فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۴- ۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

تعیین و مدل‌سازی شرایط بهینه کاتالیتیکی آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d

شعله ده‌پهلوان: کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، ایران، dahpahlevan_sholeh@yahoo.com
جلیل خارا: دانشیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، ایران، jakhara@yahoo.com
مریم موسیوند[**]**:** کارشناسی ارشد بیماری شناسی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران، mmousivand@abrii.ac.ir
مریم هاشمی[*]**:** استادیار بیوتکنولوژی صنایع غذایی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران، hashemim@ abrii.ac.ir

چکیده

مقدمه: اندو-بتا-۱و۴ گلوکاناز میکروبی از جمله آنزیم‌های کلیدی در تجزیه گلوکان است. در میان باکتری‌ها، گونه‌های مربوط به جنس *باسیلوس* یکی از منابع اصلی تولید کننده گلوکانازهای صنعتی هستند. هدف پژوهش حاضر، با توجه به تأثیر متقابل شاخص‌های محیطی بر خواص کاتالیتیکی آنزیم‌ها، بررسی توانایی تولید آنزیم بتاگلوکوناز توسط سویه بومی *باسیلوس سابتیلیس* B5d جدا شده از فیلوسفر باغات سیب و تعیین شرایط بهینه کاتالیتیکی آن است.

مواد و روش‌ها: در بررسی حاضر، پتانسیل تولید آنزیم بتاگلوکاناز از جدایه *باسیلوس* B5d به روش کیفی تایید شد. جدایه یاد شده با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد. تعیین شرایط بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکوناز تولیدی توسط *باسیلوس سابتیلیس* B5d به روش سطح پاسخ و با استفاده از طرح مرکب مرکزی انجام شد. متغیرهای مورد بررسی شامل دما (۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد) ، اسیدیته (۳/۵ تا ۸) و غلظت سوبسترا (۰/۱ تا ۱ درصد) بودند.

نتایج: مطالعات بیوشیمیایی و مولکولی مبتنی بر ژن *16 S rDNA* نشان داد که جدایه یاد شده به گونه *باسیلوس سابتیلیس* متعلق است. بر اساس نتایج به دست آمده از طرح مرکب مرکزی، مدل درجه دوم مناسب‌ترین مدل برای پیش‌بینی فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز در دامنه دمایی، اسیدیته و غلظت سوبسترای مورد بررسی تعیین شد. همچنین، نتایج بهینه‌سازی فعالیت آنزیم نشان داد که بتاگلوکوناز تولید شده توسط سویه B5d اپتیمم فعالیت کاتالیتیکی را در دامنه اسیدیته ۵/۵ تا ۷و دمای ۵۰ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت بالای سوبسترا داراست. اگرچه در دماهای ۸۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین، غلظت‌های کم سوبسترا فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. نتایج تعیین صحت مدل حاصل از بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ مطابقت خوبی را بین اعداد پیش‌بینی شده توسط مدل و داده‌های واقعی نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به ویژگی‌های بهینه کاتالیتیکی، آنزیم بتاگلوکاناز تولید شده توسط *باسیلوس سابتیلیس* B5d قابلیت کاربرد در صنایع خوراک دام و طیور را داراست.

واژه‌های کلیدی: فعالیت بتاگلوکاناز، روش سطح پاسخ، *باسیلوس سابتیلیس*، خوراک دام و طیور

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
** پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

سلولز، همی سلولز و لیگنین بخش‌های اصلی دیواره سلولی گیاهان بوده که به ترتیب ۴۰، ۳۳ و ۲۳ درصد از وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهند. گلوکان یکی از اجزای اصلی سلولزها در دیواره سلولی گیاهان و دومین پلی‌ساکارید به لحاظ فراوانی پس از سلولز است. از این رو میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده گلوکان در محیط‌های طبیعی بسیار زیادی مانند خاک، کمپوست (کود)، روده حیوانات گیاه‌خوار، حشرات و بی‌مهرگان توزیع شده اند (۱). گلوکان از هموپلیمرهای خطی حاوی مونومرهای دی- گلوکز با پیوندهای بتا ۱و۴ گلیکوزیدی تشکیل شده است. با این حال در طبیعت بیشتر حاوی زنجیره‌های جانبی استیل، ۴-O-متیل-دی گلوکورونوزیل و آرابینوفورانوزیل هستند که یک کمپلکس ناهمگن را تشکیل می‌دهند (۲). هیدرولیز کامل گلوکان نیاز به عملکرد هماهنگ آنزیم‌های گلوکونولیتیک متفاوت دارد که شامل اندوگلوکانازها، بتا-گلیکوزیداز و آنزیم‌های کمکی مانند آلفا-آرابینوفورانوزیداز، استیل گلوکان استراز و آلفا-گلوکورونیداز است. در میان این آنزیم ها اندو-بتا-۱و۴ گلوکاناز در کاتالیز و هیدرولیز زنجیره های بلند گلوکان به گلوکوالیگوساکاریدهای کوتاه بسیار اهمیت دارند (۳). اندو-بتا-۱و۴ گلوکاناز میکروبی از جمله آنزیم‌های کلیدی پاسخگو برای تجزیه گلوکان است. گلوکز محصول اصلی تجزیه گلوکان است. بیشتر گلوکانازهای صنعتی توسط قارچ های *آسپرژیلوس*[1]، *تریکودرما*[2]، *کاندیدا آلبیکنس*[3] و باکتری‌های مربوط به جنس *باسیلوس* تولید می‌شوند (۴). مشتقات محلول سلولز مانند کربوکسی‌متیل سلولز، هیدروکسی‌اتیل‌سلولز و یا سلولز تیمار شده با اسید فسفریک، سوبستراهای مناسبی برای آنزیم اندوبتا ۱و ۴گلوکاناز هستند. نقش اصلی آنزیم اندوگلوکاناز شکستن زنجیره سلولزی و تبدیل آن به قندهای کوچکتر همچون گلوکز و سلودکسترین است (۵). گلوکانازها بر اساس شباهت‌های توالی اسیدهای آمینه، ساختار، نوع فعالیت، ویژگی‌های سوبسترا و ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی به چند گروه تقسیم می‌شوند که گروه‌های ۵، ۱۶و ۱۷ گلیکوزیدهیدرولازها از مهم‌ترین آن‌ها هستند که از نظر ساختار مولکولی، ویژگی‌های کاتالیزوری و وزن مولکولی تمایز دارند (۶).

