مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰

ISSN ۲۷۱۶-۹۸۰۴ الکترونیکی، ISSN ۲۷۱۷-۰۶۳۲ چاپی

شناسایی، کلونینگ، خالص‌سازی و تعیین عملکرد آنزیم نوترکیب زایلاناز برگرفته از نمونه متاژنومی شکمبه گاو

نوع مقاله: پژوهشی 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8

سید حسین موسوی[۱]، شهره آریائی‌نژاد*[۲] و سید قاسم حسینی سالکده[۳]

۱- دانشجوی دکتری، بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استادیار، بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- استاد، بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، 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 آنزیم‌ها برای هضم غذا استفاده می‌کنند. آنزیم‌ها مهمترین مواد افزودنی در صنعت تولید خوراک حیوانی محسوب شده و موجب بهبود هضم غذا می‌شوند. از سوی دیگر، پیش‌تیمار خوراک طیور با آنزیم زایلاناز موجب بالا رفتن ارزش غذایی و افزایش هضم غذا در سیستم گوارش حیوان می‌شود. در این مطالعه با استفاده از روش‌های محاسباتی بیوانفورماتیکی از داده‌های متاژنومی شکمبه گاو یک ژن مقاوم به حرارت زایلاناز با استفاده از نرم‌افزار TAXyl شناسایی و PersiXyn9 نامگذاری شد و به‌منظور تعیین کارکرد آنزیمی تحت بررسی‌های آزمایشگاهی قرار گرفت. ژن زایلاناز موردنظر توسط پرایمرهای اختصاصی از دی.ان.ای متاژنومی جداسازی و در وکتور بیانی مناسب کلون شد و سپس بیان و خالص‌سازی 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. شاخص‌های بیوشیمیایی Km و Vmax برای این آنزیم به‌ترتیب برابر ۱/۲۲ mg/ml و ۲۰۶/۷۸ µmol min^{-1} 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 به‌عنوان افزودنی در صنعت خوراک طیور نشان داد.

واژه‌های کلیدی: متاژنوم، زایلاناز، خوراک طیور، هیدرولیز.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

مقدمه

ترکیب اصلی تشکیل‌دهنده دیواره سلول‌های گیاهی لیگنوسلولز است و همان‌طوری‌که از نام آن برمی‌آید حاوی لیگنین (۲۰-۱۵ درصد)، همی‌سلولز (۳۰-۲۵ درصد) و سلولز (۵۰-۴۰ درصد) است (Gray et al. 2006; Singla et al. 2012). این اجزاء در کنار هم با کمک برهمکنش‌های کووالانسی و غیرکووالانسی کمپلکس سه‌بعدی ایجاد می‌کنند (Sánchez. 2009).

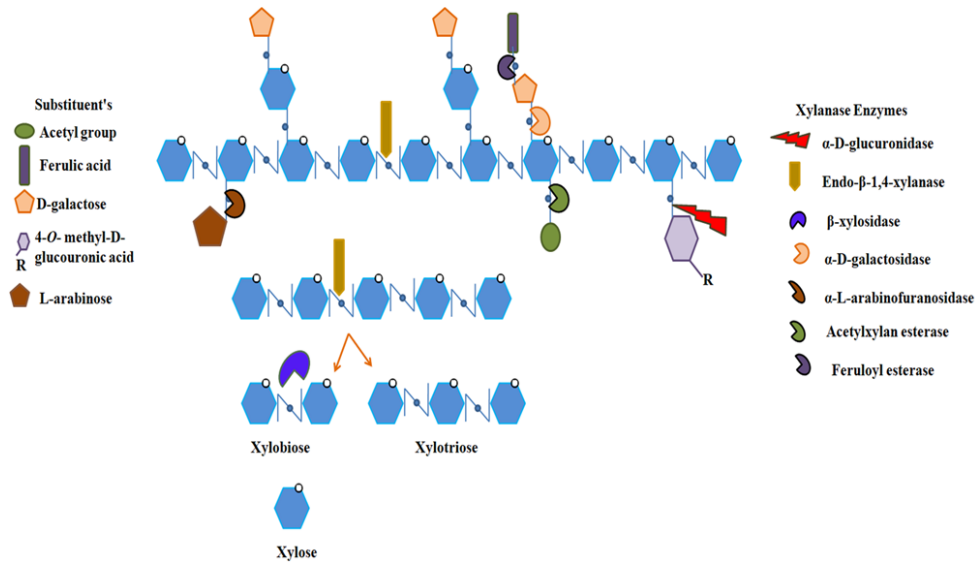
همی‌سلولز از زایلان تشکیل شده است که خود، یک هتروپلی‌ساکارید تشکیل‌شده از مونوساکاریدهایی مانند ال-آرابینوز، دی-گالاکتوز، دی‌مانوزها و ارگانیک اسیدهایی مانند استیک‌اسید، فرولیک‌اسید و باندهای استری است (Collins et al. 2005; Ahmed et al. 2007; Motta et al. 2013; Sharma 2017).

