

مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰

ISSN ۲۷۱۶-۹۸۰۴ الکترونیکی، ISSN ۲۷۱۷-۰۶۳۲ چاپی

شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته از نمونه متاژنومی شکمبه گاو



نوع مقاله: پژوهشی [20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8](https://doi.org/10.27170632.1400.14.4.5.8)

سید حسین موسوی^۱، شهره آریائی نژاد^{۲*} و سید قاسم حسینی سالکده^۳

۱- دانشجوی دکتری، بخش زیست شناسی سامانه ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استادیار، بخش زیست شناسی سامانه ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- استاد، بخش زیست شناسی سامانه ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

shariaee@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱

صفحه ۲۶-۱

چکیده

طیور مانند بسیاری از حیوانات از آنزیم ها برای هضم غذا استفاده می کنند. آنزیم ها مهمترین مواد افزودنی در صنعت تولید خوراک حیوانی محسوب شده و موجب بهبود هضم غذا می شوند. از سوی دیگر، پیش تیمار خوراک طیور با آنزیم زایلاناز موجب بالا رفتن ارزش غذایی و افزایش هضم غذا در سیستم گوارش حیوان می شود. در این مطالعه با استفاده از روش های محاسباتی بیوانفورماتیکی از داده های متاژنومی شکمبه گاو یک ژن مقاوم به حرارت زایلاناز با استفاده از نرم افزار TAXyl شناسایی و PersiXyn9 نامگذاری شد و به منظور تعیین کارکرد آنزیمی تحت بررسی های آزمایشگاهی قرار گرفت. ژن زایلاناز مورد نظر توسط پرایمرهای اختصاصی از دی.ان.ای متاژنومی جداسازی و در وکتور بیانی مناسب کلون شد و سپس بیان و خالص سازی آنزیم مذکور انجام شد. بررسی پارامترهای بیوشیمیایی در خصوص این آنزیم نشان داد که بهینه فعالیت آن در دمای ۵۰°C بوده و از طرفی pH بهینه فعالیت آن نیز ۶ است. شاخص های بیوشیمیایی Km و Vmax برای این آنزیم به ترتیب برابر ۱/۲۲ mg/ml و ۲۰۶/۷۸ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ محاسبه شد. تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از فعالیت این آنزیم بر روی خوراک طیور در دمای ۵۰°C کارایی بالای این آنزیم را به عنوان افزودنی در صنعت خوراک طیور نشان داد. واژه های کلیدی: متاژنوم، زایلاناز، خوراک طیور، هیدرولیز.

مقدمه

ترکیب اصلی تشکیل دهنده دیواره سلول های گیاهی لیگنوسلولز است و همان طوری که از نام آن برمی آید حاوی لیگنین (۲۰-۱۵ درصد)، همی سلولز (۳۰-۲۵ درصد) و سلولز (۵۰-۴۰ درصد) است (Gray et al. 2006; Singla et al. 2012). این اجزاء در کنار هم با کمک برهمکنش های کووالانسی و غیرکووالانسی کمپلکس سه بعدی ایجاد می کنند (Sánchez. 2009).

همی سلولز از زایلان تشکیل شده است که خود، یک هتروپلی ساکارید تشکیل شده از مونوساکاریدهایی مانند ال-آرابینوز، دی-گالاکتوز، دی مانوزها و ارگانیک اسیدهایی مانند استیک اسید، فرولیک اسید و باندهای استری است (Collins et al. 2005; Ahmed et al. 2007; Motta et al. 2013; Sharma 2017).

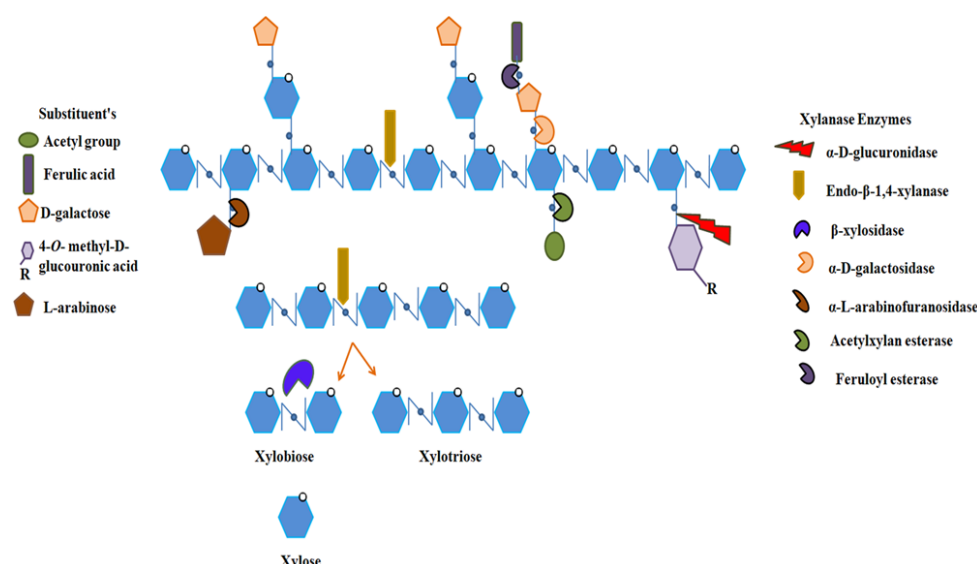
زایلان به آسانی در طبیعت یافت می شود و بعد از سلولز دومین پلی ساکارید فراوان در طبیعت است که ۳۳ درصد از کل زیست توده سلولزی موجود در جهان را تشکیل می دهد (Collins et al. 2005; Polizeli et al. 2005; Chávez et al. 2006; Walia et al. 2017). ساختار زایلان از اسکلت دی-زایلوز حاوی پیوندهای بتا ۱ و ۴

گلیکوزیدی و ال-آرابینوز با ساختار کمپلکس هتروپلیمریک تشکیل شده است. زایلان در زیست توده های مختلف و در شکل های گوناگونی یافت می شود. به عنوان مثال در نهاندانگان به شکل او-استیل-۴-او-متیل گلوکورونوزایلان (O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylan)، در بازدانگان به شکل آرابینو-۴-او-متیل گلوکورونوزایلان (arabino-4-O-methylglucuronoxylan) و در گیاهان علفی و یک ساله به شکل آرابینوزایلان (arabinoxylans) دیده می شود. این زیرواحدها می توانند با استیل، فرولیل (feruloyl)، گلوکوپیرانوزیل (glucopyranosyl)، ۴-او-متیل-گلوکورونوپیرانوزیل (O-methyl-d-glucuronopyranosyl)، پی کومارول (p-coumaroyl) یا گروه های زنجیره جانبی آلفا-ال-آرابینوفورانوزیل (α -l-arabinofuranosyl) با درجه های مختلفی جایگزین شوند. از نظر حلالیت، زایلان ها به دو شکل دیده می شوند: محلول در آب و نامحلول در آب. دو خانواده از آنزیم های زایلنازی در خوراک دام و طیور استفاده می شوند. GH10 که زایلان های محلول را هیدرولیز می کند و GH11 که زایلان های محلول و نامحلول را تجزیه می کند (Bhardwaj et al. 2019).

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته ..."

زیر واحدهای مونومری آن تجزیه می شود. زنجیره های جانبی استیل و فنولی توسط فعالیت آلفا گلوکورونوزیدازها و استیل زایلان استرازها هیدرولیز می شود. آلفا-ال آرابینوفورانوزیدازها (α -l-Arabinofuranosidases) تجزیه ی گروه های جانبی را کاتالیز می کنند. باندهای استری موجود در زایلان توسط فعالیت پی کوماریک استرازها (p-coumaric esterase) و فرولیک اسید استرازها شکسته می شود (Beg et al. 2001; Collins et al. 2005; Chakdar et al. 2016; Walia et al. 2017). شکل ۱ ساختار شماتیک زایلان و باندهای آن و همچنین آنزیم های زایلانازی مختلف به منظور تجزیه کامل زایلان به واحدهای مونومری آن را نشان می دهد (Beg et al. 2001).

آنزیم های زایلانازی نقش مهمی در شکستن ساختارهای پیچیده زایلان ایفا می کنند. بنابراین برای هیدرولیز کامل زایلان به قندهای تشکیل دهنده آن استفاده از آنزیم های مختلف که به طور اختصاصی پیوند مشخصی را هدف گیری می کنند، قابل توجه است. سیستم های زایلانازی چندکاره در باکتری ها (Zhang et al. 2016a, Driss et al. 2011; Bhardwaj et al. 2018) و اکتینومیسست ها (Hunt et al. 2016) وجود دارد که در آنها اسکلت زایلان به طور تصادفی توسط فعالیت اندو ۱ و ۴ بتادی زایلاناز ($\text{endo-1,4-}\beta\text{-d-xylanases}$) شکسته شده و از سوی دیگر پلیمر زایلوز توسط فعالیت بتادی زایلوزیداز ($\beta\text{-d xylosidases}$) به



شکل ۱- ساختار زایلان و باندهای آن و آنزیم های زایلانازی تجزیه کننده زایلان به واحدهای مونومری آن (Beg et al. 2001).

به منظور آزادسازی بیشترین مواد غذایی کپسوله شده در بذره‌های استفاده شده در خوراک طیور، آنزیم زایلاناز مختلف برای غلات گوناگون مورد نیاز است. برای مثال ۹۸ درصد از زایلان موجود در غلات نامحلول است. در این بین استفاده از آنزیم‌های کربوهیدرولازی به منظور افزایش هضم و بهبود کارایی رشد توجه زیادی را به خود جلب کرده است. اما بسیاری از آنزیم‌ها کارایی مناسبی از خود نشان نداده‌اند. بنابراین استفاده از نسل جدید آنزیم‌های هیدرولازی مقاوم با قابلیت کاربرد بر روی غلات مختلف امکان تجزیه سوبستراهای مختلف را فراهم کرده و در نتیجه افزایش شاخص‌های رشدی مانند ضریب تبدیل در طیور را به دنبال خواهد داشت (Bhardwaj et al. 2019).