با توجه به جایگاه و اهمیت روز افزون بتاگلوکانازها در صنایع مختلف مانند رنگ‌بری خمیرکاغذ، صنایع آبمیوه، خوراک دام و طیور و صنایع غذایی، بررسی پتانسیل‌های ملی به منظور تولید این آنزیم‌ها کاملاً ضروری به نظر می‌آید. شایان ذکر است که برای رفع هر کدام از نیازهای صنعتی خاص، آنزیم باید ویژگی‌های خاصی مانند پایداری مناسب در برابر حرارت و اسیدیته، فعالیت اختصاصی بالا و مقاومت در برابر کاتیون‌های فلزی و مواد شیمیایی را دارا باشند (۷-۸). به عنوان نمونه بتاگلوکانازهای ایده آل برای صنایع کاغذ، آنزیم‌های فعال در دماهای بالا و اسیدیته‌های قلیایی هستند (۹). همچنین، فعالیت قابل توجه بتاگلوکاناز در غلظت‌های پایین سوبسترا نیز از جمله خواص مهم در صنایع کاغذسازی و تولید بیواتانول است (۱۰).

جیره غذایی غنی شده با آنزیم بتاگلوکاناز از طریق افزایش قابلیت هضم فیبر، بهبود تغذیه دام و افزایش راندمان رشد و همچنین، افزایش تولید شیر در گاوهای شیری و دیگر نشخوار کنندگان را به همراه داشته است (۱۱). به طور کلی اعتقاد بر این است که بتاگلوکاناز یکی از آنزیم‌های مناسب برای تکمیل علوفه دام است و

برای این منظور داشتن فعالیت بهینه در اسیدیته ۶ از ویژگی‌های مناسب برای کاربرد آنزیم بتاگلوکاناز به عنوان مکمل خوراک دام می‌باشد (۱۰).

مطالعات گسترده‌ای در زمینه شناسایی و تعیین ویژگی‌های کاتالیتیکی آنزیم‌های بتاگلوکاناز تولید شده توسط سویه‌های مختلف باکتریایی با هدف یافتن آنزیم‌های مناسب مورد استفاده در صنایع مرتبط همچنان در حال انجام است. برای مثال در بررسی ویژگی‌های آنزیم بتاگلوکاناز تولید شده توسط *باسیلوس سابتیلیس*[۴] A4، نشان داده شد که اسیدیته ۵ تا ۶ برای دستیابی به بیشنه فعالیت آنزیم مورد مطالعه لازم است. همچنین، بتاگلوکاناز تولید شده توسط سویه یاد شده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۶ پایداری در خور توجهی داشته است. به همین علت آنزیم یاد شده به عنوان گزینه مناسبی برای کاربرد در صنعت خوراک دام معرفی شد (۱۲). در مطالعه دیگری مشخص شد که آنزیم بتاگلوکاناز تولید شده توسط *باسیلوس سابتیلیس* LN در اسیدیته ۶ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین فعالیت کاتالیتیکی داشته است (۱۳). اپتیمم دما و اسیدیته فعالیت بتاگلوکاناز مقاوم به حرارت *باسیلوس برویس*[۵] به ترتیب ۶۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد و ۸ تا ۱۰ گزارش و به عنوان گزینه مناسب برای استفاده در صنایع کاغذسازی معرفی شد (۹).

با توجه به تأثیر متقابل شاخص‌های محیطی بر خواص کاتالیتیکی آنزیم‌ها هدف این مطالعه بررسی توانایی تولید آنزیم بتاگلوکوناز توسط سویه بومی *باسیلوس سابتیلیس* B5d جدا شده از فیلوسفر باغات سیب، و تعیین شرایط بهینه کاتالیتیکی آن با مدل‌سازی تاثیرات دما، اسیدیته و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیم به روش سطح پاسخ است تا ضمن تعیین شرایط بهینه عملکرد آنزیم بتاگلوکاناز تولید شده توسط سویه مورد مطالعه، آثار متقابل متغیرهای محیطی بر فعالیت کاتالیتیکی آن نیز مشخص شود.

طراحی مناسب آزمایش‌ها، مهم‌تر از تجزیه و تحلیل آماری مفصل است. در نظر گرفتن مجموعه متغیرهای مهم در طراحی آماری آزمایش‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)[۶]، که برای ارزیابی اهمیت نسبی متغیرها در حالت وجود برهم‌کنش‌های پیچیده به کار می‌رود، شیوه مناسبی برای غلبه بر محدودیت بهینه‌سازی به روش یک عامل در هر زمان به شمار می‌آید.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و شرایط نگهداری: جدایه باکتریایی *باسیلوس سابتیلیس* B5d از فیلوسفر باغات سیب استان کرمان جمع آوری و با استفاده از روش سری رقت و بر روی محیط کشت NBY[۷] (نوترینت براث ۸ گرم بر لیتر، دی‌پتاسیم‌هیدروژن فسفات ۱ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱ گرم بر لیتر، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۰/۲۵ گرم بر لیتر، گلوکز ۲ گرم بر لیتر، ۰/۱۲ گرم بر لیتر، آگار ۱۸ گرم بر لیتر) جدا و خالص‌سازی شد. سپس، جدایه باکتریایی به منظور استفاده در بخش‌های بعدی مطالعه در بانک ژن میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی نگهداری شد به منظور فعال‌سازی سویه باکتریایی مورد نظر محیط کشت NBY تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد (۱۴).

ارزیابی کیفی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d: برای تعیین توانایی تولید آنزیم بتاگلوکاناز از محیط کشت **LB** حاوی ۰/۰۲ درصد لچین[۸] (1,3:1,4-ß-D-Glucan) به عنوان

سوبسترای آنزیم استفاده شد. شایان ذکر است که لچینن مورد استفاده (Megazyme, Lot N:70901c) از گلسنگ *Cetraria islandica* استخراج شده بود. *باسیلوس سابتیلیس* B5d به شکل نقطه‌ای روی محیط کشت یاد شده تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد (۱۵).