زایلان به آسانی در طبیعت یافت می‌شود و بعد از سلولز دومین پلی‌ساکارید فراوان در طبیعت است که ۳۳ درصد از کل زیست‌توده سلولزی موجود در جهان را تشکیل می‌دهد (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 زیست‌توده‌های مختلف و در شکل‌های گوناگونی یافت می‌شود. به‌عنوان مثال در نهاندانگان به شکل او-استیل-۴-او-متیل‌گلوکورونوزایلان (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 می‌شود. این زیرواحدها می‌توانند با استیل، فرولیل (feruloyl)، گلوکوپیرانوزیل (glucopyranosyl)، ۴-او-متیل-گلوکورونوپیرانوزیل (۴--O-methyl-d-glucuronopyranosyl)، پی‌کومارول (p-coumaroyl) یا گروه‌های زنجیره‌جانبی آلفا-ال-آرابینوفورانوزیل (α-l-arabinofuranosyl) با درجه‌های مختلفی جایگزین شوند. از نظر حلالیت، زایلان‌ها به دوشکل دیده می‌شوند: محلول در آب و نامحلول در آب. دو خانواده از آنزیم‌های زایلانازی در خوراک دام و طیور استفاده می‌شوند. GH10 که زایلان‌های محلول را هیدرولیز می‌کند و GH11 که زایلان‌های محلول و نامحلول را تجزیه می‌کند (Bhardwaj et al. 2019).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

آنزیم‌های زایلانازی نقش مهمی در شکستن ساختارهای پیچیده زایلان ایفا می‌کنند. بنابراین برای هیدرولیز کامل زایلان به قندهای تشکیل‌دهنده آن استفاده از آنزیم‌های مختلف که به‌طور اختصاصی پیوند مشخصی را هدف‌گیری می‌کنند، قابل توجه است. سیستم‌های زایلانازی چندکاره در باکتری‌ها (Zhang et al. 2016a, 2016b)، قارچ‌ها (Driss et al. 2011; Bhardwaj et al. 2018) و اکتینومیست‌ها (Hunt et al. 2016) وجود دارد که در آنها اسکلت زایلان به‌طور تصادفی توسط فعالیت اندو۱و۴ بتادی زایلاناز (endo-1,4-β-d-xylanases) شکسته شده و از سوی دیگر پلیمر زایلوز توسط فعالیت بتادی‌زایلوزیداز (β-d xylosidases) به زیرواحدهای مونومری آن تجزیه می‌شود. زنجیره‌های جانبی استیل و فنولی توسط فعالیت آلفاگلوکورونوزیدازها و استیل‌زایلان‌استرازها هیدرولیز می‌شود. آلفا–ال آرابینوفورانوزیدازها (α-l-Arabinofuranosidases) تجزیه‌ی گروه‌های جانبی را کاتالیز می‌کنند. باندهای استری موجود در زایلان توسط فعالیت پی‌کوماریک‌استرازها (p-coumaric esterase) و فرولیک‌اسیداسترازها شکسته می‌شود (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 آنزیم‌های زایلانازی مختلف به‌منظور تجزیه کامل زایلان به واحدهای مونومری آن را نشان می‌دهد (Beg et al. 2001).



شکل ۱- ساختار زایلان و باندهای آن و آنزیم‌های زایلانازی تجزیه‌کننده زایلان به واحدهای مونومری آن (Beg et al. 2001).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

به‌منظور آزادسازی بیشترین مواد غذایی کپسوله‌شده در بذرهای استفاده‌شده در خوراک طیور، آنزیم زایلاناز مختلف برای غلات گوناگون موردنیاز است. برای مثال ۹۸ درصد از زایلان موجود در غلات نامحلول است. در این بین استفاده از آنزیم‌های کربوهیدرولازی به‌منظور افزایش هضم و بهبود کارآیی رشد توجه زیادی را به خود جلب کرده است. اما بسیاری از آنزیم‌ها کارآیی 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 تخم‌مرغ، پروتئین و املاح با کیفیت بالاتری را نسبت به غذاهای گیاهی در اختیار انسان می‌گذارد. خوراک طیور به‌عنوان 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 ضدتغذیه‌ای 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 به‌عنوان فیبر هم یاد می‌شود به‌طور معمول با توجه به نوع غلات و بقولات استفاده‌شده در جیره غذایی متفاوت بوده و نسبت عکس با سطح انرژی آن دارند. به‌عنوان 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-Harthi. 2017; Teymouri et al. 2018; Waititu et al. 2018).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

همه حیوانات از آنزیم‌ها به‌منظور هضم غذا استفاده می‌کنند. این آنزیم‌ها یا توسط سلول‌های خود این حیوانات و یا توسط میکروب‌های موجود در سیستم گوارش آنها تولید می‌شود. به‌دلیل فقدان یا کمبود آنزیم‌های ضروری کربوهیدراتازی در روده طیور، ترکیبات NSP غیرقابل هضم بوده که در نهایت باعث افزایش ویسکوزیته روده و کاهش قدرت جذب مواد غذایی می‌شود. ترکیبات NSP حتی می‌توانند در هضم دیگر مواد مغذی موجود در جیره اختلال ایجاد کنند. به‌دنبال آن، این مواد غیرنشاسته‌ای ممکن است با القا رقابت بین فلور میکروبی روده جهت جذب ترکیبات غذایی با هضم آسان، باعث افزایش احتمال انواع عفونت‌های میکروبی شوند. پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای محلول و نامحلول، یکی از عوامل ضدتغذیه‌ای بوده که به مقدار زیاد در غلاتی مانند: گندم، جو، آفتاب‌گردان و کانولا موجود است که به‌دلیل نبود آنزیم‌های موردنیاز توسط پرندگان قابل‌تجزیه نیست. عدم وجود آنزیم‌هایی که بتواند فیبرهایی (کربوهیدرات‌های ساختاری یا ترکیبات غیرقابل هضمی که دیواره سلول گیاهی را تشکیل داده‌اند) شامل پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای محلول با وزن مولکولی بالا را تجزیه کند، موجب افزایش ویسکوزیته روده شده که این موضوع حرکت مواد غذایی در سیستم گوارشی و جذب مواد غذایی را کاهش می‌دهد. در نتیجه این نقص بر روی سلامتی مرغ اثر گذاشته و هزینه تولید را افزایش می‌دهد (Kaldhusdal. 2000).

