مجله تحقیقات مهندسی کشاورزی/جلد ۱۵/ شماره ٤/سال ۱۳۹۳/ص ٦٤-۵۳

تعیین ویژگی‌های مولکولی و کاتالیتیکی آنزیم زایلاناز اسیددوست *باسیلوس سابتیلیس* K40b

پریناز مرادی دزفولی، مریم هاشمی*، مریم موسیوند و محمود خسروشاهلی**

* نگارنده مسئول: بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران، ص. پ. ۱۸۹۷-۳۱۵۳۵، تلفن: ۳۲۷۰۳۵۳۶(۰۲۶)، پیام‌نگار: hashemim@abrii.ac.ir

** به‌ترتیب: دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه آموزشی بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات؛ عضو هیات علمی بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران؛ کارشناس ارشد بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران؛ و استاد گروه آموزشی بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۴

چکیده

در بررسی حاضر سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b از ریزوسفر برنج جدا و پتانسیل تولید آنزیم زایلاناز آن با استفاده از روش بیوشیمیایی ارزیابی شد. حضور ژن زایلاناز در سویه K40b به روش مولکولی ردیابی و پس از تعیین توالی در بانک ژن مرکز اطلاعات زیست فناوری ثبت شد. توالی این ژن شامل ٥٦٣ نوکلئوتید است که یک رشته پپتیدی ۱۸۷ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند. مقایسه توالی ژن زایلاناز سویه مورد بررسی با توالی‌های مرجع نشان می‌دهد که آنزیم تولید شده توسط سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b متعلق به خانواده ۱۱ گلیکوزید هیدرولاز است و بالاترین شباهت را به زایلانازهای باسیلوسی دارد. روش سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی نیز به منظور تعیین دما و pH بهینه فعالیت کاتالیتیکی آنزیم زایلاناز تولید شده به‌کار گرفته شد. دامنه مورد بررسی متغیرهای دما و pH در این مطالعه به‌ترتیب ۷۵-۲۵ درجه سلسیوس و ٤/٥-۸/٥ بود. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس، مدل درجه دوم به‌عنوان مدل مناسب برای پیش‌بینی متغیر پاسخ (فعالیت آنزیم زایلاناز) پیشنهاد شد. نتایج نشان می‌دهد که آنزیم زایلاناز تولید شده توسط سویه مورد بررسی در pH بین ٥/۲ تا ٦/۲ و دمای ٥۰ تا ٦۰ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت را دارد. همچنین، بر اساس نتایج بهینه‌سازی مشخص شد که pH قلیایی و دمای بیشتر از ۷۰ و کمتر از ٥۰ درجه سلسیوس نیز موجب کاهش قابل توجهی در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم خواهد شد.

واژه‌های کلیدی

***باسیلوس سابتیلیس*، روش سطح پاسخ، زایلاناز، طرح مرکب مرکزی**

مقدمه

سلولز، همی سلولز و لیگنین از بخش‌های اصلی دیواره سلولی گیاهان هستند که به‌ترتیب ۴۰، ۳۳ و ۲۳ درصد از وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهند (Sa Pereira *et al.*, 2003). زایلان یکی از اجزای اصلی همی‌سلولزها در دیواره سلولی گیاهان و دومین پلی‌ساکارید، به لحاظ فراوانی، بعد از سلولز است. زایلان از هوموپلیمرهای خطی حاوی مونومرهای دی- زایلوز با پیوندهای بتا ۱ و ۴ گلیکوزیدی تشکیل شده است. زایلان‌ها در طبیعت اغلب حاوی زنجیره‌های جانبی استیل، ۴- O- متیل- دی‌گلوکورونوزیل و آرابینوفورانوزیل هستند که یک کمپلکس ناهمگن را ایجاد می‌کنند (Louw *et al.*, 2006). بر این اساس هیدرولیز کامل زایلان نیاز به عملکرد هماهنگ آنزیم‌های زایلانولیتیک

© 2016,The Author(s). Published by Agricultural Engineering Research Institute. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

