایداری حرارتی آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]



شکل ۵- پایداری آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d در pHهای مختلف

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

پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ٤ انـدوگلوکاناز *B. subtilis* B5d در دماها و PHهای مختلف

پایداری آنزیم بتا ۱ و ٤ انـدوگلوکاناز سـویه *B. subtilis* B5d در دماهای ٦٠، ٦٥ و ٧٠ درجه سانتی‌گراد انـدازه‌گیـری شـد. نتـایج نشان‌داد که در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گـراد و پـس از گذشـت ١٠ دقیقه ٦٨ درصد از فعالیت آنزیمی حفـظ مـی‌شـود. درادامـه و بـا گذشت زمان روند کاهشی فعالیت آنزیمی مشاهده‌شد. به‌طوری‌که پس از گذشـت زمـان‌هـای ٢٠، ٣٠، ٤٠، ٦٠ و ٩٠ دقیقـه، آنـزیم به‌ترتیب ٥١ درصد، ٤٠ درصد،٣٤ درصد،٢٤ درصد و ١٥ درصـد از فعالیت خود را حفظ کرد و در زمان ١٢٠ دقیقه بـه ١٠ درصـد رسید. بررسـی پایـداری آنـزیم در دمـای ٦٥ درجـه سـانتی‌گـراد نشان‌داد که با گذشت زمان فعالیت آنزیمـی کـاهش مـی‌یابـد، بـه طوری‌که بعد از ١٠ دقیقه ٦٠ درصد از فعالیـت کاتالیتیـک آنـزیم حفظ شـود. بـا گذشـت زمـان‌هـای ٢٠، ٣٠، ٤٠، ٦٠ ، ٩٠ و ١٢٠ دقیقه، آنـزیم بتـا ١ و ٤ انـدوگلوکاناز سـویه B5d بـه‌ترتیـب ٥٥ درصد، ٥٠ درصد،٤٠ درصد،٣٢ درصد،١٠ درصد و ٠/٢ درصد از فعالیت خود را حفـظ کـرد. در دمـای ٧٠ درجـه سـانتی‌گـراد بـا گذشت زمان فعالیت آنزیمی به طور قابل توجهی کاهش یافـت و با گذشت ١٠ دقیقه تنها ١٩ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد و در ٦٠ دقیقه فعالیت آنزیم به ٩ درصد رسید و پـس از١٢٠ دقیقـه به صفر رسید (شکل ٤). در بررسی‌های مشابه نیز پایداری دمـایی آنزیم بتاگلوکاناز گونه‌های باسیلوس تا محدوده دمـایی ٥٠ درجـه سانتی‌گراد است و با افزایش دما فعالیت آنزیم بـه‌سـرعت کـاهش می‌یابد. آنزیم بتـا ١ و ٣ گلوکانازسـویه *B. subtilis* NSRS89-24 ١٠٠ درصـد از فعالیـت خـود را در دامنـه دمـایی ٤٠-٢٠ درجـه سانتی‌گراد حفظ کرده، افزایش دما تا ٦٠ درجه سانتی‌گـراد منجـر به کاهش ٥٠ درصد از فعالیت آنزیمی شد و در دمـای ٨٠ درجـه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم به صـفر رسـید (Leelasuphakul *et al.* 2006). همچنین در بررسـی دیگـری پایـداری دمـایی آنـزیم بتـا گلوکاناز دوسویه *Bacillus* HR43 و *Bacillus* HR68 نشان‌داد که هر دو آنزیم تا محدوده دمایی ٥٠ درجه سانتی‌گراد فعالیت داشـته و بـا افـزایش دمـا فعالیـت آنزیمـی بـه شـدت کـاهش مـی‌یابـد (Mavadza *et al.* 2000).

بررسی پایداری آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز سویه B5d در دمـای ٥٠ درجه سانتی‌گراد و محدوده pH ٣-١٠ نشان‌داد کـه بیشـترین پایدارای آنزیم در pH ٥-٦ است. براساس نتـایج بـه‌دسـت آمـده آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه B5d توانایی حفظ ٧٠ درصد،٧٩ درصد،٩١ درصـد،٩٦ درصـد،٨٧ درصـد، ٨٢ درصد،٨٠ درصـد و٧٩ درصـد از فعالیـت خـود را بـه‌ترتیـب در pHهای ٣ تا ١٠ دارا است. براساس نتایج حاصله مشخص شد که آنزیم اندوبتاگلوکاناز سویه B5d در محـدوه pH ٥ تـا ١٠ پایـدار است. نتایج به‌صورت درصد فعالیت باقیمانده در (شکل ٥) ارایـه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]

شده‌است. بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز سویه *B. cereus* درمحدوده pH ۲–۱۰ نشان‌داد که آنزیم ذکرشده حدود ۹۰ درصد از فعالیت خود را در دامنه pH ۵–۹ حفظ کرد و در۹= pH، ۸۳ درصد از فعالیت خود را حفظ می‌کند (Yan *et al.* 2012). همچنین بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳–۱ و ٤ گلوکاناز *B. subtilis* A8-8، نشان‌داد که آنزیم ذکرشده مشابه با آنزیم بتا ۱ و ٤ 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 (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 Esherichia 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-degradinge nzyme 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, Hazlewoodg P, Barkerp J, Gilbert HJ. 1991. The cellodextrinase 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, Shojaosadati 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): 7090-7094.

Hakamada Y, Endo K, Takizawa S. 2002. Enzyme properties,crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkalineendoglucanase 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.

Lindemannn 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 _-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, Zvauya R, Mattiasson B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two Bacillus strains J. Biotechnol. 83: 177–87.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]

Moranellfi 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1392.2.2.2.8]