در ادامه مواردی از فواید استفاده از آنزیم‌ها در خوراک طیور آورده شده است. ۱- افزایش کارایی و کاهش هزینه، این آنزیم‌ها با کاهش اثرات ضدتغذیه‌ای موجب می‌شود که عمل هضم بسیار بیشتر انجام شود و در نتیجه گوشت و تخم بیشتری به ازای هر کیلوگرم غذای مصرفی حاصل خواهد شد و به اصطلاح ضریب تبدیل افزایش پیدا می‌کند. ۲- اثرات زیست‌محیطی بهتر، بهبود هضم و جذب مواد غذایی موجب کاهش مدفوع حیوان شده و همچنین دفع فسفر و نیتروژن را کاهش می‌دهد. 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 می‌شود. 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 باکتری‌های مولد بیماری را کاهش می‌دهد (Raza et al. 2019; Olgun O.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

2018). رویکرد متاژنومی به‌عنوان روشی نوین به‌منظور 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 استخراج‌شده 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 به‌عنوان 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). علاوه‌بر 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 پلی ساکاریدها 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 نوترکیب با طول ۱۰۷۷ نوکلئوتید قابلیت فعالیت در دمای ۸۰°C و pH برابر ۹ را داشت (Verma et al. 2013).

در پژوهش بعدی خاصیت مقاومت حرارتی این آنزیم توسط افزودن اسیدآمینه آرژنین به جای اسیدآمینه‌های سرین/ترئونین در صفحات بتا مهندسی شد (Verma and Satyanarayana, 2013). همچنین زایلاناز جدا شده از متاژنوم آتشفشان تا دمای ۹۵°C فعال بوده و نیمه‌عمر ۲۲ ساعت در ۸۵°C را نشان داده است (Mientus et al. 2013).

به‌طور مشابه، بیان ژن زایلاناز *xyl7* مربوط به سیستم گوارش موریانه در *Escherichia coli* مقاومت دمایی بالاتری نشان داد و همچنین دمای بهینه آن ۱۰°C بالاتر بوده و از طرف دیگر در محدوده گسترده‌ای از pH بین ۱۰-۵/۵ 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

بهینه برای این آنزیم زایلاناز نوترکیب به‌ترتیب برابر ۷۵°C و ۹ بود. آنزیم‌های زایلانازی مقاوم به حرارت برگرفته از باکتری‌ها و قارچ‌ها 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، آنزیم‌های زایلانازی متعددی در شرکت‌های مختلفی در دنیا تجاری شده‌اند که برخی از آنها در خوراک طیور هم کاربرد دارند و از آنها می‌توان به آنزیم Avizyme شرکت Dupont، آنزیم Xylamax® شرکت BioResource International، آنزیم Belfeed B1100 شرکت Agrimex و آنزیم Nutri Xylanase Enzyme شرکت Ultra Biologics اشاره کرد (Chakdar et al. 2016). در طول ۳۰ سال گذشته صنعت طیور به‌طور پژوهشی و یا کاربردی از آنزیم‌ها 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 آنزیم‌های زایلاناز، پروتئاز و آمیلاز در خوراک طیور استفاده کردند و در مرغ‌ها افزایش وزن، کاهش مرگ‌ومیر و مقدار بیشتر انرژی خالص در مقایسه با گروه شاهد مشاهده کردند. از طرف دیگر، Babalola و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشاهده کردند که جیره‌ای که حاوی زایلاناز است، جذب نیتروژن و فیبر توسط پرنده در آنها بیشتر است (Babalola et al. 2006).

آنزیم‌های زایلاناز مشتق‌شده از میکروارگانیسم‌های پایدار حرارتی و البته ساکن در محیط‌های غنی از گیاه به‌عنوان بهترین گزینه جهت استفاده در صنعت خوراک طیور محسوب می‌شوند. خاصیت پایداری حرارتی ذاتی این آنزیم‌ها به آنها توانایی تحمل دماهای بالا را می‌دهد چرا که فرآوری و عمل‌آوری نهایی پلیت‌های خوراک طیور در درجه حرارت‌های بالا انجام می‌شود و ساختار آنزیم زایلاناز پایدار حرارتی در این شرایط از بین نرفته و همچنان فعال است. از طرف دیگر باکتری‌هایی حاوی این نوع از آنزیم‌ها جهت تجزیه بقایای گیاهی تکامل یافته‌اند و در صورت تحمل دماهای بالا فعالیت بسیار بالایی نیز از خود نشان می‌دهند (Basit et al. 2018).

