

هم‌ردیفی توالی آنزیم‌های مسیر بیوسنتز اینولین در گیاهان

Alignment of the Enzymes in Inulin Biosynthesis Pathway in Plants

هادی شوریده^۱، سیدعلی پیغمبری^{۲*}، منصور امید^۳، محمدرضا نقوی^۳، اسعد معروفی^۴ و مرضیه حسینی‌نژاد^۵

Hadi Shoorideh¹, Seyed Ali Peyghambari^{2*}, Mansour Omid³, Mohammad Reza Nghavi³, Asad Maroufi⁴ and Marzieh Hosseini Nejad⁵

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲ و ۳- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۴ و ۵- به ترتیب استادیار دانشگاه کردستان و پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد

1, 2, 3- PhD student of Plant Breeding, Associate Professor and Professor of Agricultural and Natural Resources College of Tehran University

4- Associate Professor of Agricultural College of Kordestan University

5- Assistant Professor of Institute of Food Science and Technology of Mashhad.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alipey@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

بیوانفورماتیک
فروکتان
توالی اسید آمینه
دومین
گروه‌بندی

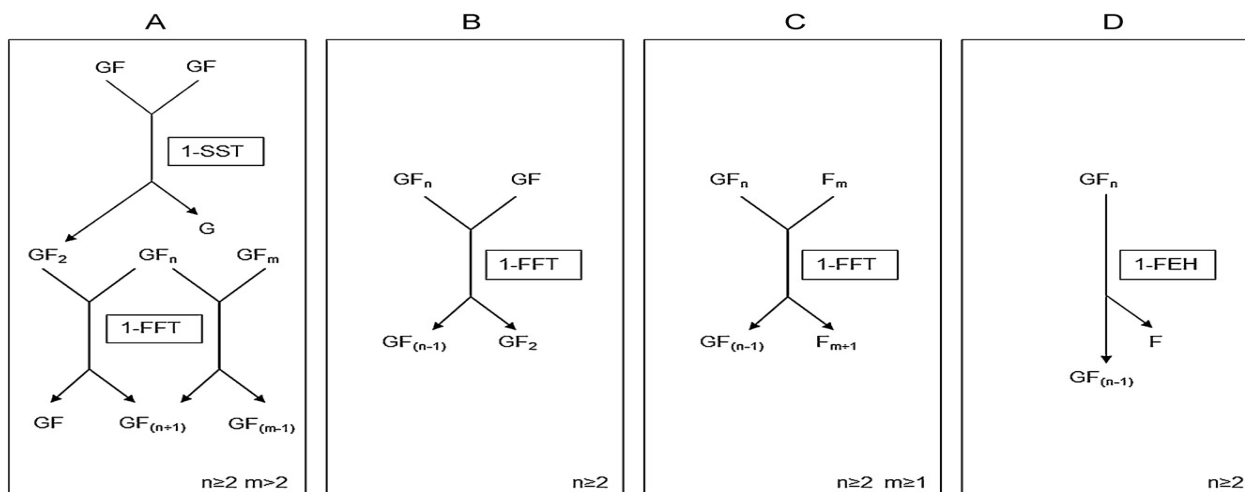
امروزه کاربرد اینولین و مشتقات آن به دلیل خصوصیات طبیعی و عملکردی آن در بسیاری از فرآورده‌های صنایع غذایی و دارویی رو به گسترش است. ترکیب پری‌بیوتیک اینولین فیزیولوژی روده بزرگ را بهبود بخشیده و فعالیت اکوسیستم میکروبی آن را افزایش می‌دهد. همچنین باعث افزایش جذب کلسیم و آهن شده و بعنوان یک ضدسرطان و ضددیابت هم مطرح است. کاسنی یکی از منابع اصلی استخراج اینولین است که سه ژن *1-FEH* و *1-FFT* و *1-SST* در بیوسنتز آن دخیل است. گروه‌بندی گیاهان با استفاده از توالی‌های اسید آمینه این سه آنزیم صورت توأم مشخص کرد که به کمک این توالی‌ها می‌توان شناسایی گیاهان را در دو گروه عمده تک لپه و دو لپه و با تفکیک در سطح گونه انجام داد. توالی اسید آمینه این سه ژن شباهت زیادی با اینورتازها و بتا فروکتوزیدازهای میکروبی دارد که همه اینها متعلق به گروه بزرگ خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیل (GH32) هستند و این فرضیه را باعث می‌شود که ژن‌های فوق دارای منشا مشترکی از ژن اولیه بتا فروکتوزیداز میکروارگانیسم‌ها هستند. با انجام هم‌ردیفی‌های چندگانه و بررسی نواحی حفاظت شده این سه آنزیم دخیل در بیوسنتز اینولین در گیاهان، مشخص شد که این آنزیم‌ها با وجود تفاوت در طول شباهت زیادی به‌ویژه در ناحیه حفاظت شده بتا فروکتوزیداز دارند. از طرفی با توجه به هم‌ردیفی توالی‌های توافقی این سه آنزیم به نظر می‌رسد علت اصلی تفاوت در عملکرد آنها به جهش‌هایی در منطقه حفاظت شده بتا فروکتوزیداز مربوط است. در مجموع با شناسایی ژن‌های مسیر بیوسنتز اینولین از منابع گیاهی تولیدکننده فروکتان یا سایر منابع مثل باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌توان اقدام به ایجاد گیاهان تراریخته تولیدکننده اینولین با کمیت و کیفیت مطلوب کرد.

مقدمه

داشته‌اند (van Arkel et al, 2013).

