

**KARAKTERISASI  $\beta$ -1,3-1,4-GLUKANASEBAKTERI ENDOFITIK  
*Burkholderia cepacia* ISOLATE76 ASAL TANAMAN PADI  
[Characterization of  $\beta$ -1,3-1,4-Glucanase from Rice Endophytic  
Bacterium *Burkholderia cepacia* E76]**

Ifa Manzila<sup>1✉</sup>, Tri Puji Priyatno<sup>1</sup>, Muhammad Faris Fathin<sup>2</sup>, Laksmi Ambarsari<sup>2</sup>,  
Yadi Suryadi<sup>1</sup>, I Made Samudera<sup>1</sup>, dan Dwi Ningsih Susilowati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A Bogor 16111

<sup>2</sup>Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Bogor

email:ifamanzila@gmail.com

**ABSTRACT**

Pathogenic fungus is one of the constraints to increase crop production. Chemical control using fungicides caused negative effects either to the environment or increased pathogen resistance to fungicide. Biological control using microbial-producing  $\beta$  glucanase is an alternative method to inhibit the growth of pathogenic fungus. The aim of this study was to characterize  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase produced by rice-endophytic bacterium, *B. cepacia* E76. Purification was carried out by ammonium sulphate precipitation, dialysis, and ion exchange chromatography using DEAE sepharose Fast Flow. A further characteristic of the enzyme activity was studied using oatmeal-glucan substrate. Results showed that precipitation using saturated 80% ammonium sulphate generated a good yield with the purity increased by 11 fold and yield of 66%. After chromatography step, the  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase of *B. cepacia* was successfully purified with an increased of purity up to 33 fold and yield of 4%. Based on 10% SDS-PAGE, the enzyme profiles had the molecular weight of 15, 48 and 55 kDa. Of the three isozymes, only the 48 kDa isozyme showed the strongest glucanase activity when grown on media containing glucan as substrate.

**Key words:** *Burkholderia cepacia* E76,  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase, purification, rice

**ABSTRAK**

Jamur patogen adalah salah satu kendala untuk meningkatkan produksi tanaman. Pengendalian secara kimia menggunakan fungisida bisa berdampak negatif baik terhadap lingkungan maupun terjadinya peningkatan resistensi patogen terhadap fungisida. Pengendalian hayati menggunakan mikroba penghasil  $\beta$ -glukanase merupakan salah satu metode alternatif untuk menghambat pertumbuhan jamur patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaraktisasi  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase yang dihasilkan oleh bakteri endofitik padi, *B. cepacia* E76. Pemurnian dilakukan masing-masing dengan pemekatan amonium sulfat, dialisis, dan kromatografi pertukaran ion menggunakan DEAE sepharosa Fast Flow. Karakteristik lebih lanjut dari aktivitas enzim dipelajari menggunakan substrat oatmeal-glukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemekatan menggunakan 80% amonium sulfat jenuh, menghasilkan kadar enzim yang baik dengan rendemen meningkat sebesar 11 kali lipat dan hasil 66%. Setelah dilakukan kromatografi,  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase dari *B. cepacia* berhasil dimurnikan dengan peningkatan rendemen hingga 33 kali lipat dan hasil 4%. Berdasarkan 10% SDS-PAGE, profil enzim memiliki bobot molekul 15, 48 dan 55 kDa. Dari ketiga isozim, hanya isozim 48 kDa yang menunjukkan aktivitas glukonase kuat ketika ditumbuhkan pada media yang mengandung glukon sebagai substrat.

**Kata kunci:** *Burkholderia cepacia* E76,  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase, pemurnian, padi

**PENDAHULUAN**

Tanaman padi selalu berinteraksi dengan berbagai macam mikroba, termasuk bakteri endofitik yang dapat mengkolonisasi jaringan tanaman selama siklus hidupnya tanpa menunjukkan tanda-tanda menginfeksi atau berpengaruh negatif pada inangnya (Strobel dan Daiy, 2003). Bakteri endofitik hampir ditemukan pada seluruh jaringan tanaman, dan bisa hidup secara aktif atau bersifat laten di daerah intra-seluler, jaringan vaskuler, dan di dalam sel tanaman (Kobayashi dan Palumbo, 2000; Maheshwari, 2010). Meskipun mekanisme interaksi antara tanaman dan bakteri endofitik belum sepenuhnya dimengerti, tetapi keberadaan bakteri ini dilaporkan berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman dengan menghasilkan senyawa metabolit sekunder dan fitohormon. Bakteri endofitik juga

dilaporkan terlibat aktif dalam mencegah perkembangan penyakit tanaman dengan mensintesis senyawa antibiotik, atau enzim yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan jamur dan bakteri patogen tanaman (Heungens dan Parke, 2000). Oleh karena itu, bakteri endofitik merupakan salah satu mikroba yang potensial untuk dikembangkan menjadi agensia pengendalian hayati yang bersifat ramah lingkungan.

Bakteri *B. cepacia* dilaporkan bertindak sebagai salah satu bakteri endofitik penting pada tanaman padi, jagung dan tebu (Bevivino *et al.*, 2000; Mendes *et al.*, 2007). Aktivitas antagonis *B. Cepacia* terjadi melalui sekresi metabolit sekunder seperti *pyrrolnitrin*, *phenazine*, *cepabactin* dan senyawa *volatile/non-volatile* yang belum dikenal pasti (Blazina *et al.*, 2010). *Burkholderia cepacia* E76

merupakan isolat bakteri endofitik koleksi Biogen *Culture Collection* yang sebelumnya dilaporkan bersifat antagonis terhadap jamur patogen (Suryadi *et al.*, 2013). *B. cepacia* E76 kemungkinan berbeda dibanding dengan isolat *B. cepacia* lainnya sebagai bakteri endofitik pada tanaman padi, karena dalam spesies yang sama bisa saja bakteri tersebut memiliki fenotipe dan aktivitas biologi yang berbeda (Meyer *et al.*, 1995). Isolat *B. Cepacia* E76 pada penelitian sebelumnya diketahui memiliki aktivitas perombak dinding sel (*cell wall degrading enzymes*) seperti kitinase dan glukukanase (Suryadi *et al.*, 2014). *Trichoderma* sp. dan *Lysobacter enzymogenes* yang bersifat antagonistik terhadap jamur patogen dilaporkan menghasilkan  $\beta$ -glukanase dalam mekanisme penghambatannya. Tanaman transgenik yang ditransformasi dengan gen glukukanase dilaporkan menunjukkan ketahanan terhadap layu Fusarium (Kang *et al.*, 1998).