متفاوت دارد که مشتمل‌اند بر: اندو زایلانازها، بتا- زایلوزیداز و آنزیم‌های کمکی مانند آلفا-آرابینوفورانوزیداز، استیل زایلان استراز و آلفا- گلوکورونیداز. در میان این آنزیم‌ها، اندو- بتا-۱ و ۴ زایلاناز (EC 3.2.1.8) در هیدرولیز زنجیره‌های بلند زایلان به زایلوالیگوساکاریدهای کوتاه بسیار اهمیت دارد (Chavez *et al.*, 2006). زایلوز (بتا-۱ و ۴- زایلوپیرانوز) محصول اصلی تجزیه زایلان و منبعی است از کربن اولیه که می‌تواند در بسیاری از جهات جایگزین گلوکز شود (Schneider, 1989). زایلانازها، بر اساس نحوه عمل، شباهت توالی اسیدهای آمینه، اختصاصی بودن سوبسترا و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی‌شان در شش خانواده ۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱ و ۴۳ گلیکوزید هیدرولاز طبقه‌بندی می‌شوند. یادآوری می‌شود که آنزیم‌هایی با فعالیت زایلاناز در خانواده‌های ۵، ۷، ۸، ۱۶، ۲۶، ۴۳، ۵۲ و ۶۲ گلیکوزید هیدرولاز هم وجود دارند ولی تنها شش خانواده فوق دارای یک بخش کاتالیتیکی زایلاناز هستند و بقیه خانواده‌ها دو یا چند بخش کاتالیتیکی غیر زایلانازی نیز دارند (Coutinho & Henrissat, 1999). اغلب اندو- بتا-۱ و ۴ زایلانازها در خانواده‌های ۱۰ و ۱۱ گلیکوزید هیدرولاز قرار می‌گیرند. خانواده گلیکوزید هیدرولاز-۱۰ حاوی اندو- بتا-۱ و ۴ زایلانازهایی با وزن مولکولی بیشتر از ۳۰ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک اسیدی است. مشخصه زایلانازهای گلیکوزید هیدرولاز-۱۰ گستردگی عمل بر سوبسترای مختلف است؛ این زایلانازها نه تنها به سوبسترای خطی زایلان حمله می‌کنند بلکه جایگاه فعالشان را با الیگوزایلوساکاریدها و هتروزایلان‌های شاخه‌دار وفق می‌دهند (Collins *et al.*, 2005). آنزیم‌های خانواده گلیکوزید هیدرولاز-۱۱ با نقطه ایزوالکتریک بالا و وزن مولکولی پایین مشخص می‌شوند. در مقایسه با دیگر خانواده‌های گلیکوزیل هیدرولازی، این خانواده تنها خانواده حاوی زایلانازها است که منحصرا بر سوبستراهای حاوی دی‌زایلوز فعال هستند. زایلانازهای خانواده ۱۱ بر اساس pH بهینه به دو گروه اسیدی و قلیایی تقسیم می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهد که pH بهینه فعالیت مربوط است به اسید آمینه مجاور جایگاه فعال آنزیمی؛ به‌نحوی که اگر این اسید آمینه آسپارتیک باشد، pH بهینه اسیدی و اگر آسپارژین باشد، pH بهینه آن قلیایی است (Pollet *et al.*, 2010).

زایلانازهای میکروبی در صنایع گوناگون از جمله در صنعت خوراک دام، نانوایی، کاغذسازی، تیمار ضایعات کشاورزی و تولید ماءالشعیر کاربرد دارند. گفتنی است که برای رفع نیازهای صنعتی خاص، زایلانازهای ایده‌آل باید ویژگی‌های خاص داشته باشند مانند پایداری مناسب در برابر حرارت بالا، pH، کاتیون‌های فلزی و مواد شیمیایی (Beg *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004; Polizeli *et al.*, 2005). زایلانازهای متعددی از میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله از باکتری‌ها، اکتینومایست‌ها، قارچ‌ها و مخمرها جدا شده‌اند (Butt *et al.*, 2008).

در سال‌های اخیر کاربردهای متنوع زایلانازها در صنایع مختلف توجه بیشتری را به جستجوی منابع میکروبی جدید به منظور دستیابی به آنزیم‌های مورد استفاده در فرآوری توده زیستی سوق داده است. بر این اساس به‌منظور تعیین خانواده آنزیمی و شرایط بهینه عملکرد آنزیم به‌روش سطح پاسخ، خصوصیات مولکولی و کاتالیتیکی آنزیم زایلاناز سویه بومی *باسیلوس سابتیلیس* K40b بررسی شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و شرایط نگهداری: سویه باکتریایی *باسیلوس سابتیلیس* K40b از ریزوسفر مزارع برنج واقع در استان مازندران جداسازی شد. استرین باکتریایی در محیط حاوی: نوترینت براث ۸ گرم بر لیتر، دی‌پتاسیم

هیدروژن فسفات ۱ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱ گرم بر لیتر، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات ۰/۲۵ گرم بر لیتر، گلوکز ۲ گرم بر لیتر، سولفات منیزیم ۰/۳ گرم بر لیتر، آگار ۱۸ گرم بر لیتر کشت و به‌مدت دو روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد (Lindemann *et al.*, 1984). به‌منظور ادامه مطالعات بعدی، سویه باکتریایی پس از لیوفیلیز شدن در بانک ژن میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی نگهداری شد.

ارزیابی کیفی و کمی فعالیت آنزیم زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b: به‌منظور ارزیابی کیفی توانایی تولید آنزیم زایلاناز، از محیط کشت اختصاصی ارزیابی کیفی زایلاناز حاوی (زایلان جو ۱۰ گرم بر لیتر، پپتون ۵ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱ گرم بر لیتر، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۴ گرم بر لیتر، سولفات منیزیم هیدراته ۰/۲ گرم بر لیتر، کلرید پتاسیم ۰/۰۲ گرم بر لیتر، سولفات آهن دو ظرفیتی هیدراته ۰/۰۲ گرم بر لیتر، آگار ۱۵ گرم بر لیتر) استفاده شد. سویه مورد بررسی به صورت نقطه‌ای کشت داده شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد (Khianngam *et al.*, 2009). مشاهده هاله روشن در اطراف محیط کشت موید مثبت بودن آزمون است.

