شناسایی، کلون، بیان و خالص‌سازی آنزیم نوترکیب جدید زایلاناز با مقاومت ساختاری بالا از جمعیت میکروبی شکمبه گوسفند

شهره آریائی نژاد* [1] مرتضی ملکی [2]، صفورا نوشی ندامانی [3]، کاوه کاوسی [4] و قاسم حسینی سالکده [5]

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

2-کارشناسی ارشد، بخش زیست شناسی سامانه ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

3- کارشناسی ارشد، بخش زیست شناسی سامانه ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

4- دکتری، آزمایشگاه سیستم های زیستی پیچیده و بیوانفورماتیک، گروه بیوانفورماتیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

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

دریافت: 1399/4/19 پذیرش 1399/10/22

چکیده

با توجه به نقش مهم آنزیم‌ها در تسهیل عملکرد فرایندهای مختلف، استفاده از آنها در اغلب صنایع بسیار مورد توجه است. درصد بسیار پایینی از میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم‌های جدید در محیط آزمایشگاهی قابل کشت می‌باشند، این درحالی است که متاژنوم منبع عظیمی از اطلاعات ژنتیکی آنزیم‌های ناشناخته را می‌تواند در اختیار ما قرار دهد. با توجه به اهمیت استفاده از آنزیم‌ها در صنایع گوناگون، آنزیم‌هایی با ساختار پایدار و مقاوم در برابر حرارت، کاربرد و عملکرد بهتری را نشان می‌دهند و تحقیقات زیادی در زمینه شناسایی و تولید آنها به‌صورت پیوسته صورت گرفته است.

در این پژوهش با استفاده از روش‌های محاسباتی، پیشگویی تعیین ساختار و استفاده از توالی آنزیم‌های زایلاناز مستخرج از داده‌های متاژنوم شکمبه گوسفند، آنزیم زایلانازی با ساختار بسیار مقاوم شناسایی و به‌صورت نوترکیب تولید شد. آنزیم زایلاناز نوترکیب مقاوم به حرارت، PersiXyn5 نام‌گذاری شده و از DNA استخراج شده از محتویات شکمبه گوسفند کلون و در باکتری *E.coli* بیان و خالص شد. فعالیت ویژه و پارامترهای کینتیکی K_m و V_{max} برای این آنزیم محاسبه شده و فعالیت بهینه این آنزیم در دمای 80 درجه سانتی‌گراد و pH 8 مشاهده شد. آنزیم زایلاناز نوترکیب جدید پس از 2 ساعت تیمار در دمای 90 درجه سانتی‌گراد 58 درصد فعالیت خود را حفظ کرد. با توجه به اینکه آنزیم زایلاناز مورد مطالعه مقاوم در دمای بالا و فعال در محیط قلیایی است برای استفاده در صنایع کاغذسازی، تهیه خوراک طیور و تولید سوخت زیستی مناسب می‌باشد.

کلید واژگان: آنزیم نوترکیب، زایلاناز، متاژنوم، پایداری دمایی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

1- مقدمه

زایلان[1] به‌عنوان ترکیب اصلی همی‌سلولزی در ساختار چوب، فراوان‌ترین پلی‌ساکارید تجدیدپذیر بعد از سلولز است. آنزیم‌های زایلاناز[2] گروهی از آنزیم‌ها هستند که پلیمر خطی بتا-1و4-زایلان[3] را به زایلوز تجزیه می‌کنند [1]. بنابراین توانایی تجزیه همی‌سلولز را دارند [2] و نقش مهمی را در میکروارگانیسم‌های ساکن روی منابع گیاهی ایفا می‌کنند. علاوه‌بر کاربرد آنزیم‌های زایلاناز در صنایع تخمیر و کاغذسازی [3]، زایلانازها در صنایع مواد افزودنی خوراک طیور [4] و بهبود خواص تغذیه‌ای سیلوهای کشاورزی [5] نیز کاربرد دارند.

آنزیم‌های زایلاناز می‌توانند جایگزین ایمن برای ترکیبات کلری و سمی مورد استفاده در فرایند رنگ بری[4] در صنایع کاغذسازی باشند [8–6]. فرایند پردازش در صنایع کاغذسازی نیازمند مقدار زیادی مواد شمیایی است که مصرف آنها سبب مشکلات دفع پساب می‌شود [9,10]. پیش تیمار با زایلانازها باعث بهبود کارایی جداسازی لیگنین از پالپ شده و نیاز به کلرین دی اکسید به‌عنوان ماده شیمیایی خطرناک را کاهش می‌دهد [9,11].