Glukanase dapat menghidrolisis  $\beta$ -glukan yang merupakan salah satu komponen utama penyusun dinding sel jamur (Adams, 2004). Hidrolisis  $\beta$ -glukan pada dinding sel jamur dapat menurunkan integritas dinding sel, sehingga jamur tidak mampu menginfeksi tanaman (Shetty *et al.*, 2009). Glukanase bekerja pada ikatan  $\beta$ -glikosidik dalam struktur  $\beta$ -glukan. Penggolongan enzim ini pun cukup beragam tergantung pada ikatan glikosidik yang dihidrolisisnya.  $\beta$ -glukanase yang menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,3 dikenal sebagai laminarinase (EC 3.2.1.39) (Doxey *et al.*, 2007), sedangkan yang menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 lebih dikenal sebagai selulase (EC 3.2.1.4) (Nishiyama *et al.*, 2001). Aktivitas  $\beta$ -glukanase yang lebih kompleks (EC 3.2.1.73) dapat menghidrolisis kedua jenis ikatan glikosidik tersebut (Wolf, 1991). Kespesifikan aktivitas  $\beta$ -glukanase tergantung pada perbedaan struktur geometri molekul glukukan.  $\beta$ -glukanase yang dihasilkan oleh *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* hanya spesifik terhadap glukukan dari oat ( $\beta$ -1,3-1,4-glukan), tetapi tidak terhadap laminarin ( $\beta$ -1,3-glukan) maupun karboksimetil selulosa ( $\beta$ -1,4-glukan).

Sejauh ini, informasi aktivitas  $\beta$ -glukanase pada bakteri endofitik *B. Cepacia* E76 belum diperoleh dengan lengkap. Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan dan mengkarakterisasi  $\beta$ -1,3-1,4-

glukanase yang dihasilkan *B. cepacia* E76. Kajian awal ini diharapkan dapat diperoleh data karakteristik  $\beta$ -glukanase bakteri endofitik *B. Cepacia* E76 untuk selanjutnya dapat dikembangkan sebagai agen hayati untuk mengendalikan jamur patogen tanaman padi.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Penyiapan bakteridan substrat $\beta$ -Glukan

Bakteri endofitik *B. cepacia* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *B. cepacia* isolat E76 koleksi BiogenCC yang diisolasi dari tanaman padi. Bakteri dipelihara dan disubkultur setiap 3 minggu sekali dalam tabung reaksi berisi media Luria-Bertani (LB) (10 g tripton, 10 g NaCl, dan 5 g ekstrak khamir) dan diinkubasi pada suhu ruang (24°C).

Substrat glukukan disiapkan dari bahan tepung oatmeal mengikut metode Wood dan Weisz (1984). Sebanyak 20 goatmeal dilarutkan dalam 200 ml akuades kemudian pH-nya diatur dengan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% (b/v) hingga mencapai pH 10 sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan sampai suhu 45°C selama 30 menit. Kemudian, larutan oatmeal disentrifugasi pada kecepatan 4000xg selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan ke gelas piala dan diatur pH-nya menjadi 4.5 menggunakan HCl 1 M, lalu disentrifugasi lagi dengan kecepatan 17000xg selama 20 menit. Supernatan ditambahkan dengan 80 ml etanol 96% secara perlahan sambil diaduk. Setelah diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 4°C, campuran disentrifugasi pada kecepatan 17000xg selama 10 menit untuk mendapatkan pelet glukukan yang selanjutnya diresuspensi dengan 5-10 ml *phosphate buffer saline* (PBS).

### Pengaruh umur biakan terhadap assay glukukanase

Penyiapan assay glukukanase *B. cepacia* E76 dilakukan pada media M9 dengan sedikit modifikasi (6,0 g/l  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 3,0 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g/l NaCl, 1,0 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 0,015 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 1% koloidal kitin, 0,5 g/l ekstrak khamir, dan 0.1 g/l pepton dengan pH 7). Media M9 disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dantekanan 1 psi. Setelah dingin, media diinokulasi dengan 1 ml biakan *B. cepacia* E76 berumur 16 jam dalam media LB cair. Kultur diinkubasi pada tiga waktu yang berbeda yaitu 24, 48, dan 72 jam setelah inokulasi (JSI) sam-

bil diaduk dengan kecepatan 75 rpm pada suhu ruang (22°C). Total protein dalam biakan diukur dengan reagen Bradford (Bradford, 1976). Aktivitas kitinase dideteksi dengan reagen *Dinitro Salisilic Acid* (DNS) (Miller, 1959) dan uji agar difusi dalam cawan Petri.

#### **Uji kualitatif aktivitas glukanase menggunakan metode difusi agar**

Agarosa (0,3 g) dilarutkan dalam 29 ml akuades dan ditambah dengan 1 ml substrat  $\beta$ -glukan. Campuran dipanaskan selama 5 menit dalam oven microwave, kemudian dituang ke dalam cawan Petri. Agar media kemudian dilubangi dengan *cork borer* berdiameter 0.5 cm dan sebanyak 20  $\mu$ L masing-masing fraksi, diteteskkan ke dalam lubang. Cawan uji diinkubasi semalam pada suhu 40°C, dan setelah diwarnai dengan *congo red*, kemudian substrat media agarose- glukantersebut diinkubasi selama 5 menit, lalu dibilas dengan NaCl 1 M beberapa kali hingga timbul zona lisis.

#### **Uji kuantitatif aktivitas glukanase berdasarkan gula reduksi.**

Sebanyak 50  $\mu$ l substrat  $\beta$ -glukan dimasukkan ke dalam 2 ml tabung mikro, kemudian ditambah dengan masing-masing 15  $\mu$ l fraksi yang akan diuji. Bufer Tris-HCl pH 6.8 ditambahkan ke dalam 100  $\mu$ l volume campuran, kemudian diinkubasi selama dua jam pada suhu 40°C. Sebanyak 300  $\mu$ L reagen DNS ditambahkan dan dihomogenkan ke dalam campuran, selanjutnya campuran reaksi dipanaskan selama 10 menit dan diukur absorbannya pada panjang gelombang 540 nm (Miller, 1959). Konsentrasi glukosa yang terbentuk ditentukan melalui persamaan kurva standar, dan aktivitas  $\beta$ -glukanase dinyatakan dalam Unit per mililiter. Definisi satu unit aktivitas glukanase adalah sejumlah enzim yang menghasilkan 1  $\mu$ mol gula reduksi setara dengan glukosa permenit.