دام و طیور در تامین مواد غذایی در جهان بسیار اهمیت دارند. در میان پرندگان، مرغ یکی از مهم‌ترین مواد غذایی انسان بوده و از طریق گوشت و تخم مرغ، پروتئین و املاح با کیفیت بالاتری را نسبت به غذاهای گیاهی در اختیار انسان می‌گذارد. خوراک طیور به عنوان نهاده اصلی در تولید، بین ۷۰ الی ۷۵ درصد از کل هزینه تولید را شامل می‌شود (Raza et al. 2019). بخش عمده خوراک طیور مرکب از دانه‌های غلات مانند ذرت،

سویا، گندم، سورگوم و پروتئین‌های گیاهی است که منبع اصلی تامین انرژی و رشد پرنده است. غلات مقرون به صرفه‌تر مانند جو، جو دوسر، تریتیکاله، چاودار، زیتون و آفتابگردان نقش مهمی در جایگزینی با ذرت، گندم و سویا دارند اما حاوی فاکتورهای ضد تغذیه‌ای هستند که کارایی رشد و سلامت روده پرنده را تحت تاثیر قرار می‌دهد. غلات دارای مقادیر مختلفی از مواد با ارزش تغذیه‌ای کمتر مانند پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای (Non-starch polysaccharides (NSP)) هستند که اغلب نقش ساختمانی دارند و در دیواره سلول‌های گیاهی یافت می‌شوند. میزان NSP که از آن به عنوان فیبر هم یاد می‌شود به طور معمول با توجه به نوع غلات و بقولات استفاده شده در جیره غذایی متفاوت بوده و نسبت عکس با سطح انرژی آن دارند. به عنوان مثال، جیره‌های غذایی متشکل از ذرت-سویا دارای NSP اندکی هستند و دارای قابلیت هضم بالایی هستند. برعکس، جیره حاوی گندم دارای فیبر بالاتری است. بالا بودن میزان فیبر در اقلام جیره باعث می‌شود تا مرغ خوراک بیشتری مصرف کند، ضریب تبدیل خوراک کاهش یابد و از بازده آن کاسته شود (Al-Harhi. 2017; Teymouri et al. 2018; Waititu et al. 2018).

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته ..."

ویسکوزیته روده شده که این موضوع حرکت مواد غذایی در سیستم گوارشی و جذب مواد غذایی را کاهش می دهد. در نتیجه این نقص بر روی سلامتی مرغ اثر گذاشته و هزینه تولید را افزایش می دهد (Kaldhusdal. 2000).

در ادامه مواردی از فواید استفاده از آنزیم ها در خوراک طیور آورده شده است. ۱- افزایش کارایی و کاهش هزینه، این آنزیم ها با کاهش اثرات ضد تغذیه ای موجب می شود که عمل هضم بسیار بیشتر انجام شود و در نتیجه گوشت و تخم بیشتری به ازای هر کیلو گرم غذای مصرفی حاصل خواهد شد و به اصطلاح ضریب تبدیل افزایش پیدا می کند. ۲- اثرات زیست محیطی بهتر، بهبود هضم و جذب مواد غذایی موجب کاهش مدفوع حیوان شده و همچنین دفع فسفر و نیتروژن را کاهش می دهد. ۳- بهبود پایداری، کاهش تنوع غذایی در محتویات خوراک طیور، پایداری غذایی بیشتری را به همراه داشته که این خود موجب رشد یکنواخت حیوان و تولید تخم می شود. ۴- کمک به حفظ و نگهداری سلامت سیستم گوارشی، با بهبود هضم مواد غذایی، مواد کمتری در سیستم گوارشی حیوان باقی مانده که این موضوع پتانسیل رشد باکتری های مولد بیماری را کاهش می دهد (Raza et al. 2019; Olgun O.)

همه حیوانات از آنزیم ها به منظور هضم غذا استفاده می کنند. این آنزیم ها یا توسط سلول های خود این حیوانات و یا توسط میکروب های موجود در سیستم گوارش آنها تولید می شود. به دلیل فقدان یا کمبود آنزیم های ضروری کربوهیدراتازی در روده طیور، ترکیبات NSP غیر قابل هضم بوده که در نهایت باعث افزایش ویسکوزیته روده و کاهش قدرت جذب مواد غذایی می شود. ترکیبات NSP حتی می توانند در هضم دیگر مواد مغذی موجود در جیره اختلال ایجاد کنند. به دنبال آن، این مواد غیر نشاسته ای ممکن است با القا رقابت بین فلور میکروبی روده جهت جذب ترکیبات غذایی با هضم آسان، باعث افزایش احتمال انواع عفونت های میکروبی شوند. پلی ساکاریدهای غیر نشاسته ای محلول و نامحلول، یکی از عوامل ضد تغذیه ای بوده که به مقدار زیاد در غلاتی مانند: گندم، جو، آفتاب گردان و کانولا موجود است که به دلیل نبود آنزیم های مورد نیاز توسط پرندگان قابل تجزیه نیست. عدم وجود آنزیم هایی که بتواند فیبرهایی (کربوهیدرات های ساختاری یا ترکیبات غیر قابل هضمی که دیواره سلول گیاهی را تشکیل داده اند) شامل پلی ساکاریدهای غیر نشاسته ای محلول با وزن مولکولی بالا را تجزیه کند، موجب افزایش

- 2018). رویکرد متاژنومی به عنوان روشی نوین به منظور جستجو برای آنزیم‌های جدید با قابلیت استفاده در صنایع وابسته به آنزیم، محدودیت‌های ناشی از روش‌های وابسته به کشت را برطرف کرده و فرصتی را جهت کشف آنزیم‌های جدید از میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت فراهم می‌کند. غربالگری کتابخانه‌های متاژنومی حاوی آنزیم‌های زایلاناز منجر به شناسایی آنزیم‌های زایلاناز مقاوم به حرارت شده است. نمونه‌های دی.ان.ای محیطی استخراج شده از محیط‌های مختلف مانند سیستم گوارشی حشرات و حیوانات، آب‌های زاید مانند فاضلاب‌های صنعتی، نمونه‌های چشمه‌های آب گرم و محیط‌های داغ، چینه‌دان مرغ و دهانه آتشفشان‌ها مانند آتشفشان آواچینسکی به عنوان منابع آنزیم زایلاناز معرفی شده‌اند (Mientus et al. 2013).
- زایلاناز برگرفته از متاژنوم چینه‌دان مرغ جهت فعالیت به غلظت‌های بالایی از نمک و حلال‌های آلی نیاز دارد (Darkazali et al. 2017). علاوه بر این، پیشنهاد شده است که درصد بالایی از خوراک طیور حاوی پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای مانند زایلان و آرابینو زایلان است، بنابراین میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت تجزیه این پلی‌ساکاریدها در روده مرغ بایستی فراوان باشند (Mead et al. 1989). در یک مطالعه، یک ژن رمزکننده اندوزایلاناز *GH11* مقاوم به حرارت و شرایط قلیایی از طریق غربالگری متاژنومی کاربردی نمونه‌های کمپوست خاک شناسایی شد. این زایلاناز نو ترکیب با طول ۱۰۷۷ نوکلئوتید قابلیت فعالیت در دمای 80°C و pH برابر ۹ را داشت (Verma et al. 2013).
- در پژوهش بعدی خاصیت مقاومت حرارتی این آنزیم توسط افزودن اسید آمینه آرژنین به جای اسید آمینه‌های سرین/ترئونین در صفحات بتا مهندسی شد (Verma and Satyanarayana, 2013). همچنین زایلاناز جدا شده از متاژنوم آتشفشان تا دمای 95°C فعال بوده و نیمه عمر ۲۲ ساعت در 85°C را نشان داده است (Mientus et al. 2013).
- به طور مشابه، بیان ژن زایلاناز *xy17* مربوط به سیستم گوارش موریانه در *Escherichia coli* مقاومت دمایی بالاتری نشان داد و همچنین دمای بهینه آن 10°C بالاتر بوده و از طرف دیگر در محدوده گسترده‌ای از pH بین ۵/۵-۱۰ فعال بود (Qian et al. 2015). از طرف دیگر در پژوهشی توسط Ming-Zhe در سال ۲۰۱۵، از دی.ان.ای متاژنومی مدفوع گاو یک آنزیم زایلاناز جدا، کلون و در *Bacillus megaterium* بیان شد. دما و pH

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته ..."

شاهد مشاهده کردند. از طرف دیگر، Babalola و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشاهده کردند که جیره ای که حاوی زایلاناز است، جذب نیتروژن و فیبر توسط پرند در آنها بیشتر است (Babalola et al. 2006).

آنزیم های زایلاناز مشتق شده از میکروارگانیسم های پایدار حرارتی و البته ساکن در محیط های غنی از گیاه به عنوان بهترین گزینه جهت استفاده در صنعت خوراک طیور محسوب می شوند. خاصیت پایداری حرارتی ذاتی این آنزیم ها به آنها توانایی تحمل دماهای بالا را می دهد چرا که فرآوری و عمل آوری نهایی پلیت های خوراک طیور در درجه حرارت های بالا انجام می شود و ساختار آنزیم زایلاناز پایدار حرارتی در این شرایط از بین نرفته و همچنان فعال است. از طرف دیگر باکتری های حاوی این نوع از آنزیم ها جهت تجزیه بقایای گیاهی تکامل یافته اند و در صورت تحمل دماهای بالا فعالیت بسیار بالایی نیز از خود نشان می دهند (Basit et al. 2018).