پس از تایید کیفی توانایی سویه باکتریایی K40b در تولید زایلاناز، فعالیت آنزیمی آن به‌روش دی‌نیترو سالیسیلیک اسید اندازه‌گیری شد (Bailey *et al.*, 1992). بدین منظور ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر سوبسترا (زایلان ۱ درصد چوب درخت قان در بافر ۰/۲ مولار) به‌مدت ۵ دقیقه در دمای مورد نظر قرار داده شد. برای تهیه pHهای مختلف نیز از بافرهای مناسب (بافر فسفات و سیترات) با غلظت ۰/۲ مولار استفاده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم با رقت مناسب به سوبسترا اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دما و pH مورد نظر گرمخانه‌گذاری شد. در پایان، ۶۰۰ میکرولیتر از معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای جوش قرار داده شد. غلظت قندهای آزاد شده از زایلان در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. واحد فعالیت آنزیم برابر است با مقدار آنزیمی که در یک دقیقه، در شرایط مطلوب، یک میکرومول سوبسترا را به محصول تبدیل کند.

به‌منظور رسم نمودار استاندارد غلظت زایلوز، ابتدا محلول ۰/۲ درصد از زایلوز تهیه و پس از آن رقت‌های متفاوت زایلوز (۶×۱۰^{-۳} - ۶×۱۰^{-۲} میلی‌مول) آماده شد. رقت‌های مختلف زایلوز، پس از افزودن یک میلی‌لیتر معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید، به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. در پایان، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت (کشور سوئیس، Microplate Reader, Tecan impro200)، خوانده شد و بر اساس مقدار جذب نوری، نمودار استاندارد تعیین غلظت زایلوز رسم گردید. با استفاده از معادله به‌دست آمده مقدار زایلوز موجود در نمونه‌های سنجش آنزیمی محاسبه و با اعمال ضریب رقت فعالیت کمی آنزیم زایلاناز بر حسب واحد بر لیتر گزارش شد.

تولید آنزیم زایلاناز: برای تهیه مایه تلقیح، سویه K40b به محیط کشت نوترینت براث منتقل و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. پس از آن ۲ درصد از مایه تلقیح آماده شده به محیط کشت تولید آنزیم افزوده و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. محیط کشت تولید آنزیم شامل زایلان ۱۲ گرم بر لیتر، عصاره گوشت ۳ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۴ گرم بر لیتر، کلرید کلسیم ۰/۵ گرم بر لیتر، سولفات منیزیم هیدراته ۰/۳ گرم بر لیتر و دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۱ گرم بر لیتر بود. به‌منظور جداسازی آنزیم، محیط کشت تخمیر شده به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور

بر دقیقه سانتریفوژ شد. فاز روماند به‌عنوان منبع آنزیم خام، تا زمان اجرای آزمون‌های مربوط، در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

تعیین شرایط بهینهٔ فعالیت کاتالیتیکی زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b: به‌منظور تعیین شرایط بهینه فعالیت کاتالیتیکی زایلاناز تولید شده از سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b از روش سطح پاسخ استفاده شد. طرح آزمایشی مرکب مرکزی دو متغیره برای بهینه‌سازی پارامترهای pH و دما در پنج سطح ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) به‌کار گرفته شد (جدول ۱). بر اساس طرح آزمایشی به‌کار رفته، تیمارهای مورد بررسی متشکل از ۱۴ آزمایش، شامل پنج تکرار نقطه مرکزی برای تعیین خطای آزمایشی بود (جدول ۲). مقدار آنزیم زایلاناز تولید شده بر حسب فعالیت آنزیم به‌عنوان پاسخ، اندازه‌گیری و نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Design Expert به‌روش آنالیز واریانس بررسی شد.

جدول ۱- دامنه آزمایش‌ها و سطوح متغیرها در طرح مرکب مرکزی

سطوح / متغیرها	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH	۳/۵	۴/۲۳	۶	۷/۷۷	۸/۵
دما (درجه سلسیوس)	۲۵	۳۲/۳	۵۰	۶۷/۷	۷۵

جدول ۲- تیمارهای مورد بررسی در طرح مرکب مرکزی به همراه پاسخ (فعالیت زایلاناز)

تیمار	متغیر ۱ X_1: pH	متغیر ۲ X_2: دما (درجه سلسیوس)	فعالیت زایلاناز (واحد بر لیتر)
۱	۶/۰۰	۵۰	۷۳۱
۲	۷/۷۷	۳۲/۳۲	۲۸
۳	۶/۰۰	۷۵	۴۲۹
۴	۴/۲۳	۶۷/۶۸	۳۳۶
۵	۸/۵۰	۵۰	۵۷
۶	۶/۰۰	۵۰	۵۸۵
۷	۴/۲۳	۳۲/۳۲	۳۴۹
۸	۶/۰۰	۵۰	۵۴۸
۹	۶/۰۰	۲۵	۴۱۴
۱۰	۶/۰۰	۵۰	۵۸۵
۱۱	۶/۰۰	۵۰	۷۳۱
۱۲	۳/۵۰	۵۰	۴۰۲
۱۳	۷/۷۷	۶۷/۶۸	۰