#### **Pemekatan glukanase dengan amonium sulfat dan dialisis**

Glukanase untuk pemekatan amonium sulfat dilakukan dari 1 liter biakan *B. cepacia* E76 yang berumur 48 JSI dalam media M9. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 4000xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dipekatkan dengan larutan 20% sampai 80% amonium sulfat yang ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirer* pada suhu dingin (4°C)

(Monisha *et al.*, 2009). Campuran disimpan dalam suhu 4°C selama 16 jam, lalu disentrifugasi pada kecepatan 17000xg selama 10 menit. Pelet diresuspensi dengan 2 ml PBS dan selanjutnya didialisis menggunakan *cellulose tubing cut-off* 12 kDa, lalu disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan dalam proses pemurnian dan uji aktivitas.

#### **Pemurnian glukanase dengan kromatografi tukar ion.**

Glukanase selanjutnya dimurnikan dengan metode kromatografi tukar ion. Untuk menentukan jenis tukar ion yang sesuai, terlebih dahulu diuji dua macam resin, yaitu *diethylene aminoetil* (DEAE) dan *carboxymetyl* (CM) sepharose yang masing-masing bertindak sebagai penukar anion dan kation. Proses optimasi penukar ion dilakukan dengan rentang pH 5 -7.5. Suspensi resin sebanyak 500  $\mu$ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000xg selama 5 menit. Supernatan dibuang dan diganti dengan bufer fosfat pH 7.5, kemudian dikocok dengan cara membolak balik tabung. Suspensi disentrifugasi kembali dan dibuang supernatannya. Prosedur tersebut diulang sampai lima kali. Selanjutnya sebanyak 20  $\mu$ l protein hasil dialisis ditambahkan ke dalam resin. Tabung dikocok kembali dan didiamkan selama 10 menit sebelum disentrifugasi 5000xg untuk mengambil supernatan. Konsentrasi protein dalam supernatan diuji dengan pereaksi Bradford menggunakan bovine serum albumine (BSA) sebagai standar, kemudian nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm (Bradford, 1976). Absorbansi terendah menunjukkan jenis resin dan kondisi pH optimum untuk pemurnian.

Untuk proses pemurnian glukanase, resin penukar ion optimum dicuci beberapa kali menggunakan bufer fosfat dan pH optimum. Resin dikemas dalam kolom berukuran 0,5 x 7,0 cm. Sebanyak 200  $\mu$ l sampel dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dielusi dengan 50 mM bufer fosfat pH 7 yang mengandung NaCl dengan konsentrasi 0-1000 mM. Fraksi hasil elusi ditampung setiap 500  $\mu$ l dan diuji aktivitasnya dengan metode DNS (Miller, 1959).

#### **Penentuan Bobot Molekul dengan SDS-PAGE dan analisis zimogram**

Elektroforesis 10% SDS-PAGE digunakan

untuk memisahkan sampel protein. Elektroforesis dijalankan pada tegangan listrik 150 V dengan arus 25 mA menggunakan alat mini protean (Biorad). Pola migrasi yang terbentuk divisualisasi dengan reagen *Coomassie Brilliant Blue* selama 12 jam. Gel yang telah diwarnai, kemudian didokumentasikan dalam bentuk berkas gambar. Bobot molekul dianalisis dengan perangkat lunak *Photocapt-MW*.

Analisis zimogram dilakukan untuk mengetahui pola isoenzim glukonase yang dihasilkan oleh *B. cepacia* E76. Analisis dilakukan pada PAGE (*native*) yang mengandung substrat glukon 0.2%. Setelah dielektroforesis, sampel direnaturasi dengan cara merendam gel dalam larutan 50 mM bufer sitrat (pH 6) yang mengandung 50% etanol dan diaduk dengan *magnetic stirer* selama 30 menit. Proses ini diulang sebanyak 3-5 kali. Selanjutnya, gel direndam dalam 50 mM bufer sitrat (pH 6) dan diinkubasikan semalam pada suhu 37°C. Aktivitas enzim pada gel dideteksi dengan pewarnaan larutan Congo red 0.01% dalam air destilasi. Aktivitas enzim divisualisasi dari zona bening pada gel setelah dicuci beberapa kali dengan 20% etanol.

## HASIL

### Pengaruh umur biakan terhadap assay glukonase

Aktivitas glukonase secara kualitatif dilihat pada media agarosa 1% yang mengandung substrat  $\beta$ -1,3-1,4-glukan dalam cawan Petri, dimana hasilnya menunjukkan bahwa pembentukan zona bening yang terjadi akibat aktivitas hidrolisis  $\beta$ -1,3-1,4-glukan oleh glukonase berbeda antar umur biakan. Biakan bakteri berumur 48 jam setelah inkubasi (JSI) menghasilkan diameter zona bening yang paling lebar (1,40 cm) jika dibandingkan umur biakan 24 JSI (1,28 cm) dan 72 JSI (1,15 cm) (Gambar 1).

Aktivitas glukonase secara kuantitatif yang tinggi terjadi pada umur biakan 48 JSI dengan aktivitas  $1,23 \times 10^{-1}$  U/ml dan aktivitas total  $3,06 \times 10^{-1}$  U, sedangkan umur biakan 24 dan 72 JSI berturut-turut memiliki aktivitas  $9,75 \times 10^{-2}$  U/ml dengan aktivitas total  $1,95 \times 10^{-1}$  U dan  $8,49 \times 10^{-2}$  U/ml dengan aktivitas total  $2,71 \times 10^{-1}$  U (Tabel.1).

### Pemekatan glukonase dengan amonium sulfat dan dialisis

Protein yang mengendap hasil pemekatan dengan amonium sulfat 80% menghasilkan konsen-

**Tabel. 1.** Rerata aktivitas  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase pada tiga umur biakan yang berbeda (*Means of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase activities of three different old cultures*).

