

## **Cloning and expression of recombinant xylanase enzyme (*xynA*) in *E. coli*.**

**Amin Sadeghi Alikelayeh** 

PhD Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: a.s.phd.biotech@gmail.com

**Neda Mirakhorli** 

\*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: neda.mirakhorli.54@gmail.com

**Mohammad Reza Akbari** 

Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: mrakbari5@gmail.com

**Behzad Shareghi Brojeni** 

Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Basic Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Email: b\_shareghi@yahoo.com

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

Today, global increasing in corn prices has led to the replacement of wheat instead of corn in poultry diets. The NSPs in the cell wall prevents the uptake of wheat nutrients by poultry. Using xylanase is one of the methods to remove NSPs. Xylanases can digest xylan. The aim of current investigation was to produce xylanase (*xynA*) gene as a supplement of poultry diets in *E. coli*.

#### **Materials and methods**

In present study, the thermostable xylanase (*xynA*) gene in a bacterial secretory expression system along with: Shine-Dalgarno sequence, Usp45 signal peptide and *T7* promoter was cloned in plasmid pET-22b (+) from *E. coli* strain BL21 (DE3) using The heat shock method. IPTG

were used at different times to induce the expression of recombinant xylanase gene. In addition, catalytic indicators were done according to the DNS method.

## Results

PCR colony confirmed the presence of 743 bp recombinant xylanase gene sequence on 1% agarose gel. SDS-PAGE showed protein with 27 kDa molecular weight. Also, the activity of recombinant protein was 189.47 (unit/ml) using DNS method at optimum temperature of 65 °C and pH=6. As well as, michaelis-menten curve determined  $K_m$  and  $V_{max}$  4.1 (mg/ml) and 87 (unit/ml), respectively.

## Conclusions

Xylanase are the most important complementary enzymes in poultry diets that are added to wheat-based diets. Results showed that produced recombinant xylanase is thermostable enzyme with acceptable activity and concentration. Furthermore, because of the secretory expression system, it is produced at a lower cost.

**Keywords:** Recombinant xylanase enzyme, *E. coli*, Wheat

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Sadeghi Alikelayeh A, Mirakhorli N, Akbari MR, Shareghi Brojeni B (2020) Cloning and expression of recombinant xylanase enzyme (*xynA*) in *E. coli*. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (4), 1-22.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 12 (4), 1-22.

DOI: 10.22103/jab.2020.16372.1255

Received: September 19, 2020.

Accepted: November 7, 2020.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production,



Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

---

## همسانه‌سازی و بیان آنزیم نو ترکیب زایلاناز (*xynA*) در باکتری *E. coli*

امین صادقی علیکلایه

دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کدپستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. رایانامه: a.s.phd.biotech@gmail.com

ندا میرآخورلی

\*نویسنده مسئول: استادیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کدپستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. رایانامه: neda.mirakhorli.54@gmail.com

محمدرضا اکبری

استادیار، گروه علوم دامی و طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، کدپستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. رایانامه: mrakbari5@gmail.com

بهزاد شارقى بروجنى

استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، کدپستی: ۸۸۱۸۶۳۴۱۴۱، شهرکرد، ایران. رایانامه: b\_shareghi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۷

### چکیده

**هدف:** امروزه، افزایش جهانی قیمت ذرت در جیره طیور سبب جایگزینی گندم به جای ذرت شده است. اما وجود پلی ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در دیواره سلولی مانع جذب ترکیبات غذایی موجود در گندم توسط طیور می‌گردند. یکی از روش‌های حذف پلی ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای موجود در گندم استفاده از آنزیم زایلاناز در جیره‌ی غذای طیور می‌باشد. زایلانازها سبب شکسته

شدن پیوند اندو بتا (۴-۱) آرایینوزایلان در دیواره سلولی گندم می‌شود. هدف از این پژوهش تولید آنزیم نوترکیب مقاوم به حرارت زایلاناز در باکتری *E. coli*، به عنوان مکمل جیره غذایی طیور می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش ژن مقاوم به حرارت زایلاناز (*xynA*) در یک سیستم بیان ترشحی باکتریایی شامل: توالی شاین-دالگارنو، سیگنال‌پپتید ترشحی Usp45 و پروموتور T7 در پلاسמיד (+) pET-22b از باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) با استفاده از روش شوک حرارتی کلون شد. جهت القای بیان ژن نوترکیب زایلاناز از القاگر IPTG در زمان‌های مختلف استفاده گردید. همچنین، بررسی شاخص‌های کاتالیتیکی نیز طبق روش DNS صورت پذیرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از کلونی PCR وجود توالی ژن نوترکیب زایلاناز به طول ۷۴۳ bp را بر روی ژل آگارز ۱ درصد تأیید نمود. ژل اکریل‌آمید SDS-PAGE، حضور پروتئین با وزن مولکولی ۲۷ kDa را نشان داد. همچنین میزان فعالیت پروتئین نوترکیب به مقدار ۱۸۹/۴۷ (unit/ml) با استفاده از روش DNS در دمای بهینه ۶۵°C و pH=۶ تعیین گردید. علاوه بر این، نتایج منحنی میکائیلیس-منتن میزان ثابت میکائیلیس (*Km*) و حداکثر سرعت واکنش (*Vmax*) را برای آنزیم نوترکیب زایلاناز به ترتیب ۴/۱ (mg/ml) و ۸۷ (unit/ml) تعیین نمود.

**نتیجه‌گیری:** زایلانازها مهمترین آنزیم‌های مکمل جیره طیور می‌باشند که در جیره‌های بر پایه گندم اضافه می‌شوند. نتایج نشان داد، آنزیم نوترکیب حاصل، دارای فعالیت و غلظت مناسب می‌باشد و مقاوم به حرارت است. همچنین آنزیم نوترکیب زایلاناز به دلیل خاصیت ترشحی بودن با هزینه اندک قابل استحصال می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** آنزیم نوترکیب زایلاناز، *E. coli*، گندم

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** صادقی علیکلایه امین، میرآخوری ندا، اکبری محمدرضا، شارقى بروجنى بهزاد (۱۳۹۹) همسانه‌سازی و بیان آنزیم نوترکیب زایلاناز (*xynA*) در باکتری *E. coli*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱-۲۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production,



Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

## مقدمه

پرورش ماکیان یکی از مهمترین دستاوردهای بشری محسوب می‌گردد که قدمت آن را در ایران به دوران قبل از میلاد مسیح تخمین زده‌اند. در آن دوران به دلیل وجود امپراطوری بزرگ ایران (پرشیا) از هند تا دریای مدیترانه و به طبع آن گستردگی مرزهای زمینی و دریایی، حمل و نقل محصولات بویژه ماکیان از فراوانی قابل توجهی برخوردار بوده که سبب توسعه جمعیت ماکیان شده