استخراج DNA: DNA ژنومی با استفاده از کیت اختصاصی (کیاژن، شماره کاتالوگ: ۶۹۵۰۴) و با توجه به دستورالعمل آن از سویه *باسیلوس سابتیلیس* k40b استخراج شد. به‌منظور تعیین غلظت DNA، میزان جذب نمونه DNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از نانودراپ اسپکتوفتومتر (Thermo Scientific 2000C) اندازه‌گیری شد.

شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b: سویهٔ *باسیلوس سابتیلیس* K40b با آزمون‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شامل آزمون گرم، اکسیداز، کاتالاز، استفاده از سیترات، آزمون O/F[1]، تولید و تعیین جایگاه تشکیل اندوسپور به‌صورت مقدماتی شناسایی شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده به‌منظور تکثیر ژن 16S rDNA شامل توالی پیشرو paf (5́-agagtttgatcctggctcag-3́) و توالی پسرو par (5́-aaggaggtgatccagccgca-3́) بود. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل ۴ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه به‌صورت یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه در ۵۸ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از کیت خالص‌سازی اختصاصی (Roche.11.732.668.001) بازیافت و تعیین توالی شد. نتایج مربوط به تعیین توالی پس از آنالیز با نرم‌افزار بلاست[2] در بانک ژن مرکز اطلاعات زیست فناوری مقایسه ثبت شد (Zakaria *et al.*, 2009).

تکثیر ژن زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b: ژن اختصاصی زایلاناز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به‌روش واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر و پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Oligo Tec طراحی شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده شامل آغازگر پیشرو (5́-aatattataggaggtaacatatg-3́) و آغازگر پس‌رو (5́-ttaccacactgttacgttag-3́) بود. واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۵۰ میکرولیتر، شامل ۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره ای پلیمراز (10x)، ۳ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مولار، ۱/۲۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر آغازگر پیش‌رو، ۵ میکرولیتر آغازگر پس‌رو، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم DNA تگ پلی‌مراز، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۲۹/۲۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل ۳ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه به‌صورت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس ، ۱ دقیقه در ۵۸ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از اجرای الکتروفورز (ولتاژ ۸۰)، ژل آگاروز ۱ درصد با ژل‌رد رنگ‌آمیزی و محصول PCR با دستگاه ترنس لومیناتور مشاهده و عکسبرداری شد. قطعه مورد نظر با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Roche.11.732.668.001) بازیافت شد. DNA بازیافت شده تعیین توالی و با استفاده از نرم‌افزار بلاست با توالی‌های موجود در مرکز اطلاعات زیست فناوری مقایسه و در بانک ژن پایگاه مذکور ثبت شد.

آنالیز فیلوژنتیکی: توالی ژن کدکننده آنزیم زایلاناز سویه مورد مطالعه با ۱۴ ژن زایلاناز ثبت شده در بانک ژن مرکز اطلاعات زیست فناوری مقایسه مقایسه و خانواده آنزیمی آن تعیین شد. درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های مرجع پس از اعمال هم‌ردیفی با کلاستر W، با نرم‌افزار مگا ۴ و روش neighbor-joining رسم شد. درجه اعتبارسنجی گروه‌بندی‌های ایجاد شده با روش بوت استرپ و با ۱۰۰۰ تکرار تعیین شد.

1. Oxidative/Fermentative

2- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

نتایج و بحث

ارزیابی کیفی و کمی فعالیت آنزیم زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b

بررسی تولید آنزیم زایلاناز از سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b به روش کیفی نشان می‌دهد که سویه مذکور قادر به تولید آنزیم زایلاناز هست. ایجاد هاله روشن به قطر ۵ سانتی‌متر که در اثر فعالیت زایلانازی باکتری روی محیط کشت بود، به منزله مثبت بودن آزمون تلقی شد (شکل ۱). با استفاده از آزمون کمی، میزان تولید آنزیم در محیط کشت و شرایط تخمیر مورد استفاده معادل ۲۸۹۰ واحد بر لیتر برآورد شد.