سنتز اینولین نیازمند دو آنزیم متفاوت است که در ابتدا یک تری‌ساکارید ۱-کتوز و یک گلوکز آزاد از دو ملکول ساکاروز توسط آنزیم ساکاروز: ساکاروز ۱- فروکتوترانسفراز ($I\text{-SST}$, EC 2.4.1.99) بوجود می‌آید. سپس آنزیم فروکتان: فروکتان ۱- فروکتوسیل ترانسفراز ($I\text{-FFT}$, EC 2.4.1.100) در یک واکنش برگشت‌پذیر طویل شدن زنجیره را بوسیله انتقال واحدهای فروکتوسیل (رادیکال فروکتوز) به ۱-کتوز (یا یک اینولین بزرگتر) از یک ملکول اینولین دیگر فراهم می‌آورد. فروکتان نوع اینولین خود به دو دسته تقسیم می‌شود نوع اینولین منظم یا GFn که دارای گلوکز انتهایی به همراه n فروکتوز است و نوع اینولونوز یا Fn که فاقد گلوکز انتهایی است. مشخص شده است که اینولونوز در کاسنی یک محصول حاصل از تخریب نیست بلکه این ملکول با بکارگیری فروکتوزهای آزاد توسط $I\text{-FFT}$ یا بکارگیری فروکتان‌های نوع Fn به‌عنوان سوبسترای پذیرنده، ایجاد می‌شود. بدین معنی که $I\text{-FFT}$ می‌تواند یا فروکتوز آزاد و یا فروکتان نوع Fn را در کنار فروکتان‌های نوع GFn قرار دهد (شکل ۱؛ Van den Ende et al, 1996). تنوع در ساختار فروکتان و درجه پلیمریزاسیون در گونه‌های مختلف گیاهی دیده می‌شود که بیشتر به خواص متفاوت این فروکتوسیل ترانسفرازها نسبت داده می‌شود (Hellwege, 2000). تخریب فروکتان توسط هیدرولیزکننده‌های فروکتان (FH) یا فروکتانازها کاتالیز می‌شود. دو آنزیم $I\text{-FH}$ (اینولیناز) و 6-FH (لواناز) می‌توانند توسط نوع پیوندی که مورد تجزیه قرار می‌دهند، شناسایی شوند. هیدرولیز کننده‌ها در گیاهان فقط هیدرولیز نوع بیرونی فروکتان (FEH) را انجام می‌دهند که واحدهای فروکتوز را از انتهای زنجیره آزاد می‌کنند در حالی که در باکتری‌ها و قارچ‌ها هم هیدرولیز درونی (endo) و هم بیرونی (exo) انجام می‌شود. سه نوع از هیدرولیز کننده‌های بیرونی فروکتان در کاسنی شناسایی شده است (Van den Ende et al, 2001). شباهت زیادی در سطوح ملکولی و بیوشیمیایی بین آنزیم‌های بیوسنتز کننده فروکتان، آنزیم‌های تخریب کننده فروکتان و اینورتازها (آنزیمی که هیدرولیز ساکاروز را کاتالیز کرده و پیوند c-o فروکتوز را برش می‌دهد که نمونه بارز آن در

امروزه نقش فروکتان‌ها به‌ویژه اینولین به لحاظ حفظ فلور میکروبی مفید سیستم گوارش و کنترل پاتوژن‌ها شناخته شده است و به همین خاطر کاربردهای وسیعی در صنایع غذایی و دارویی پیدا کرده‌اند (Roberfroid, 2005 & 2007). فروکتان‌های گیاهی بین ۱۰ تا ۲۰۰ واحد فروکتوسیل بسته به تنوع تاکسونومیکی گونه‌های گیاهی تولید کننده آنها دارند (van Arkel et al, 2013). فروکتان‌ها علاوه بر گیاهان دولپه‌ای متعلق به خانواده آستراسه (Asteraceae) در خانواده‌های گیاهی چون پوآسه (Poaceae) و لیلیاسه (Liliaceae) نیز وجود دارند، ولی منبع اصلی استخراج آنها همان خانواده آستراسه است. پنج گروه عمده از فروکتان‌ها در طبیعت وجود دارند که شامل اینولین، لوان، گرامینان، اینولین نئوسری و لوان نئوسری هستند (Ritsem and Smeeckens, 2003). پیوند بین دو فروکتوز در لوان از نوع فروکتوزیل ($\beta(2\rightarrow6)$) است، ولی در اینولین که بیشتر در گیاهان خانواده آستراسه یافت می‌شود، پیوند فروکتوزیل ($\beta(2\rightarrow1)$) بوده و گرامینان که بیشتر در خانواده پوآسه موجود است هر دو نوع پیوند را داراست. لوان نئوسری و اینولین نئوسری که بیشتر در پوآسه و لیلیاسه موجودند، دارای ۲ زنجیره لوان یا اینولین هستند که به کربن‌های ۱ و ۶ گلوکز مربوط به ساکاروز اولیه متصل هستند (Narai-kanayama et al, 2007). اینولین به‌عنوان پلی‌ساکارید ذخیره‌ای در ریشه و غده گیاهانی چون کاسنی (*Helianthus tuberosus*) و قاصدک (*Taraxacum officinale*) ذخیره می‌شود (Cairns, 2003) و نقش محافظت از گیاه در مقابل کمبود آب و تحمل به سرما را به عهده دارد (Pilon-Smits et al, 1995). یکی از گیاهان اصلی منبع اینولین کاسنی است که تجمع اینولین را در ریشه انجام می‌دهد ولی در انتهای فصل رشد به دلیل وقوع سرما کیفیت اینولین (درجه پلیمریزاسیون اینولین: تعداد واحدهای فروکتوز متصل به زنجیره) افت کرده و به زیر ۲۵ می‌رسد که علت اصلی آن فعالیت زیاد آنزیم‌های $I\text{-FFT}$ و $I\text{-FEH}$ است (شکل ۱؛ واکنش‌های B و D). مهندسان ژنتیک تلاش‌های زیادی برای حل این معضل هم از طریق خاموشی ژن FEH و هم معرفی ژن‌های $I\text{-SST}$ و $I\text{-FFT}$ به گیاهان غیرتولید کننده فروکتان



شکل ۱- واکنش‌های بیوسنتز فروکتان در کاسنی. A: پلیمریزاسیون فروکتان با 1-SST و 1-FFT، B: انتقال معکوس توسط 1-FFT، C: تولید اینولین توسط 1-FFT و D: هیدرولیز فروکتان توسط 1-FEH (GF = ساکاروز، F = فروکتوز، G: گلوکوز، GF2: 1-کتوز، GFn/m: اینولین و Fm: اینولونوز) (Van Arkela et al, 2012).