است (Moazeni et al. 2016; Mohammadifar and Mohammadabadi 2017). بر اساس مطالعات باستان‌شناسی West and Zhou نشان می‌دهد که فسیل استخوانی ماکیان در جنوب شرقی ایران به دوران ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ پیش از میلاد مسیح تعلق دارد (Mohammadifar et al. 2014; Mohammadifar and Mohammadabadi 2018). از آنجا که براساس توصیه سازمان بهداشت جهانی یک سوم پروتئین مصرفی انسان باید از منابع پروتئین حیوانی تأمین گردد. پرورش طیور در چند سال اخیر رشد چشم‌گیری داشته است. یکی از مهمترین موارد در پرورش صنعتی طیور، تأمین خوراک طیور می‌باشد. ذرت مهمترین ماده غذایی جیره طیور به شمار می‌رود که حدود ۶۵ درصد آن را تشکیل می‌دهد. امروزه تولید سوخت‌های زیستی و اتانول از ذرت سبب افزایش قیمت این محصول و کاهش سهمیه مصرفی آن برای طیور شده است (Wang et al. 2018). یکی از راهکارها جهت رفع این معضل، جایگزین کردن گندم در جیره غذایی طیور به جای ذرت می‌باشد. میزان پروتئین خام گندم نسبت به ذرت بالاتر است اما به دلیل وجود پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای (non-starch polysaccharides) موجود در دیواره سلولی گندم، جذب ترکیبات غذایی آن توسط طیور کاهش پیدا می‌کند (Engberg et al. 2004). پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای سبب افزایش میزان ویسکوزیته، کاهش برخوردهای مؤثر بین آنزیم‌های گوارشی و سوبستراها و بروز مشکلات روده‌ای در طیور می‌گردد. پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای موجود در دیواره سلولی گندم عمدتاً از گروه آرابینوزایلان‌ها هستند. مناسب‌ترین راهکار جهت حذف آرابینوزایلان‌ها استفاده از آنزیم زایلاناز می‌باشد. افزودن آنزیم زایلاناز به جیره‌های بر پایه گندم می‌تواند اثرات نامطلوب پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای را از بین ببرد (Fajardo et al. 2012). زایلانازها آن دسته از آنزیم‌هایی هستند که پلی‌ساکارید خطی زایلان منجمله همی سلولز، یکی از اجزای اصلی دیواره سلول‌های گیاهی، را هضم می‌کنند. به همین ترتیب، این ماده نقش مهمی در رشد میکروارگانیسم‌های موجود در منابع گیاهی برای تخریب مواد گیاهی به مواد مغذی قابل استفاده دارد. زایلانازها توسط قارچ‌ها، باکتری‌ها، مخمرها، جلبک‌های دریایی، تک یاخته‌ها، حلزون‌ها، سخت پوستان، حشرات و دانه‌ها تولید می‌شوند. از این رو آنزیم زایلاناز علاوه بر تجزیه غذای طیور در صنایع مختلف مانند: تولید سوخت زیستی، تولید خمیر کاغذ و در صنایع غذایی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Vieco-Saiz et al. 2019). یکی از مهمترین روش‌های تولید آنزیم در صنعت خوراک دام و طیور استفاده از علم مهندسی ژنتیک و تولید آنزیم در میکروارگانیسم‌ها است. تولید انواع آنزیم‌های نوترکیب می‌تواند مانع از خروج سالانه ارز جهت واردات مکمل‌های غذایی دامی گردد. یکی از بخش‌های بسیار مهم در فرآیند تولید آنزیم، ساخت کانستراکت بیانی مناسب می‌باشد. ساخت یک کانستراکت بیانی به همراه سیگنال‌پپتید و توالی شاین-دالگرنو سبب افزایش میزان بیان ژن هدف و تسهیل فرآیند خالص‌سازی پروتئین نوترکیب می‌گردد (Vasudevan et al. 2019). باکتری *E. coli* به دلیل قابلیت دستورزی آسان به طور گسترده جهت تولید انواع واکسن، دارو و آنزیم‌های تجاری استفاده می‌گردد. هدف از این پژوهش همسانه‌سازی و بیان ژن مقاوم به حرارت زایلاناز (*xynA*) در باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) به عنوان مکمل خوراک طیور می‌باشد. این تحقیق می‌تواند امکان تولید آنزیم زایلاناز را در شکل صحیح خود فراهم آورد و هزینه‌های استخراج را کاهش دهد.

## مواد و روش‌ها

**باکتری‌ها، پلاسمید و ژن هدف:** باکتری‌های گرم منفی *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  و سویه BL21 (DE3) به ترتیب

جهت کلون‌سازی و بیان ژن زایلاناز (*xynA*) مورد استفاده قرار گرفتند. پلاسمید (+) pET-22b حاوی ژن نشانگر انتخابی آمپی‌سیلین از قدرتمندترین ناقل‌هایی است که برای بیان ژن و تولید پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli* کاربرد دارد. ژن هدف در ناحیه MCS پلاسمید، کلون می‌شود که تحت کنترل پروموتور قوی T7 است. حضور اپرون *LacI* در پلاسمید امکان کنترل و القای بیان ژن توسط القاگر شیمیایی IPTG را فراهم می‌کند. ژن هدف (*xynA*) (Gene ID: 939861)، کدکننده آنزیم اندو بتا (۱-۴) زایلاناز مقاوم به حرارت می‌باشد که از باکتری *Bacillus subtilis* بدست آمده است. آنزیم زایلاناز سبب شکسته شدن پیوند اندو بتا (۱-۴) آرابینوزایلان در دیواره سلولی گندم می‌گردد.

**شرایط رشد باکتری *E. coli*:** به منظور فعال‌سازی و همچنین کشت شبانه‌ی باکتری *E. coli* مقدار ۲۰ میکرولیتر

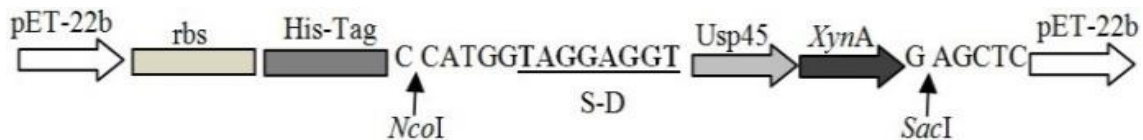
از استوک گلیسرول ذخیره باکتری به یک فالکون استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لوریا-برتانی (LB) حاوی: عصاره مخمر (۵ g/l)، تریپتون (۱۰ g/l) و NaCl (۵ g/l) تلقیح شد و در دمای ۳۷°C درون انکوباتور شیکردار (Gyromax 727, USA) با شدت دور ۱۹۰ rpm به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفت.

**کشت جامد باکتری *E. coli*:** جهت تهیه محیط کشت جامد LB، پس از ساخت محیط کشت مایع، به ازای هر لیتر

محیط کشت مایع مقدار 11 گرم آگار اضافه و پس از انحلال، اتوکلاو صورت پذیرفت و درون پتری دیش توزیع گردید. رشد سویه‌های DH5 $\alpha$  و BL21(DE3) در دمای ۳۷°C و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور، صورت پذیرفت.

**طراحی سازواره بیانی نوترکیب:** به منظور بررسی ترجیح کدونی توالی‌های مورد نظر در باکتری *E. coli*، از

نرم‌افزارهای آنالین JCat (<http://www.jcat.de>) و GenScript (<http://www.genscript.com>) استفاده شد. توالی ژن مقاوم به حرارت زایلاناز (*xynA*) به همراه سیگنال‌پپتید ترشچی Usp45 (Gene ID: 166200971)، توالی شاین-دالگارنو (S-D) و توالی آنزیم‌های برشی *SacI* و *NcoI* به صورت یک قطعه‌ی نوترکیب به طول ۷۴۳ جفت‌باز و ۲۴۶ اسیدآمین، با استفاده از نرم‌افزار SnapGene® (4.2.11v) طراحی و توسط شرکت پیشگامان انتقال ژن (دانشگاه شهید بهشتی، تهران) سنتز گردید. با جایگزینی قطعه در پلاسمید (+) pET-22b سازواره نوترکیب به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱. سازواره ژن نو ترکیب زایلاناز حاوی: توالی آنزیم‌های برشی *NcoI* و *SacI*، توالی شاین-دالگارنو (S-D)، سیگنال پپتید ترشحي *Usp45* و ژن زایلاناز (*xynA*)

**Figure 1. Construction of recombinant xylanase gene containing: *NcoI* and *SacI* restriction enzymes sequences, Shine-Dalgarno (S-D) sequence, *Usp45* secretory signal peptide and xylanase gene (*xynA*)**

**تهیه سلول مستعد باکتری *E. coli*:** جهت تهیه سلول مستعد از روش کلرید کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) استفاده گردید (Sambrook et al. 1989). بدین منظور مقدار ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت LB مایع درون ارلن ۲۵ میلی لیتری ریخته شد، سپس به کمک لوپ مقداری از باکتری *E. coli* به آن اضافه گردید و به مدت ۱۶ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  درون انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۹۰ rpm قرار گرفت. مقدار یک میلی لیتر از کشت شبانه درون یک ارلن، حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع فاقد آنتی بیوتیک در دمای  $37^\circ\text{C}$  درون انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۹۰ rpm کشت مجدد صورت پذیرفت. زمانی که میزان غلظت بهینه ( $\text{OD}_{600}$ ) کشت مجدد باکتری بین ۰/۴-۰/۶ به دست آمد، کشت مجدد باکتری از انکوباتور خارج شده و به مدت ۲۰ دقیقه در یخ قرار گرفت و سپس ۲۵ میلی لیتر از آن درون فالكون‌های ۵۰ میلی لیتری استریل ریخته شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای  $4^\circ\text{C}$  و با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (Germany, eppendorf 5920 R) انجام شد. بلافاصله محلول رویی آن‌ها خارج و فالكون‌ها به روی یخ منتقل شدند. سپس ۱/۵ میلی لیتر از محلول کلرید کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) ۰/۱ مولار به هر یک از فالكون‌ها اضافه گردید و رسوب موجود در ته فالكون به آرامی در محلول کلرید کلسیم حل شد و به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای  $4^\circ\text{C}$  و با سرعت ۴۰۰۰ rpm انجام گرفت. مجدداً فالكون‌ها روی یخ منتقل شدند و به سرعت محلول رویی آن‌ها خارج گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار مخلوط با گلیسرول ۱۵ درصد به نسبت ۱:۱ به هر یک از فالكون‌ها اضافه و رسوب موجود در ته فالكون به آرامی در این محلول حل گردید. در نهایت، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد تهیه شده، درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری استریل توزیع و پس از انجماد سریع در ازت مایع، در فریزر (Netherland, VF 475) در دمای  $-70^\circ\text{C}$  نگهداری شدند (Tu et al. 2005).