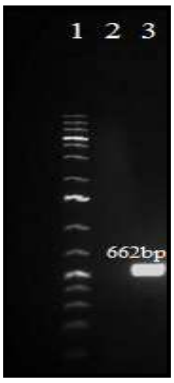
شکل ۱- نتیجه آزمون کیفی تولید آنزیم زایلاناز از سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b در محیط کشت اختصاصی ارزیابی کیفی زایلاناز پس از ۴۸ ساعت

شناسایی بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و مولکولی سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b

نتایج شناسایی بیوشیمیایی و مورفولوژیکی نشان می‌دهد که سویه باکتریایی مورد بررسی گرم مثبت، هوازی اجباری، تولیدکننده اندوسپور با موقعیت مرکزی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و سیترات مثبت است. همچنین آنالیز توالی ژن ۱۶S rDNA با نرم‌افزار بلاست و مقایسه آن با توالی‌های مرجع نشان می‌دهد که توالی ژن سویه مورد مطالعه با ۱۰۰ درصد همولوژی مشابه ژن ۱۶S rDNA پنج سویه به‌شرح زیر است: *باسیلوس سابتیلیس* (JF804770.1)، *باسیلوس سابتیلیس* AZ-11 (TCCC17018)، *باسیلوس سابتیلیس* IHR-BS39 (KJ675633.1)، *باسیلوس سابتیلیس* (KF641179.1)، *باسیلوس سابتیلیس* M-N2 (KF672740.1) و *باسیلوس سابتیلیس* B10 (KF010354.1). بر اساس نتایج شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی مشخص شد که سویه K40b، متعلق به جنس و گونه *باسیلوس سابتیلیس* است. توالی ژن ۱۶S rDNA این باکتری در بانک ژن مرکز اطلاعات زیست فناوری مقایسه با کد KF856737 ثبت شد.

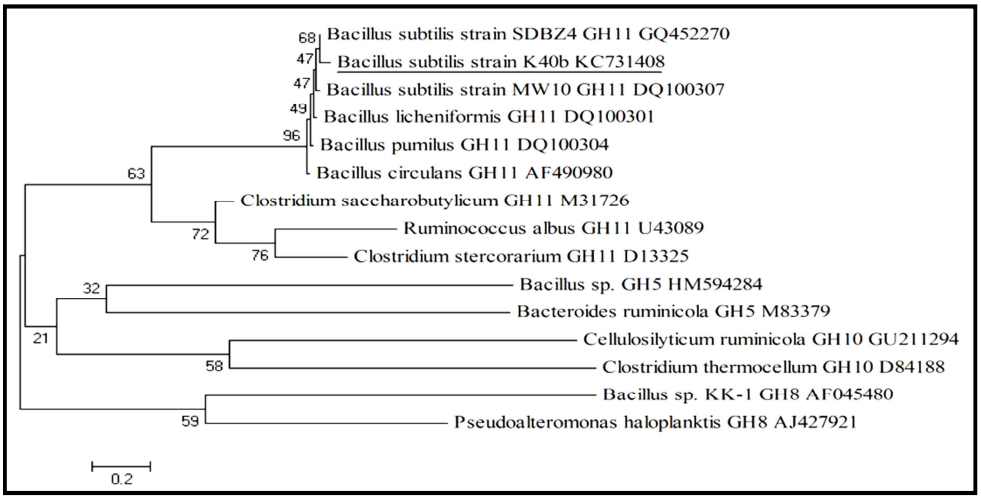
آنالیز فیلوژنتیکی ژن زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b

پس از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، نتایج الکتروفورز محصول واکنش نشان داد که سویه باکتریایی مورد مطالعه، ژن زایلاناز را داراست (شکل ۲). این ژن پس از تعیین توالی در بانک ژن مرکز اطلاعات زیست فناوری مقایسه با کد KC731408 ثبت شد. اندازه ژن تکثیر شده ۵۶۳ bp است که یک رشته پپتیدی شامل ۱۸۷ اسید آمینه را کد می‌کند. مقایسه این توالی با توالی‌های مرجع موجود در بانک ژن مرکز اطلاعات زیست فناوری مقایسه با نرم‌افزار بلاست نشان می‌دهد که توالی مذکور با توالی ژن کدکننده زایلاناز سویه‌های مرجع تا ۹۶ درصد شباهت دارد.



شکل ۲- ردیابی مولکولی ژن کدکننده آنزیم زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b؛ چاهک ۱ DNA استاندارد؛ چاهک ۲ کنترل؛ چاهک ۳ قطعه تکثیر شده از ژن زایلاناز

نتایج تجزیه و تحلیل توالی مورد بررسی با ۱۴ توالی ثبت شده در مرکز اطلاعات زیست فناوری متعلق به خانواده‌های ۵، ۸، ۱۰ و ۱۱ گلیکوزید هیدرولاز نشان می‌دهد (شکل ۳) که توالی ژن زایلاناز سویه مورد بررسی با توالی ژن زایلاناز خانواده ۱۱ گونه‌های باسیلوس مانند *باسیلوس سابتیلیس* SDBZ4 (GQ452270)، *باسیلوس سابتیلیس* MW10 (DQ100307)، *باسیلوس لشنی‌فورمیس* (DQ100301)، *باسیلوس پومیلوس* (DQ100304) و *باسیلوس سیرکولانس* (AF490980) بیشترین شباهت را دارد و از آنجا که غالب‌ترین خانواده آنزیمی زایلاناز در باسیلوس‌ها خانواده ۱۱ گلیکوزید هیدرولاز می باشد (Collins *et al*. 2005) با نتایج حاصل مطابقت دارد. همچنین، مقایسه ژن زایلاناز سویه باکتریایی مورد بررسی با ژن زایلاناز خانواده‌های ۵، ۸، ۱۰ و ۱۱ برخی سویه‌های باکتریایی نشان می‌دهد که این ژن با توالی ژن زایلاناز خانواده ۱۱ برخی از میکروارگانیسم‌ها از قبیل *رومینوکوکوس آلبوس*(U43089) و *کلستریدیوم استرکوراریوم* (D13325) در مقایسه با زایلانازهای خانواده ۵، ۸ و ۱۰ قرابت بیشتری دارد. یادآوری می‌شود که اساس طبقه‌بندی این آنزیم‌ها در خانواده‌های مختلف توالی‌های حفظ شده آمینو اسیدی در نواحی کاتالیتیکی است (Henrissat & Coutinho, 2001).