Fig. 1. The reactions of fructan biosynthesis in chicory. Fructan polymerization by 1-SST and 1-FFT (A), back transfer by 1-FFT (B), inulo-n-ose production by 1-FFT (C), fructan exohydrolysis by 1-FEH (D) (GF = sucrose, F = fructose, G = glucose, GF2 = 1-kestose, GFn/m = inulin, Fm = inulo-n-ose) (Van Arkela et al., 2012).

ماده با ارزش، بررسی روابط تکاملی بین گونه‌های گیاهی تولید کننده اینولین جهت دست‌ورزی‌های ژنتیک انجام شده است. بنابراین، در این پژوهش به کمک نرم‌افزارها و روش‌های بیوانفورماتیک، رابطه تکاملی به منظور بررسی میزان شباهت‌ها، شناسایی نواحی حفاظت شده، دومین‌ها و خانواده پروتئینی آنزیم‌های مسیر بیوسنتز اینولین با توجه به اهمیت روز افزون این ترکیب در صنایع غذایی و دارویی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

توالی ژن‌های دخیل در بیوسنتز اینولین (1-SST، 1-FFT و 1-FEH) از بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (Sayers et al, 2011) (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih>.) برای گونه‌های موجود جمع‌آوری شد. همچنین توالی اسیدآمینه آنزیم‌های فوق‌الذکر از سایت مخزن پروتئین جهانی (UniProt) (Bairoch et al, 2005) برای گونه‌های قابل دسترس گیاهی جمع‌آوری شد. با استفاده از نسخه 5 نرم‌افزار مگا (Tamura et al, 2011) هم‌ردیفی چندگانه برای توالی‌های اسیدآمینه به روش کلاستال دابلو (ClustalW) انجام شد و ترسیم درخت فیلوژنی

زنبور عسل باعث می‌شود تا از نکتار عسل بدست آید) وجود دارد. اینورتازها (بتا فروکتوزیدازها) سطح ساکاروز و FEHها سطح فروکتان را متعادل نگه می‌دارند که هر دو دارای منشاء مشابه (به احتمال زیاد بتا فروکتوزیدازها میکروبی) هستند (Verhaest et al, 2005).

آنزیم FFT واحد فروکتوسیل را از یک فروکتان دهنده به انتهای یک گیرنده منتقل کرده که منجر به طویل شدن پذیرنده‌ها و تخریب دهنده‌ها می‌شود. ویژگی‌های FFT تعیین کننده نوع پیوند گلیکوزیدی و الگوی ساختاری فروکتان است. FEH در گیاهان منجر به تخریب فروکتان‌ها و آزادسازی فروکتوز آزاد از انتهای زنجیره می‌شود. بنابراین تعادل بین 1-FFT و 1-FEH بر تغییرات طول فروکتان یا درجه پلیمریزاسیون (DP) آنها اثرگذار است (Narai-kanayama et al, 2007).

با استفاده از توالی اسید نوکلئیک کد کننده آنزیم‌های دارای نقش یکسان و یا توالی اسیدآمینه آنها در موجودات مختلف، می‌توان روابط تکاملی بین آنها را ترسیم کرد و موجودات نزدیک به هم را از لحاظ تکاملی شناسایی کرد. بنابراین با توجه به تنوع موجود برای آنزیم‌های ذکر شده در مسیر بیوسنتز اینولین به عنوان یک