**انتقال پلاسمید به باکتری *E. coli*:** مراحل انتقال پلاسمید به باکتری *E. coli* طبق روش Sambrook et al (1989) صورت پذیرفت. در این روش ابتدا مقدار ۳ میکرولیتر از پلاسمید نو ترکیب (+) pET-22b حاوی ژن مقاوم به حرارت زایلاناز به آرامی به درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری حاوی سلول مستعد باکتری *E. coli* انتقال داده شدند و ۱ میکرولیتر محلول DMSO نیز به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت درون فریزر در دمای  $-20^\circ\text{C}$  قرار گرفتند. بلافاصله پس از

خروج از فریزر، نمونه‌ها به مدت ۹۰ ثانیه در دمای  $42^{\circ}\text{C}$  در دستگاه بلوک حرارتی (Germany, eppendorf 5890M56) قرار داده شدند سپس بلافاصله نمونه‌ها از دستگاه بلوک حرارتی خارج و به مدت ۵ دقیقه درون یخ قرار گرفتند. در ادامه مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع فاقد آنتی‌بیوتیک به هر یک از نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ، درون انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۹۰ rpm قرار داده شدند. نهایتاً محلول توسط لوب استریل بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) کشت شد.

**تأیید ترانسفورماسیون:** پس از رشد کلونی‌های نوترکیب بر روی محیط کشت انتخابی حاوی آمپی‌سیلین، جهت تأیید حضور ژن نوترکیب زایلاناز در سوبه‌های باکتری *E. coli* از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده گردید. در این مرحله با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و استفاده از تک کلون‌های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی به عنوان نمونه (Sample)، واکنش کلونی PCR صورت پذیرفت. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول کلونی PCR جهت تأیید بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد. نهایتاً با استفاده از تیغ اسکالپل قطعه ژن نوترکیب زایلاناز جهت انجام توالی‌یابی از روی ژل آگارز ۱ درصد جدا و توسط کیت AddPrep Gel Purification شرکت *Add Bio*، خالص‌سازی گردید. قطعه خالص شده جهت انجام توالی‌یابی به شرکت *Bioneer* کره جنوبی ارسال گردید

#### جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر ژن نوترکیب زایلاناز

Table 1. Primer sequences used to amplify the recombinant xylanase gene

آغازگرها	توالی آغازگر
Primers	Primer sequence
رفت	AGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCT
Forward (5'→3')	ATGTTTAAGTTTAAAAAGAATTTCT
برگشت	TAACGTAACAGTGTGGTAAGAGCT
Reverse (5'→3')	C

**القای بیان پروتئین:** جهت القای بیان پروتئین نوترکیب زایلاناز در باکتری *E. coli* سویه BL21 از القاگر IPTG (ایزوپروپیل  $\beta$ -D-تیوگالاکتوزید) به غلظت ۱ میلی‌مولار استفاده شد. بدین منظور از کلون‌های نوترکیب تازه رشد یافته بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین یک کلون انتخاب شده و در ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت شبانه (۱۶ ساعت) درون انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۹۰ rpm در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. پس از رسیدن به



مقدار غلظت بهینه، مقدار ۵ میلی لیتر از محیط کشت را به عنوان شاهد (بدون القاگر) برداشته و الباقی محیط کشت را درون ۵ فالکون استریل محلول القاگر IPTG اضافه شد. سپس تمامی فالکون ها به انکوباتور شیکردار با دمای  $30^{\circ}\text{C}$  در بازه های زمانی ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ساعت منتقل گردیدند. پس از استخراج پروتئین کل، نمونه ها بر روی ژل الکتروفورز SDS-PAGE بارگذاری شدند (Laemmli 1970).

#### سنجش میزان فعالیت (یونیت) آنزیم نوترکیب زایلاناز: برای اندازه گیری میزان پروتئین فعال از آزمون قندهای

احیاکننده استفاده گردید (Miller 1959). به منظور سنجش فعالیت آنزیم، یک گرم آرد گندم را با ۶ میلی لیتر اتانول مرطوب کرده سپس ۹۰ میلی لیتر بافر سیترات سدیم فسفات ( $\text{pH}=4/6$ ) به آن اضافه شد، سوبسترای حاصل بدست آمده تا جایی که بجوش بیاید حرارت داده شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین زایلاناز در محدوده دمایی ۶۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری انکوبه و به ۱ میلی لیتر سوبسترا اضافه گردیدند (Afzal et al. 2010). در ادامه با اضافه نمودن ۳ میکرولیتر معرف DNS (۵،۳ دی نیترو سالیسیلیک اسید) میزان قند احیاکننده در محیط تعیین گردید. معرف DNS با قند (گلوکز) احیاکننده واکنش می دهد و به ۳-آمینو-۵-نیتروسالیسیلیک اسید تبدیل می شود و رنگ معرف از زرد به نارنجی یا قرمز تغییر می کند. نهایتاً با قرار دادن نمونه ها درون حمام بن ماری با دمای  $100^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه تغییرات رنگی ظاهر شده و نمونه ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر قرائت گردیدند. میزان قند احیاکننده با رسم نمودار استاندارد گلوکز تعیین شد. جهت تعیین میزان واحد (یونیت) آنزیم نوترکیب زایلاناز تولید شده از رابطه ۱ (McCleary 2001) استفاده گردید.

$$\text{رابطه ۱)} \quad \text{مقدار گلوکز آزاد شده بر حسب میکرومول در میلی لیتر} = \frac{\text{مقدار واحد آنزیمی}}{\text{زمان (دقیقه)}}$$

#### تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب زایلاناز: کینتیک آنزیمی، به بررسی سرعت واکنش و عوامل موثر بر

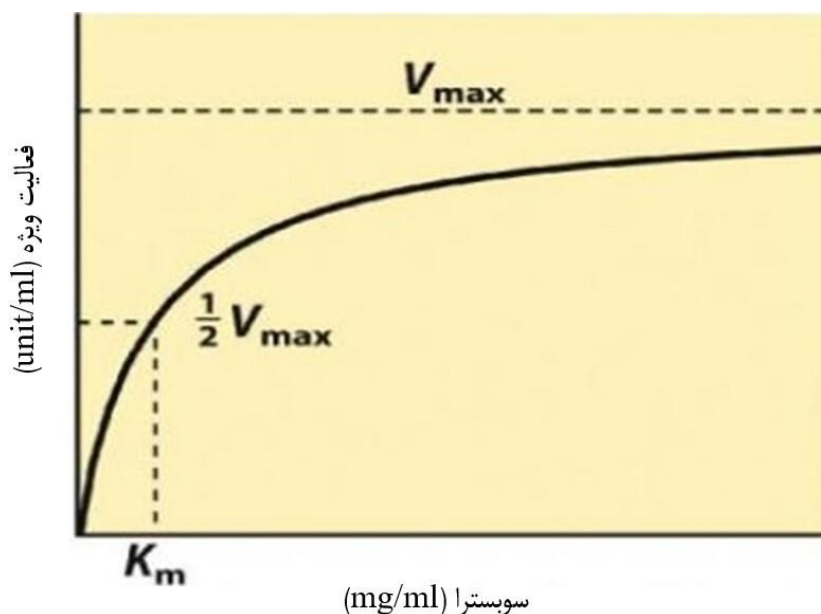
آن اطلاق می گردد. سرعت واکنش آنزیمی (V) به عواملی از قبیل: دما، میزان pH، و غلظت سوبسترا بستگی دارد. به منظور تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب زایلاناز آزمون قندهای احیاکننده در محدوده دمایی ۶۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی گراد انجام شد.

#### تعیین میزان pH بهینه فعالیت آنزیم زایلاناز: جهت بدست آوردن میزان pH بهینه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از

پروتئین زایلاناز طبق آزمون قندهای احیاکننده در سه نوع بافر سیترات سدیم (۵۰ mM) برای ایجاد pH ۳-۶، بافر تریس (۵۰ mM) برای ایجاد pH ۷/۱-۹/۱ و بافر کربنات پتاسیم (۵۰ mM) برای ایجاد pH ۹-۱۱ مخلوط شد. نهایتاً میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری (Germany, eppendorf BioPhotometer) قرائت گردید (Dhiman et al. 2008).