Perlakuan ( <i>Treatments</i> )	Protein (mg/ml)	Aktivitas ( <i>Activities</i> ) (U/mlx10 <sup>-1</sup> )	Aktivitas total ( <i>Total activities</i> ) (Ux 10 <sup>-1</sup> )	Zona bening ( <i>Clearing zone</i> ) (cm)
Kultur 24 JSI (24 hours-old culture)	2,7	$9,75 \times 10^{-2}$	$1,95 \times 10^{-1}$	1,28
Kultur 48 JSI (48 hours-old culture)	13,6	$1,23 \times 10^{-1}$	$3,06 \times 10^{-1}$	1,40
Kultur 72 JSI (72 hours old-culture)	19,5	$8,49 \times 10^{-2}$	$2,71 \times 10^{-1}$	1,15

Keterangan: JSI = jam setelah inkubasi (*JSI = hours after incubation*)



**Gambar 1.** Deteksi aktivitas  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase *B. cepacia* E76 dari berbagai umur biakan 24 JSI, 48 JSI, dan 72 JSI pada media agarosa 1% yang mengandung glukon. Aktivitas glukonase secara kualitatif ditunjukkan oleh zona bening (*Detection of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase activities of *B. cepacia* isolate E76 from 24, 48, dan 72-hours old-culture by plate diffusion method on 1% agarose containing glukon as substrates*).

trasi protein total terbanyak, yaitu 8,49 mg (Tabel 2). Konsentrasi protein total yang hampir sama (8,0 mg) diperoleh dari hasil pengendapan amonium sulfat 20%.Aktivitas total enzim yang dihasilkan setiap tingkat pemekatan terlihat beragam. Aktivitas total hasil pemekatan amonium sulfat 40% menghasilkan konsentrasi terendah yaitu,  $7,13 \times 10^{-4}$  U, sedangkan hasil pemekatan amonium sulfat 80% menghasilkan konsentrasi tertinggi ( $1,85 \times 10^{-1}$  U). $\beta$ -1,3-1,4-glukanase tidak mengendap dengan baik pada pemekatan amonium sulfat 40%, sebagaimana ditunjukkan oleh tingkat rendemennya yang hanya mencapai 0,72 kali dan hasilnya hanya 0,26% dibanding ekstrak kasar. Pengendapan yang baik terjadi pada pemekatan 20% dan 80% amonium sulfat. Aktivitas total yang dimiliki kedua fraksi tersebut cukup tinggi.

Hasil pemekatan dengan 20% amonium sulfat memiliki aktivitas total  $7,12 \times 10^{-2}$  U dengan konsentrasi protein yang dihasilkan 25,44%, namun rendemennya hanya 4,44 kali. Pemekatan dengan 80% amonium sulfat memiliki aktivitas total  $1,85 \times 10^{-1}$  U dengan rendemen 10,89 kali dan hasil 66,15%.

### Analisis bobot molekul glukunase dengan SDS-PAGE dan pola zimogram

Berdasarkan hasil elektroforegram 10% SDS-PAGE terdeteksi 3 pita protein dengan bobot molekul masing-masing 53, 48 dan 15 kDa (Gambar 2A) dan analisis zimogram juga menunjukkan tiga subunit glukunase yang diekstraksi dari biakan *B.cepacia*E76.Pita isoenzim 48 kDa menunjukkan aktivitas glukunase yang kuat pada media yang mengandung substrat glukun (Gambar 2B).

Bobot molekul  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase ditentukan melalui elektroforesisSDS-PAGE, terhadap empat fraksi amonium sulfat yang memiliki kemurnian cukup baik (20, 30, 50, dan 80%) dan satu fraksi hasil proses pemekatan dialisis (FD). Hal ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan profil sub unit protein yang terjadi setelah dilakukan proses tersebut. Gambar 3 menunjukkan pola migrasi protein yang berbeda dari setiap fraksi.

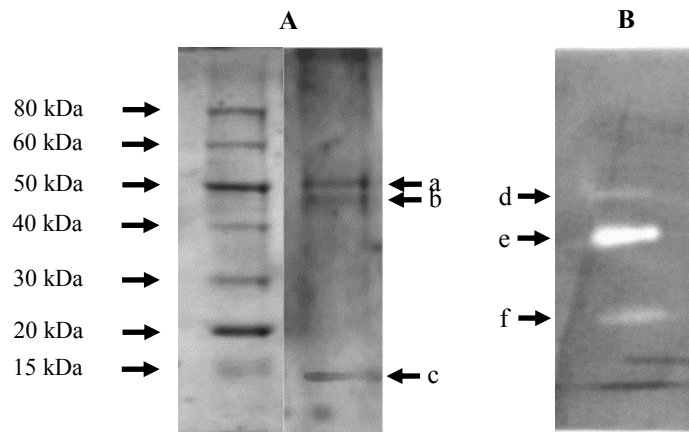
### Kromatografi Penukar Ion

Keterjerapan DEAE sepharose terjadi pada pH 7,0-7,5 dengan absorbansi 0,113 dan 0,114 (Tabel 3). Keterjerapan ini lebih baik jika dibanding-

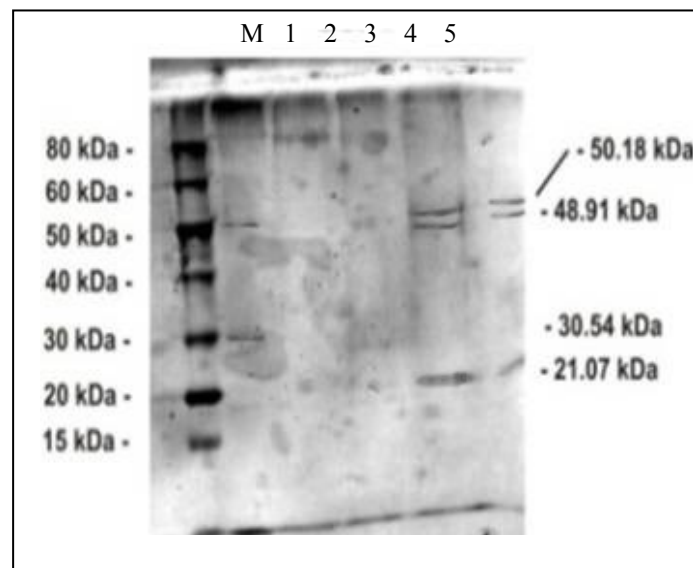
**Tabel 2.** Rerata aktivitas  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase *B. cepacia* E76 hasil berbagai tingkat pemekatan amonium sulfat (Means of  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase activities of *B. cepacia* isolate E76 extracted with different concentration of ammonium sulphate)