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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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 به‌طور کارا عمل هضم خوراک گیاهی را انجام می‌دهد می‌تواند پیش‌بینی‌کننده فعالیت مطلوب این آنزیم بر روی خوراک طیور نیز باشد.

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. به‌منظور جداسازی کامل توالی نوکلئوتیدی ژن *PersiXyn9* از دی.ان.ای کامل متاژنومی شکمبه، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 توالی آغازگر رفت 5'-TGATAGGGATCCATGAATGAATGGGA AAAGGAAT-3' و توالی آغازگر برگشت 5'-

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

TGATAGGTCGACTCAGCGTATACTACT
'GAATC-3 طراحی شد.

جایگاه‌های آنزیم‌های برشی *BamHI* و *Sall* به‌ترتیب 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. واسرشت‌سازی 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 طویل‌سازی 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 طویل‌سازی 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 kb 1 با تیغ جراحی استریل بریده شد و خالص‌سازی باند ژن هدف با استفاده از کیت GeneJET Gel Extraction Kit شرکت Thermo Scientific انجام شد. جهت افزایش دقت، بررسی صحت جایگاه‌های برشی تعبیه‌شده در آغازگرها و افزایش راندمان کلونینگ نهایی، ژن استخراج‌شده از ژل در وکتور خطی pTZ57/RT با سیستم کلونینگ T/A کلون شد و کلون‌های مثبت با سیستم Cloning-PCR مشخص شدند. سپس بر روی وکتور نوترکیب برش دو آنزیمی با آنزیم‌های برشی *BamHI* و *Sall* گذاشته شد.

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

صبح روز بعد ۱۰ میلی‌لیتر از کشت باکتری به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

کاناماسین ($50\ \mu g\ ml^{-1}$) 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 ۲۵°C و به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. خالص‌سازی پروتئین PersiXyn9 با کیت Ni-NTA Fast start kit شرکت کیاژن و طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. کمیت و کیفیت پروتئین خالص‌شده بر روی ژل SDS-PAGE با ژل سیستم رنگ‌آمیزی کوماسی بلو مشخص شد.

آزمون تعیین فعالیت آنزیم زایلاناز PersiXyn9

جهت آزمون تعیین فعالیت ابتدا آنزیم زایلاناز PersiXyn9 همراه با زایلان در بافر فسفات (۵۰ mM، pH= 6) انکوبه شد. زایلان توسط آنزیم زایلاناز هیدرولیز شده و قندی به نام زایلوز ایجاد می‌شود که می‌تواند دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) را تبدیل به ماده‌ای با رنگ قهوه‌ای روشن کند. رابطه‌ای خطی بین میزان قند تولیدشده از هیدرولیز و شدت رنگ تولیدی وجود دارد. بنابراین فعالیت آنزیم زایلاناز در محلول واکنش را می‌توان 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).

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

رابطه ۱

(Bradford. 1976)

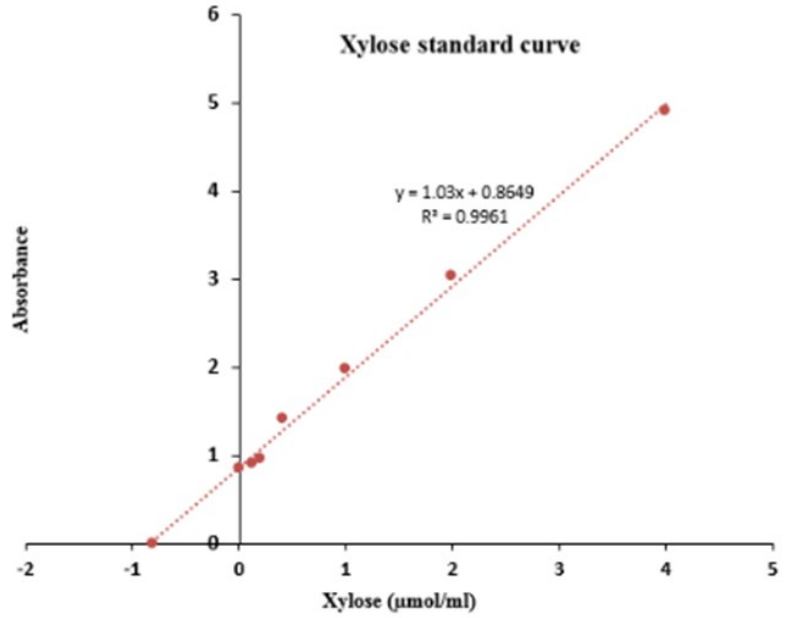
بنابراین ابتدا یک منحنی استاندارد برای میزان قند تولیدی و جذب ایجادشده از واکنش با DNS تهیه شد (شکل ۲ و ۳).



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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]



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

اندازه‌گیری 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 به‌عنوان سوبسترای آنزیم به ۲۰ میکرولیتر آنزیم در بافر فسفات (۵۰ mM، pH= 6) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دماهایی ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و۸۰ 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 ۱۰۰°C قرار داده شد. مقدار جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری 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 ΔA540 برابر اختلاف جذب خوانده شد.

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

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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

$$\frac{\text{Units}}{mg} = \frac{Units/ml}{protein\ (mg)}$$ رابطه ۲ (Bailey et al. 1992)

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 به‌طور 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 تیمارشده و کنترل (بدون کوکتل آنزیمی) با دستگاه خشک‌کن 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.