شکل ۳- آنالیز فیلوژنی بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b و ۱۴ توالی مرجع ثبت شده در پایگاه مرکز اطلاعات زیست فناوری مقایسه

(اعداد پشت شاخه‌ها درجه اعتبارسنجی گروه‌بندی‌ها را بر اساس روش بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار نشان می‌دهد.)

تعیین شرایط بهینه فعالیت کاتالیتیکی زایلاناز تولید شده سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b به روش سطح پاسخ

بـر اسـاس نتـایج حاصـل از طـرح مرکـب مرکـزی، مدل درجه دوم مناسب ترین مدل برای پیش‌بینی فعالیـت آنزیم مـورد بررسـی در دامنـه دمـایی و pH تعریـف شـده است. مـدلی کـه متغیـر پاسـخ را بـه شـکل قابـل قبـول پیش‌بینی می‌کند عبارت است از رابطه ۱:

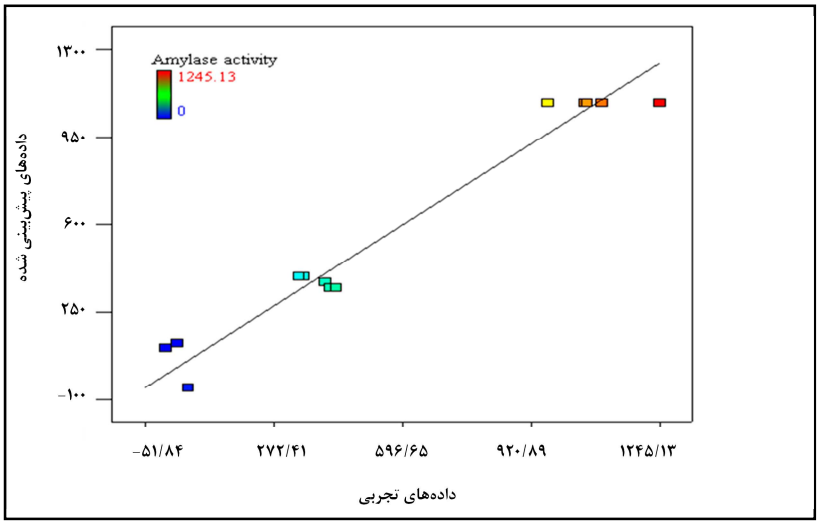
$$Y\ (Xylanase\ activity) = -6660.39020 +1689.08962X_1 +117.17796X_2 +0.18254X1X2 -48.48612X_1^2 -.18283X_2^2 \quad (۱)$$

که در آن،

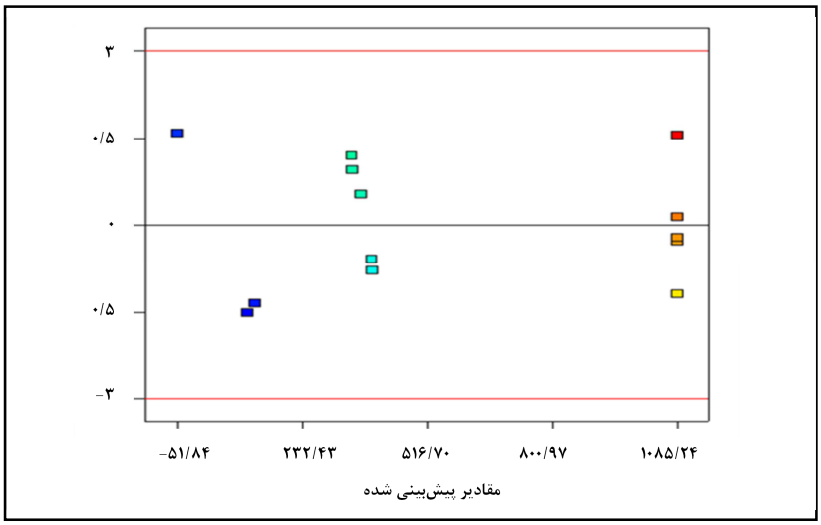
X_1 و X_2 به‌ترتیب نمایانگر متغیرهـای مسـتقل pH و دمـا، X_1X_2 تاثیر متقابل و همچنین X_1^2 و X_2^2 جمله‌های درجـه دوم متغیرهای مـورد بررسـی را نشـان مـی‌دهنـد. نتـایج تجزیه و تحلیل واریانس نشان مـی‌دهـد کـه مـدل بـرازش داده شده در سطح ۹۹ درصد معنی‌دار است ($P<0.0001$). بر اساس نتایج تجزیـه و تحلیـل واریـانس، ضـریب تعیـین (R^2) فعالیت آنزیم خام حاصل ۰/۹۶۱۸ برآورد شده اسـت به ایـن معنـی کـه مـدل آمـاری مـی‌توانـد ۹۶/۱۸ درصـد تغییرات پاسخ را توضیح دهد.