Pemekatan (Concentration)	Protein total(mg) <sup>a</sup>	Aktivitas total (Total activities) (U) <sup>b</sup>	Aktivitas (Activities) (U/ml) <sup>c</sup>	Aktivitas spesifik (Specific activities) (U/mg) <sup>d</sup>	Hasil (Results) (%) <sup>e</sup>	Rendemen (kali) (Redement, fold) <sup>f</sup>
Kasar (crude)	140,00	$2,80 \times 10^{-1}$	$2,80 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-3}$	100,00	1,00
20%	8,00	$7,12 \times 10^{-2}$	$1,48 \times 10^{-2}$	$8,88 \times 10^{-3}$	25,44	4,44
30%	2,86	$2,83 \times 10^{-2}$	$1,09 \times 10^{-2}$	$9,92 \times 10^{-3}$	10,14	4,96
40%	0,50	$7,13 \times 10^{-4}$	$4,19 \times 10^{-2}$	$1,44 \times 10^{-3}$	0,26	0,72
50%	2,50	$2,93 \times 10^{-2}$	$1,95 \times 10^{-2}$	$1,17 \times 10^{-2}$	10,50	5,86
60%	5,70	$1,61 \times 10^{-2}$	$1,07 \times 10^{-2}$	$2,84 \times 10^{-3}$	5,77	1,42
70%	6,64	$3,94 \times 10^{-2}$	$3,28 \times 10^{-2}$	$5,95 \times 10^{-3}$	14,10	2,97
80%	8,49	$1,85 \times 10^{-1}$	$1,32 \times 10^{-1}$	$2,17 \times 10^{-2}$	66,15	10,89

Keterangan: <sup>a</sup>Konsentrasi protein dihitung dengan metode Bradford menggunakan standar BSA (mg/ml),<sup>b</sup>Aktivitas total menunjukkan jumlah total unit enzim yang terdapat tiap konsentrasi. Aktivitas total = volume glukunase x kadar protein, <sup>c</sup>Aktivitas = aktivitas (U/ml) x volume (ml), <sup>d</sup>Aktivitas spesifik(U/mg)=aktivitas/kadar protein (mg/ml),<sup>e</sup>Hasil = jumlah enzim setelah pemekatan/total enzim sebelum pemekatan, <sup>f</sup>Rendemen= aktivitas spesifik enzim setelah pemekatan/aktivitas spesifik sebelum pemekatan(Protein concentration based on Bradford method using BSA as standard, <sup>b</sup>Total activities showed total of unite enzymes in each concentration. Total activity=glukanase volume x protein content., <sup>c</sup>Activity=activity (U/ml) x volume, <sup>d</sup>Specific activity (U/mg)=activity/protein content (mg/ml), <sup>e</sup>Result=total enzymes after concentrated/total enzyme before concentrated, <sup>f</sup>Rendement=specific activity after concentrated/specific activity before concentrated).



**Gambar 2.** Elektroforegram SDS-PAGE (A) dan analisis zimogram (B)  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase *B. cepacia* E76. a,b, dan c pita protein dengan bobot molekul 53, 48 dan 15 kDa; d,e, dan f adalaha tiga subunit glukanase hasil analisis zimogram pada SDS-PAGE yang mengandung glukukan sebagai substrat (*Electrophoregram of SDS-PAGE (A) and zymogram analysis (B) of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase. Band of a, b, and c are protein fractions with molecular weight 53, 48 and 15 kDa, respectively; Band of f, d, e, and f are glucanase subunit detected with zymogram analysis using glucukan as substrates*).



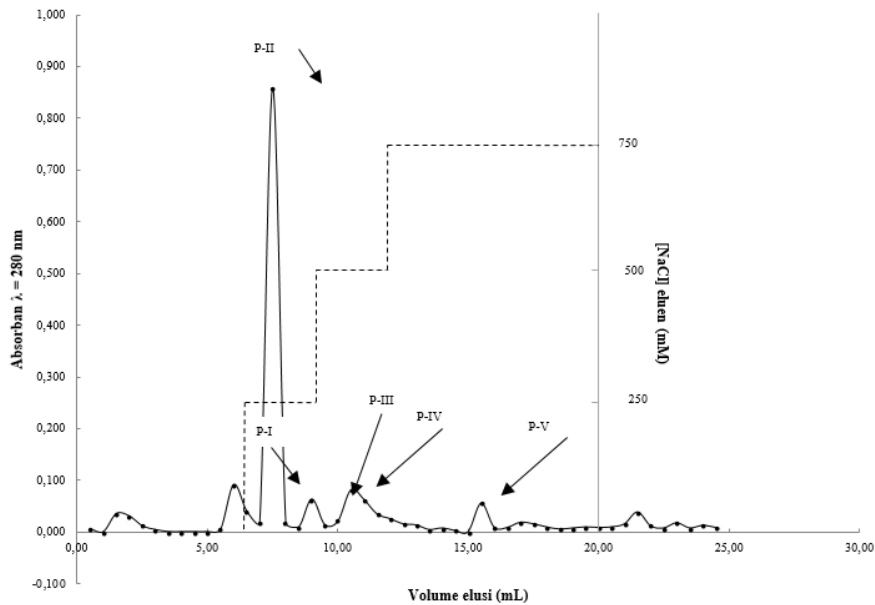
**Gambar 3.** Elektroforegram SDS-PAGE fraksi  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase *B. cepacia* E76. Lajur M=marker, lajur 1=pemekatan amonium sulfat 20%, lajur 2=pemekatan amonium sulfat 30%, lajur 3=pemekatan amonium sulfat 50%, lajur 4=pemekatan amonium sulfat 80%, dan lajur 5=pemekatan hasil dialisis (*Electrophoregram of SDS-PAGE of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase fractions. Lane M=marker, lane 1=20% ammonium sulphate, lane 2= 30% ammonium sulphate, lane 3=50% ammonium sulphate, lane 4=80% ammonium sulphate, and lane 5=concentrated fraction*).

kan dengan keterjerapan yang dihasilkan resin CM sepharose pada pH 6,0, sehingga sistem kromatografi yang digunakan untuk pemurnian adalah menggunakan resin penukar anion DEAE sepharose pada pH 7.0.