تعیین میزان  $K_m$  و  $V_{max}$  آنزیم زایلاناز: شاخص کاتالیتیکی ثابت میکائیلیس ( $K_m$ ) به عنوان تمایل آنزیم برای اتصال به سوبسترای خود معرفی می‌شود و هرچه میزان  $K_m$  کوچکتر باشد، تمایل آنزیم برای اتصال به سوبسترا بیشتر خواهد بود (رابطه ۲). همچنین شاخص حداکثر سرعت واکنش ( $V_{max}$ ) نیز زمانی رخ می‌دهد که کلیه جایگاه‌های فعال آنزیم توسط سوبسترا اشغال شده باشد و مولکول‌های سوبسترا به فرآورده تبدیل شده و آنزیم آزاد می‌شود تا مولکول دیگری از سوبسترا بلافاصله به آن متصل شود. برای تعیین مقادیر ثابت میکائیلیس و حداکثر سرعت واکنش فعالیت آنزیم نو ترکیب زایلاناز، دما و pH بهینه به ازای غلظت‌های مختلف سوبسترا (محلول زایلان گندم) بررسی گردید (شکل ۲). در هر تیوب استریل، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر متانول ۷۰٪، حجم ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا، آنزیم زایلاناز و بافر پتاسیم فسفات ۰/۲ مولار به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر در ۳ تکرار رسانده شد و مخلوط گردیدند. جهت تعیین  $K_m$ ، غلظت سوبسترا بین ۰/۱ تا ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد و با اضافه نمودن معرف DNS تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر ثبت گردید (Glickman & Schmid 2007)

$$K_m = \frac{1}{2} V_{max} \quad \text{(رابطه ۲)}$$



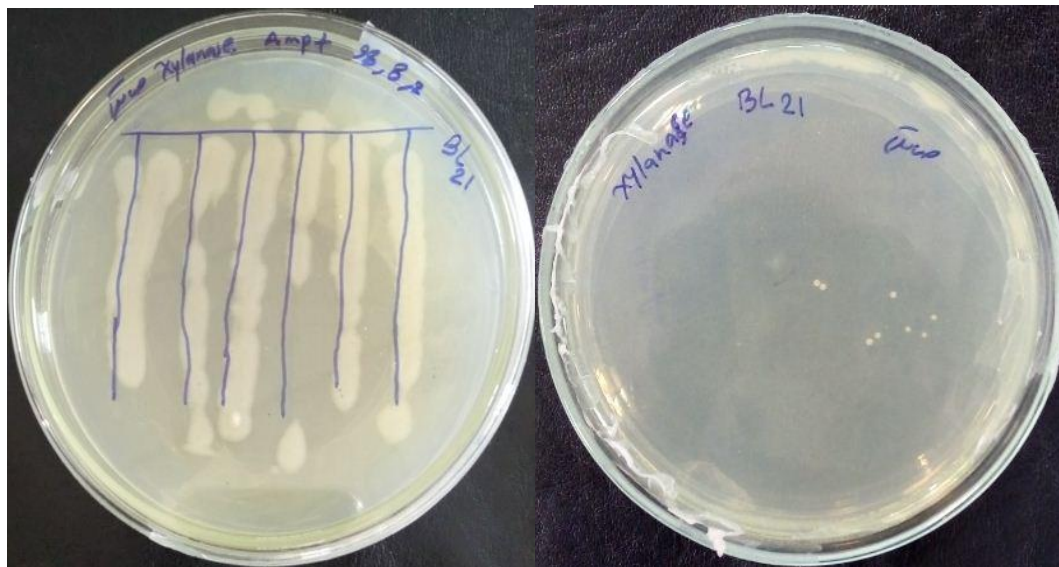
شکل ۲. نمای شماتیک از منحنی میکائیلیس-متن جهت تعیین ثابت میکائیلیس ( $K_m$ ) و حداکثر سرعت واکنش ( $V_{max}$ )

Figure 2. Schematic view of the michaelis-menten curve to determine the enzymatic constant coefficient ( $K_m$ ) and maximum reaction rate ( $V_{max}$ )

**آنالیز آماری:** آنالیز تجزیه واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار (i386 3.5.0) R صورت پذیرفت. همچنین مقایسات میانگین‌ها به روش LSD و در سطح احتمال معنی‌داری ۵ درصد انجام شدند.

### نتایج و بحث

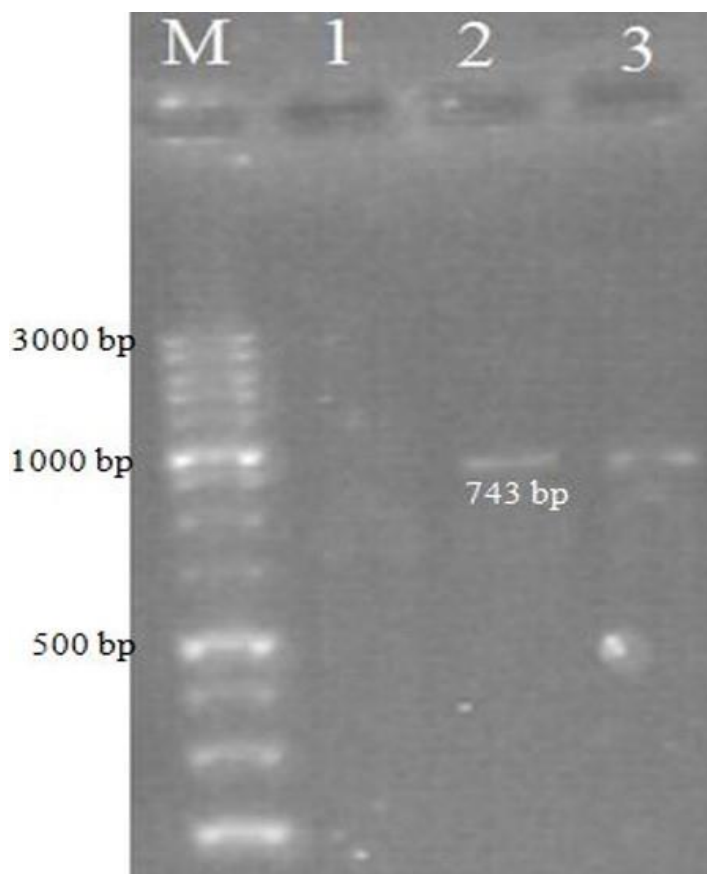
**ترانسفورماسیون پلاسمید نو ترکیب (+) pET-22b به سویه BL21:** پس از استخراج پلاسمید نو ترکیب از سویه DH5 $\alpha$ ، مقدار ۱۰ میکرولیتر از پلاسمید نو ترکیب با روش شوک حرارتی به درون سویه BL21 منتقل گردید. سپس بر روی محیط کشت انتخابی به مدت ۱۶ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷°C قرار داده شدند. در ادامه، از کلون‌های رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی بصورت خطی کشت داده شدند (شکل ۳).



شکل ۳. کلونی باکتری *E. coli* ترانسفورم شده سویه BL21 بر روی محیط کشت انتخابی (تصویر راست) - کشت خطی کلون‌های باکتری نو ترکیب بر روی محیط کشت انتخابی حاوی آمپی‌سیلین (تصویر چپ)

**Figure 3. Clone of transformed *E. coli* strain BL21 on selective culture medium (right image) - Linear culture of recombinant bacterial clones on selective culture medium containing ampicillin (left image)**

**تأیید کلونی‌های نو ترکیب به روش کلونی PCR:** نتایج حاصل از کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (R و F) قطعه ۷۴۳ جفت‌بازی را بصورت تک باند بر روی ژل آگارز ۱ درصد تأیید نمود (شکل ۴).