مشاهده هاله زرد رنگ در حضور معرف کنگو رد به منزله مثبت بودن این آزمون تلقی شد. پس از تایید تولید آنزیم توسط جدایه یاد شده اندازه‌گیری آنزیم تولیدی با استفاده از روش دی نیتروسالیسیلیک اسید انجام شد. بدین منظور ابتدا محلول لچینن ۱ درصد در بافر مورد (فسفات یا سیترات) نظر تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای مورد نظر قرار داده شد. برای تهیه اسیدیته‌های مختلف نیز از بافرهای سیترات و فسفات با غلظت ۰/۲ مولار استفاده شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم به سوبسترا اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای مورد نظر قرار داده شد و در نهایت، ۶۰۰ میکرولیتر از معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. در پایان و پس از رسیدن دمای نمونه به دمای محیط جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر[۹] در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز غلظت قندهای آزاد شده محاسبه شد (۱۶).

استخراج DNA ژنومی: استخراج دی ان ا[۱۰] ژنومی با استفاده از کیت DNeasy Blood &Tissue Kit[۱۱] و با توجه به دستورالعمل مربوطه از *باسیلوس* B5d انجام شد. کیفیت و غلظت دی ان ا استخراج شده با استفاده از نانودراپ اسپکتوفتومتر[۱۲] و در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجش شد.

شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی *باسیلوس سابتیلیس* B5d مبتنی بر *16S rDNA*: با استفاده از آزمون‌های ریخت‌شناختی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شناسایی مقدماتی باکتری *باسیلوس سابتیلیس* B5d انجام شد. به منظور شناسایی مولکولی و پس از استخراج دی ان ا، تکثیر ژن *16S rDNA* با استفاده از پرایمر Paf و Par انجام شد. واکنش PCR در حجم ۵۰، شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، 3 میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مولار، ۱/۲۵ میکرولیتر 10 DNTPs میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر آغازگر پیش رو[۱۳]

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

۵ میکرولیتر آغازگر پس رو[۱۴]

5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'،

۰/۵ میکرولیتر (حاوی ۲/۵ واحد) از آنزیم Taq DNA Polymerase، 1 میکرولیتر DNA الگو و ۲۹/۲۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر[۱۵] با برنامه دمایی شامل ۳ دقیقه واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه به شکل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در۵۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از کیت PCR purification kit; Roch بازیافت و پس از تعیین توالی و انجام تحلیل‌های BLAST[۱۶] در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد.

تولید آنزیم بتاگلوکاناز: ابتدا سویه *باسیلوس سابتیلیس* B5d در محیط کشت NBY به شکل خطی تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس، یک لوپ از باکتری رشد کرده برای تهیه مایه تلقیح از محیط کشت جامد به

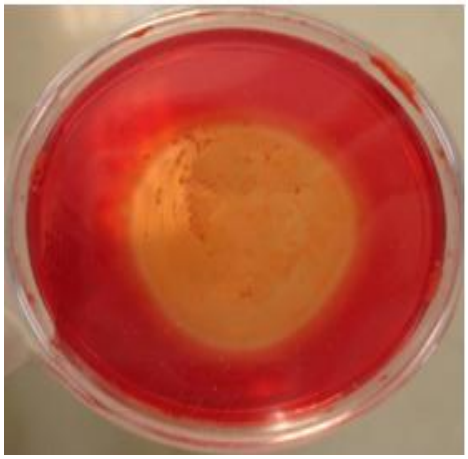
محیط کشت نوترینت براث منتقل و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. سپس، ۲ درصد مایه تلقیح آماده شده به محیط کشت تولید آنزیم (۱۰ گرم بر لیتر بتاگلوکان[۱۷]، ۳ گرم بر لیتر عصاره گوشت، ۴ گرم بر لیترعصاره مخمر، ۰/۵ گرم بر لیتر کلرید کلسیم، ۰/۳گرم بر لیتر سولفات منیزیم و ۱ گرم بر لیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات) افزوده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد (۱۷). به منظور جداسازی آنزیم، محیط کشت تخمیر شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ[۱۸] و فاز روماند به عنوان منبع آنزیم خام تا زمان انجام آزمون‌های مربوطه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین شرایط بهینه عملکرد بتاگلوکاناز تولیدی *باسیلوس سابتیلیس* B5d: به منظور تعیین شرایط بهینه کاتالیتیکی آنزیم تولید شده، تاثیر سه متغیر دما، اسیدیته و غلظت سوبسترا به ترتیب در دامنه‌های (۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد)، (اسیدیته ۳/۵ تا ۸) و غلظت ۰/۱ تا ۱ درصد لچینن بر فعالیت بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d به روش سطح پاسخ و در پنج سطح (-α, -1, 0, +1, +α) بررسی شد (جدول ۱). طرح آزمایشی مرکب مرکزی سه متغیره برای بهینه‌سازی شاخص‌های اسیدیته، دما و غلظت سوبسترا متشکل از ۲۰ آزمایش، شامل ۶ تکرار نقطه مرکزی برای تعیین خطای آزمایشی به کار گرفته شد (جدول ۲).

پاسخ‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت ۷[۱۹] (به روش تحلیل واریانس تجزیه و تحلیل شد. بر اساس نتایج تحلیل آماری مدل درجه دوم مناسب‌ترین مدل برای پیش‌بینی فعالیت آنزیم مورد بررسی در دامنه دمایی، اسیدیته و غلظت سوبسترای مورد بررسی تعیین شد.

نتایج

ارزیابی کیفی توانایی تولید آنزیم بتاگلوکوناز توسط *باسیلوس سابتیلیس* B5d: هاله شفاف تولید شده بر محیط کشت غربال‌گری پس از افزودن معرف کنگو رد به قطر ۵ سانتی‌متر معرف توانایی تولید آنزیم بتاگلوکاناز توسط *باسیلوس سابتیلیس* B5d به روش کیفی بود (شکل ۱).