ضرائب مثبت یا منفی X_1، X_2، جمله‌های درجه دوم و اثر متقابـل متغیرهـا نشـان‌دهنـده اثـر افـزایش‌دهنـده یـا کاهش‌دهنده فعالیت زایلاناز هستند. بر اساس معادله بالا، اثر خطی متغیر pH و دما و اثر متقابل آنها ضـرائب مثبـت دارند در حالی‌که جمله‌های درجه دوم هر دو متغیر نشانگر تأثیر منفی بر فعالیت زایلاناز مورد بررسی است برای مثال ضریب منفی جمله درجه دوم متغیر دما بیانگر این موضوع است که با وجود اثر خطی مثبـت ایـن متغیـر بـر فعالیـت آنزیمی، افزایش بیشتر دما به‌ویژه چنانچـه بـا افـزایش pH همراه باشد، موجب کاهش فعالیت زایلاناز می‌شود. نمودار تطابق، همبستگی قابل قبولی را میـان مقـادیر آزمایشـی و مقادیر پیش‌بینـی شـده فعالیـت زایلانـاز نشـان مـی‌دهـد (شکل ۴).

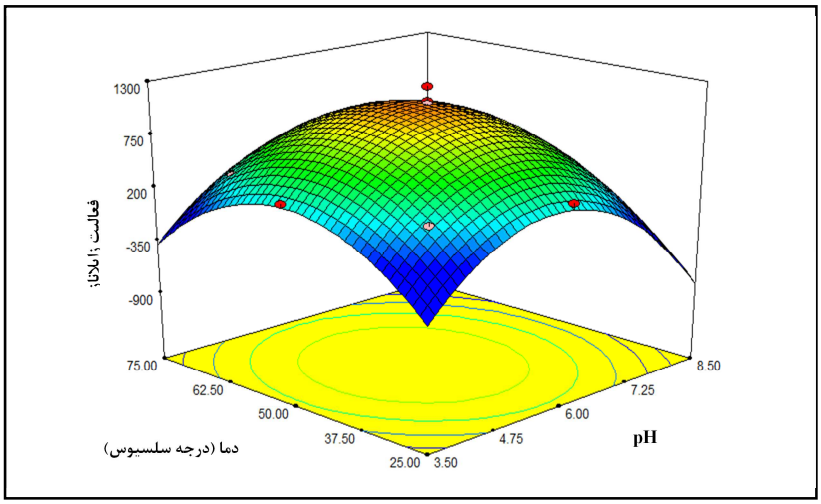
تجمع نقاط پیرامون خط شـیب‌دار، نمایـانگر اخـتلاف قابل قبول میان مقادیر تجربی و مقادیر پیش‌بینی شـده در دامنه عملیاتی متغیرها است. برای بررسی بسندگی مدل‌هـا نیز نمودار توزیع باقیمانده پاسخ‌های پیش‌بینی شده رسم شـد (شکل ۵). با توجه به توزیع باقیمانـده‌هـا در دو سـوی محـور عرضی می‌توان گفت که مدل برازش شده، فعالیـت آنزیمـی را با استفاده از پاسخ سطح به طـور مناسـب توصـیف مـی‌کنـد. نمودار سه‌بعدی نیـز نـواحی بهینـه دمـا و pH و چگـونگی تغییـرات پاسـخ را در شـرایط آزمایشـی نشـان مـی‌دهـد (شکل ۶). همان‌گونه که مشاهده می‌شـود زایلانـاز تولیـد شده توسط سویه K40b بیشترین فعالیت کاتالیتیکی را در pH بین ۵/۲ تا ۶/۲ و دمـای ۵۰ تـا ۶۰ درجـه سلسـیوس دارد. دمای بیش از ۷۰ و کمتر از ۳۰ درجـه سلسـیوس و نیـز pH قلیـایی کـاهش قابـل توجـه فعالیـت آنـزیم را به‌همراه دارد.