نتایج

پیشبینی بیوانفورماتیکی ساختار سه بعدی آنزیم PersiXyn9

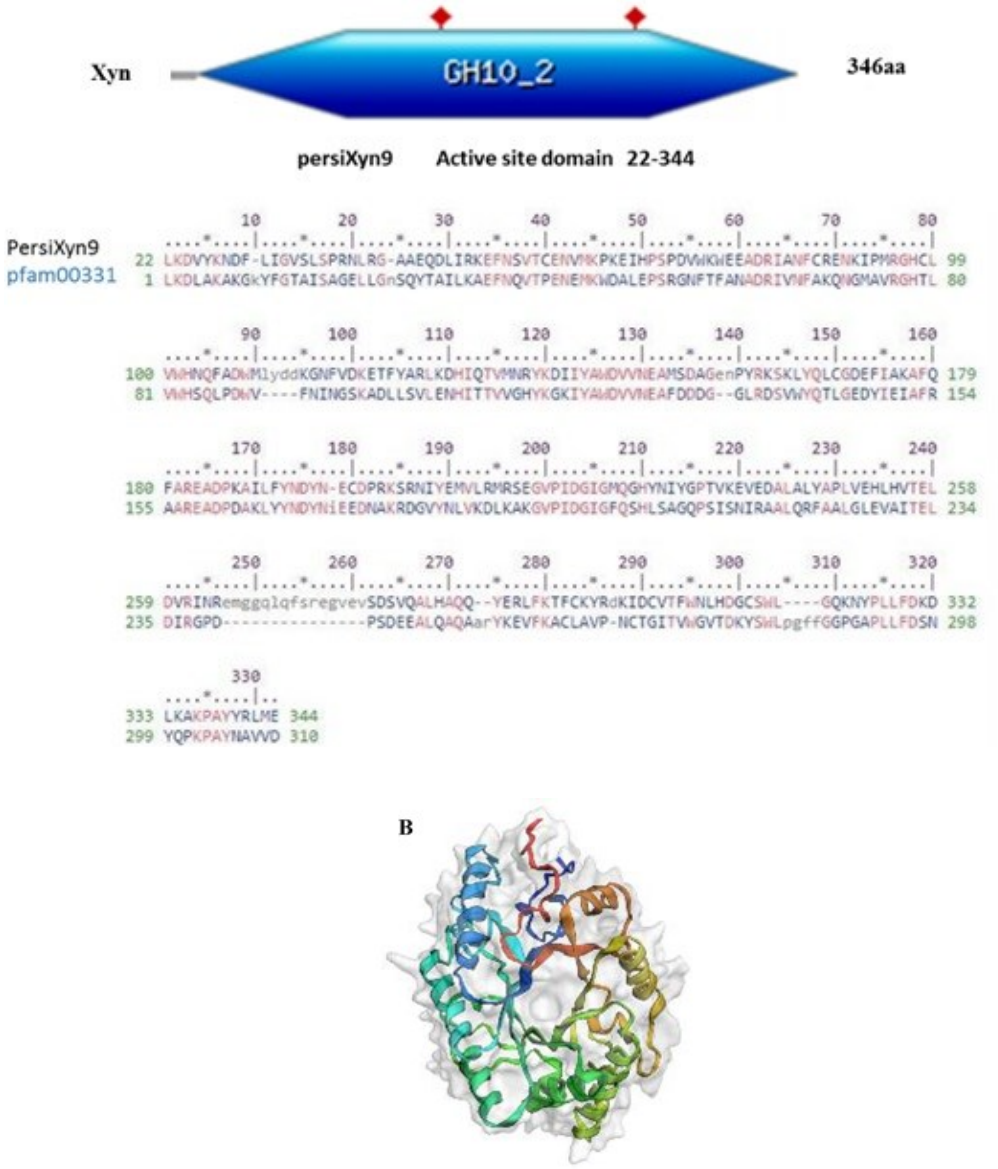
ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی شده برای PersiXyn9 در شکل ۴ نشان داده شده است. مشابه‌ترین ساختار در PDB که در Phyre2 به‌عنوان الگوی اولیه استفاده شد مربوط به یک زایلاناز برگرفته از باکتری *Cellvibrio Japonicus* با رمز PDB (1us2) و با درصد همپوشانی ۹۵ درصد بود.

پیشگویی ساختار در وب سرویس PROSITE نشان داد که این آنزیم با دو جایگاه فعال حاوی دو اسیدآمینه گلوتامیک‌اسید در موقعیت ۱۵۰ و ۲۵۷ به‌ترتیب به‌عنوان جایگاه دهنده پروتون و نوکلئوفیل در زایلانازهای خانواده GH10 رایج است.

در شکل۴ ساختار سه بعدی PersiXyn9 شامل جایگاه‌های فعال و دُمین فعال که با نرم‌افزار EzMol مشخص شده است (Marchler-Bauer .et al. 2017).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]



شکل ۴- (A) تعیین دُمین و جایگاه‌های فعال آنزیمی توسط نرم‌افزار PROSITE (B). ساختار سه‌بعدی PersiXyn9 با استفاده از فایل PDB و پیشگویی ساختار آنزیم و ترسیم شکل به‌وسیله نرم‌افزار EzMol انجام شد.