شکل۱- نتیجه آزمون کیفی تعیین توانایی تولید آنزیم بتاگلوکاناز توسط *باسیلوس سابتیلیس* B5d که به صورت هاله شفاف پس از افزودن معرف کنگو رد مشاهده می‌شود

جدول ۱- دامنه و سطوح متغیرهای آزمایشی در طرح مرکب مرکزی

متغیرها	$-\alpha^*$	-۱	۰	+۱	$+\alpha^*$
اسیدیته	۳/۵	۴/۴۱	۵/۷۵	۷/۰۹	۸
دما (درجه سانتی‌گراد)	۲۰	۳۲/۱۶	۵۰	۶۷/۸۴	۸۰
غلظت سوبسترا (درصد)	۰/۱	۰/۲۸	۰/۵۵	۰/۸۲	۱

*Alpha=1.68

جدول ۲- طرح مرکب مرکزی بر اساس مقادیر واقعی به همراه پاسخ تجربی

تیمار	X_1: اسیدیته	X_2: دما (درجه سانتی‌گراد)	X_3: غلظت سوبسترا (درصد)	فعالیت بتاگلوکاناز سویه B5d (U/L)
۱	۵/۷۵	۵۰	۰/۱	۱۴۵/۴۶
۲	۵/۷۵	۵۰	۱	۷۶۷/۲۰
۳	۵/۷۵	۵۰	۰/۵۵	۵۷۵/۲۰
۴	۵/۷۵	۵۰	۰/۵۵	۵۹۷/۵۳
۵	۷/۰۹	۶۷/۸۴	۰/۲۸	۱۶۹/۳۰
۶	۷/۰۹	۶۷/۸۴	۰/۸۲	۴۷۷/۸۳
۷	۵/۷۵	۸۰	۰/۵۵	۱۷۵/۶۶
۸	۵/۷۵	۵۰	۰/۵۵	۶۷۰/۴۰
۹	۷/۰۹	۳۲/۱۶	۰/۸۲	۴۳۵/۵۳
۱۰	۵/۷۵	۵۰	۰/۵۵	۶۲۲/۶
۱۱	۵/۷۵	۵۰	۰/۵۵	۵۶۳/۶۳
۱۲	۴/۴۱	۶۷/۸۴	۰/۲۸	۱۱۰/۱۶
۱۳	۴/۴۱	۶۷/۸۴	۰/۸۲	۳۴۱/۰۳
۱۴	۳/۵	۵۰	۰/۵۵	۱۴۲/۶۰
۱۵	۴/۴۱	۳۲/۱۶	۰/۸۲	۴۲۵/۹۳
۱۶	۷/۰۹	۳۲/۱۶	۰/۲۸	۱۴۶/۷۳
۱۷	۵/۷۵	۲۰	۰/۵۵	۲۴۴/۰۳
۱۸	۸	۵۰	۰/۵۵	۴۰۳/۹۶
۱۹	۴/۴۱	۳۲/۱۶	۰/۲۸	۲۸۳/۲۳
۲۰	۵/۷۵	۵۰	۰/۵۵	۵۳۸/۸۶

شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی *باسیلوس سابتیلیس* B5d مبتنی بر *16S rDNA*: بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی نشان داد که جدایه یاد شده گرم مثبت، میله‌ای شکل، دارای اندوسپور با موقعیت مرکزی و هوازی اجباری است. همچنین، تکثیر ژن *16SrDNA*، تعیین توالی و مقایسه با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI متعلق بودن جدایه مورد بررسی به گونه *باسیلوس سابتیلیس* را مشخص و با کد شناسایی KF856736 در بانک ژن پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد.

تعیین ویژگی‌های کاتالیتیکی بهینه بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d به روش سطح پاسخ: به منظور تعیین شرایط بهینه کاتالیتیکی آنزیم بتاگلوکاناز تولید شده توسط *باسیلوس سابتیلیس* B5d، از روش سطح پاسخ سه متغیره شامل اسیدیته، دما و غلظت سوبسترای لچینن استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده از طرح مرکب مرکزی مدل درجه دوم مناسب‌ترین مدل برای پیش‌بینی فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز تولید شده توسط *باسیلوس سابتیلیس* B5d در دامنه دمایی، اسیدیته و غلظت سوبسترای تعریف شده بود. بر اساس نتایج تحلیل واریانس مدل ذیل متغیر پاسخ را به شکل قابل قبولی پیش‌بینی می‌کند: (معادله ۱)

که در آن X_1 و X_2 و X_3 به ترتیب نمایانگر متغیرهای مستقل اسیدیته و دما و غلظت سوبسترا و Y نشان دهنده متغیر پاسخ است. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس نشان می‌دهد که مدل برازش داده شده در سطح ۹۹ درصد معنادار است (P *value*<0.0001). بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل واریانس، ضریب تعیین (R^2) فعالیت آنزیم خام ۰/۹۴۸۵ برآورد شده است؛ به این معنا که مدل آماری می‌تواند ۹۴/۸۵ درصد تغییرات پاسخ را توضیح دهد. ضرایب مثبت یا منفی آثار خطی (X_1، X_2، X_3) و درجه دوم (X_1^2، X_2^2، X_3^2) هر کدام از متغیرها و برهمکنش متقابل آن‌ها (X_1 X_2، X_2 X_3، X_1X_3) به ترتیب نشانگر اثر افزایش‌دهنده و یا کاهنده متغیر پاسخ است.

همان‌گونه که در معادله ۱ قابل مشاهده است اثر خطی هر سه متغیر مورد بررسی بر فعالیت آنزیم مثبت بوده است. اگرچه ضرایب بزرگ‌تر متغیرهای اسیدیته و غلظت سوبسترا نسبت به متغیر دما حاکی از نقش بیشتر این دو متغیر در تنظیم فعالیت بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d است. نتایج تحلیل واریانس نیز گویای معنادار نبودن اثر خطی دما بر مقدار پاسخ است (جدول ۳).