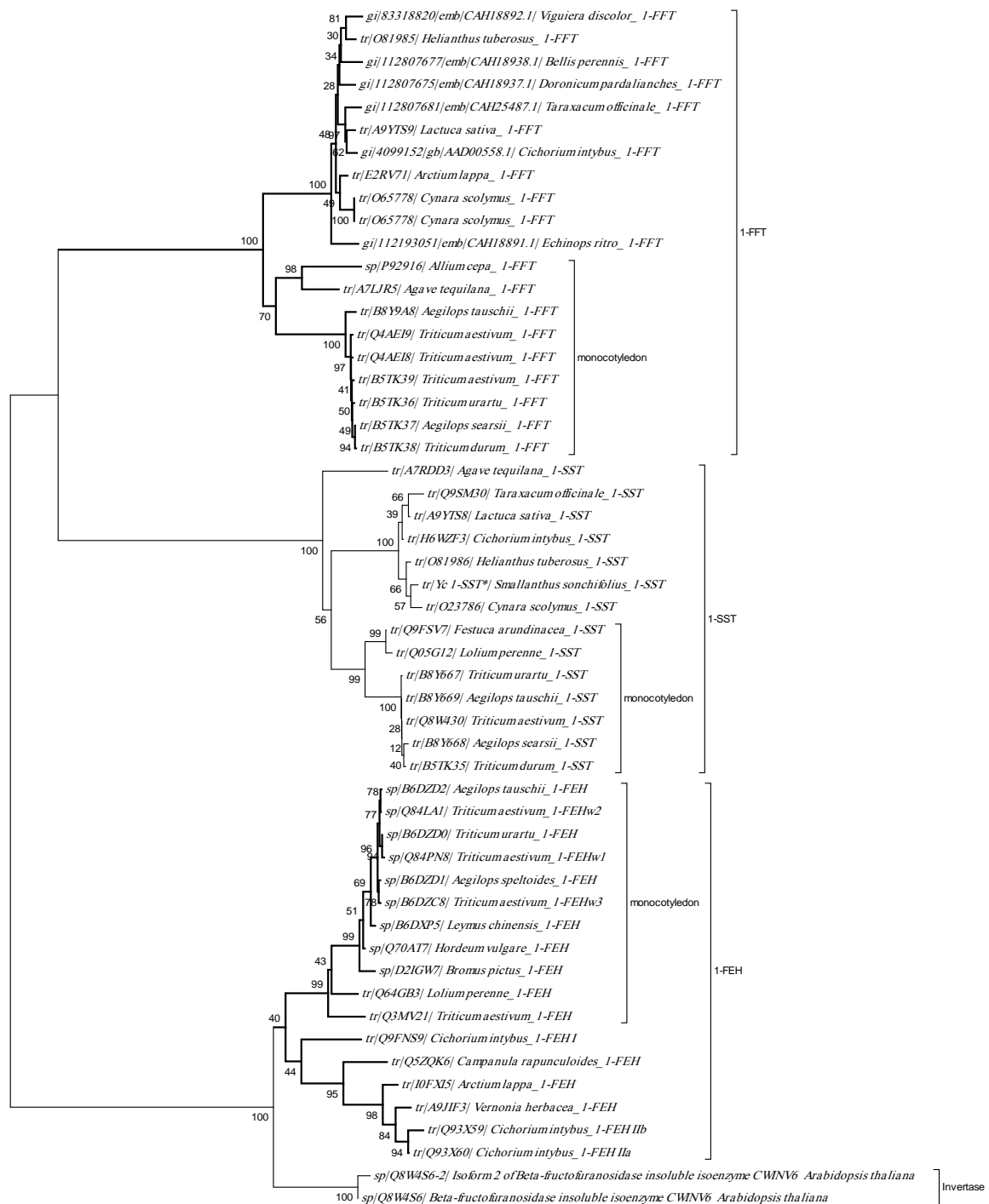
هم‌ردیفی به روش کلاستال دابلو با نرم‌افزار مگا درخت فیلوژنی آنها تهیه شد (شکل ۲). در این شکل مشاهده می‌شود تک‌لپه‌ای‌ها شامل خانواده‌های پوآسه و لیلیاسه و دولپه‌ای‌ها شامل خانواده آستراسه در دو گروه اصلی قرار گرفته‌اند که این موضوع در خصوص توالی اسیدآمین‌ها هر سه آنزیم *I-SST*، *I-FFT* و *I-FEH* صدق می‌کند (شکل ۲). دو آنزیم *I-SST* و *I-FFT* در کاسنی (*C. intybus*) که منبع اصلی استخراج اینولین است، بیشترین شباهت را با آنزیم‌های *I-SST* و *I-FFT* در کاهو (*L. sativa*) نشان می‌دهند (شکل ۲). در بین سه نوع آنزیم *I-FEH* در کاسنی، دو آنزیم *I-FEH IIa* و *I-FEH IIb* شباهت بیشتری به یکدیگر نسبت به *I-FEH I* دارند. قابل ذکر است که توالی اسیدآمین *I-FEH I* کاهو در حال حاضر موجود نیست تا با سه نوع *I-FEH* کاسنی مورد مقایسه قرار گیرد. با توجه به اینکه از توالی‌های اسیدآمین برای ترسیم درخت فیلوژنی استفاده شده است بنابراین این شجره‌های فیلوژنی از اعتبار بیشتری نسبت به سایر روابط فیلوژنی ماحصل از توالی‌های اسیدنوکلئیک کدکننده و غیر کدکننده برخوردارند (Calonje et al, 2008). بنابراین با استفاده از این توالی‌ها می‌توان گروه‌بندی را در سطح گونه انجام داد چرا که به‌خوبی بین گونه‌های مختلف جنس تریبتیکوم تفکیک قائل شده است (شکل ۲). با استفاده از نمودار درختی (شکل ۲) مشاهده می‌شود دو آنزیم *I-SST* و *I-FFT* نسبت به یکدیگر شباهت بیشتری نسبت به *I-FEH* به‌ویژه در ناحیه بتافرکتوزیداز (شکل ۴) دارند. این موضوع با توجه به اینکه هر دو آنزیم می‌توانند بر روی ساکاروز واکنش انجام دهند، تایید می‌شود (شکل ۱). از طرف دیگر دو آنزیم *I-FFT* و *I-FEH* فعالیت مشترک برداشتن فروکتوسیل از انتهای زنجیره دارند با این تفاوت که *I-FFT* این عمل را می‌تواند بر روی ساکاروز نیز انجام داده و فروکتوسیل مربوطه را به انتهای زنجیره فروکتان و یا ساکاروز دیگر افزوده ولی *I-FEH* فقط بر روی فروکتان عمل کرده و منجر به آزاد شدن فروکتوز می‌شود. بنابراین می‌توان شباهت‌های موجود در توالی توافقی دو آنزیم *I-FFT* و *I-FEH* را به فعالیت مشترک آنها منتسب کرد و تفاوت‌های بین آنها را که با توالی توافقی *I-SST* مشترک است را به فعالیت خاص افزودن فروکتوز به انتهای ساکاروز منتسب کرد (شکل ۴). همچنین *I-FEH*

مربوط به این توالی‌ها به روش نیبرجویینگ^۱ با مدل پویسون و بوت سترپ^۲ ۱۰۰۰ جهت اطمینان از صحت گروه‌بندی صورت گرفت. همچنین از توالی اینورتازها به‌عنوان گروه بیرونی جهت ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنی استفاده شد. جهت بررسی نواحی دومین این آنزیم‌ها از دو سایت بانک اطلاعاتی نواحی حفاظت شده^۳ (CDD) (Marchler-Bauer et al, 2009) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) و سایت بانک اطلاعات آنزیم‌های فعال کربوهیدرات‌ها^۴ dbCAN (Yin et al, 2012) (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN>) استفاده شد. سایت اخیر مخصوص آنزیم‌های فعال بر روی کربوهیدرات‌ها است و از دو منبع بانک اطلاعاتی CAZy و CAT مخصوص کربوهیدرات‌ها بهره می‌گیرد که این دو از اطلاعات CDD استفاده می‌کنند. بنابراین با توجه به اطلاعات موازی سایر سایت‌ها با سایت‌های استفاده شده، نتایج آنها در اینجا آورده نشده است. برای بدست آوردن توالی توافقی این سه آنزیم و هم‌ردیف کردن آنها برای مشخص کردن مناطق حفاظت شده از نرم‌افزار DNASTar استفاده شد.