شکل ۴. ژل الکتروفورز ۱ درصد محصول کلونی PCR جهت تأیید حضور ژن نوترکیب زایلاناز. مارکر ۱۰۰

جفت باز پلاس *Thermo fisher* (M) \_ کنترل منفی (۱) \_ باند مربوط به ژن نوترکیب زایلاناز (۲ و ۳)

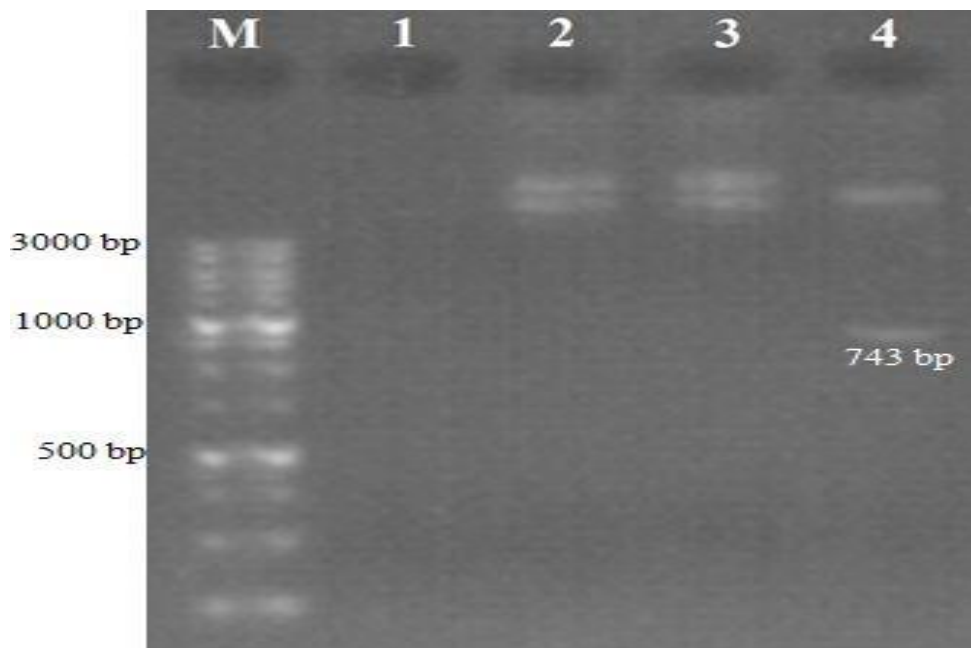
**Figure 4. Electrophoresis of 1% PCR colony product to confirm the presence of recombinant xylanase gene. *Thermo fisher* (M) plus 100 bp marker \_ Negative control (1) \_ Xylanase recombinant gene band (2 and 3)**

هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب (+) pET-22b: استخراج پلاسمید نوترکیب (+) pET-22b از سویه BL21

طبق دستورالعمل کیت Plasmid Miniprep Kit شرکت *Genet Bio* صورت پذیرفت. پلاسمید نوترکیب به همراه

آنزیم‌های محدودگر *SacI* و *NcoI* در دستگاه بلوک حرارتی در دمای ۳۷°C به مدت یک ساعت انکوبه شدند. نتایج حضور باند

بطول ۷۴۳ جفت‌بازی را بر روی ژل آگارز ۱ درصد تأیید نمودند (شکل ۵).



شکل ۵. هضم دوگانه پلاسمید نو ترکیب (+) pET-22b جهت تأیید برش ژن نو ترکیب زایلاناز. مارکر ۱۰۰ جفت باز پلاس *Thermo fisher* (M) \_ کنترل منفی (۱) \_ پلاسمید نو ترکیب (+) pET-22b (۲ و ۳) \_ باند مربوط به ژن نو ترکیب زایلاناز (۴)

**Figure 5. Dual digestion of recombinant plasmid pET-22b (+) to confirm recombination of recombinant xylanase gene. *Thermo fisher* (M) plus 100 bp marker \_ negative control (1) \_ recombinant plasmid pET-22b (+) (2 and 3) \_ recombinant xylanase gene band (4)**

**تعیین توالی قطعه:** نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم افزار کروماس (Chromas v2.6.6) مشاهده شد (شکل ۶). جهت کاهش میزان خطا، خوانش توالی از نوکلئوتید شماره ۵۰ آغاز شد. همچنین همردیف یابی نوکلئوتیدی (BLAST)، شباهت بیش از ۹۹ درصد را با توالی ژن زایلاناز (ID: 1150916273) موجود در باکتری *Bacillus subtilis* strain 168 نشان داد (شکل ۷). نتایج توالی یابی، وجود توالی های ژن زایلاناز، سیگنال پپتید Usp45، شاین-دالکارنو و آنزیم های محدودگر را تأیید نمود.

**القای بیان ژن در باکتری *E. coli*:** استخراج پروتئین نو ترکیب از باکتری در زمان های مختلف ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰

ساعت پس از القا توسط القاگر شیمیایی IPTG انجام شد. نمونه ها با استفاده از روش SDS-PAGE تفکیک شدند. همچنین با بارگذاری عکس ژل حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE درون نرم افزار Image J میزان چگالی نسبی تعیین گردید. نتایج حاصل بصورت تک باند مشاهده شد و وجود پروتئین با وزن مولکولی ۲۷ kDa را تأیید نمود (شکل ۸). همچنین بیشترین میزان بیان پروتئین ۶ ساعت پس از القا بوسیله IPTG با میزان چگالی نسبی ۲۵/۲۷ درصد مشخص شدند (شکل ۹). مطالعات گذشته نشان دادند با افزایش میزان زمان القا بوسیله IPTG مقدار پروتئین نو ترکیب زایلاناز کاهش پیدا کرد (Bhardwaj et al. 2019).



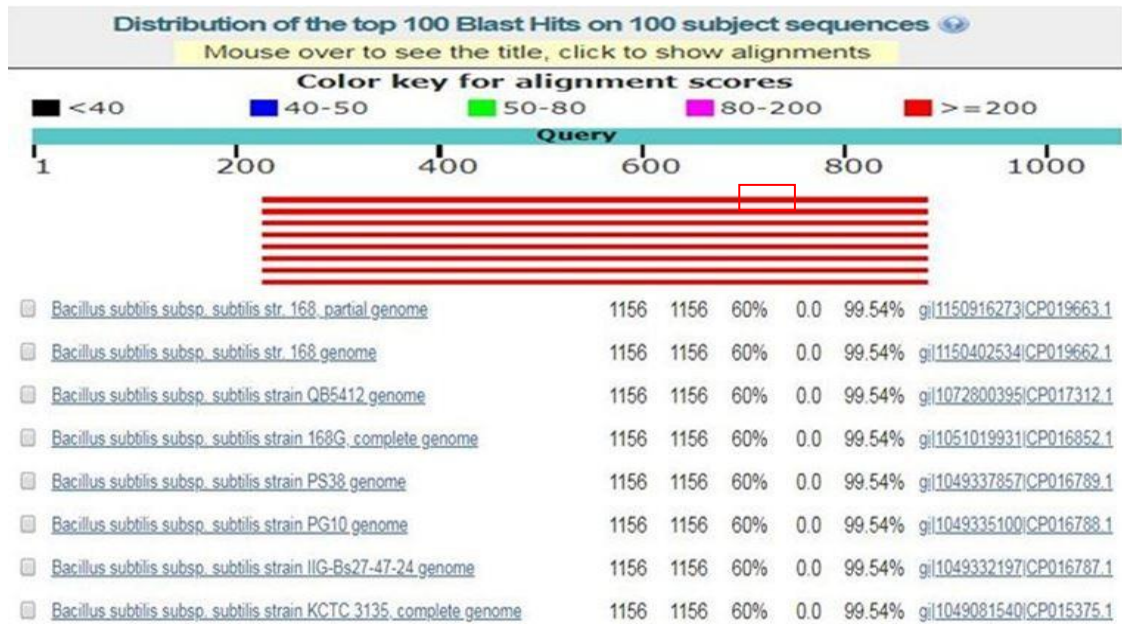
همچنین پژوهشی که بر روی کلونینگ ژن زایلاناز در پلاسمید pET-32c(+) انجام شده است میزان زمان بهینه القای IPTG را ۶ ساعت تعیین نمودند (Bilgin et al. 2018). Akyol et al (2009) در مطالعه‌ای توانستند ژن *Xyn2A* را با طراحی پرایمر اختصاصی از قارچ *Neocallimastix* استخراج نموده و در پلاسمید pCTXZA در باکتری *E. coli* سویه BL21 کلون نمایند. Wang et al (2011) نیز کلونینگ ژن زایلاناز (*Auxyn10A*) استخراج شده از قارچ *Aspergillus* را بررسی نمودند. طی این مطالعه ژن هدف در پلاسمید pET22 باکتری *E. coli* سویه BL21 وجود باند پروتئینی ۲۷ kDa را تأیید نمودند.

```

GGGGGTTGATGGGCGGTACATTCCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG
ATATACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCC
AGCCGCGATGGCCATGGTAGGAGGTATGAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGT
                NcoI   S-D       Usp45
CTACAGTGATACTTTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCTATGTTTAAGTTTA
                →
AAAAGAATTTCTTAGTTGGATTATCGGCAGCTTTAATGAGTATTAGCTTGTTTTCGGCAA
CCGCCTCTGCAGCTAGCACAGACTACTGGCAAATTGGACTGATGGGGGCGGTATAGTAA
ACGCTGTCAATGGGTCTGGCGGAATTACAGTGTTAATTGGTCTAATACCGGAAATTTTG
TTGTTGGTAAAGTTGGACTACAGGTTCCGCAATTTAGGACGATAAACTATAATGCCGGAG
TTTGGGCGCCGAATGGCAATGGATATTTAACTTTATATGGTTGGACGAGATCACCTCTCA
TAGAATATTATGTAGTGGATTCATGGGGTACTTATAGACCTACTGGAACGTATAAAGGTA
CTGTAAAAAGTGATGGGGGTACATATGACATATATACTACACGTTATAACGCACCTT
CCATTGATGGCGATCGCACTACTTTTACGCAGTACTGGAGTGTTCCGCCAGTCGAAGAGAC
CAACCGGAAGCAACGCTACAATCACTTTACGCAATCATGTGAACGCATGGAAGAGCCATG
GAATGAATCTGGGCAGTAATTGGGCTTACCAAGTCATGGCGACAGAAAGGATATCAAAGT
                ← SacI
AGTGGAAGTTCTAACGTAACAGTGTGGTAAAGAGCTCGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACT
CGAGCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGA
GTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCATAACTAGCATACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTT
GAGGGGTTTTTGTGAAAGGAGAACTATATCCGGGATTGGCGAAT
    
```