(معادله ۱)

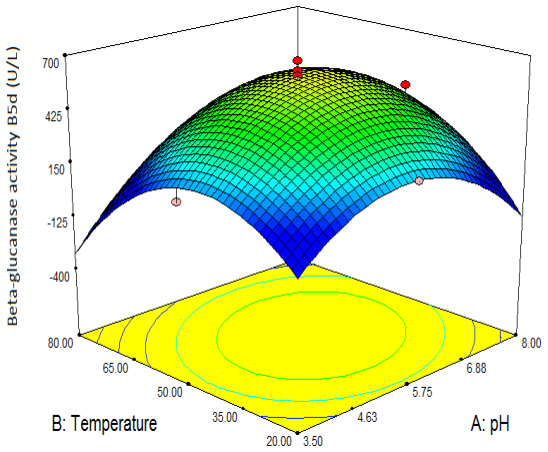
$$Y= -5062.95676+1347.29473X_1+70.44105X_2+1483.48085X_3+3.69588X_1X_2+169.26472X_2X_3+6.13058X_1X_3-136.02952X_1^2-0.97183X_2^2-1420.56035X_3^2$$

جدول ۳- تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) سطح پاسخ مدل درجه دوم برای فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d

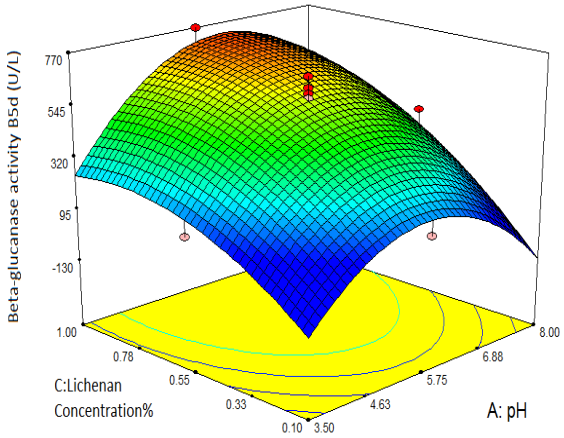
منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F آماره	P آماره Prob > F
مدل	۷۶۲۷۱۰/۷	۹	۸۴۷۴۵/۶۳	۲۰/۴۶	۰/۰۰۰۱ >
X_1	۱۸۹۱۳/۵۴	۱	۱۸۹۱۳/۵۴	۴/۵۷	۰/۰۵۸۳
X_2	۶۹۴۹/۸۵۱	۱	۶۹۴۹/۸۵۱	۱/۶۸	۰/۲۲۴۳
X_3	۲۹۷۱۸۷/۳	۱	۲۹۷۱۸۷/۳	۷۱/۷۵	۰/۰۰۰۱ >
X_1X_2	۱۳۰۲۷/۶۷	۱	۱۳۰۲۷/۶۷	۳/۱۵	۰/۱۰۶۵
X_1X_3	۶۲۵۸/۹۴۲	۱	۶۲۵۸/۹۴۲	۱/۵۱	۰/۲۴۷۱
X_2X_3	۱۴۵۵/۲۹۹	۱	۱۴۵۵/۲۹۹	۰/۳۵	۰/۵۶۶۵
X^2_1	۱۸۳۷۸۷/۲	۱	۱۸۳۷۸۷/۲	۴۴/۳۷	۰/۰۰۰۱ >
X^2_2	۲۶۳۸۳۴/۷	۱	۲۶۳۸۳۴/۷	۶۳/۷۰	۰/۰۰۰۱ >
X^2_3	۳۳۵۷۹/۲۵	۱	۳۳۵۷۹/۲۵	۸/۱۱	۰/۰۱۷۳
Residual	۴۱۴۲۰/۱۲	۱۰	۴۱۴۲/۰۱۲		
Lack of Fit	۳۰۴۴۰/۴۵	۵	۶۰۸۸/۰۹	۲/۷۷	۰/۱۴۳۷
Pure Error	۱۰۹۷۹/۶۷	۵	۲۱۹۵/۹۴		
Cor Total	۸۰۴۱۳۰/۸	۱۹			

با وجود مثبت بودن ضریب اثر متقابل دو متغیر دما و اسیدیته (معادله ۱)، افزایش همزمان این دو متغیر تأثیر معناداری بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز مورد بررسی نداشته است (*P value*>0.05). بر اساس نمودار سه بعدی اثر متقابل دو متغیر دما و اسیدیته، حداقل فعالیت آنزیمی در دماهای ۸۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد و کم‌ترین اسیدیته مورد بررسی در این مطالعه ثبت شده است. در حالی که در دامنه دمایی ۳۶ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته‌های ۴/۸ تا ۷/۴ افزایش فعالیت آنزیمی مشاهده شد. جمله درجه دوم دو متغیر دما و اسیدیته منفی و بیانگر آن است که افزایش بیش از حد هر کدام از این دو متغیر سبب کاهش فعالیت آنزیمی می‌شود (شکل ۲).

بر اساس نتایج تحلیل واریانس اثر خطی متغیر غلظت سوبسترا مثبت و معنادار بود (*P value*<0.05). اگرچه بر اساس مدل پیشنهادی (معادله ۱) ضریب اثر متقابل دو متغیر غلظت سوبسترا و اسیدیته بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d نیز مثبت بود ولی تأثیر معناداری بر تغییرات پاسخ نشان نداد (*P value*>0.05)، بدین معنا که افزایش همزمان این دو متغیر تأثیر مهمی بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d ندارد (جدول۳). نمودار سه بعدی تأثیر متقابل متغیرهای غلظت سوبسترا و اسیدیته کم‌ترین فعالیت بتاگلوکاناز مورد مطالعه را در اسیدیته (۳/۵) و کم‌ترین غلظت سوبسترا (۰/۱ درصد) نشان می‌دهد. حداکثر فعالیت آنزیمی در دامنه اسیدیته ۴/۹ تا ۷/۳ و غلظت‌های ۰/۴ تا ۱ درصد سوبسترا مشاهده شد. جملات درجه دوم هر دو متغیر نیز منفی و نشانگر تأثیر کاهنده افزایش بیش از حد این دو متغیر بر فعالیت بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d است (شکل ۳).