با توجه به بررسی های به عمل آمده در خصوص اهمیت و کاربرد آنزیم زایلاناز پایدار حرارتی در خوراک طیور و همچنین با توجه به اینکه تقریباً اکثر آنزیم های مورد استفاده در

بهینه برای این آنزیم زایلاناز نو ترکیب به ترتیب برابر 75°C و ۹ بود. آنزیم های زایلانازی مقاوم به حرارت برگرفته از باکتری ها و قارچ ها کاربردهای فراوانی در خوراک انسان، خوراک دام، صنایع کاغذسازی و شوینده و همچنین تبدیل بیولوژیکی لیگنوسلولزها داشته و حجم برآورد شده بازار سالیانه آنها برابر با ۵۰۰ میلیون دلار امریکا است (Chanda et al. 2019). تاکنون، آنزیم های زایلانازی متعددی در شرکت های مختلفی در دنیا تجاری شده اند که برخی از آنها در خوراک طیور هم کاربرد دارند و از آنها می توان به آنزیم Avizyme شرکت Dupont، آنزیم Xylamax® شرکت BioResource International، آنزیم Belfeed B1100 شرکت Agrimex و آنزیم Nutri Ultra Biologics شرکت Xylanase Enzyme اشاره کرد (Chakdar et al. 2016). در طول ۳۰ سال گذشته صنعت طیور به طور پژوهشی و یا کاربردی از آنزیم ها در خوراک طیور استفاده کرده است (Ugwuanyi. 2016). در پژوهشی توسط Café و همکاران در سال ۲۰۰۲ از یک کمپلکس چند آنزیمی تجاری (Avizyme) حاوی آنزیم های زایلاناز، پروتئاز و آمیلاز در خوراک طیور استفاده کردند و در مرغ ها افزایش وزن، کاهش مرگ و میر و مقدار بیشتر انرژی خالص در مقایسه با گروه

مواد و روش‌ها

شناسایی محاسباتی، جداسازی، کلونینگ و بیان آنزیم زایلاناز *PersiXyn9* مربوط به متاژنوم شکمبه گاو

پس از توالی‌یابی و آنالیز متاژنومی دی.ان.ای خالص‌شده از باکتری‌های مربوط به شکمبه گاو تعداد بسیار زیادی ژن زایلاناز در داده‌های ژنتیکی آنالیز شده مشخص شد (Gharechahi et al. 2021).

از طرفی با توجه به اهمیت مقاومت حرارتی آنزیم‌های زایلاناز تجاری، جهت غربالگری توالی‌های زایلاناز مقاوم به حرارت، توالی‌های نوکلئوتیدی زایلانازها به پایگاه اطلاعاتی TAXyl (Thermal activity prediction for xylanase) (Shahraki et al. 2019) داده شد و چندین ژن پایدار حرارتی توسط این پایگاه اطلاعاتی مورد آنالیز قرار گرفت و در نهایت از میان آنها ژن *PersiXyn9* جهت بررسی‌های بیشتر آزمایشگاهی انتخاب شد. به منظور جداسازی کامل توالی نوکلئوتیدی ژن *PersiXyn9* از دی.ان.ای کامل متاژنومی شکمبه، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 توالی آغازگر رفت 5'-TGATAGGGATCCATGAATGAATGGGA-3' و توالی آغازگر برگشت 5'-

خوراک طیور از جمله زایلاناز وارداتی هستند، این پژوهش جهت شناسایی و کشف آنزیم زایلانازی پایدار حرارتی از نمونه‌های متاژنوم شکمبه گاو با قابلیت کاربرد در خوراک طیور انجام شد.

در ابتدا از تعداد بسیار زیاد آنزیم زایلاناز شناسایی‌شده در نمونه متاژنومی توالی‌یابی‌شده یک مورد با نام *PersiXyn9* با استفاده از نرم‌افزار TAXyl انتخاب شد. پس از کلون، بیان و خالص‌سازی آنزیم مورد نظر، جهت بررسی عملکرد این آنزیم بر روی خوراک طیور خواص بیوشیمیایی آن و همچنین عملکرد آن در تجزیه خوراک طیور در دما و pH بهینه آنزیم بررسی شد. خواص بیوشیمیایی آنزیم *PersiXyn9* مانند فعالیت در دماهای بالای ۵۰°C و همچنین نزدیک بودن pH بهینه فعالیت این آنزیم با pH موجود سیستم گوارش مرغ می‌تواند نشان‌دهنده قابلیت این آنزیم برای کاربرد در صنعت خوراک طیور باشد.

همچنین با توجه به اینکه منبع جداسازی این ژن از ژنوم باکتری‌های همزیست با سیستم گوارش گاو است و اینکه سیستم گوارش این حیوان به طور کارا عمل هضم خوراک گیاهی را انجام می‌دهد می‌تواند پیش‌بینی‌کننده فعالیت مطلوب این آنزیم بر روی خوراک طیور نیز باشد.

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زیالاناز برگرفته ..."

افزایش راندمان کلونینگ نهایی، ژن استخراج شده از ژل در وکتور خطی pTZ57/RT با سیستم کلونینگ T/A کلون شد و کلون های مثبت با سیستم Cloning-PCR مشخص شدند. سپس بر روی وکتور نو ترکیب برش دو آنزیمی با آنزیم های برشی *BamHI* و *Sall* گذاشته شد.

محدوده باند حدود 1 kb از ژل با تیغ بریده شده و ریکاوری ژن هدف از ژل با کیت انجام شد. در نهایت قطعه خالص شده در وکتور pET-28a با سر و ته سازگار از نظر آنزیم های برشی کلون شد. صحت کلونینگ در وکتور بیانی توسط سیستم Cloning-PCR و سپس برش دو آنزیمی مشخص شد. وکتور نو ترکیب pET-28a+ PersiXyn9 با روش شوک حرارتی در باکتری *E. coli* سویه BL21 وارد شد و کلون های مثبت پس از ۱۸ ساعت بر روی محیط LB-Agar حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین ظاهر شدند. جهت بیان پروتئین هدف در مقیاس زیاد، پس از بررسی بیان اولیه یک تک کلون از روی پتری حاوی آنتی بیوتیک برداشته شد و در ۱۰ میلی لیتر محیط LB-Broth حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت شد.

صبح روز بعد ۱۰ میلی لیتر از کشت باکتری به ۲۵۰ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک

TGATAGGTCGACTCAGCGTATACTACT
'3-GAATC طراحی شد.

جایگاه های آنزیم های برشی *BamHI* و *Sall* به ترتیب در آغازگرهای رفت و برگشت تعبیه شد. برنامه گرادیانت PCR جهت جداسازی ژن *PersiXyn9* از دی.ان.ای متاژنومی شکمبه گاو و با دستگاه ترموسایکلر شرکت BioRad انجام شد. واسرشت سازی اولیه دی.ان.ای کامل در دمای ۹۵°C و به مدت ۵ دقیقه به میزان یک چرخه، ۱۰ چرخه تکثیر ۹۰°C به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال (گرادیانت) ۵۰°C تا ۶۰°C به مدت ۴۰ ثانیه و طویل سازی دی.ان.ای در ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و در ادامه ۳۵ چرخه به شکل ۹۵°C به مدت ۴۰ ثانیه، در دمای ۵۴°C به مدت ۴۰ ثانیه و طویل سازی ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه ۷۲°C به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر انجام شد.

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد برده شد و سپس محدوده ژل آگارز حاوی باند حدود 1 kb با تیغ جراحی استریل بریده شد و خالص سازی باند ژن هدف با استفاده از کیت GeneJET Gel Extraction Kit شرکت Thermo Scientific انجام شد. جهت افزایش دقت، بررسی صحت جایگاه های برشی تعبیه شده در آغازگرها و

کانامایسین ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) منتقل شد و پس از رسیدن OD600 به ۰/۸، القاء بیان پروتئین PersiXyn9 توسط ماده شیمیایی IPTG با غلظت نهایی ۰/۵ mM و دمای 25°C و به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. خالص سازی پروتئین PersiXyn9 با کیت Ni-NTA Fast start kit شرکت کیاژن و طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. کمیت و کیفیت پروتئین خالص شده بر روی ژل SDS-PAGE با ژل سیستم رنگ آمیزی کوماسی بلو مشخص شد.

زایلاناز هیدرولیز شده و قندی به نام زایلوز ایجاد می شود که می تواند دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) را تبدیل به ماده ای با رنگ قهوه ای روشن کند. رابطه ای خطی بین میزان قند تولید شده از هیدرولیز و شدت رنگ تولیدی وجود دارد. بنابراین فعالیت آنزیم زایلاناز در محلول واکنش را می توان توسط سنجش میزان رنگ محلول به روش اسپکتروفتومتری تعیین کرد. یک واحد آنزیمی (Unit) مقدار آنزیمی است که در مدت زمان ۱ دقیقه ۱ میکرومول محصول تولید کند (رابطه ۱) (Bradford. 1976).

آزمون تعیین فعالیت آنزیم زایلاناز PersiXyn9 جهت آزمون تعیین فعالیت ابتدا آنزیم زایلاناز PersiXyn9 همراه با زایلان در بافر فسفات

آزمون تعیین فعالیت آنزیم زایلاناز PersiXyn9

جهت آزمون تعیین فعالیت ابتدا آنزیم زایلاناز PersiXyn9 همراه با زایلان در بافر فسفات

$$\frac{\text{Units}}{\text{mL}} = \frac{\text{Xylose librated } (\mu\text{mol}) * \text{Dilution factor}}{\text{Incubation time (min)} * \text{assay volium}}$$

رابطه ۱

(Bradford. 1976)

تهیه شد (شکل ۲ و ۳).