کلونینگ، بیان و خالص‌سازی آنزیم PersiXyn9

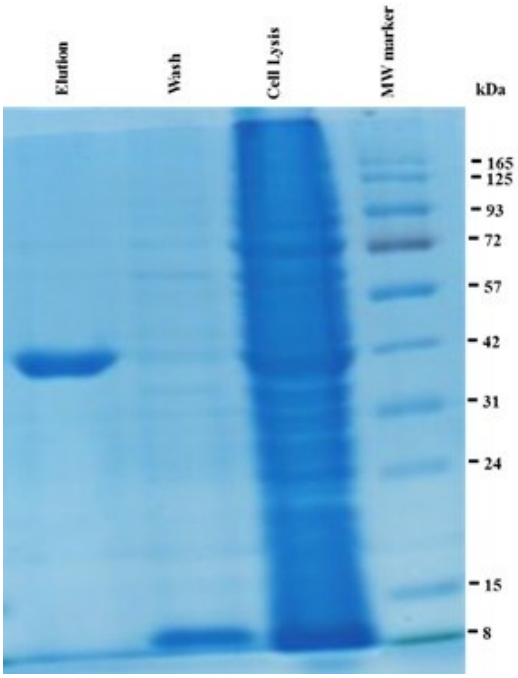
به‌منظور شناسایی آنزیمی از نمونه آب شکمبه گاو، دی.ان.اِی متاژنومی استخراج و توالی‌یابی دی.ان.اِی متاژنومی این نمونه‌ها در خارج از کشور توسط دستگاه Illumina HiSeq 2500 system انجام گرفت. آنالیز و چینش داده‌های خام

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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 معرفی‌شده ژن *PersiXyn9* جهت آنالیز بیشتر انتخاب شد. جهت آگاهی از بهترین 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* به‌ترتیب ۲۵°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-PAG مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵- تصویر SDS-PAGE مربوط به پروتئین خالص‌شده PersiXyn9.

با استفاده از مارکر پروتئینی و آنالیز بیوانفورماتیکی وزن مولکولی پروتئین زایلاناز هدف برابر ۵۰ kDa تخمین زده شد. OK235706، شماره اکسشن بانک ژن (GenBank accession

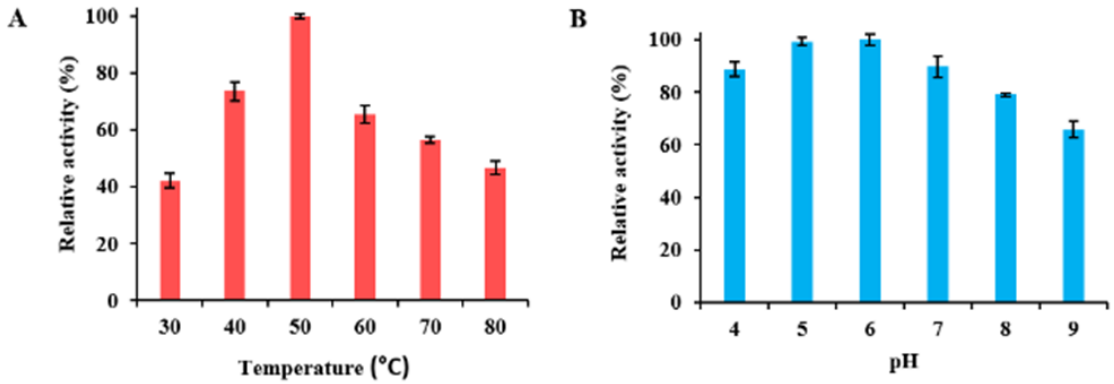
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

number) ژن *PersiXyn9* در پایگـــاه داده NCBI است.

مشـــخص کـــردن فعالیـــت آنـــزیم PersiXyn9 و آشکارسازی شاخصه‌های سینتیکی

با اندازه‌گیری میزان قند آزاد شـده از هیـدرولیز زایلان و رسم نمودار اسـتاندارد زایلـوز مشـخص شـد کـه آنـزیم زایلانـاز PersiXyn9 در طیـف گسترده‌ای از دما و pH فعالیـت قابـل تـوجهی از خود نشـان مـی‌دهـد. همـانطوری‌کـه در شـکل ۶ مشاهده می‌شود این آنزیم بیشترین فعالیـت را در دمای ۵۰°C داشت. لازم بـه ذکـر اسـت از دمـای ۳۰°C تا ۵۰°C شاهد سیر افزایش فعالیت به شکل تصاعدی بود به‌طوری‌که در دمای ۵۰°C ، حـدود ۱۰۰ درصد فعالیت مشاهده شد و با اعمال دمـای ۸۰°C فعالیت بـه حـدود ۴۶ درصـد نـزول کـرد. همچنین همانطوری‌که در شکل ۶ مشاهده می‌شود در خصوص pH بهینه فعالیـت آنـزیم PersiXyn9 نتایج به این شرح بود که بیشـترین فعالیـت (۱۰۰ درصد) این آنزیم در pH برابـر ۶ مشـاهده شـد و این آنزیم در pHهای ۴ و ۹ به‌ترتیب فعالیتی برابر ۸۸ و ۶۵ درصد از خـود نشـان داد. مشـاهدات و بررسی‌های کینتیکی نشـان داد کـه ایـن آنـزیم از شاخص‌های کینتیکـی میکـائیلیس-منتـون پیـروی می‌کند. نتایج نشان داد که شاخص‌های بیوشیمیایی Km و Vmax برای آنـزیم PersiXyn9 بـه‌ترتیـب برابـــر ۱/۲۲۹ mg/ml و ۲۰۶/۷۸ µmol/mg.min بود.