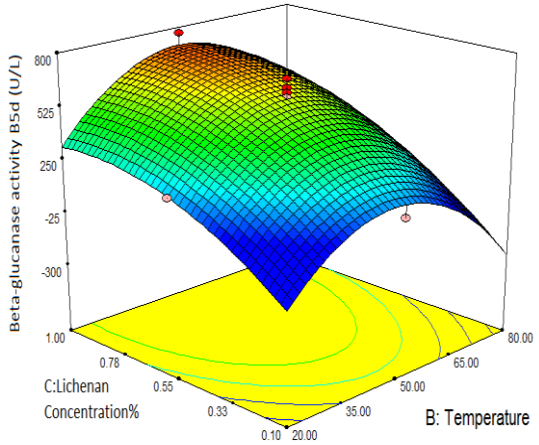


شکل ۲- نمودار سه بعدی اثر متقابل دما و اسیدیته بر فعالیت بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d در نقطه مرکزی غلظت سوبسترا



شکل ۳- نمودار سه بعدی اثر متقابل اسیدیته و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5dدر نقطه مرکزی دما

همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود افزایش همزمان دما و غلظت سوبسترا نیز در دامنه مورد ارزیابی به افزایش فعالیت بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d منجر شد اگرچه افزایش یاد شده از نظر آماری معنادار نبود (*P value*>0.05). کم‌ترین فعالیت آنزیمی نیز در دماهای ۲۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد و کم‌ترین غلظت لچینن مشاهده شد. در حالی که بیشینه فعالیت آنزیمی در دامنه دمایی ۳۷ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های ۰/۴ تا ۱ درصد سوبسترا ثبت شد.



شکل ۴- نمودار سه بعدی اثر متقابل دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d در نقطه مرکزی اسیدیته

از آن‌جا که دما، اسیدیته وغلظت سوبسترا از عوامل تأثیرگذار بر فعالیت آنزیمی به‌شمار می‌آیند و با در نظر گرفتن این موضوع که شرایط خاصی از عوامل یاد شده مطلوب کاربردهای مختلف آنزیم بتاگلوکاناز در صنایع است، بر همین اساس جدول ۴ چند نمونه از شرایط بهینه عملکرد آنزیم بتاگلوکاناز تولید شده توسط *باسیلوس سابتیلیس* B5d را در شرایط خاصی از متغیرهای مورد بررسی نشان می‌دهد. بیشینه فعالیت آنزیمی بر اساس مدل پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار (U/L 1723) در دمای ۵۱/۳۳ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۶/۲۷ و غلظت ۱ درصد لچینن حاصل می‌شود. بهینه‌سازی فعالیت آنزیم مورد بررسی در بیشینه دما هدف بعدی بود که بر این اساس مدل دمای ۶۵/۰۷ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۶/۴۶ و غلظت سوبسترای ۱ درصد را به عنوان شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز (U/L 1544) پیش‌بینی کرد. بر اساس نتایج حاصل از بهینه‌سازی فعالیت کاتالیتیکی در شرایط مختلف محیطی، آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d قابلیت کاربرد در خوراک دام و طیور به عنوان افزودنی دارد.

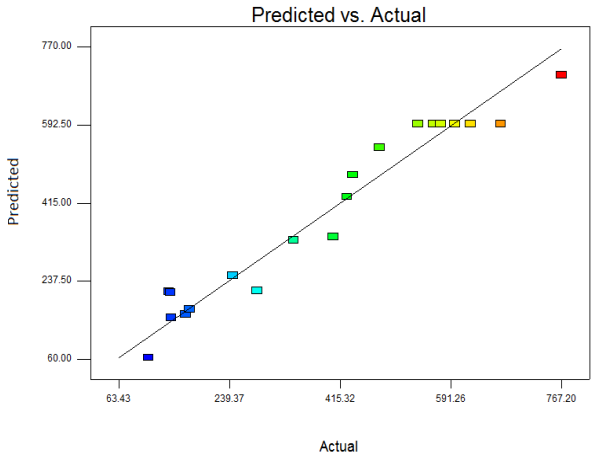
جدول ۴- فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d در شرایط مختلف محیطی بر اساس مدل پیش‌بینی شده

حالت	هدف	دما (درجه سانتی‌گراد)	اسیدیته	غلظت لچینن (درصد)	فعالیت بتاگلوکاناز (U/L)
فعالیت بتاگلوکاناز	بیشینه	۵۱/۳۳	۶/۲۷	۱	۱۷۲۳
فعالیت بتاگلوکاناز دما	بیشینه بیشینه	۶۵/۰۷	۶/۴۶	۱	۱۵۴۴
فعالیت بتاگلوکاناز دما اسیدیته	بیشینه بیشینه کمینه	۶۱/۵۵	۵/۱۰	۰/۹۶	۱۳۹۱
فعالیت بتاگلوکاناز اسیدیته	بیشینه بیشینه	۵۳/۵	۷/۴۱	۱	۱۵۵۱
فعالیت بتاگلوکاناز غلظت لچینن	بیشینه کمینه	۴۸/۷۹	۵/۸۸	۰/۴۳	۱۲۶۹

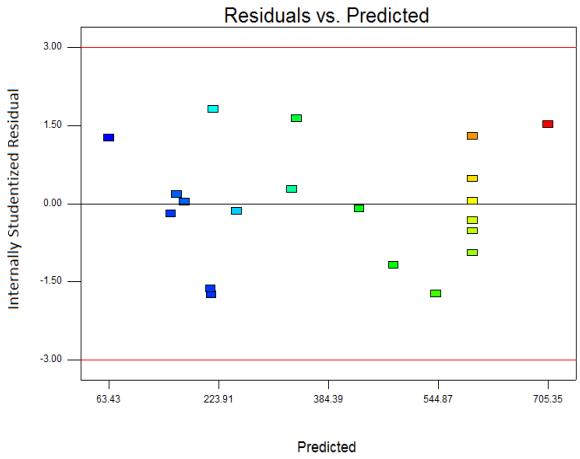
نمودار تطابق (شکل ۵) همبستگی قابل قبولی میان مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده فعالیت بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d را نشان می‌دهد. تجمع نقاط پیرامون خط شیب‌دار، نمایانگر اختلاف قابل قبول میان مقادیر تجربی و پیش‌بینی شده در دامنه عملیاتی متغیرهاست.