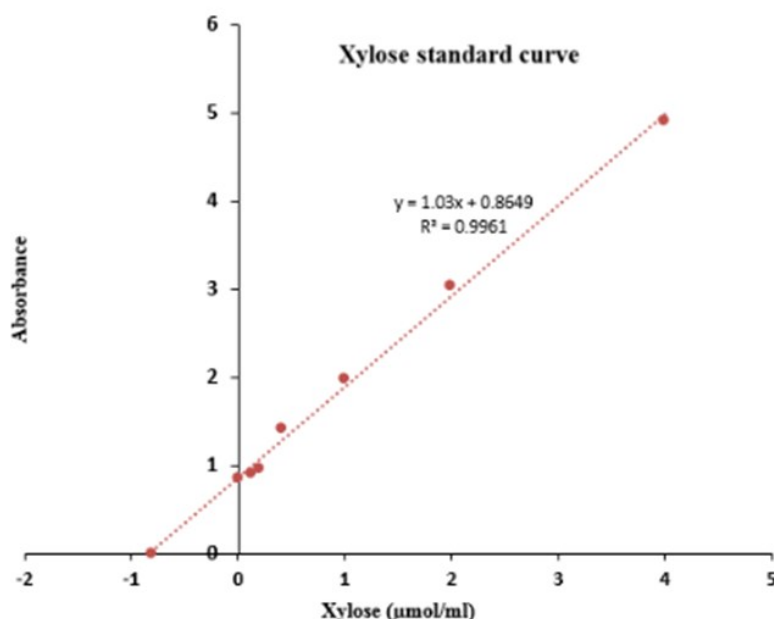
بنابراین ابتدا یک منحنی استاندارد برای میزان

قند تولیدی و جذب ایجاد شده از واکنش با DNS



شکل ۲- طیف رنگ ایجاد شده در اثر سریال رقت آنزیم

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته ..."



شکل ۳- منحنی استاندارد زایلوز: ثبت جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر بر حسب سریال رقت زایلوز

مقدار جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد.

جهت حذف پاسخ زمینه کنترل منفی، ۶۰ میکرولیتر زایلان به ۲۰ میکرولیتر آنزیم افزوده و ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده و سپس ۱۸۰ میکرولیتر معرف رنگی DNS اضافه شد. پارامترهای نشان داد شده در جدول شامل ΔA_{540} برابر اختلاف جذب خوانده شد.

برای محاسبه زایلوز آزاد شده ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$) از جای گذاری در معادله $y = 1.03x + 0.86$ نشان داده شده در شکل ۳ استفاده شد.

فعالیت آنزیم ($\text{Units} \cdot \text{ml}^{-1}$) با توجه به رابطه ۲ محاسبه شد (Bailey et al. 1992).

اندازه گیری دما و PH مناسب فعالیت آنزیم PersiXyn9

سنجش دمای بهینه برای فعالیت آنزیمی PersiXyn9 به این صورت انجام شد که ۶۰ میکرولیتر زایلان (beechwood xylan) یک درصد به عنوان سوبسترای آنزیم به ۲۰ میکرولیتر آنزیم در بافر فسفات (pH= 6، ۵۰ mM) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دماهایی ۷۰، ۶۰، ۵۰، ۴۰، ۳۰ و ۸۰ درجه سلیسیوس قرار گرفت (Bailey et al. 1992).

سپس برای توقف واکنش و سنجش میزان قند تولیدی ۱۸۰ میکرولیتر معرف رنگی DNS اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای 100°C قرار داده شد.

$$\frac{\text{Units}}{\text{mg}} = \frac{\text{Units/ml}}{\text{protein (mg)}}$$

رابطه ۲

(Bailey et al. 1992)

نتایج

پیشینی بیوانفورماتیکی ساختار سه بعدی آنزیم

PersiXyn9

ساختار سه بعدی پیش بینی شده برای PersiXyn9 در شکل ۴ نشان داده شده است. مشابه ترین ساختار در PDB که در Phyre2 به عنوان الگوی اولیه استفاده شد مربوط به یک زایلاناز برگرفته از باکتری *Cellvibrio Japonicus* با رمز PDB (1us2) و با درصد همپوشانی ۹۵ درصد بود.

پیشگویی ساختار در وب سرویس PROSITE نشان داد که این آنزیم با دو جایگاه فعال حاوی دو اسید آمینه گلوتامیک اسید در موقعیت ۱۵۰ و ۲۵۷ به ترتیب به عنوان جایگاه دهنده پروتون و نوکلئوفیل در زایلانازهای خانواده GH10 رایج است.

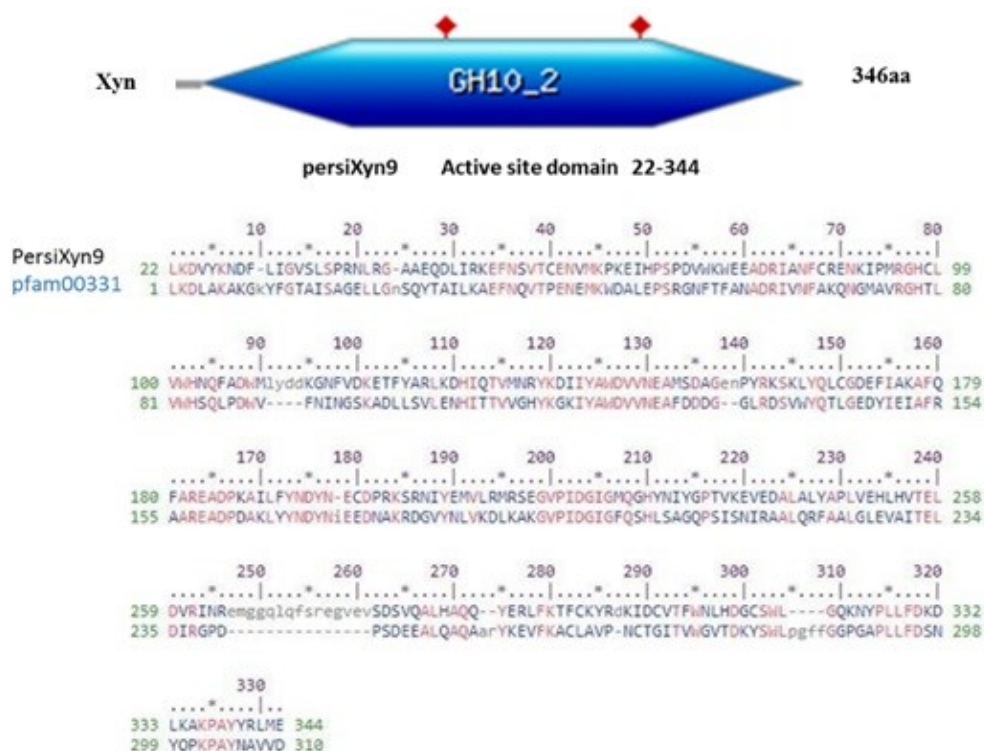
در شکل ۴ ساختار سه بعدی PersiXyn9 شامل جایگاه های فعال و دُمین فعال که با نرم افزار EzMol مشخص شده است (Marchler-Bauer et al. 2017).

تعیین pH اپتیمم فعالیت آنزیمی به این صورت انجام شد که آنزیم PersiXyn9 در مجاورت سوبسترای زایلان و در بافرهای سدیم سیترات (pH= 4-5)، پتاسیم فسفات (pH= 6-8) و کربنات-بیکربنات (pH= 9) در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس قرار گرفت. فعالیت آنزیم زایلاناز در pHهای ذکر شده با استفاده از روش DNS انجام شد و فعالیت نسبی آنزیمی به طور درصد بیان شد.

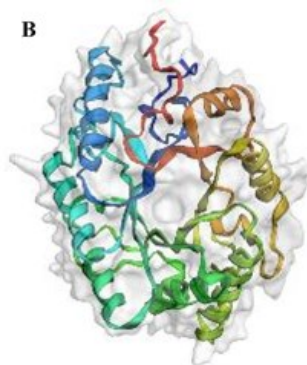
آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (scanning electron microscope: SEM)

تغییرات مورفولوژیکی خوراک طیور در طول فرآیند تخمیر فاز جامد (solid-state fermentation: SSF) و در حضور آنزیم زایلاناز توسط SEM مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های تیمار شده و کنترل (بدون کوکتل آنزیمی) با دستگاه خشک کن انجمادی (lyophilizer) به مدت ۲۴ ساعت خشک شد و تغییر ساختاری آنها با استفاده از SEM (FEI Quanta 200, USA) در ولتاژ ۱۵ کیلوولت بررسی شد.

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زیالاناز برگرفته ..."



B



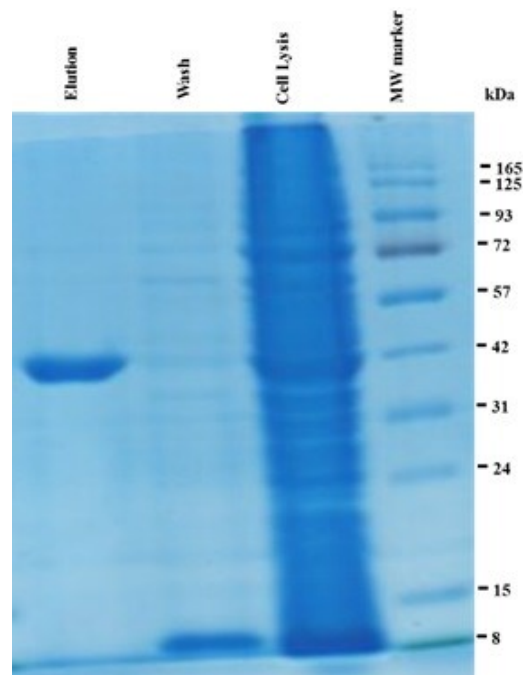
شکل ۴- (A) تعیین دُمین و جایگاه های فعال آنزیمی توسط نرم افزار (B) PROSITE. ساختار سه بعدی PersiXyn9 با استفاده از فایل PDB و پیشگویی ساختار آنزیم و ترسیم شکل به وسیله نرم افزار EzMol انجام شد.