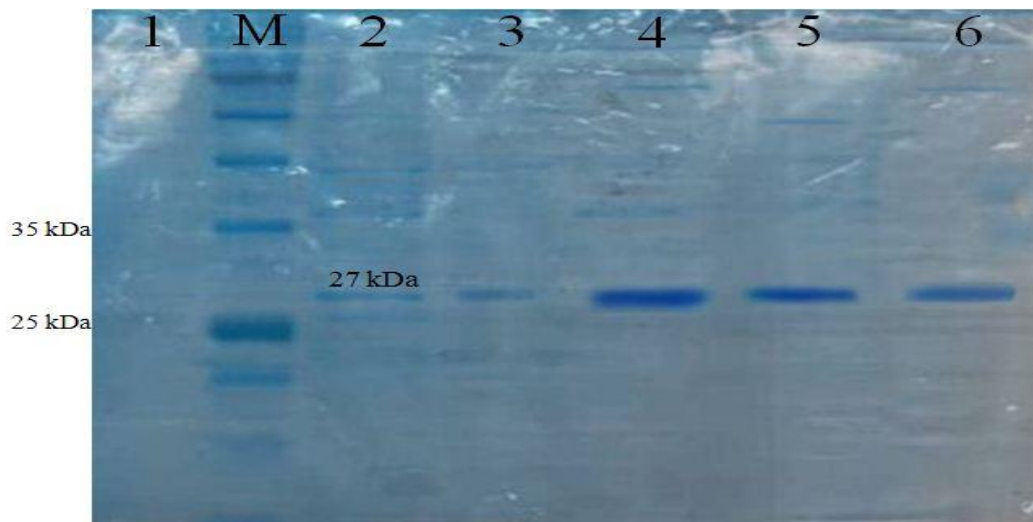
شکل ۶. نتایج توالی‌یابی به روش سانگر در نمونه نمونه باکتری *E. coli* سویه BL21. ژن زایلاناز (قرمز)، سیگنال پپتید Usp45 (خاکستری)، شاین-دالگارنو (بنفش) و آنزیم‌های محدودگر (سبز)

Figure 6. Results of sequencing by Sanger method in a sample of *E. coli* strain BL21. xylanase gene (red), Usp45 signal peptide (gray), Shine-Dalgarno (purple) and restriction enzymes (green)



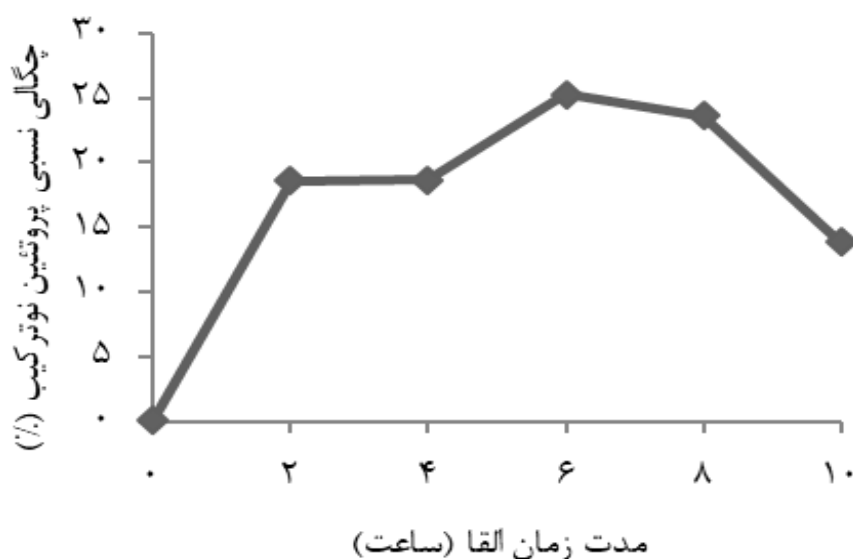
شکل ۷. نتایج همردیفی نوکلئوتیدی (BLAST) توالی‌یابی به روش سنجر

Figure 7. Result of nucleotide alignment (BLAST) of Sanger sequencing



شکل ۸. نتایج استخراج پروتئین نو ترکیب از باکتری *E. coli* بر روی SDS-PAGE. مارکر پروتئینی ۲۴۵ کیلودالتون (M) Pishgam (PM2700) \_ شاهد فاقد القاگر (۱) \_ چاهک‌های مربوط به ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ساعت پس از القا IPTG به ترتیب (۲، ۳، ۴، ۵ و ۶)

Figure 8. Results of recombinant protein extraction from *E. coli* on SDS-PAGE. Pishgam 245 kDa protein marker (PM2700) (M) \_ control sample without inducer (1) \_ wells 2, 4, 6, 8 and 10 hours after IPTG induction respectively (2, 3, 4, 5 and 6)



شکل ۹. نمودار میزان چگالی نسبی پروتئین نوترکیب زایلاناز در زمان‌های مختلف پس از القا IPTG

Figure 9. Diagram of the relative density of recombinant xylanase protein at different times after IPTG induction

#### مقدار دمای بهینه و میزان فعالیت (یونیت) آنزیم نوترکیب زایلاناز: پس از استخراج پروتئین نوترکیب زایلاناز

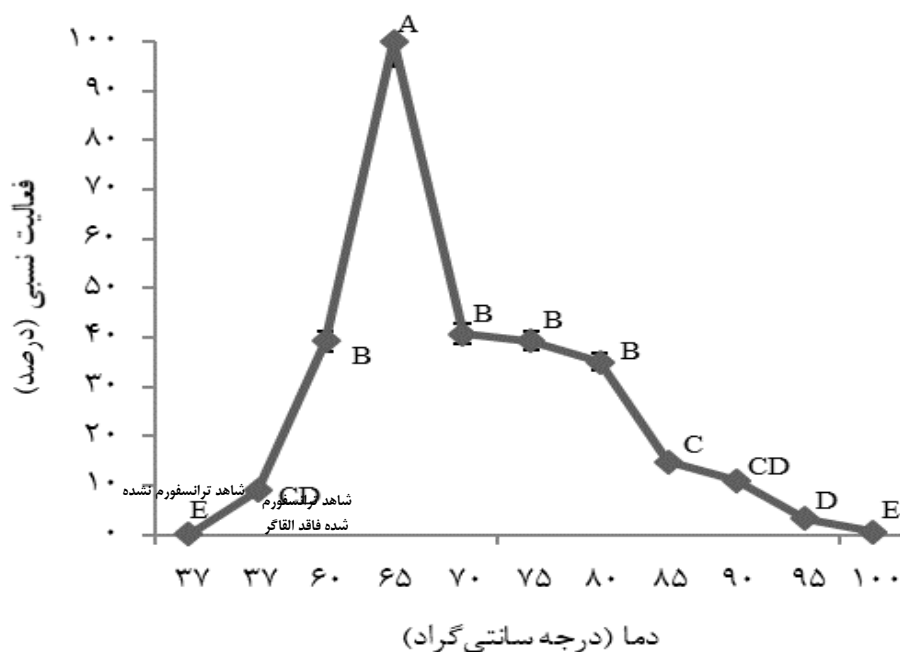
از باکتری‌های *E. coli* با استفاده از نمودار استاندارد گلوکز و معادله خطی حاصل از میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۵ نانومتر، میزان دمای بهینه فعالیت آنزیم در محدوده دمایی ۶۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین میزان واحد (یونیت) تولید شده آنزیم با استفاده از روش DNS صورت پذیرفت. جدول تجزیه واریانس (ANOVA)، وجود تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها را در سطح ۱ درصد نشان داد (جدول ۲). نتایج حاصل، دمای ۶۵°C را به عنوان دمای بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب زایلاناز معرفی نمود (شکل ۱۰). همچنین با قرار دادن نتایج در رابطه ۱، حداکثر میزان یونیت تولیدی آنزیم را ۱۸۹/۴۷ (unit/ml) تعیین نمود. نتایج مطالعات گذشته میزان دمای بهینه فعالیت آنزیم را ۶۰°C گزارش نمودند که در این پژوهش با توجه به مقاومت آنزیم نسبت به حرارت، افزایش ۵ درجه‌ای دما سبب کارایی بالاتر آنزیم نوترکیب زایلاناز در صنایع مختلف می‌گردد. همچنین وجود توالی شاین-دالگارنو در نواحی بالادست سازواره طراحی شده سبب افزایش میزان یونیت تولیدی آنزیم نوترکیب زایلاناز نسبت به نمونه زایلاناز فاقد توالی شاین-دالگارنو شده است (Jie et al. 2017). در پژوهشی که توسط Mao et al (2013) انجام شد آنزیم مقاوم به حرارت بتا (۳-۱) (۴-۱) زایلاناز از باکتری *Bacillus subtilis* استخراج و در باکتری *E. coli* بیان گردید. آن‌ها میزان مقاومت آنزیم به حرارت را پس از خالص‌سازی سنجیدند و دمای بهینه و اسیدیته لازم برای فعالیت آنزیم را ۶۵°C و pH=۶ گزارش کردند.