شکل ۴- نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده مدل فعالیت زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b



شکل ۵- نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده مدل فعالیت زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b



شکل ۶- تاثیر دما و pH بر فعالیت زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b؛ نمودار سه‌بعدی

نتیجه‌گیری

ردیابی مولکولی ژن کدکننده آنزیم زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b موید غربال کیفی و کمی پتانسیل تولید آنزیم سویه مذکور است. پس از مقایسه توالی ژن زایلاناز سویه مورد بررسی با توالی‌های موجود در بانک ژن پایگاه اطلاعاتی مرکز اطلاعات زیست فناوری مقایسه، مشخص شد که آنزیم تولید شده توسط این سویه متعلق به خانواده ۱۱ گلیگوزید هیدرولاز است و بالاترین شباهت را به زایلانازهای باسیلوسی نشان می‌دهد. همچنین، شرایط بهینه فعالیت کاتالیتیکی این آنزیم به‌منظور تعیین کاربرد صنعتی مناسب تعیین شد. ویژگی‌های بهینه فعالیت زایلاناز تولید شده توسط سویه *باسیلوس سابتیلیس* K40b بر اساس روش سطح پاسخ بررسی و pH بین ۵/۲ تا ۶/۲ و دمای ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس به عنوان شرایط بهینه فعالیت آنزیم مشخص شد.

قدردانی

از بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران برای فراهم آوردن امکانات این تحقیق قدردانی می‌شود.

مراجع

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

Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G. S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 326-38.

Butt, M. S., Tahir Nadeem, M., Ahmad, Z. and Sultan, M. T. 2008. Xylanases and their applications in baking industry. Food Technol. Biotechnol. 46, 22-31.

Chavez, R., Bull, P. and Eyzaguirre, J. 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus Penicillium. J. Biotechnol. 123, 413-433.

Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 29, 3-23.

Coutinho, P. M. and Henrissat, B. 1999. Carbohydrate-Active Enzyme Server (CAZY). Available at: http://afmb.cnrs-mrs.fr.

Henrissat, B. and Coutinho, P. M. 2001. Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. Methods Enzymol. 330, 183-201.

Khianngam, S., Tanasupawat, S., Lee, J., Lee, K. and Akaracharanya, A. 2009. *Paenibacillus siamensis* sp. nov. *Paenibacillus septentrionalis* sp. nov. and *Paenibacillus montaniterrae* sp. nov., xylanase-producing bacteria from Thai soils. Int. J. Syst. Evol. Micr. 59, 130-134.

Lindemann, J., Arny, D. C. and Upper, C. D. 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.

Louw, C., La Grange, D., Pretorius, I. S. and van Rensburg, P. 2006. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour. J. Biotechnol. 125, 447-461.

Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J. and Amorim, D. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67, 577-591.

Pollet, A., Delcour, J. A., Courtin, C. M. 2010. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. Crit. Rev. Biotechnol. 30(3): 176-191.

Sa Pereira, P., Paveia, H., Costa-Ferreiram, M. and Aires-Barros, M. R. 2003. A new look at xylanases: an overview of purification strategies. Mol. Biotechnol. 24, 257-281.

Schneider, H. 1989. Conversion of pentoses to ethanol by yeasts and fungi. Crit. Rev. Biotechnol. 9, 1-40.

Wu, Y. B., Ravidran, V., Thomas, D. G., Birtles, M. J. and Hendricks, W. H. 2004. Influence of method of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology of broilers. Brit. Poultry Sci. 45, 385-94.

Zakaria, M. R., Tabatabaei, M., Ghazali, F. M., Abd-Aziz, S., Shirai ,Y. and Hassan, M. A. 2009. Polyhydroxyalkanoate production from anaerobically treated palm oil mill effluent by new bacterial strain *Comamonas* sp. EB172. World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 767-774.

AERI JAER *Journal of Agricultural Engineering Research/Vol.15/No.4/2015/P:53-64*

Molecular and Catalytic Characterization of Acidophilic Xylanase *Bacillus Subtilis* K40b

P. Moradi-Dezfouli, M. Hashemi*, M. Mousivand and M. Khosroshahli

* Corresponding author: Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, P. O. Box: 31535-1897, Karaj, Iran. Email: hashemim@abrii.ac.ir
Received: 27 November 2013, Accepted: 15 November 2014

Bacillus subtilis K40b was isolated from rice rhizospheres and its potential for production of xylanase was evaluated using biochemical methods. The gene for xylanase in *B. subtilis* K40b was amplified, sequenced and assigned to the NCBI Genebank. The gene size was estimated to be 563 bp encoding 413 amino acids. Comparison of the xylanase gene with reference sequences showed that the xylanase of *B. subtilis* k40b belongs to the glycosyl hydrolyase family 11 (GH11) and was closely related to Bacillus xylanase. Response surface methodology using a central composite design was applied to determine the optimum temperature and pH of the xylanase *B. subtilis* K40b catalytic activity. Testing was carried out at temperatures of 25 to 75 ℃ and pH values of 4.5 to 8.5. ANOVA was used to derive a quadratic model equation for prediction of enzyme activity. Results showed that the optimal conditions for xylanase activity were 6.5 pH and 50℃. Alkaline pH and temperatures >70℃ and <50℃ resulted in a noticeable decrease in xylanase activity.

Keywords: *Bacillus Subtilis*, Central Composite Design, Response Surface Methodology, Xylanase