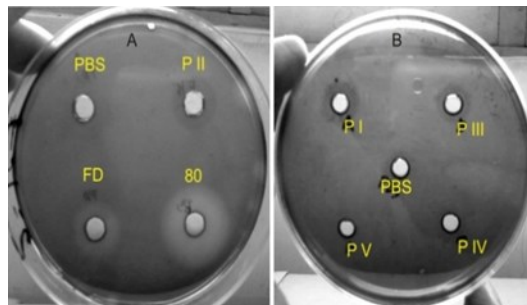
Gambar 4 menunjukkan nilai absorbansi yang baik, terlihat dari puncak yang tidak saling berdempet (terpisah) satu sama lain dengan bentuk yang simetri. Hasil kromatogram menunjukkan lima puncak yang terbentuk selama elusi gradien yang di-

**Tabel 3.** Optimasi filtrasi $\beta$ -1,3-1,4-glukanase menggunakan kromatografi dengan resin penukar ion (*Optimization of  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase filtration using ion exchange chromatography*)

Resin penukar ion( <i>Ion exchange resin</i> )	pH	Nilai Absorbansi( <i>Absorbance</i> )
DEAE-Sepharose FF	5,0	0,166
	5,5	0,132
	6,0	0,122
	6,5	0,121
	7,0	0,113
CM-Sepharose FF	7,5	0,114
	5,0	0,159
	5,5	0,151
	6,0	0,123
	6,5	0,128
	7,0	0,140
	7,5	0,136



**Gambar 4.** Kromatogram hasil fraksinasi  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase. (*Chromatome of  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase fractionation*)



**Gambar 5.** Deteksi aktivitas  $\beta$ -1,3-1,4-glukanasehasil pemekatan amonium sulfat, dialisis dan kromatografi pada cawan petri berisi media agarosa 1% yang mengandung substrat glukan. Zona bening yang terbentuk menunjukkan aktivitas  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase. (*Detection of  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase concentrated using ammonium sulphate, dialysis, and chromatography on 1% agarose containing glukan. Clearing zone showed  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase activities*).

**Tabel 4.** Rerata aktivitas  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase hasil fraksinasi pemurnian kromatografi (*Means of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase activities of each chromatography fractions*)

Fraksi (Fractions)	Protein total (mg) <sup>a</sup>	Aktivitas total (Total activities) (Ux10 <sup>-2</sup> ) <sup>b</sup>	Aktivitas (Activities) (U/mlx10 <sup>-2</sup> ) <sup>c</sup>	Aktivitas spesifik (Specific activities) (U/mgx10 <sup>-2</sup> ) <sup>d</sup>	Hasil (Result) (%) <sup>e</sup>	Rendemen (kali) (Rendemen, fold) <sup>f</sup>
P-I	0,3	1,5	1,5	5,0	5,5	25,0
P-II	0,8	4,4	8,8	5,6	1,6	2,8
P-III	0,2	1,1	2,3	6,6	4,1	32,8
P-V	0,4	2,3	2,3	5,7	8,2	28,3

Keterangan: <sup>a</sup>Konsentrasi protein dihitung dengan metode Bradford menggunakan standar BSA (mg/ml), <sup>b</sup>Aktivitas total menunjukkan jumlah total unit enzim yang terdapat tiap fraksi. Aktivitas total = volume glukonase x kadar protein, <sup>c</sup>Aktivitas = aktivitas (U/ml) x volume (ml), <sup>d</sup>Aktivitas spesifik (U/mg)= aktivitas/kadar protein (mg/ml), <sup>e</sup>Hasil= jumlah enzim setelah purifikasi/total enzim sebelum purifikasi, <sup>f</sup>Rendemen= aktivitas spesifik enzim setelah purifikasi/aktivitas spesifik sebelum purifikasi. (*Protein concentration based on Bradford method using BSA as standard, <sup>b</sup>Total activities showed total of unite enzymes in each concentration. Total activity=glucanase volume x protein content., <sup>c</sup>Activity=activity (U/ml) x volume, <sup>d</sup>Specific activity (U/mg)=activity/protein content (mg/ml), <sup>e</sup>Result=total enzymes after concentrated/total enzyme before concentrated, <sup>f</sup>Rendement=specific activity after concentrated/specific activity before cocntrated*).

lakukan. Tiga puncak (P-I, P-II, dan P-III) terbentuk pada elusi 250 mM NaCl, satu puncak (P-IV) pada elusi 500 mM NaCl, dan puncak terakhir (P-V) pada elusi 750 mM NaCl. Jumlah puncak yang muncul hasil kromatogram ini agak berbeda dengan jumlah subunit protein yang terdeteksi hasil elektroforegram.

Puncak kedua (P-II) pada elusi 250 mM merupakan puncak tertinggi dengan protein total 0,79 mg dan dibentuk oleh satu fraksi (Tabel 4). Uji aktivitas glukonase pada cawan Petri menunjukkan bahwa fraksi pemekatan amonium sulfat 80% menghasilkan zona bening yang paling luas dengan diameter 2,50 cm, sedangkan fraksi hasil pemekatan dialisis (FD) dan fraksi P-II memiliki diameter zona bening masing-masing 1,60 cm dan 1,45 cm (Gambar 5A). Fraksi P-V kurang menunjukkan aktivitas glukonase pada cawan uji karena zona bening yang dihasilkan hanya berdiameter 0,9 cm (Gambar 5B).

## PEMBAHASAN

Sekresi glukonase oleh isolat bakteri *B. cepacia* E76 sudah terdeteksi sejak umur biakan 24 jam setelah inkubasi (JSI). Semakin lama waktu inkubasi, total protein yang dihasilkan biakan semakin tinggi, tetapi tidak demikian halnya dengan total aktivitas glukonase. Aktivitas total menunjukkan jumlah total unit enzim yang terdapat dalam suatu fraksi (Nelson dan Cox, 2004).

Konsentrasi protein dipetakan dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat mulai dari tingkat konsentrasi 20% sampai dengan 80% dengan tujuan untuk mengetahui tingkat kejenuhan amonium sulfat yang optimum dalam mengendapkan glukonase (Nelson dan Cox, 2004). Hasil konsentrasi protein yang tinggi pada pengendapan 80% menunjukkan protein yang terendap di dalamnya bersifat sangat hidrofilik, seperti  $\beta$ -glukonase yang sangat hidrofilik yang dihasilkan oleh *Bacillus circulans* juga terendap pada pemekatan 80% amonium sulfat. Protein dengan sifat hidrofilik yang tinggi akan membutuhkan konsentrasi amonium sulfat yang lebih tinggi untuk mengendap (Chen dan Lee, 1994). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat beberapa protein yang memiliki aktivitas  $\beta$ -1,3-1,4-glukonase, namun hanya terendap pada tingkat kejenuhan amonium sulfat yang berbeda (Aono *et al.*, 1995).

Ketiga protein yang terlihat dari hasil pola zimogram kemungkinan merupakan protein yang berbeda dan terpisah selama pengendapan amonium sulfat. Jenis  $\beta$ -glukonase banyak dilaporkan sebagai isozim pada organisme tertentu (Yang *et al.*, 2008). Selain sebagai isozim,  $\beta$ -glukonase ditemukan juga dalam bentuk selulosom atau multi-enzim.  $\beta$ -glukonase berasosiasi dengan kitinase, xy-lanase, manannase, dan berbagai hidrolase lainnya (Zverlov *et al.*, 2002; Bayer *et al.*, 2004). Hal ini menyebabkan *inducer* yang digunakan dalam produksi enzim ini beragam (Wolf *et al.*, 1995; Cel-



estino *et al.*, 2006).