جدول ۲. تجزیه واریانس (ANOVA) میزان فعالیت آنزیم زایلاناز تحت تأثیر تیمارهای دمایی. \*\* در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار (LSD)

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) of xylanase activity under the influence of temperature treatments. \*\* Significant at probability level 1% (LSD)

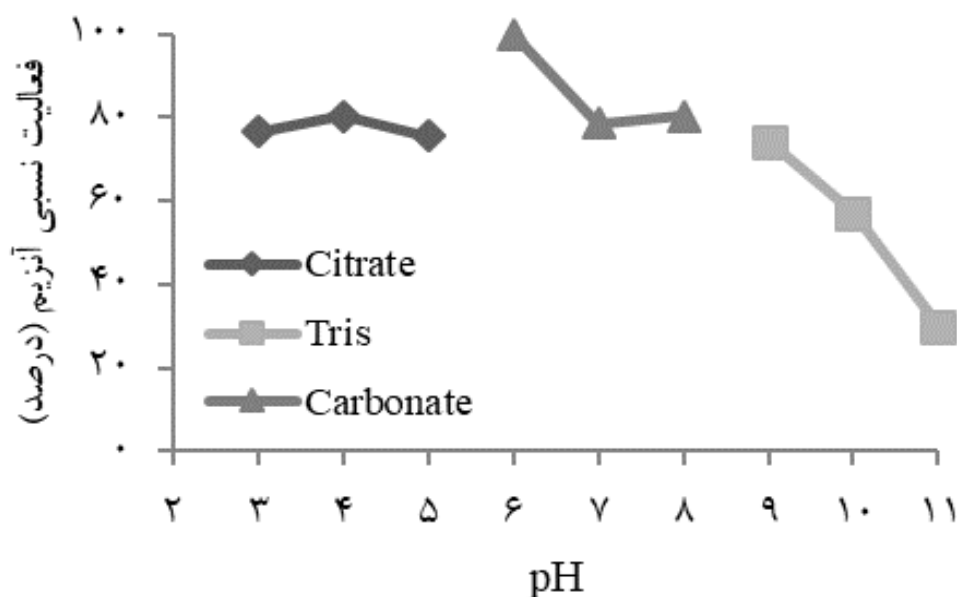
Pr > F	F Value	متغیر	درجه آزادی (DF)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)
<0.0001	20.38**	تیمار دمایی	10	8.104	0.81
		خطا	22	0.874	0.039
		کل	32	8.979	



شکل ۱۰. نمودار میزان دمای بهینه آنزیم نو ترکیب زایلاناز در باکتری *E. coli*

Figure 10. Diagram of optimal temperature of recombinant xylanase enzyme in *E. coli*

تعیین pH بهینه آنزیم نوترکیب زایلاناز: جهت بدست آوردن میزان pH بهینه از سه نوع بافر سیترات سدیم، تریس و کربنات پتاسیم استفاده گردید. نتایج حاصل، حداکثر فعالیت آنزیم نوترکیب زایلاناز را در pH=۶ نشان داد که دارای تمایل اسیدی و خنثی می باشد و با نتایج مطالعات (Pastor et al (2007) مطابقت داشتند (شکل ۱۱). همچنین، Yadav et al (2018) بیان نمودند آنزیم های صنعتی در بازه pH بین ۵/۵-۷/۳ قابلیت کارایی حداکثری را در اتصال با سوبسترا از خود نشان می دهند.

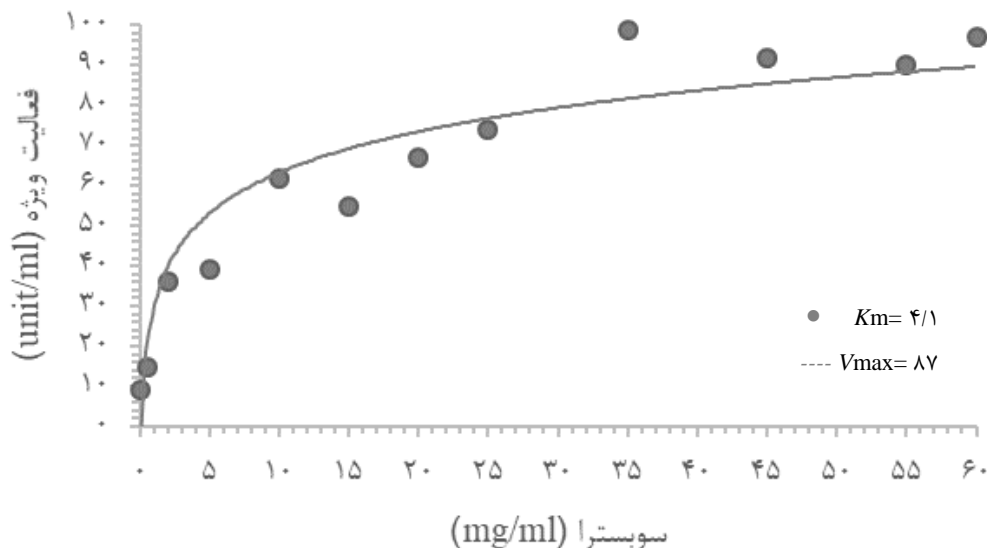


شکل ۱۱. نمودار تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم زایلاناز در باکتری *E. coli*

Figure 11. Diagram of optimal pH Determination of xylanase activity on *E. coli*

میزان  $V_{max}$  و  $K_m$  آنزیم زایلاناز: شاخص کاتالیتیکی  $K_m$  به عنوان تمایل آنزیم برای سوبسترای خود معرفی می شود و هرچه میزان  $K_m$  کوچکتر باشد، تمایل آنزیم برای سوبسترا بیشتر خواهد بود. همچنین شاخص  $V_{max}$  زمانی رخ می دهد که کلیه جایگاه های فعال آنزیم توسط سوبسترا اشغال شده باشد و مولکول های سوبسترا به فرآورده تبدیل شده و آنزیم آزاد می شود تا مولکول دیگری از سوبسترا بلافاصله به آن متصل شود. نتایج حاصل از نمودار میکائیلیس-منتن میزان  $V_{max}$  و  $K_m$  را به ترتیب ۴/۱ و ۸۷ تعیین نمود (شکل ۱۲). Ma et al (2020) طی مطالعه ای که بر روی همسان سازی ژن زایلاناز در باکتری *E. coli* داشتند میزان  $K_m$  را ۳/۳ بیان نمودند. همچنین Laura et al (2012) اعلام نمودند وجود توالی اسیدهای آمینه کاتالیتیکی سرین و ترئونین سبب افزایش میزان اتصال آنزیم به سوبسترا نیز می گردد. پژوهش اخیر نشان داد وجود توالی

اسیدهای آمینه کاتالیتیکی در نواحی انتهایی آنزیم نو ترکیب زایلاناز سبب کاهش میزان  $K_m$  و در نتیجه افزایش میزان اتصال آنزیم و سوبسترا شده است.