دی.ان.ای متاژنومی این نمونه ها در خارج از کشور توسط دستگاه Illumina HiSeq 2500 system انجام گرفت. آنالیز و چینش داده های خام

کلونینگ، بیان و خالص سازی آنزیم PersiXyn9 به منظور شناسایی آنزیمی از نمونه آب شکمبه گاو، دی.ان.ای متاژنومی استخراج و توالی یابی

شرایط دمایی جهت القاء ابتدا بررسی بیان ژن زایلاناز هدف در حجم‌های ۱۰ میلی‌لیتر انجام شد که بهترین دما و زمان و غلظت IPTG برای ژن زایلاناز به ترتیب 25°C ، ۱۸ ساعت و ۰/۵ mM به دست آمد. بیان ژن موردنظر در حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر و در شرایط بهینه شده دما، زمان و غلظت IPTG انجام شد. خالص‌سازی پروتئین PersiXyn9 با استفاده از کیت خالص‌سازی پروتئین شرکت کیاژن انجام شد و نتایج بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده شد (شکل ۵).

با استفاده از نرم‌افزار Megahit انجام شد (Gharechahi et al. 2021). جهت شناسایی ژن‌های زایلاناز مقاوم به حرارت با روش محاسباتی از سرور TAXyl استفاده شد (Shahraki et al. 2019) و چندین ژن زایلاناز مقاوم به حرارت توسط این نرم‌افزار معرفی شد. این نرم‌افزار قابلیت شناسایی ژن‌های زایلاناز پایدار حرارتی مقاوم به حرارت را دارد. از میان ژن‌های زایلاناز معرفی شده ژن PersiXyn9 جهت آنالیز بیشتر انتخاب شد. جهت آگاهی از بهترین



شکل ۵- تصویر SDS-PAGE مربوط به پروتئین خالص شده PersiXyn9.

هدف برابر ۵۰ kDa تخمین زده شد. OK235706، شماره اکسشن بانک ژن (GenBank accession

با استفاده از مارکر پروتئینی و آنالیز بیوانفورماتیکی وزن مولکولی پروتئین زایلاناز

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته ..."

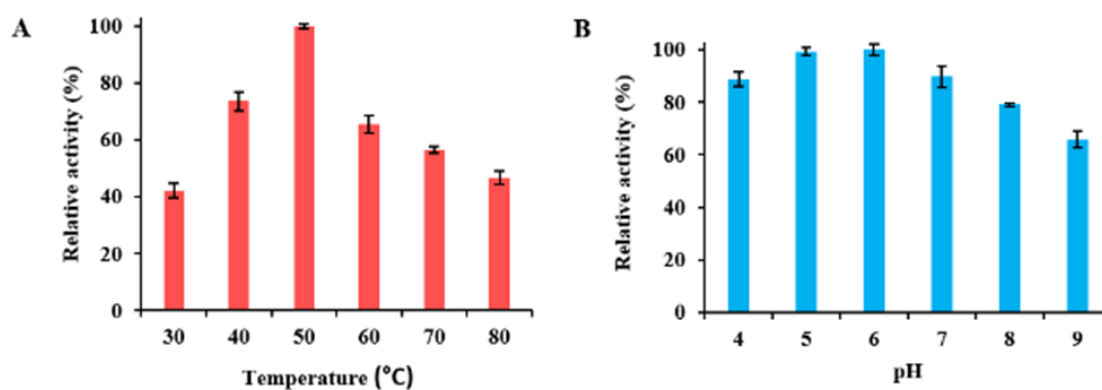
۸۰°C فعالیت به حدود ۴۶ درصد نزول کرد. همچنین همانطوری که در شکل ۶ مشاهده می شود در خصوص pH بهینه فعالیت آنزیم PersiXyn9 نتایج به این شرح بود که بیشترین فعالیت (۱۰۰ درصد) این آنزیم در pH برابر ۶ مشاهده شد و این آنزیم در pH های ۴ و ۹ به ترتیب فعالیتی برابر ۸۸ و ۶۵ درصد از خود نشان داد. مشاهدات و بررسی های کینتیکی نشان داد که این آنزیم از شاخص های کینتیکی میکائیلیس-منتون پیروی می کند. نتایج نشان داد که شاخص های بیوشیمیایی Km و Vmax برای آنزیم PersiXyn9 به ترتیب برابر ۱/۲۲۹ mg/ml و ۲۰۶/۷۸ $\mu\text{mol}/\text{mg}.\text{min}$ بود.

(number) ژن PersiXyn9 در پایگاه داده NCBI است.

مشخص کردن فعالیت آنزیم PersiXyn9 و

آشکارسازی شاخصه های سینتیکی

با اندازه گیری میزان قند آزاد شده از هیدرولیز زایلان و رسم نمودار استاندارد زایلوز مشخص شد که آنزیم زایلاناز PersiXyn9 در طیف گسترده ای از دما و pH فعالیت قابل توجهی از خود نشان می دهد. همانطوری که در شکل ۶ مشاهده می شود این آنزیم بیشترین فعالیت را در دمای ۵۰°C داشت. لازم به ذکر است از دمای ۳۰°C تا ۵۰°C شاهد سیر افزایش فعالیت به شکل تصاعدی بود به طوری که در دمای ۵۰°C، حدود ۱۰۰ درصد فعالیت مشاهده شد و با اعمال دمای



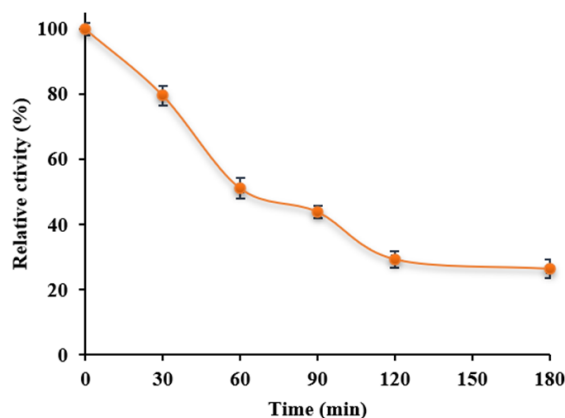
شکل ۶- دما (A) و pH بهینه فعالیت آنزیم PersiXyn9.

شد که سوبسترا در دمای ۵۰°C با آنزیم تیمار شد و در طول سه ساعت، هر ۳۰ دقیقه فعالیت نسبی

جهت تعیین میزان پایداری آنزیم PersiXyn9 در دمای بهینه فعالیت (۵۰°C) به این صورت عمل

فعالیت در دمای 50°C ، ۲۶ درصد فعالیت نسبی خود را حفظ کرده است (شکل ۷).

آنزیم در دمای 50°C اندازه گیری شد و در نهایت مشخص شد که آنزیم پس از گذشت سه ساعت



شکل ۷ - پایداری فعالیت آنزیم در دمای 50°C درجه سلیسیوس و به مدت ۳ ساعت.

و با سطوح محدب را نشان داد (شکل ۸). اضافه کردن آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت به سوسپانسیون در حال تخمیر، موجب تغییر در ساختار سوبسترا شد. همانطوری که در شکل ۸ نشان داده شده است آرایش اولیه ساختار خوراک طیور از بین رفته و حفره های بزرگ و بلوک های متخلخل ایجاد شده است. این موضوع نشان دهنده این است که ساختار سطحی خوراک طیور در طول تخمیر و با فعالیت آنزیم PersiXyn9 تخریب شده است. فرآیندی که در نتیجه آن ترکیبات فنولی آزاد شده و موجب افزایش خواص تغذیه ای می شود.

بررسی های SEM بر روی تغییرات ساختاری خوراک طیور

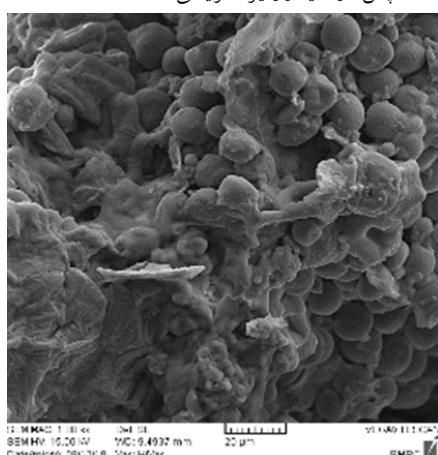
جهت بررسی اثرات ساختاری آنزیم PersiXyn9 از خوراک طیور شرکت نیکان دام آروین استفاده شد (جدول ۱). میزان ذرت و سویا موجود در این خوراک به ترتیب ۶۱/۴ و ۳۴ درصد بود همچنین کلیه مواد تشکیل دهنده آن در جدول یک آمده است. خوراک طیور تهیه شده در قالب تخمیر جامد تحت اثر آنزیم PersiXyn9 قرار گرفت. بررسی تغییرات ساختاری خوراک طیور قبل و بعد از تیمار با آنزیم زایلاناز توسط SEM بررسی شد (شکل ۸). تصویر SEM نمونه های تیمار نشده (شاهد) گرانول های کروی فشرده و دست نخورده

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته ..."

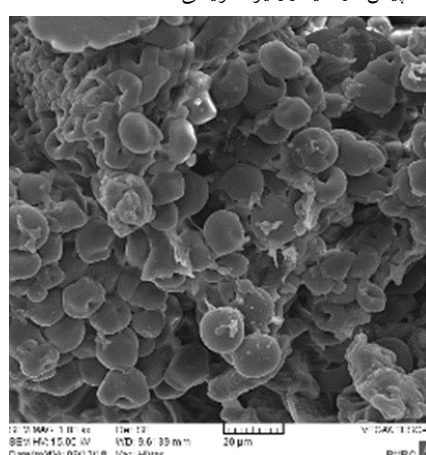
جدول ۱- ترکیب خوراک طیور و ترکیبات مغذی خوراک تهیه شده از شرکت نیکان دام آروین.