Bobot molekul  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase *B. cepacia* E76 ternyata tidak berbeda dengan  $\beta$ -glukanase dari berbagai sumber mikroorganisme lainnya.  $\beta$ -glukanase yang dihasilkan *B. cepacia* E76 tergolong berbobot molekul sedang. Bobot molekul 1,3-1,4- $\beta$ -glukanase beberapa bakteri berkisar dari 20 sampai 65 kDa seperti yang dihasilkan *Bacillus* sp. dan *Ruminococcus flavefaciens* (Erflle dan Teather, 1990), *Clostridium thermocellum* (Celestino *et al.*, 2006), dan *Fibrobacter succinogenes* (Zeng *et al.*, 2009).

Pola migrasi yang terbentuk menunjukkan beberapa subunit protein. Subunit protein berbobot molekul 30,54 kDa terlihat pada fraksi pemekatan amonium sulfat 20%, sedangkan subunit protein berukuran 21,16 dan 48,91 kDa terlihat pada fraksi pemekatan amonium sulfat 80%. Subunit protein berbobot molekul 18,59 kDa terlihat juga pada fraksi amonium sulfat 30% dan 50%, namun tidak tampak begitu jelas. Fraksi hasil pemekatan dialisis (FD) menunjukkan pola yang sama dengan fraksi pemekatan amonium sulfat 80%, dimana protein berbobot molekul 21,16 dan 48,91 kDa masih ditemukan.

Kromatografi penukar ion dilakukan untuk proses pemurnian protein. Proses kromatografi ini dapat dilakukan lebih efektif jika titik isoelektrik dari protein target telah diketahui. Akan tetapi, proses kromatografi penukar ion tetap dapat dilakukan tanpa diketahuinya data titik isoelektrik dengan optimalisasi keterjerapan protein yang terjadi pada berbagai jenis resin dan pH dalam jenis bufer tertentu (Bollag dan Edelstein, 1991).

Pada penelitian ini, dua resin uji (DEAE dan CM) diaktifkan dengan bufer fosfat pada pH 5,0-7,5. Keterjerapan protein fraksi dialisis (FD) pada setiap sistem diukur dengan uji Bradford. Keterjerapan optimum ditentukan berdasarkan nilai absorbansi terendah yang terukur pada supernatan. Absorban yang terukur sebanding dengan konsentrasi protein yang ada di dalam supernatan yang merupakan protein yang tidak terjerap pada resin, sehingga semakin tinggi nilai absorbansi yang terukur, semakin banyak protein yang tidak terjerap pada resin.

Aktivitas total yang ditunjukkan oleh fraksi P-II tidak setinggi puncak yang lain, walaupun memiliki konsentrasi protein yang paling tinggi, yaitu  $4,41 \times 10^{-3}$  U dengan rendemen 2,81 kali. Hasil fraksi

ini pun paling kecil hanya 1,58% dibandingkan puncak lainnya. Puncak lain yang terelusi pada konsentrasi NaCl 250 mM adalah puncak pertama (P-I) memiliki aktivitas total  $1,53 \times 10^{-2}$  U dengan hasil 5% dan rendemen 25,0 kali.

Puncak ketiga (P-III) merupakan fraksi dengan rendemen tertinggi sebesar 32,81 kali dengan aktivitas total  $1,14 \times 10^{-2}$  U dan hasil 4,07%. Aktivitas total P-III lebih kecil daripada puncak keempat (P-IV) yang terelusi pada konsentrasi NaCl 500 mM. Aktivitas total yang dimiliki P-IV dua kali lebih besar, yaitu  $2,28 \times 10^{-2}$  U. Fraksi ini memiliki hasil yang tinggi sebesar 8,15% dengan rendemen yang tidak berbeda jauh dengan rendemen P-III, yaitu 28,33 kali. Keterpisahan P-IV lebih baik daripada P-III, rendemen keduanya tidak jauh berbeda, tetapi memiliki aktivitas total yang lebih tinggi.

Zona bening fraksi PII pun cenderung tidak transparan jika dibandingkan dengan zona bening fraksi dialisis dan fraksi amonium sulfat 80%. Fraksi P-V tidak menunjukkan aktivitas pada uji aktivitas menggunakan DNS. Ketiga fraksi lainnya menghasilkan zona bening yang baik. Fraksi P-I dan P-III membentuk zona bening yang terlihat jelas, dengan diameter berturut-turut 1,40 cm dan 1,10 cm. Tiga diantaranya membentuk zona bening pada zimogram penelitian sebelumnya dan kemungkinan terelusi pada keempat puncak pertama. Puncak kelima (P-V) tidak memiliki aktivitas; subunit protein pada puncak iniyang terdeteksi pada elektroforegram berukuran 18,59 kDa, dan di bawah 15 kDa. Protein yang terelusi pada masing-masing puncak belum diketahui karena belum dilakukan analisis lebih lanjut terhadap fraksi-fraksi tersebut.

Hasil penelitian sebelumnya mengindikasikan bahwa selain memiliki aktivitas glukanase, isolat *B. cepacia* E76 juga menunjukkan aktivitas kitinase (Suryadi *et al.*, 2014). Ketiga enzim tersebut diketahui sebagai enzim yang berperan penting dalam mekanisme *cell wall-degrading enzymes*. Hal ini berkaitan dengan sifat anti jamur dari *B. cepacia* E76 yang cukup baik dimana dalam beberapa pengujian sebelumnya isolat tersebut efektif terhadap jamur patogen *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Fusarium oxysporum*, dan *Colletotrichum gloeosporoides* (Suryadi *et al.*, 2014), sehingga penelitian ini perlu dilanjutkan dengan melakukan formulasi

bakteri berbahan enzim glukanolitik perombak dinding sel sebagai agen anti-jamur patogen tanaman.