شکل ۱۲. نمودار میکائیلیس-منتن آنزیم زایلاناز موجود در باکتری *E. coli*

Figure 12. Mikaelis-menten diagram of xylanase enzyme in *E. coli*

### نتیجه گیری

امروزه افزایش جهانی مصرف ذرت به دلیل استفاده از آن در تولید سوخت‌های زیستی و اتانول سبب کاهش سهمیه مصرفی و افزایش قیمت تمام شده آن در جیره غذایی طیور گردیده است (Hristov et al. 2013). یکی از راهکارها جهت کاهش هزینه تولید در مرغداری‌ها و کاهش واردات ذرت دامی، جایگزین کردن گندم بجای ذرت در جیره طیور می‌باشد. هرچند گندم نسبت به ذرت دارای مزایای متعددی از قبیل: مقدار پروتئین خام بالاتر، کیفیت پلت بهتر و دارای اسیدهای آمینه ضروری لیزین، آرژنین، متیونین و تریپتوفان بالاتر می‌باشد اما به دلیل وجود پلی ساکارییدی غیرنشاسته‌ای (NSPs) در دیواره سلولی گندم که عموماً آرایینوزایلان‌ها می‌باشند، سبب افزایش ویسکوزیته محتویات روده و کاهش انرژی قابل هضم توسط طیور می‌گردد (Osek et al. 2010). جهت حذف آرایینوزایلان‌ها از آنزیم زایلاناز استفاده می‌گردد. آنزیم‌های نو ترکیب که به روش مهندسی ژنتیک تولید می‌شوند در صنایع مختلف مانند: صنایع غذایی، داروسازی و تولید مکمل جیره طیور استفاده می‌شوند. زایلانازها مهمترین آنزیم‌های مکمل جیره طیور می‌باشند که در جیره‌های بر پایه گندم اضافه می‌شوند (Ndazigaruye et al. 2019). در این پژوهش برای نخستین بار ژن مقاوم به حرارت زایلاناز به همراه توالی سیگنال پپتید ترشحی و توالی شاین-دالکارنو به باکتری گرم منفی *E. coli* سویه BL21 منتقل شد. تولید آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت نه تنها در تولید مکمل جیره طیور بلکه در کارخانجات صنایع غذایی مانند: تولید آلبیمو و پنیر و همچنین تولید خمیر کاغذ و تولید صنعتی بیودیزل بسیار پرکاربرد

می‌باشد. آنزیم نوترکیب زایلاناز را می‌توان بصورت مستقیم به جیره غذایی طیور اضافه نمود. زایلاناز مقاوم به حرارت سبب می‌شود تا با القای حرارت، باکتری تراریخته *E. coli* از بین رفته و الزامات مقررات پروتکل ایمنی‌زیستی اجرا گردد. علاوه‌براین، وجود توالی شاین-دالگارنو در بالادست توالی هدف سبب افزایش میزان بیان پروتئین نوترکیب نیز گردیده است. همچنین وجود توالی سیگنال‌پپتید ترشچی Usp45 در توالی آنزیم نوترکیب زایلاناز، نیاز به خالص‌سازی پروتئین را کاهش داده و صرفه اقتصادی تولید تجاری آنزیم را بهبود می‌بخشد.

**سپاسگزاری:** بدینوسیله نگارندگان برخورد لازم می‌دارند از حمایت‌های مادی و معنوی مرکز رشد و شتاب‌دهی دانشگاه شهرکرد و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) کمال تشکر را بجا آورند.

#### منابع

محمدی‌فر آمنه، فقیه ایمانی سید علی، محمدآبادی محمد رضا، سفلی محمد (۱۳۹۲) تأثیر ژن  $TGF\beta$  بر ارزش‌های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۵(۴)، ۱۳۶-۱۲۵.

#### References

- Afzal S, Saleem M, Yasmin R et al. (2010) Pre and post cloning characterization of a beta-1, 4-endoglucanase from *Bacillus* sp. *Mol Bio Res* 37, 23–1717.
- Akyol I, Comlekcioglu U, Kar B et al. (2009) Cloning of a xylanase gene *xyn2A* from rumen fungus *Neocallimastix* sp. *GMLF2* in *Escherichia coli* and its partial characterization. *Biologia* 64, 664–670.
- Bhardwaj N, Kumar B, Verma P (2019) A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresour Bioprocess* 6, 40.
- Bilgin S, Ulusu Y, Kudug H, Gokce I (2018) Cloning, Expression and Characterization of Xylanase (*xyn-akky1*) from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*. *Sakarya Uni J Sci* 22, 1508–1517.
- Dhiman SS, Sharma J, Battan B (2008) Industrial applications and future prospects of microbial xylanases. *Bio Resource* 3, 1377–1402.
- Engberg M, Hedemann S, Steinfeldt S, Jensen B (2004) Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. *Poult Sci* 83, 925–938.
- Fajardo P, Pastrana L, Endez J et al. (2012) Effects of Feeding of Two Potentially Probiotic Preparations from Lactic Acid Bacteria on the Performance and Faecal Microflora of Broiler Chickens. *The Sci World J* 23, 1–9.

- Glickman JF, Schmid A (2007) Farnesyl pyrophosphate synthase: real-time kinetics and inhibition by nitrogen-containing bisphosphonates in a scintillation assay. *Assay Drug Dev Technol* 5, 205–214.
- Hristov AN, Oh J, Lee C et al. (2013) Mitigation of greenhouse gas emissions. In Gerber, PJ, Henderson, B and Makkar, HPS. Eds. *Livestock production—a review of technical options for non-CO2 emissions*. FAO Anim Prod Health Paper 177.
- Jie H, Li Z, Wang P et al. (2017) A simple method based on Sanger sequencing and MS Word wildcard searching to identify Cas9-induced frameshift mutations. *Lab Invest* 97, 1500–1507.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Laura R, Jarboe AB, Ping LB et al. (2012) Optimization of enzyme parameters for fermentative production of biorenewable fuels and chemicals. *Comput Struct Biotechnol J* 3, e10005.
- Ma L, Aizhan R, Wang X et al. (2020) Cloning and characterization of low-temperature adapted GH5-CBM3 endo-cellulase from *Bacillus subtilis* 1AJ3 and their application in the saccharification of switchgrass and coffee grounds. *AMB Expr* 10, 42.
- Mao S, Lu Z, Zhang CH et al. (2013) Purification, characterization, and heterologous expression of a thermostable  $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9. *Appl Biochem Biotechnol* 169, 960–975.
- McCleary BV (2001) Analysis of feed enzymes. In: *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, M.R. Bedford and G.G. Partridge (Eds.). CAB International, 406.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31, 426–428.
- Moazeni S, Mohammadabadi MR, Sadeghi M et al. (2016) Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. *Open J Anim Sci* 6, 1-8.
- Mohammadifar A, Faghih Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M (2014) The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Agric Biotech J* 5, 125-136 (In Persian).
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2018) Melanocortin-3 receptor (mc3r) gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. *Malay Appl Biol* 47, 85–90.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2017) The Effect of Uncoupling Protein Polymorphisms on Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in the Fars Indigenous Chicken. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 679-685.

- Ndazigaruye G, Kim DH, Kang CH et al. (2019) Effects of Low-Protein Diets and Exogenous Protease on Growth Performance, Carcass Traits, Intestinal Morphology, Cecal Volatile Fatty Acids and Serum Parameters in Broilers. *Anim* 9, 226.
- Osek M, Milczarek A, Janocha A, Świnarska R (2010) Effect of triticale as a partial or complete wheat and maize substitute in broiler chicken diets on growth performance, slaughter value and meat quality. *Ann Anim Sci* 10, 275–283.
- Pastor FIJ, Gallardo O, Sanz-Aparicio J (2007) Xylanases: molecular properties and applications. In: Polaina J, MacCabe AP (eds) *Industrial enzymes*. Springer, 65–82.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Vasudevan R, Gale GAR, Schiavon AA et al. (2019) CyanoGate: A modular cloning suite for engineering cyanobacteria based on the plant MoClo syntax. *Plant Physiol*, 01401.
- Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R et al. (2019) Benefits and Inputs from Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. *Front Microbiol* 11, 10–57.
- Wang J, Zhang H, Wu M, Tang C (2011) Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, Auxyn10A, from *Aspergillus usarii*. *Biotechnol Lett* 33, 1029–1038.
- Wang W, Yan-long J, Yi-chun L et al. (2018) Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells. *Sci Report* 7, 10416.
- Yadav P, Maharjan J, Korpole S et al. (2018) Production, Purification, and Characterization of Thermostable Alkaline Xylanase From *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13. *Bioeng Biotechnol* 6, 65.