عناصر تشکیل دهنده	کیلوگرم در یک تن خوراک
ذرت	۶۱۴
سویا	۳۴۰
روغن	۱۰
کربنات کلسیم	۶
کنستانتره	۳۰
جمع	۱۰۰۰
ترکیب مواد مغذی	آزمایشگاهی
انرژی (kcal/kg)	۰/۹۱
پروتئین (%)	۱۵
کلسیم (%)	۷/۷
فسفر کل (%)	۶/۵۸
فسفر در دسترس (%)	۵/۸۶
سدیم (%)	۵/۱۹
کولین (%)	۱۰
لیزین (%)	۴/۷۸
متیونین (%)	۱۲/۱۱
سیستین (%)	۰/۰۲
متیونین + سیستین (%)	۱۲/۱۳
ترئونین (%)	۰/۰۷
تریپتوفان (%)	۰/۰۲۴

(B) پس از هیدرولیز آنزیمی



(A) پیش از هیدرولیز آنزیمی

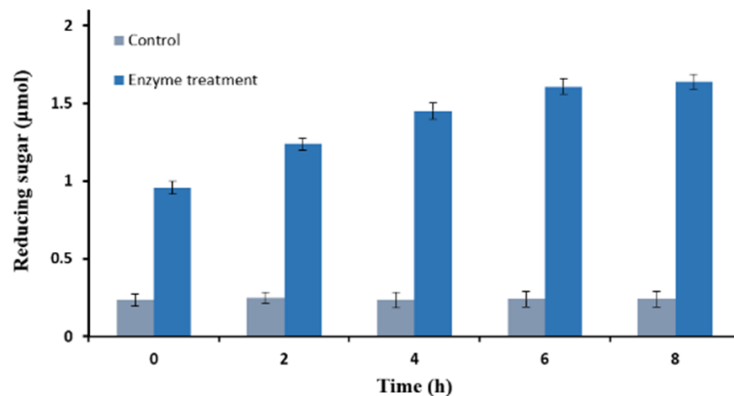


شکل ۸- بررسی تغییرات هیدرولیز ساختاری خوراک طیور پیش (A) و پس (B) از تیمار با آنزیم PersiXyn9 توسط SEM.

هیدرولیز خوراک طیور

آنزیم‌های زایلاناز با قابلیت استفاده در صنعت بایستی توانایی مقاومت در شرایط سخت مانند محیط‌های اسیدی/قلیایی و دماهای بالا را داشته باشند. اگرچه آنزیم‌های قلیایی برای صنایع آب میوه‌گیری و شوینده مناسب است اما زایلاناز مناسب برای استفاده در خوراک طیور بایستی در شرایط pH اسیدی تا خنثی فعالیت کند. بنابراین

تحمل آنزیم به دماهای بالا و pH دو فاکتور اساسی و مهم در انتخاب آنزیم به منظور استفاده در خوراک طیور می باشد (Chadha et al. 2019). همانطوری که در شکل ۹ نشان داده شده است قند آزاد شده از خوراک طیور در اثر تیمار با آنزیم PersiXyn9 و در دمای ۵۰°C در طول ۸ ساعت روند افزایشی داشته و پس از ۸ ساعت میزان قند آزاد شده برابر ۱/۶۴ میکرومول بود.



شکل ۹- میزان قند آزاد شده از هیدرولیز خوراک طیور توسط آنزیم PersiXyn9 طی ۸ ساعت و در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس.

بحث

در نیم قرن اخیر طیف وسیعی از آنزیم‌ها به منظور استفاده در زیست‌شناسی مولکولی، پزشکی، صنعت و کشاورزی تجاری شده‌اند. ورود آنزیم‌ها به زندگی انسان علاوه بر رفع مشکلات در حوزه پزشکی و غیرپزشکی موجب ارتقاء کیفیت زندگی انسان نیز شده است. از دیدگاه تجاری

اغلب این آنزیم‌ها توسط گروه وسیعی از میکروارگانیسم‌ها و یا به طور نوترکیب در سلول‌های یوکاریوتی و یا پروکاریوتی به شکل تخمیر مایع و یا جامد تولید شده‌اند. در این میان، میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها برجسته‌تر بوده و میزبان‌های مناسبی برای تولید پایدار و صنعتی اکثر آنزیم‌های مهم به شمار

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته ..."

می‌روند. آنزیم‌ها در صنایع مختلفی از جمله صنعت خوراک طیور استفاده می‌شوند و در طول سه دهه اخیر آنزیم‌ها جایگاه مناسبی در این صنعت پیدا کرده‌اند. برخی از آنزیم‌های معمولی که در آماده‌سازی خوراک طیور استفاده می‌شوند عبارتند از زایلانازها، گلوکانازها، پکتینازها، سلولازها، پروتئنازها، آمیلازها، فیتازها و گالاکتوزیدازها. آنزیم‌های هیدرولازی فاکتورهای ضد تغذیه‌ای موجود در خوراک طیور را حذف کرده و علاوه بر تجزیه خوراک طیور موجب افزایش هضم در سیستم گوارشی طیور نیز می‌شوند. زایلانازها، آنزیم‌های کلیدی در تجزیه پیوندهای زایلوزیدی در ساختار زایلان موجود در زیست توده خوراک طیور هستند. آنزیم‌های مقاوم به حرارت زایلانازی فعالیت اختصاصی بالایی در دماهای بالا داشته و از نظر خصوصیات بیوشیمیایی، ساختاری و نحوه عمل با زایلانازهای ناپایدار در برابر حرارت متفاوت هستند. به دلیل تنوع گسترده در سطح گونه و شرایط محیطی، میکروارگانیسم‌ها به عنوان یکی از بهترین منابع جهت جداسازی ژنهای زایلانازی و یا تولید زایلانازهای تجاری محسوب می‌شوند. باکتری‌ها، آرکی‌ها و قارچ‌ها سه منبع میکروبی جهت تولید زایلاناز در طبیعت هستند (Basit et al. 2018).

میکروارگانیسم‌های شکمبه حیوانات اهلی مانند گاو حاوی ذخایر ارزنده‌ای از ژنهای هیدرولازی مفید هستند که واکاوی داده‌های متاژنومی مرتبط به آنها و انجام آزمایشات عملیاتی تکمیلی می‌تواند منجر به معرفی ژنهای جدید به حوزه صنعت دام و طیور شود. این میکروارگانیسم‌ها در طول هزاران سال در شکمبه این حیوانات جهت تجزیه بقایای گیاهی و همزیستی مثبت با این موجودات تکامل یافته‌اند و به بهترین شکل و بالاترین کارایی بقایای گیاهی موجود در سیستم گوارشی حیوان را تجزیه کرده و انرژی آن را در اختیار موجود قرار می‌دهند از این رو، به عنوان یکی از بهترین محیط‌ها جهت شناسایی آنزیم‌های مقاوم به حرارت مانند آنزیم PersiXyn9 محسوب می‌شوند.

در تحقیق حاضر شاخص‌های بیوشیمیایی مختلفی در مورد فعالیت آنزیم PersiXyn9 مشخص شد که تمامی این شاخص‌ها و خصوصاً فاکتور pH و قابلیت فعالیت در دماهای بالا به عنوان پیش‌بینی عملکرد این آنزیم جهت استفاده در خوراک طیور می‌توانند ارزشمند باشند. نکته مهم و حائز اهمیت در خصوص این آنزیم داشتن فعالیت بر روی خوراک طیور بود. این موارد بسیار مهم و به عنوان مهمترین فاکتورها در انتخاب یک

در مقایسه با زایلاناز جدا شده از روش‌های وابسته به کشت، زایلاناز جدا شده از *Anoxybacillus kamchatkensis* کمتر از ۲۰ درصد فعالیت در pH برابر ۴ و دمای ۸۰°C نشان داد (Yadav et al. 2018).

Darkazali و همکاران (۲۰۱۷) یک نمونه آنزیم زایلاناز از متازنوم سکوم (روده‌کور) مرغ جداسازی و آن را XynAMG1 نام‌گذاری کردند. این آنزیم ۳۷۲ اسید آمینه طول دارد و متعلق به خانواده زایلانازی GH10 است. هم‌ردیفی توالی XynAMG1 با پروتئین‌های مشابه در بانک‌های ژنی نشان داد که این آنزیم ۵۹ درصد شباهت با آنزیم اندو۱ و ۴۰ زایلاناز باکتری‌های *Prevotella bryantii* و *Prevotella ruminicola* دارد. آنزیم XynAMG1 حاوی دو موتیف حفظ شده DVVNE و TEXD بوده که مربوط به خانواده زایلانازی GH10 است و حاوی دو اسید آمینه گلوتامات (E157 و E262) در این موتیف‌ها است و پیش‌بینی شد که جایگاه فعال این آنزیم‌ها باشد. اپتیمم pH فعالیت این آنزیم برابر ۶ بود و در pH برابر ۹ میزان ۳۲ درصد فعالیت اولیه را از خود نشان داد و در pH برابر ۱۰ کل فعالیتش را از دست داد. دمای بهینه برای فعالیت XynAMG1 برابر ۴۵°C بود. این آنزیم در pH محدوده ۵-۸ به

آنزیم زایلاناز جهت اهداف صنعتی است. قابلیت تحمل دماهای بالا و البته داشتن فعالیت مناسب حاکی از به هم نخوردن ساختار سوم آنزیم و سالم ماندن جایگاه فعال آن است (Hock et al. 2021). یکی از اهداف مهم در صنعت طیور، راندمان خوراک پرندگان است. آنزیم‌های هیدرولیزکننده کربوهیدرات برای کاهش هزینه تغذیه و در دسترس قرار دادن مواد مغذی برای استفاده طیور استفاده می‌شوند (Yadav and Jha, 2019). فعالیت بالای PersiXyn9 در محدوده وسیعی از دما و pH در مقایسه با فعالیت زایلانازهای معرفی‌شده در مقالات گذشته تأیید شد. آنزیم PersiXyn9 میزان ۴۶ درصد از فعالیت خود را در دمای ۸۰°C حفظ کرد در حالی که آنزیم زایلاناز برگرفته از کتابخانه متازنوم گاو هلشتاین کمتر از ۱۰ درصد فعالیت خود را در دمای ۸۰°C حفظ کرده بود (Cheng et al. 2012). آنزیم PersiXyn9 همچنین فعالیت بالایی را در محدوده وسیعی از pH نشان داد به نحوی که این آنزیم در pHهای ۴ و ۹ به ترتیب فعالیتی برابر ۸۸ و ۶۵ درصد از خود نشان داد. در حالی که زایلاناز حاصل از دی.ان.ای متازنومی کمپوست سرگین گاو ۴۰ درصد فعالیتش را در pH برابر ۴ و کمتر از ۲۰ درصد از فعالیتش را در pH برابر ۹ نشان داد (Zheng et al. 2015).