نتایج و بحث

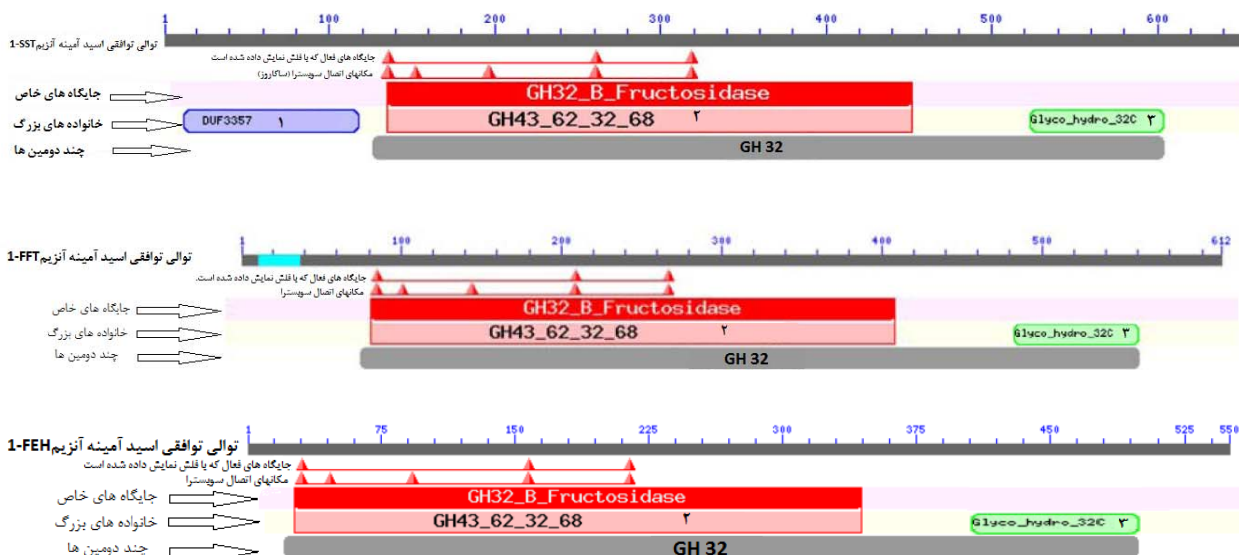
قسمت اعظم اطلاعات توالی اسید نوکلئوییک آنزیم‌های مورد بررسی در بانک‌های اطلاعاتی برای گونه‌های گیاهی به‌صورت ناقص و یا فقط شامل توالی mRNA بود، بنابراین تجزیه و تحلیل آنها با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک صورت نگرفت. در نتیجه برای بررسی روابط خویشاوندی از توالی‌های اسیدآمین استفاده شد. توالی‌های اسیدآمین آنزیم *I-SST* بیشتر از نوع TrEMBL بودند. بدین معنی که ترجمه mRNA کدکننده این آنزیم هستند. در خصوص *I-FFT* یک مورد از توالی‌های اسیدآمین به‌طور مستقیم از روی توالی پروتئین آنزیم بدست آمده بود و در مورد *I-FEH* بیشتر توالی‌های گروه‌های تک‌لپه‌ای به‌طور مستقیم از روی توالی پروتئین آنزیم بدست آمده بودند (شکل ۲). پس از انجام

- 1- Neighbor-joining
- 2- Bootstrap
- 3- Conserved Domains Database
- 4- Data Base for automated Carbohydrate-active enzyme Annotation



شکل ۲- درخت فیلوژنی آنزیم های 1-SST، 1-FFT و 1-FEH در بین گونه‌های مختلف گیاهی به روش نیبرجویینگ (شماره دستیابی در سایت یونی پرات به همراه اسم گونه ذکر شده است. tr: توالی اسیدآمینه در سایت EMBL از طریق ترجمه توالی mRNA بدست آمده است و sp: توالی اسیدآمینه به‌طور مستقیم از روی توالی پروتئینی آنزیم بدست آمده است. *: توالی اسیدآمینه از منبع پن و همکاران (Pan et al, 2009) اخذ شده است. gi: کد دستیابی ژن در NCBI، emb: کد دستیابی توالی اسیدآمینه در سایت EMBL و gb: کد دستیابی توالی اسیدآمینه در NCBI)

Figure 2- Phylogenetic tree of 1-SST enzyme for different plant species using neighbor-joining method (Entry at the Uniprot site noted along with species name. tr: Amino acid sequence at EMBL site obtained through translation of mRNA and sp: Amino acid sequence obtained directly from enzyme *: Amino acid sequence for this species was gotten from Pan et al., 2009., gi: Entry of gene at NCBI, emb: Entry of Amino acid sequence at EMBL site and gb: Entry of Amino acid sequence at NCBI).