برای بررسی بسندگی مدل‌ها نیز، نمودار توزیع باقیمانده پاسخ‌های پیش‌بینی شده رسم شده است (شکل۶). با توجه به توزیع باقیمانده‌ها در دو سوی محور عرضی می‌توان اظهار داشت که مدل برازش شده، فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d را با استفاده از پاسخ سطح به طور مناسبی توصیف می‌کند.

به منظور تعیین صحت مدل‌های حاصل از بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ، فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d در دماهای (۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد)، اسیدیته (۴/۵، ۵/۵ و ۶) و غلظت سوبسترای (۰/۶، ۰/۷ و ۰/۸ درصد) ارزیابی شد. نتایج مطابقت خوبی را بین اعداد پیش‌بینی شده توسط مدل و داده‌های واقعی نشان داد که این موضوع درستی مدل به دست آمده را تایید می‌کند (جدول ۵).



شکل ۵- نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d



شکل ۶-نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده مدل

جدول ۵- تعیین صحت مدل درجه دوم پیش‌بینی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم بتاگلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* B5d در شرایط ارزیابی شده

تیمار	دما (درجه سانتی‌گراد)	اسیدیته	غلظت سوبسترا (درصد)	فعالیت پیش‌بینی شده بتا گلوکاناز (U/L)	فعالیت واقعی بتا گلوکاناز (U/L)
۱	۵۰	۶	۰/۸	۶۹۹/۵۰	۷۴۸/۷۳
۲	۶۰	۵/۵	۰/۷	۵۷۶/۸۸	۵۹۴/۴۵
۳	۷۰	۴/۵	۰/۶	۳۴۸/۷۲	۳۶۶/۵۳

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، تعیین ویژگی‌های بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* B5d به روش سطح پاسخ انجام و بهترین شرایط فعالیت آنزیم منتخب مشخص شد. منظور از بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ، یافتن نقاط مطلوب در فضای طراحی است. بر اساس هدف هر فرآیند نقاط مطلوب ممکن است نقاطی باشند که کم‌ترین و یا بیش‌ترین مقدار پاسخ را داشته باشند و یا دامنه‌ای از متغیرهای مورد بررسی که پاسخ مشابهی را باعث شوند. با توجه به نتایج به‌دست آمده بتاگلوکاناز تولید شده توسط سویه B5d بیش‌ترین فعالیت کاتالیتیکی را در اسیدیته برابر ۶/۲۷، دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱ درصد لچین داراست. در حالی‌که اسیدیته قلیایی به کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم در دامنه دمایی و شرایط مورد بررسی منجر شد. دماهای ۸۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد و کاهش غلظت سوبسترا نیز فعالیت آنزیم را نشان دادند.

در مطالعه‌ای، پژوهشگران پس از بررسی ویژگی‌های آنزیم اندو بتا ۱و ۳-۱ و۴ گلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* ۱۶۸، اپتیمم دمای ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۵ تا ۷ را به عنوان شرایط بهینه عملکرد آنزیم مورد مطالعه گزارش کردند. بیشینه فعالیت بتاگلوکانازی آنزیم یاد شده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۶ ثبت شد (۲). در پژوهش دیگری به منظور بررسی ویژگی‌های عملکردی آنزیم بتاگلوکاناز تولید شده توسط *باسیلوس لچنی‌فورمیس*[۲۰] EGW039 (CGMCC 0635)، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۵/۶ به عنوان شرایط مطلوب دستیابی به بهینه فعالیت آنزیمی تعیین شد (۱۸). دما و اسیدیته بهینه فعالیت کاتالیتیکی آنزیم بتا ۱و۳- ۱و۴ گلوکاناز *باسیلوس سابتیلیس* GN156 نیز به ترتیب ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۷ گزارش شده است (۱۹).

بررسی ویژگی‌های بهینه فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌ها در تعیین حوزه مناسب کاربرد صنعتی آن‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد (۲۰). با توجه به دامنه دمایی و اسیدیته بهینه، آنزیم مورد بررسی قابلیت استفاده در صنعت خوراک دام و طیور را دارد. اگرچه بهینه‌سازی محیط و شرایط کشت به منظور افزایش بهره‌وری و کاهش هزینه تولید ضروری به نظر می‌آید.

References

(1) Klemm D., Heublein B., Fink H P., Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte. Chemie International Edition.* 2005; 44 (22): 3358- 93.

(2) FurtadoG P., RibeiroL F., SantosC R., TonoliC C., de SouzaA R., OliveiraR R., et al. Biochemical and structural characterization of a β-1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochemistry* 2011; 46 (5): 1202- 06.

(3) Aggarwal R., Purwar S., Kharbikar L., Gupta S.Induction of a wheat β-1,3-Glucanase gene during the defense response to *Bipolaris sorokiniana*. *Acta Phytopathologica Entomologica Hungarica.* 2011; 46 (1): 39- 47.

(4) Vuong T V., Wilson D B.Glycoside hydrolases: Catalytic base/ nuclephile diversity. *Biotechnology & Bioengineering* 2010; 107 (2): 195- 205.

(5) Xia L., Shen X.Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. *Process Biochemistry* 2004; 39 (11): 1363- 7.

(6) Song J.,Nam K., Sun Y U.,Kang M., Kim C H., Kwon S K.,et al.Molecular andbiochemical characterization of a novel arthropod endo-β-1,3-glucanase from the Antarctic springtail, Cryptopygus antarcticus horizontally acquired from bacteria. *Comparative Biochemistry & Physiology*.Part B 2010; 155 (4): 403- 12.

(7) Beshay U., Enshasy H E., Ismail I., Moawad H., Wojciechowska E., Ghany S A.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 Biochemistry* 2003; 39 (3): 307- 13.

(8) Rajoka M I.Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas flavigena*.*Electronic Journal of Biotechnology* 2004; 7 (3): 256- 63.