## KESIMPULAN

$\beta$ -1,3-1,4-glukanase dari *B. cepacia* isolat E76 berhasil dipekatkan dan dimurnikan dengan menggunakan pengendapan amonium sulfat, dialisis dan kromatografi penukar ion. Enzim terendap dengan baik pada pemekatan 80% amonium sulfat dengan rendemen 11 kali. Tiga subunit (isozim) glukukanase yang terdeteksi pada isolat *B. cepacia* E76, yaitu subunit glukukanase dengan berbobot molekul 15 kDa yang terendap pada fraksi pemekatan amonium sulfat 20%, serta subunit 48 dan 55 kDa yang terendap pada fraksi pemekatan amonium sulfat 80%. Hasil fraksinasi dengan kromatografi penukar ion menghasilkan empat fraksi puncak dengan puncak ketiga pada elusi 250 mM memiliki rendemen tertinggi mencapai sekitar 33 kali. Ketiga subunit glukukanase memiliki aktivitas yang berbeda-beda, tetapi berdasarkan zimogram aktivitas yang paling kuat adalah subunit 48 kDa.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari DIPA BB Biogen Nomor 1798,009,001,011. Disampaikan penghargaan kepada Sdr. Siti Aminah, Jajang Kosasih dan Pamuji Adi Nugraha yang telah membantu dalam penyiapan dan pemeliharaan mikroba yang digunakan dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adams DJ.** 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* **150**, 2029-2035.
- Aono R, M Hammura, M Yamamoto and T Asano.** 1995. Isolation of extracellular 28 and 42 kilodalton  $\beta$ -1,3-glucanases and comparison of three  $\beta$ -1,3-glucanases produced by *Bacillus circulans* IAM1165. *Applied Environmental Microbiology* **61**, 122-129.
- Bayer EA, J Belaich, Y Shoham and R Lamed.** 2004. The cellulosomes: multienzyme machine for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* **58**, 521-554.
- Bevivino A, C Dalmastrri, S Tabacchioni and L Chiarini.** 2000. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biology and Fertility of Soils Journal* **31(3-4)**, 225-231.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **12**, 248-254.
- Blazina M, M Najdek, A Ruso and D Fuks.** 2010. Adaptational changes in cellular fatty acids of cultured bacteria as a response to tropic differences. *Acta Adriatica* **51**, 131-140.
- Bollag DM and SJ Edelstein.** 1991. *Protein Methods*, 415. Wiley Liss, New York.
- Celestino KRS, RB Cunha and CR Felix.** 2006. Characterization of a  $\beta$ -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and its potential for application in the brewing industry. *BioMed Central Biochemistry* **7**, 23-31.
- Chen JP and MS Lee.** 1994. Simultaneous production and partition of chitinase during growth of *Serratia marcescens* in an aqueous two-phase system. *Biotechnology Techniques* **8(11)**, 783-788.
- Doxey AC, MW Yaish, BA Moffatt, M Griffith and BJ McConkey.** 2007. Functional divergence in the *Arabidopsis*  $\beta$ -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression state. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1045-1055.
- Erfle JD and RM Teather.** 1991. Isolation and properties of a (1,3)- $\beta$ -D-glucanase from *Ruminococcus flavefaciens*. *Applied Environmental Microbiology* **57**, 122-129.
- Heungens K and JL Parke.** 2000. Zoospore homing and infection events: effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on two oomycete pathogen of pea (*Pisum sativum*). *Applied Environmental Microbiology* **66**, 5192-5200.
- Kang Y, R Carlson, W Tharpe and MA Schell.** 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Applied Environmental Microbiology* **64**, 3939-3947.
- Kobayashi DY and JD Palumbo.** 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: *Microbial Endophytes*. C.W. Bacon and J.F. White (eds.), 199-233. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Maheshwari DK, M Saraf and A Aeron.** 2013. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, 220-254. Springer, New York.
- Mendes R, AA Pizzirani-Kleiner, WL Araujo and JM Raaijmakers.** 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied Environmental Microbiology* **73**, 7259-7267.
- Miller GL.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31(2)**, 426-428.
- Monisha R, MV Uma and K Murthy.** 2009. Partial purification and characterization of *Bacillus pumilus* xylanase from soil source. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* **5**, 137-148.
- Nelson DL and MM Cox.** 2012. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 1100, sixth ed. WH Freeman and Company. New York
- Nishiyama Y, S Kuga and S Sato.** 2001. Role of the putative membrane-bound putative endo- $\beta$ -D-1,4-glucanase KOR-RIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* **42**, 251-263.
- Meyer JM, V Tran, A Stinzi, O Berge and G Winkelman.** 1995. Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia vietnamiensis* (formely *Pseudomonas cepacia*). *Biometals* **8**, 309-307.
- Shetty NP, JD Jensen, A Knudsen, C. Finnie, N Geshi, A Blenow, DB Collinge and HJL Jorgensen.** 2009. Effect of  $\beta$ -1,3-glucan from *Setoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4287-4300.
- Suryadi Y, TP Priyatno, IM Samudra, DN Susilowati, Patricia dan W Irawati.** 2013. Karakterisasi dan identifikasi isolat bakteri endofitik penghambat jamur patogen padi. *Buletin Plasma Nutfah* **19(1)**, 25-32.
- Suryadi Y, DN Susilowati, P Lestari, TP Priyatno, IM Samudra, N Hikmawati and NR Mubarik.** 2014. Characterization of bacterial isolates producing chitinase and glucanase for biocontrol of plant fungal pathogens. *Journal of Agricultural Technology* **10(4)**, 983-999.

- Strobel GA and B Daisy. 2003.** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Review* **67**(4), 63-68.
- Wood PJ and J Weisz. 1984.** Use of calceofluor in analysis of oat beta-D-glucan. *Cereal Chemistry* **6**,73-75
- Wolf N. 1991.** Complete nucleotide sequence of *Hordeum vulgare* gene encoding  $\beta$ -(1,3-1,4)-glucanase isoenzyme II. *Plant Physiology* **96**, 1382-1384.
- Wolf M, A Geczi, O Simon and R Borriss. 1995.** Genes encoding xylan and  $\beta$ -glucan hydrolising enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping, and construction of strains deficient in lichenase, cellulase, xylanase. *Microbiology* **141**, 281-290.
- Yang S, Y Qiaojuan, Z Jiang, G Fan and L Wang. 2008.** Biochemical characterization of a novel thermostable  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase from *Paecilomyces thermophila*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **56**, 5345-5351.
- Zeng YF, JH Ying, JC Ming, CP Chi, JTC Tzen and RL Je. 2009.** Simultaneous refolding, purification, and immobilization of recombinant *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4- $\beta$ -glucanase on artificial oil bodies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **84**, 1480-1485.
- Zverlov VV, K Fuchs and WH Swarz. 2002.** Chi18A, the endochitinase in the cellulosome of the thermophilic cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3176-3179.