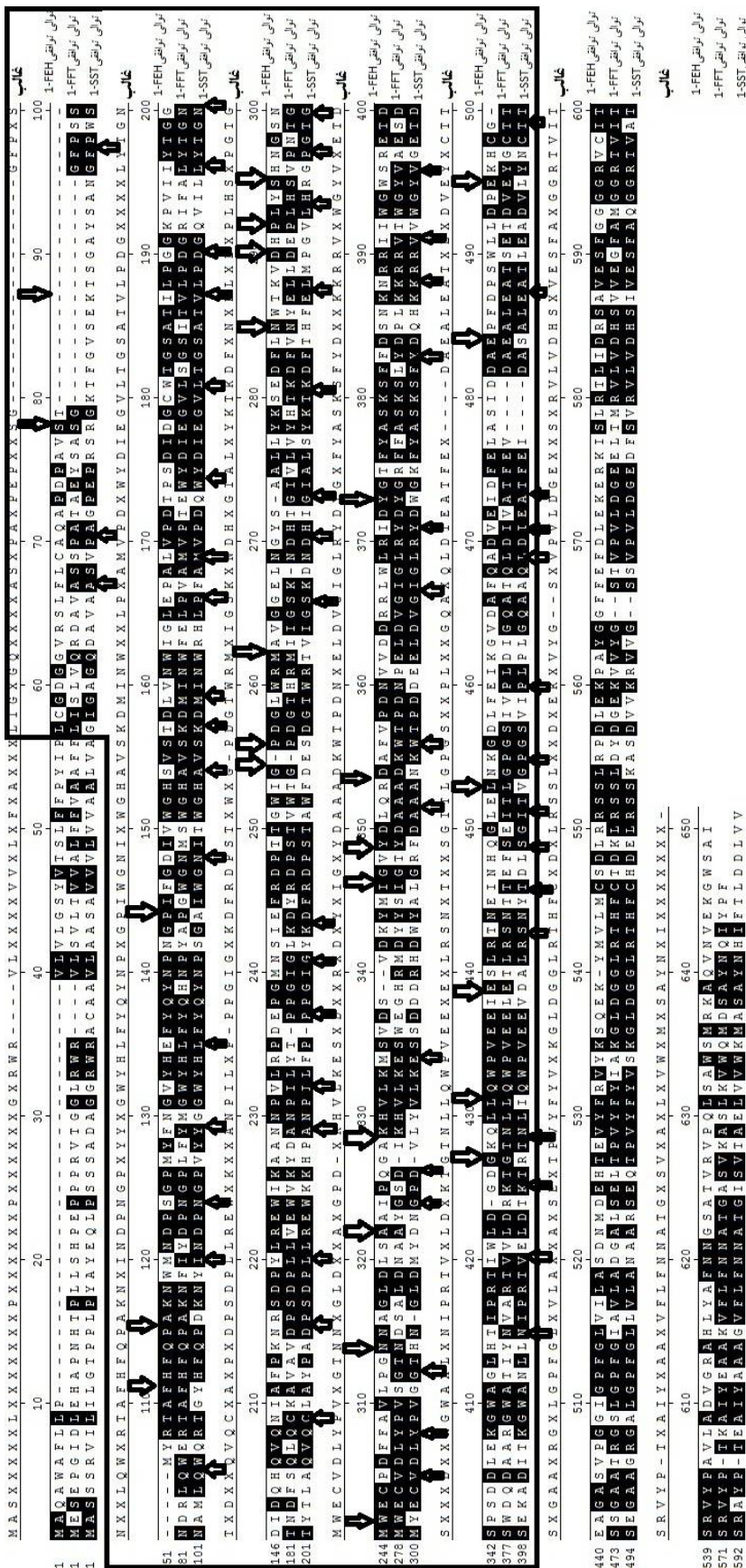
شکل ۳- توالی اسید آمینه سه آنزیم *I-SST*، *I-FFT* و *I-FEH* به همراه نمایش زیرگروه‌های خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیدی (GH32) حاوی موتیف‌های اسیدآمینه‌ای محافظت شده (جایگاه‌های خاص) که منجر به ساختار سه بعدی مشابه در آنها می‌شود (منبع: بانک اطلاعاتی نواحی حفاظت شده: CDD).

Figure 3- Amino acid sequences of three enzymes (1-SST, 1-FFT and 1-FEH) along with demonstration of Glycosyl hydrolase family (GH32) subgroups and conserved amino acid motifs (specific sites) which led to common structure of these enzymes. (Source: Conserved Domain Database).

آمینی توالی اسیدآمینه قرار دارد و به‌طور کلی طول آن بین ۹۶ تا ۱۱۹ اسید آمینه است. این دومین به خانواده پروتئینی ۱۱۸۳۷ تعلق داشته و در یوکاریوت‌ها مشاهده می‌شود، که عمل آن هنوز ناشناخته است. جدا از تفاوت در طول زنجیره این سه آنزیم تفاوت دیگر مربوط به موقعیت محافظت شده اصلی این سه آنزیم یعنی GH32 است که در آنزیم *I-SST* از اسیدآمینه ۱۲۰ شروع شده و تا اسیدآمینه ۶۰۰ ادامه دارد ولی در *I-FFT* از اسیدآمینه ۷۵ شروع شده و تا اسیدآمینه ۵۶۰ ادامه دارد و در نهایت در آنزیم *I-FEH* از اسیدآمینه ۱۷ شروع شده و تا اسیدآمینه ۴۹۵ ادامه دارد (شکل ۳). همانگونه که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود ناحیه GH32 در دو آنزیم *I-SST* و *I-FFT* در موقعیت مشابه‌ای نسبت به *I-FEH* قرار دارد و طول این ناحیه در هر سه آنزیم مشابه و حدود ۴۸۰ اسیدآمینه است که شامل دو زیر خانواده بزرگ ۲ و ۳ که به ترتیب ناحیه حفاظت شده بتا فروکتوزیدازها و انتهای کربوکسیل خانواده ۳۲ هیدرولیز کننده گلیکوزیدی است. بنابراین این موضوع بیانگر تشابه بیشتر در آنزیم *I-SST* و *I-FFT* نسبت به یکدیگر در مقایسه با *I-FEH* است که با بررسی رابطه