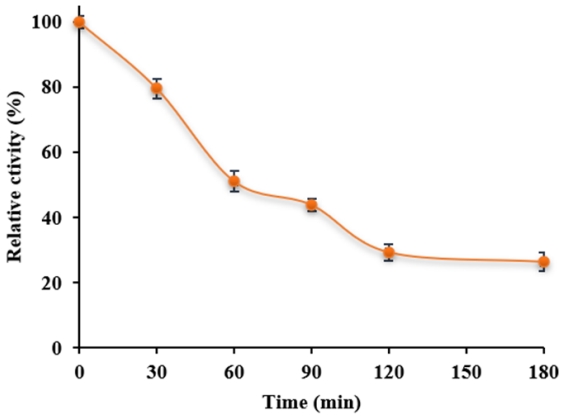
شکل ۶- دما (A) و pH (B) بهینه فعالیت آنزیم PersiXyn9.

جهت تعیین میزان پایـداری آنـزیم PersiXyn9 در دمای بهینه فعالیت (۵۰°C) به این صورت عمل شد که سوبسترا در دمای ۵۰°C با آنزیم تیمار شد و در طول سه ساعت، هر ۳۰ دقیقه فعالیت نسـبی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

آنزیم در دمای ۵۰°C اندازه‌گیری شد و در نهایت مشخص شد که آنزیم پس از گذشت سه ساعت فعالیت در دمای ۵۰°C، ۲۶ درصد فعالیت نسبی خود را حفظ کرده است (شکل ۷).



شکل۷ - پایداری فعالیت آنزیم در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس و به مدت ۳ ساعت.

بررسی‌های SEMبر 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 به‌ترتیب ۶۱/۴ و ۳۴ درصد بود همچنین کلیه مواد تشکیل‌دهنده آن در جدول یک آمده است. خوراک طیور تهیه‌شده 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 نمونه‌های تیمار نشده (شاهد) گرانول‌های کروی فشرده و دست نخورده 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. همانطوری‌که در شکل ۸ نشان داده شده است آرایش اولیه ساختار خوراک طیور از بین رفته و حفره‌های بزرگ و بلوک‌های متخلخل ایجاد شده است. این موضوع نشان‌دهنده 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 تغذیه‌ای می‌شود.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

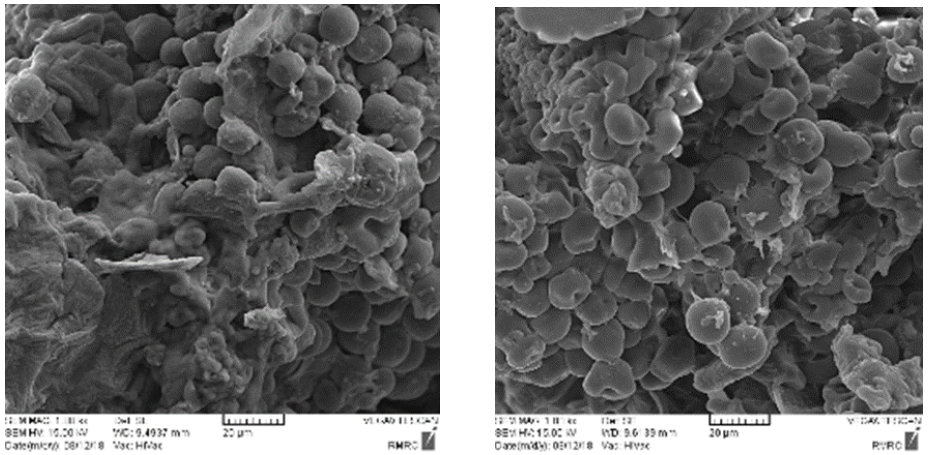
[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

جدول ۱- ترکیب خوراک طیور و ترکیبات مغذی خوراک تهیه‌شده 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
سیستئین(٪)	۰/۰۲
متیونین+سیستئین(٪)	۱۲/۱۳
ترئونین(٪)	۰/۰۷
تریپتوفان(٪)	۰/۰۲۴