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته ..."

مدت ۶۰ دقیقه فعال بود و حدود ۷۰ درصد از فعالیت خود را در pH برابر ۸ حفظ کرد. آنزیم XynAMG1 بعد از ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۶۰°C ۷۲ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده بود (Darkazali et al. 2017).

در پژوهشی توسط Verma و همکاران در سال ۲۰۱۳، یک زایلاناز مقاوم به حرارت و شرایط قلیایی از متازنوم کمپوست-خاک جداسازی کردند. این پروتئین ۳۵۸ اسید آمینه طول داشته و با گلیکوزید هیدرولازهای خانواده ۱۱ همولوژی داشت و ایتیم pH و فعالیت این آنزیم به ترتیب ۹ و ۸۰°C گزارش شد (Verma et al. 2013).

Wu و همکاران (۲۰۲۱) متازنوم گات (Gut) موربان (Pseudacanthotermes militaris) را جهت شناسایی آنزیم زایلاناز مورد غربالگری قرار دادند و یک آنزیم زایلاناز شناسایی کردند که Pm25 نام گذاری و فعالیت آن مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم Pm25 خالص شده بیش از ۸۰ درصد از فعالیت خود را در pH محدوده ۴/۵-۸ حفظ کرد. همچنین فعالیت آنزیم در محدوده دمای ۵۰-۷۵°C بررسی شد و شرایط بهینه دما و pH برای آزمون آنزیم به ترتیب ۵۰°C و ۷/۵ برآورد شد (Wu et al. 2021).

در سال ۲۰۱۸ آریائی نژاد و همکاران یک نمونه

آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت از متازنوم شکمبه شتر شناسایی، جداسازی و تعیین عملکرد کردند. این آنزیم ۳۸۱ اسید آمینه طول داشت و به طور نو ترکیب در باکتری *E. coli* بیان و خالص سازی شد. این محققان نشان دادند که آنزیم شناسایی شده در pH با محدوده ۶-۱۱ و دمای ۹۰-۲۵°C فعالیت دارد. ایتیم pH و دما برای این آنزیم به ترتیب برابر ۸ و ۴۰°C بود. همچنین این آنزیم در pH برابر ۸ و دمای ۴۰°C پس از یک ساعت ۸۰ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده بود. آنها همچنین فعالیت این آنزیم بر خمیر کاغذ را با استفاده SEM بررسی کردند. پس از تیمار با آنزیم زایلاناز تغییرات قابل توجهی مانند ایجاد ترک، منافذ و لایه برداری در سطح خمیر کاغذ نسبت به نمونه تیمار نشده آنزیمی مشاهده شد (Ariaeenejad et al. 2018).

در پژوهش حاضر ساختار سوم آنزیم PersiXyn9 با استفاده از ساختار کریستالی پروتئین 1us2 مربوط به زایلاناز مقاوم به حرارت باکتری *Cellvibrio japonicus* مدل سازی شد. در این مطالعه مشخص شد که توالی اسید آمینه PersiXyn9 ساختارهای ثانویه مختلفی مانند آلفا هلیکس، بتا شیت و لوپ (-alpha-helices, beta-sheet, loops) را تشکیل می دهد. پروفایل های

ساختار ثانویه در موقعیت‌های مربوطه در امتداد توالی اسید آمینه دو زایلاناز بسیار مشابه (۹۵ درصد) هستند. مدلینگ ساختار سوم PersiXyn9 نشان داد که ساختار عمومی β/α 8 TIM-barrel fold در آن مانند دیگر خانواده زایلانازهای GH10 شبیه کاسه سالاد (salad bowl) است (Henrissat et al. 1995).

تصاویر مربوط به SEM در مطالعه حاضر بر روی PersiXyn9، نتایج مشابهی مانند تخریب ساختار سطحی خوراک طیور، ایجاد حفره‌های بزرگ و بلوک‌های متخلخل در طول تخمیر را نشان داد که این موضوع حاکی از فعالیت مطلوب آنزیم PersiXyn9 است و در نتیجه فعالیت آن موجب آزاد شدن ترکیبات فنولی و موجب افزایش خواص تغذیه‌ای می‌شود.

دمای بهینه برای فعالیت PersiXyn9 برابر 50°C است که مشابه با دیگر زایلانازهای GH10 است (Alvarez et al. 2013; Xu et al. 2015). اکثر زایلانازهای خانواده ۱۰ بهینه دمای فعالیت بین $40-80^{\circ}\text{C}$ دارند (Polizeli et al. 2005).

یافته‌های این پژوهش در خصوص PersiXyn9 نشان می‌دهد که پایدار حرارتی بودن این آنزیم احتمالاً بتواند شرایط دمایی تهیه خوراک طیور را تحمل کند و همچنین بهینه pH فعالیت این آنزیم

به pH موجود سیستم گوارشی مرغ بسیار نزدیک است چرا که pH سیستم گوارش مرغ اسیدی (۶-۵/۵) است (Wielen et al. 2000) و بنابراین این آنزیم احتمالاً بتواند فعالیت موثری در تجزیه خوراک طیور در سیستم گوارش مرغ داشته باشد.

نتیجه‌گیری

امروزه آنزیم‌ها با کاربرد در تولید خوراک طیور جزء جدانشدنی صنعت تولید خوراک طیور بوده و اثر بخشی آن در افزایش فاکتورهای رشدی، عملکردی، سلامت، محیط زیست و امنیت غذایی به‌طور کامل محسوس است. یکی از آنزیم‌های مهم در صنعت تولید خوراک طیور آنزیم زایلاناز است. یکی از محیط‌های بسیار خوب جهت کاوش آنزیم‌های زایلانازی شکمبه حیوانات اهلی مانند گاو و گوسفند است چرا که سیستم گوارش این حیوانات جهت هضم علوفه و مواد گیاهی تکامل یافته است. با توجه به اهمیت مقاوم به حرارت بودن آنزیم‌های زایلانازی در صنعت تولید خوراک طیور، در این تحقیق به‌منظور کوتاه‌تر کردن مسیر غربالگری آنزیم و انتخاب هدفمند آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت از نرم‌افزار TAXyl جهت شناسایی آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت از میان تعداد زیادی آنزیم زایلاناز موجود در داده‌های

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زایلاناز برگرفته ..."

متاژنومی گاو استفاده شد. ژن پایدار حرارتی انتخاب شده *PersiXyn9* نام گذاری شد و در مراحل بعدی کلون، بیان و خالص شد و آزمون های بیوشیمیایی در دما و pH های مختلف جهت تعیین فعالیت آن انجام شد. آزمون های انجام شده حاکی از این موضوع است که آنزیم مورد نظر بر روی سوبسترای اختصاصی و خوراک طیور در دمای ۵۰°C فعالیت بسیار خوبی داشته است و تصاویر SEM حاکی از تغییر ساختار خوراک طیور بعد از اعمال تیمار آنزیمی است. فعالیت خوب آنزیم در دمای ۵۰°C و pH برابر ۶ بر روی سوبسترای خوراک طیور نشان دهنده قابلیت این آنزیم به منظور استفاده در صنعت خوراک طیور است. تحقیقات مزرعه ای و انجام تست بر روی جوجه های گوشتی می تواند قابلیت استفاده این آنزیم را در صنعت خوراک طیور بیشتر مشخص کند.

References

فهرست منابع

- Ahmed S, Jabeen A, Jamil A. 2007. Xylanase from *Trichoderma harzianum*: enzyme characterization and gene isolation. J Chem Soc Pak. 29:176–182.
- Al-Darkazali H, Meevootisom V, Isarangkul D, Wiyakrutta S. 2017. Gene expression and molecular characterization of a xylanase from chicken cecum metagenome. Int J Microbiol. p. 4018398
- Al-Harathi M. 2017. The effect of olive cake, with or without enzymes supplementation, on growth performance, carcass characteristics, lymphoid organs and lipid metabolism of broiler chickens. Rev. Bras. Ci^encia Avícola. 19: 83-90.
- Alvarez TM, Goldbeck R, Santos CRD. 2013. Development and biotechnological application of a novel endoxylanase family GH10 identified from sugarcane soil metagenome. PLoS ONE. 8(7).
- Ariaenejad S, Hosseini E, Maleki M, Kavousi K, Moosavi-Movahedi AA, Salekdeh GH. 2019. Identification and characterization of a novel thermostable xylanase from camel rumen metagenome. International Journal of Biological Macromolecules. 126: 1295–302.
- Babalola TO, Apata DF, Atteh JO. 2006. Effect of β -xylanase supplementation of boiled castor seed meal-based diets on the performance, nutrient absorbability and some blood constituents of pullet chicks. Trop. Sci. 46: 216–223.
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. 1992. Inter laboratory testing of methods for assay of xylanase activity, J. Biotechnol. 23: 257-270.
- Basit A, Liu J, Rahim K, Jiang W, Lou H. 2018b. Thermophilic xylanases: from bench to bottle. Crit. Rev. Biotechnol. 38: 989–1002.
- Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol. 56: 326–338.
- Bhardwaj N, Kumar B, Verma P. 2019. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. Bioresour. Bioprocess. 6(1): 40.
- Bhardwaj N, Verma VK, Chaturvedi V, Verma P. 2018. GH10 XynF1 and Xyn11A: the predominant xylanase identified in the profiling of extracellular proteome of *Aspergillus oryzae* LC1. Ann Microbiol. 68: 731–742.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254.