بیشترین شباهت را با اینورتازها دارد (شکل ۲) که این موضوع با توجه کارکرد مشابه آنها یعنی واکنش د-گلیکوزیلاسون^۶ قابل انتظار است (Lammens et al, 2009). جهت تعیین نواحی حفاظت شده این آنزیم‌ها در ابتدا از بانک اطلاعاتی آنزیمی کربوهیدرات‌ها (dbCAN) استفاده شد که البته فقط ناحیه مربوط به خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیدی (GH32) را در این آنزیم‌ها شناسایی کرد. با توجه به اینکه منبع اطلاعات این سایت به‌طور غیرمستقیم از NCBI است، به‌طور مستقیم از بانک اطلاعاتی دومین‌های حفاظت شده سایت NCBI (CDD) جهت شناسایی نواحی حفاظت شده و دومین‌های احتمالی این آنزیم‌ها استفاده شد. با بررسی در بانک اطلاعاتی نواحی دومین حفاظت شده دوباره این سه آنزیم همانند سایت بانک اطلاعاتی آنزیمی کربوهیدرات‌ها (dbCAN) به خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیدی منتسب شدند (شکل ۳)، با این تفاوت که برای آنزیم *I-SST* ناحیه حفاظت شده شماره ۱ متعلق به خانواده بزرگ DUF3357 شناسایی شد که در موقعیت انتهای

5- Deglycosylation



شکل ۴- هم‌ردیفی سه توالی توافق‌ی برای آنزیم‌های *1-FEH*، *1-FFT* و *1-SST* (پیکان‌ها بالا بیانگر نواحی متفاوت مستعد آنزیم‌ها برای اثر بر روی ساکاروز است در ناحیه بنافر و کوزیدازای نمایش داده شده با کادر سیاه است و پیکان‌ها پایین بیانگر نواحی متفاوت مستعد توانا ساختن آنزیم برای اثر بر روی اینولین است).

Figure 4- Alignment of consensus amino acid sequence of 1-SST, 1-FFT and 1-FEH enzymes. (Up arrow shows potential regions which able enzyme to affect on sucrose in the beta fructosidase domain which shown by black cadre and Down arrow shows potential regions which able enzyme to affect on inulin)

فیلوژنیک این سه آنزیم (شکل ۲) و همچنین نقاط مشترک توالی توافقی آنها در شکل ۴ قابل تایید است. ناحیه بتا فروکتوزیداز در *I-SST* روی ساکاروز عمل کرده و ضمن شکستن پیوند بین گلوکز و فروکتوز منجر به تشکیل تری ساکارید ۱-کتوز هم می‌شود. این ناحیه در *I-FFT* منجر به آزاد سازی یک گروه فروکتوسیل از یک ملکول اینولین و اتصال آن به ملکول اینولین دیگر و یا ساکاروز می‌شود ولی در *I-FEH* فقط منجر به آزاد سازی یک فروکتوز آزاد از انتهای زنجیره می‌شود. اینورتازها هم واکنش مشابهی را بر روی ساکاروز انجام می‌دهند و باعث آزاد شدن فروکتوز ملکول ساکاروز می‌شوند، بنابراین تشابه اینورتازها با *I-FEH* به جهت انجام واکنش مشابه آنها یعنی واکنش د-گلیکوزیلاسیون تایید می‌شود. ناحیه انتهای کربوکسیل GH32 ساختارهای ساندویچ بتا را به وجود می‌آورد که جایگاهی برای اتصال کربوهیدرات‌ها فراهم می‌آورد. به نظر می‌رسد که جدا از سایر تفاوت‌های بحث شده تفاوت در توالی اسید آمینه ناحیه حفاظت شده بتا فروکتوزیداز عامل اصلی تفاوت عملکرد این سه آنزیم باشد. این عقیده وجود دارد که تمامی آنزیم‌های متابولیسم فروکتان از اینورتازها با تعداد کمی تغییرات جهشی به وجود آمده‌اند (Vijn and Smeekens, 1999). بیشتر این آنزیم‌ها مقدار کمی فعالیت اینورتازی یعنی تجزیه ساکاروز به گلوکز و فروکتوز را در غلظت‌های کم ساکاروز از خود نشان می‌دهند بجز FEH که به نظر می‌رسد که این توانایی اثر بر روی ساکاروز را به‌طور کامل از دست داده است. به نظر می‌رسد یک ژن بتا فروکتوزیداز قدیمی که هم اکنون در میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود به داخل ژنوم گیاهان نفوذ کرده و یک شاخه از آن به اینورتازها و شاخه دیگر به FEH و سایر آنزیم‌های دخیل در متابولیسم فروکتان تبدیل شده است (Verhaest et al, 2005). به همین جهت همه این آنزیم‌ها یک توالی اسیدآمینه‌ای خیلی مشابه دارند که به خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیل تعلق دارد.

پس از هم‌ردیف کردن توالی‌های هر یک از آنزیم‌ها به روش

کلاستال دابلو و حصول توالی توافقی برای هر یک از آنزیم‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNASTar می‌توان هم‌ردیف کردن سه توالی توافقی آنزیم‌های *I-SST*، *I-FFT* و *I-FEH* و یافتن نقاط متفاوت در ناحیه بتا فروکتوزیداز (کادر سیاه شکل ۴) که نقش احتمالی در تفاوت عملکرد آنزیم‌ها دارند، انجام داد (نقاط نمایش داده شده با پیکان سربالا [↑] کاندید برای توانا ساختن آنزیم جهت اثر بر ساکاروز و نقاط نمایش داده شده با پیکان سر پایین [↓] کاندید برای توانا ساختن آنزیم جهت اثر بر اینولین). بر این اساس به نظر می‌رسد ناحیه حذف شده در ابتدای ناحیه بتا فروکتوزیدازی (شکل ۴) بیشترین اثر را در تغییر قابلیت این سه آنزیم داشته است به گونه‌ای که وقوع حذف بزرگ تقریباً ۳۰ اسیدآمینه‌ای در *I-FEH* به ویژه ناحیه متمایز از *I-FFT* (۲۰ اسیدآمینه ابتدای ناحیه حذف شده) منجر به عدم توانایی اثر این آنزیم بر روی ساکاروز شده است.