(9) Louw M E., Reid S H., Watson T J.Characterization, cloning and sequencing of a thermostable endo- (1,3-1,4)β-glucanase- encoding gene from an alkalophilic *Bacillusbrevis*. *Applied Microbiol*ogy & *Biotechnology* 1993; 38 (4): 507- 13.

(10) Kuhad R C., Gupta R., Singh A.Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* 2011; 1- 10.

(11) Bedford M R., Partidge G G., *Enzyme in Farm Animal Nutrition*, 2nd edition Marlborough: CABI Publishing; 2001.

(12) IbrahimA M., Abdel-Aziz A A., Mahrous H.,Abdulraouf U M.Cloning and sequencing of cellulose- encoding gene (cel2)fromlocally isolated *Bacillus sp*.strain A4.*Journal of Biotechnology*.2009; 6 (1-2): 75- 88.

(13) Aftab S., Aftab M N., Haq I., Javad M M., Zafar A.,Iqbal I.Cloning and expression of endo-1,4-B-Glucanase gene from *Bacilluslicheniformis* ATCC14580 into *Escherichiacoli* BL21 (DE3). *African Journal of Biotechnoogyl* 2012*;* 11 (12): 2846- 54.

(14) Lindemann J., Arny DC., Upper CD.Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv.*Syringae* on snap bean and non host plants and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. *Phytopathology* 1998. 74 (11): 1329- 33.

(15) Walter J., Mangold M.,Tannock G W.Construction, Analysis, and Glucanase Screening of a Bacterial Artificial Chromosome Library from the Large-Bowel Microbiota of Mice. *Applied Environmental Microbiology* 2005; 71 (5): 2347- 54.

(16) Bailey M., Biely P., Poutanen K.Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 1992; 23 (3): 257- 70.

(17) Hashemi M., Shojaosadati SA., Razavi SH., Mousavi SM.The potential of brewer's spent grain to improve the production of α-amylase by *Bacillus* sp.KR-8104 in submerged fermentation system. *New Biotechnology* 2011; 28 (2): 165- 72.

(18) Teng D., WangJ., Fan Y., Yang Y., TianZ., Luo J., et al.Cloning of β-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635)and its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Applied Microbiology & Biotechnol*ogy 2006; 72 (4): 705- 712.

(19) Apiraksakorn J., Buwjoom T.,

Nitisinprasert S.Characterization of Grass Degrading Bacteria Active on β-1,3-1,4-D-glucans from *Bacillus subtilis* GN156 PotentialUse for Grass Silage-Making.*Kasetsart Journal* (Nat.Sci.) 2006; 40 (1): 136- 47.

(20) Naghavi N S., Naderi S, Shahanipoor K, Zia M A., Rastegari Esfahani A A. Optimization of exopectinase activity of the fungus Monilia isolated from tangerine in submerged fermentation. *Biological Journal of Microorganisms* 2012; 1 (1) :23- 30.

[1]- *Aspergillu*s
[2]- *Trichoderma*
[3]- *Candida albica*s
[4]- *Bacillus subtilis*
[5]- *Bacillus brevis*
[6]- Response Surface Methodology
[7]- Nutrient Broth Yeast Extract
[8]- Lichenan
[9]- Tecan, pro M200, Switzerland
[10]- DNA
[11]- QIAGEN. Cat. No. 69504
[12]- Spectrophotometr (Thermo Scientific 2000C)
[13]- Forward
[14]- Revese
[15]- Bio-Rad, Canada
[16]- Basic Local Alignment Search Tool
[17]- Brewer spent grain
[18]- Tommy, Japan
[19]- Stat-Ease Inc. Minneapolis, MN, USA (Design Expert 7.0.0)
[20]- *Bacillus licheniformis*

Determination and modeling the optimum conditions of beta glucanase *Bacillus subtilis* B5d activity with potential used as feed additive

Sholeh Dahpahlevan
M.Sc. of plant physiology, Urmia University, Urmia, Iran, dahpahlevan_sholeh@yahoo.com
Jalil Khara
Associate Professor of plant physiology, Biology Department, Urmia University, Urmia, Iran, jakhara@yahoo.com
Maryam Mousivand
M.Sc. of Plant Pathology, Microbial Biotechnology & Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran, mmousivand@abrii.ac.ir
Maryam Hashemi *
Assistant Professor of Food Biotechnology, Microbial Biotechnology & Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran, hashemim@abrii.ac.ir

Abstract

Introduction: Microbial β - 1, 4 glucanase is one of the key enzymes in glucan hydrolysis. Among bacteria, *Bacillus* species is a main source for industrial glucanse production. According to interaction between environmental factors on the enzymatic catalytic properties, in this study the potential of β-glucanase production by native strain *B. subtilis* B5d isolated from apple phyllosphere orchards and determination and modeling the optimum conditions of enzyme activity was surveyed.

Materials and methods: In this study, the potential of β-glucanase production by *B. subtilis* B5d was confirmed using qualitative method. The *B. subtilis* B5d isolate was identified through biochemical and molecular methods. Determination of optimum condition for beta glucanase activity was evaluated by response surface method and Central Composite Design. Investigated variables included temperature (20- 80 °C), pH (3.5- 8) and concentration of substrate (0.1- 1%).

Results: According to the molecular and biochemical analysis, the strain *B. subtilis* B5d belonges to *B.subtilis* species. Based on the Central Composite Design results, the quadratic model was the most suitable model for predicting β-glucanase activity in experimental temperature, pH and substrate concentration range. Furthermore, the optimization of enzyme activity showed that the β-glucanase produced by strain B5d has highest catalytic activity at pH (5.5- 7) and temperature (50- 65°C) and the high concentration of lechinan. However, the enzyme activity is reduced in 80 and 20 °C as well as low concentration of substrate. Validation test of the prediction model of optimization obtained by response surface methodology showed a good agreement between experimental and predicted data.

Discussion and conclusion: According to the optimum catalytic characteristics, the β-glucanase produced by *B. subtilis* B5d has a potential to be used as a feed additive.

Key words: β-glucanase activity, Optimal conditions, *Bacillus subtilis*, Feed

* Corresponding author
Received: February 22, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014