- Café MB, Borges CA, Fritts CA, Waldroup PW. 2002. Avizyme improves performance of broilers fed corn-soybean meal-based diets. J. Appl. Poult. Res. 11: 29–33.
- Chadha B, Kaur B, Basotra N, Tasng A, Pandey A. 2019. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective. Bioresour. Technol. 277: 195–203.
- Chakdar H, Kumar M, Pandiyan K, Singh A, Nanjappan K, Lal Kashyap P, Kumar Srivastava A. 2016. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. 3 Biotech. 6: 1–15.
- Chakdar H, Kumar M, Pandiyan K, Singh A, Nanjappan K, Kashyap PL. 2016. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. 3 Biotech. 6: 1–15.
- Chávez R, Bull P, Eyzaguirre J. 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. J Biotechnol. 123: 413–433.
- Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol Rev. 29:3–23.
- Driss D, Bhiri F, Elleuch L. 2011. Purification and properties of an extracellular acidophilic endo-1, 4- β -xylanase, naturally deleted in the "thumb", from *Penicillium occitanis* Pol6. Process Biochem. 46: 1299–1306.
- Gomez LD, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ. 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. New Phytol. 178: 473–485.
- Gray KA, Zhao L, Emptage M. 2006. Current opinion in chemical biology. Bioethanol Curr Opin Chem Biol. 10: 141–146.
- Gharechahi J, Vahidi MF, Bahram M, Han J-L, Ding X-Z, Salekdeh GH. 2021. Metagenomic analysis reveals a dynamic microbiome with diversified adaptive functions to utilize high lignocellulosic forages in the cattle rumen. The ISME J. 15: 1108–1120.
- Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G. 1995. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 92(15): 7090–7094.
- Hunt CJ, Tanksale A, Haritos VS. 2016. Biochemical characterization of a halotolerant feruloyl esterase from *Actinomyces* spp.: refolding and activity following thermal deactivation. Appl Microbiol Biotechnol. 100: 1777–1787.
- Juturu V, Wu JC. 2014. Microbial exo-xylanases: a mini review. Appl Biochem Biotechnol. 174: 81–92.
- Kaldhusdal M. 2000. Necrotic enteritis as affected by dietary ingredients. World Poult. 16 (6): 42–43.
- Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Geer LY, Bryant SH. 2017. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. Nucleic Acids Res. 45: D200–D203.
- Mientus M, Brady S, Angelov A, Zimmermann P, Wemheuer B, Schuldes J. 2013. Thermostable xylanase and β -glucanase derived from the metagenome of the Avachinsky crater in Kamchatka (Russia). Curr. Biotechnol. 2: 284–293.
- Ming-zhe S, Hong-chen Z, Ling-cai M, Jun-she S, Hui S, Yun-juan B, Haisheng P, Zheng Y, Xiu-qing Z, Jing-sheng Z, Yi-han L, Fu-ping L. 2015. Direct cloning, expression of a thermostable xylanase gene from the metagenomic DNA of cow dung compost and enzymatic production of xylooligosaccharides from corn cob. Biotechnol. Lett. 37: 1877–1886.
- Motta FL, Andrade CCP, Santana MHA. 2013. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization. InTechOpen, New York. 251–275.
- Olgun O, Altay Y, Yildiz AO. 2018. Effects of carbohydrase enzyme supplementation on performance, eggshell quality, and bone parameters of laying hens fed on maize-and wheat-based diets. Br. Poult. Sci. 59 (2): 211–217.
- Polizeli M, Rizzatti ACS, Monti R. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 67: 577–591.
- Qian C, Liu N, Yan X. 2015. Engineering a high-performance, metagenomic-derived novel xylanase with improved soluble protein yield and thermostability. Enzyme Microb Technol. 70: 35–41.

"موسوی و همکاران، شناسایی، کلونینگ، خالص سازی و تعیین عملکرد آنزیم نو ترکیب زیلاتناز برگرفته ..."

- Raza A, Bashir S, Tabassum R. 2019.** An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. *Heliyon*. 5: e01437.
- Romero-Fernández M, Moreno-Perez S, Orrego AH. 2018.** Designing continuous flow reaction of xylan hydrolysis for xylooligosaccharides production in packed-bed reactors using xylanase immobilized on methacrylic polymer-based supports. *Bioresour Technol*. 266: 249–258.
- Sánchez C. 2009.** Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv*. 27:185–194.
- Shahraki MF, Farhadyar K, Kavousi K, Azarabad MA, Boroomand A, Ariaeenejad S, Hosseini Salekdeh Gh. 2019.** TAXyl: an in-silico method for predicting the thermal activity for xylanases from GH10 and GH11 families. *BioRxiv [Preprint]* 10.1101/826040.
- Sharma PK. 2017.** Xylanases current and future perspectives: a review Pawan Kumar Sharma. *New Biol Rep*. 6: 122.
- Singla A, Paroda S, Dhamija SS. 2012.** Bioethanol production from xylose: problems and possibilities. *J Biofuels*. 3: 1–17.
- Teymouri H, Zarghi H, Golian A. 2018.** Evaluation of hull-less barley with or without enzyme cocktail in the finisher diets of broiler chickens. *J. Agric. Sci. Technol*. 20 (3): 469-483.
- Ugwuanyi JO. 2016.** Enzymes for nutritional enrichment of agro-residues as livestock feed. In *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme, Production*; **Gurpreet SD, Surinder K, Eds.**; Academic Press: Cambridge, MA, USA. 233–260.
- Van Der Wielen PWJJ, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BAP, Van Knapen F. 2000.** Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(6): 2536–2540.
- Van Hoeck V, Wu D, Somers I, Wealleans ABL, Vasanthakumari ABL, Gonzalez Sanchez AL, Morisset D. 2021.** Xylanase impact beyond performance: a prebiotic approach in broiler chickens- *J. Appl. Poult. Res*. 30: 100193.
- Verma D, Satyanarayana T. 2013.** Improvement in thermostability of metagenomic GH11 endoxylanase (Mxyl) by site-directed mutagenesis and its applicability in paper pulp bleaching process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 40: 1373–1381.
- Waititu S, Sanjayan N, Hossain M, Leterme P, Nyachoti C. 2018.** Improvement of the nutritional value of high-protein sunflower meal for broiler chickens using multi-enzyme mixtures. *Poultry Sci*. 97 (4): 1245-1252.
- Walia A, Guleria S, Mehta P. 2017.** Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*. 7:1–12.
- Wu H, Ioannou E, Henrissat B, Montanier CY, Bozonnet S, O'Donohue MJ, Dumon C .2020.** Investigating the multi-modularity of a GH10 xylanase found in termite gut metagenome. *Appl Environ Microbiol*. 87: 3.
- Xu B, Dai L, Li J .2015.** Molecular and biochemical characterization of a novel xylanase from *Massilia* sp. RBM26 isolated from the feces of *Rhinopithecus bieti*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26: 9–19.
- Yadav P, Maharjan J, Korpole S, Prasad GS, Sahni G.2018.** Production, purification, and characterization of thermostable alkaline xylanase from *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 6: 65.
- Yadav S, and Jha R. 2019.** Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *J. Anim. Sci. Biotechnol*. 10: 1–11.
- Zhang D, Wang Y, Zheng D. 2016a.** New combination of xylanolytic bacteria isolated from the lignocellulose degradation microbial consortium XDC-2 with enhanced xylanase activity. *Bioresour Technol*. 221: 686–690.
- Zhang Y, An J, Yang G. 2016b.** Structure features of GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii*: implication for its thermophilic adaption and substrate binding preference. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 48: 948–957.
- Zheng MSH, Sun LMJ, Liu XZJZY, Lu F. 2015.** Direct cloning, expression of a thermostable xylanase gene from the metagenomic DNA of cow dung compost and enzymatic production of xylooligosaccharides from corncob. *Biotechnol. Lett*. 37: 1877–1886.

Identification, Cloning, Purification and Activity Determination of a Recombinant Xylanase Enzyme Identified from Bovine Rumen Metagenome

Seyed Hossein Mousavi¹, Shohreh Ariaeenejad^{1*}, Ghasem Hosseini Salekdeh¹

1- PhD. Student, Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

3-Professor, Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

shariaee@gmail.com

Abstract

Poultry, like many animals, uses enzymes for the digestion of feed. To overcome the undesirable effects of deleterious factors and improve digestion of feed, enzymes are used as supplements in feed formulation. Supplementation of feed with definite enzymes enhances its nutritive value, thereby increasing the effectiveness of digestion. Enzymes are the most important and useful additives in the animal feed industry. Xylanases are widely used in the animal feed industry. Pretreatment of animal feed with xylanases increases the nutritional value and digestion in ruminants. In this study, metagenomic data of bovine rumen were explored and then a thermostable xylanase gene was identified using TAXyl software and named *PersiXyn9*. The laboratory tests were carried out to determine the enzymatic activity. Protein expression was done in *E. coli* (BL21) and a Nickel column was used for protein purification. The biochemical parameters of the enzyme showed the optimal activity at 50°C, and the optimum pH of 6. Kinetic values, K_m and V_{max} , for this enzyme were calculated to be 1.18 mg/ml and 206.78 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ respectively. Scanning electron microscopy (SEM) images of the activity of the enzyme on poultry feed at 50°C represent the high efficiency of the xylanase as an additive in the poultry feed industry.

Keywords: Metagenome, Xylanase, Poultry Feed, Hydrolysis.