در مجموع به نظر می‌رسد که با استفاده از توالی آنزیم‌های کارکردی، می‌توان روابط فیلوژنی بین گونه‌های موجود گیاهی و حتی موجودات پست میکروبی را تعیین کرد. در ضمن با استفاده از اینگونه پژوهش‌ها می‌توان به توالی‌های دلخواه اینولیناز برای دستیابی به انواع مشتقات مطلوب حاصل از اینولین همچون دی فروکتوز انیدریدها (DFAs) که امروزه به دلیل خاصیت پری‌بیوتیکی و شیرین کنندگی خاص کاربردهای وسیعی در صنایع دارویی و غذایی پیدا کرده‌اند، دست یافت. هم‌چنین با شناسایی ژن‌های مسیر بیوسنتز اینولین از منابع گیاهی تولید کننده فروکتان یا سایر منابع مثل باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌توان اقدام به تولید گیاهان تراریخته تولید کننده اینولین با کمیت و کیفیت مطلوب کرد. گیاه مطلوب برای این منظور چغندرقد است چرا که ماده اولیه ساکاروز را به وفور در خود داراست و می‌توان با افزودن دو ژن مناسب *I-SST* و *I-FFT* به ژنوم آن گیاه تراریخته مطلوب را مهندسی کرد.

منابع

1. Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Natale, D. A., O'Donovan, C., Redaschi N. and Yeh. L. L. 2005. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids*

Research, 33: Database issue D154–D159.

2. Cairns, A. J. 2003. Fructan biosynthesis in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany*, 54: 549–567.

3. Calonje, M., Martín-Bravo, S., Dobeš, Ch., Gong,

- W., Jordon-Thaden, I., Kiefer, Ch., Kiefer, M., Paule, J., Schmickl, R. and Koch, M. A. 2008. Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Plant Systematics and Evolution* 282(3-4): 257-280.
4. Hellwege, E.M., Czaplá, S., Jahnke, A., Willmitzer, L. and Heyer, A.G. 2000. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proceeding of National Academic Science of USA*, 97: 8699–8704.
5. Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K. DeWeese-Scott, C. Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang N., and Bryant S. H. 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research*, 37: Database issue D205–D210.
6. Narai-kanayama, A., Tokita, N. and Aso, K. 2007. Dependence of fructooligosaccharide content on activity of fructooligosaccharide-metabolizing enzymes in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuberous roots during storage. *Journal of Food Science*, 72: 381-387.
7. Pan, W., Sunayama, Y., Nagata, Y., Taniguchi, M., Takano, M., Inoue, E., Tamagake, H. and Anzai, H. 2009. Cloning of a cDNA encoding the sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from Yacon and its expression in transgenic rice. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 23: 1479-1484
8. Pilon-Smiths, E. A. H., Ebskamp, M. J. M., Paul, M. J., Jeuken, M. J. W., Weisbeek, P. J. & Smeekens, S. C. M. 1995. Evaluation of safety on inulin and oligofructose as dietary fiber. *Plant Physiology*, 107: 125–130.
9. Ritsema T, Smeekens S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 223–30.
10. Roberfroid M.B. 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *Journal of Nutrition*, 137: 2493S–2502S.
11. Roberfroid, M. B. 2005. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93: 13-25.
12. Sayers E. W., Barrett, T., Benson, D.A., Bolton, E., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Federhen, S., Feolo, M., Fingerma, I.M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D. J. Lu, Z., Madden, T. L., Madej, T., Maglott, D. R., Marchler-Bauer, A., Miller, V., Mizrahi, L., Ostell, J., Panchenko, A., Phan, L., Pruitt, K. D., Schuler, G. D., Sequeira, E., Sherry, S. T., Shumway, M., Sirotkin, K., Slotta, D., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T. A., Wagner, L., Wang, Y., Wilbur, W. J., Yaschenko E. and Ye J. 2011.. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 39: Database issue, D38–D51.
13. Shigematsu, N., Okuhara, Y., Shiomi, T., Tomita, F., and Hara, H. 2004. Effect of difructose anhydride III on calcium absorption in humans. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 68: 1011–1016.
14. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*, 28: 2731–2739.
15. Van Arkela, J., Séveniera, R., Hakkerta, J. C., Bouwmeester, H. J., Koopsa, A. J., and Van der Meera, I. M. 2013. Tailor-made fructan synthesis in plants: A review. *Carbohydrate Polymers*, 93: 48-56.
16. Van Arkela, J., Vergauwen, R., Séveniera, R., Hakkerta, J. C., Van Laere, A., Bouwmeester, H. J., Koopsa, A. J., and Van der Meera, I. M. 2012. Sink filling, inulin metabolizing enzymes and carbohydrate status in field grown chicory (*Cichorium intybus L.*). *Journal of Plant Physiology*, 169: 1520-1529.
17. Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J., and Van Laere, A. 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal*, 2: 1281–1295.
18. Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wouterghem, D., Clerens, S.P., De Roover, J. and Van Laere, A.J. 2001. Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa and fructan 1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology*, 126: 1186–1195.
19. Van den Ende, W., Mintiens, A., Speleers, H., Onuoha, A., and Van Laere, A. 1996. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus L.* during growth, storage and forcing. *New Phytologist*, 132: 555–563.
20. Verhaest, M., Van den Ende, W., Roy, K.L., De Ranter, C. J., Van Laere, A., and Anja, R. 2005. X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *The Plant Journal*, 41: 400–411.
21. Vijn, I. and Smeekens, S. (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*. 120: 351–360.
22. Willem Lammens, Katrien Le Roy, Lindsey Schroeven, André Van Laere, Anja Rabijns, and Wim Van den Ende. 2009. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications *J. Exp. Bot.* 60: 727-740.
23. Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., and Xu, Y. 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 40: Web Server Issue: W445–W451.