A) پیش از هیدرولیز آنزیمی

B) پس از هیدرولیز آنزیمی



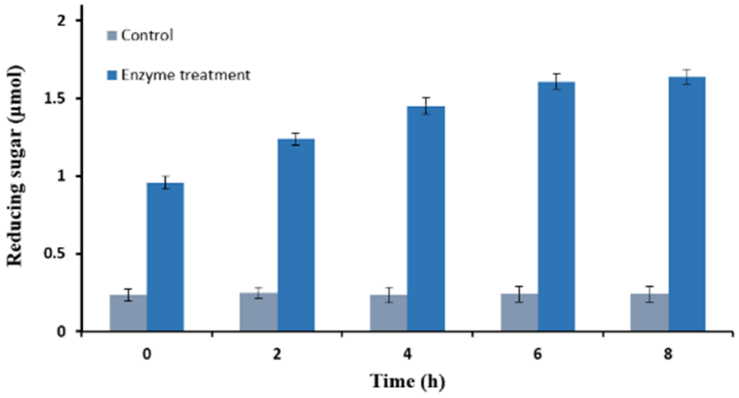
شکل ۸- بررسی تغییرات هیدرولیز ساختاری خوراک طیور پیش (A) و پس (B) از تیمار با آنزیم PersiXyn9 توسط SEM.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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 به‌منظور استفاده در خوراک طیور می باشد (Chadha et al. 2019). همانطوری‌که 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 به‌منظور استفاده در زیست‌شناسی مولکولی، پزشکی، صنعت و کشاورزی تجاری شده‌اند. ورود آنزیم‌ها به زندگی انسان علاوه‌بر 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 به‌طور 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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، پروتئازها، آمیلازها، فیتازها و گالاکتوزیدازها. آنزیم‌های هیدرولازی فاکتورهای ضدتغذیه‌ای موجود در خوراک طیور را حذف کرده و علاوه‌بر تجزیه خوراک طیور موجب افزایش هضم در سیستم گوارشی طیور نیز می‌شوند. زایلانازها، آنزیم‌های کلیدی در تجزیه پیوندهای زایلوزیدی در ساختار زایلان موجود در زیست‌توده 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. به‌دلیل تنوع گسترده در سطح گونه و شرایط محیطی، میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان 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 این‌رو، به‌عنوان یکی از بهترین محیط‌ها جهت شناسایی آنزیم‌های مقاوم به حرارت مانند آنزیم PersiXyn9 محسوب می‌شوند.

در تحقیق حاضر شاخص‌های بیوشیمایی مختلفی در مورد فعالیت آنزیم PersiXyn9 مشخص شد که تمامی این شاخص‌ها و خصوصا فاکتور pH و قابلیت فعالیت در دماهای بالا به‌عنوان 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 به‌عنوان مهمترین فاکتورها در انتخاب یک

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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 حالی‌که آنزیم زایلاناز برگرفته از کتابخانه متاژنوم 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 به‌ترتیب فعالیتی برابر ۸۸ و ۶۵ درصد از خود نشان داد. در حالی‌که زایلاناز حاصل از دی.ان.ای متاژنومی 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).

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 متاژنوم 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 اندو۱و۴ 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 اسیدآمینه گلوتامات (E157 و E262) در این موتیف‌ها است و پیش‌بینی شد که جایگاه فعال این آنزیم ها 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 ۸-۵ به

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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 متاژنوم کمپوست-خاک جداسازی کردند. این پروتئین ۳۵۸ اسید آمینه طول داشته و با گلیکوزید هیدرولازهای خانواده ۱۱ همولوژی داشت و اپتیمم pH و فعالیت این آنزیم به‌ترتیب ۹ و ۸۰°C گزارش شد (Verma et al. 2013).

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

در سال ۲۰۱۸ آریائی‌نژاد و همکاران یک نمونه آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت از متاژنوم شکمبه شتر شناسایی، جداسازی و تعیین عملکرد کردند. این آنزیم ۳۸۱ اسید آمینه طول داشت و به‌طور نوترکیب در باکتری *E. coli* بیان و خالص‌سازی شد. این محققان نشان دادند که آنزیم شناسایی‌شده در pH با محدوده ۱۱-۶ و دمای ۹۰°C -۲۵ فعالیت دارد. اپتیمم 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 لایه‌برداری 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* مدلسازی 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 می‌دهد. پروفایل‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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 ۵۰°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 ۴۰-۸۰°C دارند (Polizeli et al. 2005).

یافته‌های این پژوهش در خصوص PersiXyn9 نشان می‌دهد که پایدار حرارتی بودن این آنزیم احتمالا 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

متاژنومی گاو استفاده شد. ژن پایدار حرارتی انتخاب‌شده *PersiXyn9* نام‌گذاری شد و در مراحل بعدی کلون، بیان و خالص شد و آزمون‌های بیوشیمیایی در دما و pHهای مختلف جهت تعیین فعالیت آن انجام شد. آزمون‌های انجام‌شده حاکی از این موضوع است که آنزیم موردنظر 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 نشان‌دهنده قابلیت این آنزیم به‌منظور استفاده در صنعت خوراک طیور است. تحقیقات مزرعه‌ای و انجام تست بر روی جوجه‌های گوشتی می‌تواند قابلیت استفاده این آنزیم را در صنعت خوراک طیور بیشتر مشخص کند.

فهرست منابع

References

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-Harthi 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).

Ariaeenejad 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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 xylooligosaccahrides 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]

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

Seyed Hossein Mousavi[1], Shohreh Ariaeenejad[1*], Ghasem Hosseini Salekdeh[1]

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℃, and the optimum pH of 6. Kinetic values, Km and Vmax, for this enzyme were calculated to be 1.18 mg/ml and 206.78 μmol $min^{-1}mg^{-1}$ respectively. Scanning electron microscopy (SEM) images of the activity of the enzyme on poultry feed at 50℃ represent the high efficiency of the xylanase as an additive in the poultry feed industry.

Keywords: Metagenome, Xylanase, Poultry Feed, Hydrolysis.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.4.5.8]