برای اطمینان از استفاده تجاری از بقایای همی سلولزی، نیاز به تولید آنزیم زایلاناز با بازده زیاد و هزینه کم است. از این نظر جداسازی و کلون کردن ژن‌های آنزیم‌های زایلاناز مرحله مهمی از مهندسی میکروارگانیسم‌هاست [12]. زایلانازهای میکروبی در بسیاری از صنایع شامل خوراک دام، داروسازی، کاغذ، نان و تیمار ضایعات کشاورزی کاربرد دارند.

جمعیت میکروبی شکمبه نشخوارکنندگان، به دلیل وجود باکتری‌ها، قارچ‌ها و آرکی‌ها دارای منابع مهم این آنزیم‌های هیدرولازی است. اکثر این میکروب‌ها تاکنون کشت نشده‌اند اما روش متاژنومیکس[5] راه‌حلی بر این محدودیت است [13]. جست‌وجوی متاژنومیکس ابزاری ارزشمند و یکی از روش‌های کاربردی برای یافتن آنزیم‌های جدید و کاوش در تنوع زیستی موجود است [18–14]. تاکنون زایلانازهای جدیدی از منابعی مانند خاک [19]، محیط کشت غنی از کاه برنج [20]، موریانه [21] و مدفوع گاو [22] با استفاده از کتابخانه متاژنومی کشف شده است.

تنوع میکروارگانیسم‌ها در شکمبه نشخوارکنندگان و به تبع آن تنوع آنزیمی میکروبی در شکمبه نشخوارکنندگان بسیار زیاد است[23] . بسیاری از آنزیم‌های مؤثر در فرایند هضم، توسط میکروارگانیسم‌های موجود در شکمبه نشخوارکنندگان تولید می‌شود. با توجه به پیچیدگی بسیار زیاد محیط میکروبیوم شکمبه، هنوز بخش بزرگی از این میکروارگانیسم‌ها شناسایی نشده‌اند. به‌عنوان شاهدی بر این مدعا می‌توان به پروژه بزرگ Hungate 1000 اشاره کرد که طی آن تنها نزدیک به 400 میکروارگانیسم مقیم در شکمبه نشخوارکنندگان به‌صورت کامل شناسایی شده‌اند و توالی ژنوم آنها استخراج شده است. بسیاری از باکتری ها، آرکی‌ها و ویروس‌ها تاکنون شناسایی نشده، ژنوم آنها تعیین توالی نگردیده و به دنبال آن آنزیم‌های تولید کننده این موجودات نیز ناشناخته می‌باشد. این پروژه و پروژه‌های بسیار دیگری در سطح دنیا در پی یافتن این میکروارگانیسم ها می‌باشند. حتی در مورد میکروارگانیسم‌هایی که توالی ژنوم آنها تعیین شده

1. xylan
2. Xylanase
3. β-1, 4-xylan
4. biobleaching
5. Metagenomics

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

است، علی‌رغم مشخص بودن آنزیم‌هایی که تولید می‌کنند، اطلاعاتی در مورد میزان و شرایط فعالیت بهینه آنها در دست نمی‌باشد.

زمینگ و همکاران برای کشف ژن‌های مرتبط با فعالیت زایلانازی در شکمبه، کتابخانه متاژنومی شامل 12/704 کلون از نمونه‌های شکمبه گوسفند تهیه کردند که از بین آنها 18 کلون با فعالیت زایلانازی به دست آمد [24]. اما برای به دست آوردن جزئیات بیشتر از خصوصیات آنزیم‌های زایلاناز شکمبه، پروتئین‌های بیان‌شده باید با روش‌های بیوشیمیایی بررسی شوند.

شرایط بهینه فعالیت آنزیم، شامل دما و pH از عوامل اصلی مشخص کننده کاربرد آنزیم زایلاناز در صنایع گوناگون می باشد.[25]

برای مثال زایلانازهای کاربردی در صنایع کاغذسازی در دماهای بالاتر و pH های قلیایی فعالیت دارند [26] درحالی‌که زایلانازهای فعال در pH های اسیدی در صنایع غذایی و خوراک دام کاربرد دارند [27]. آنزیم‌های زایلاناز در صنایع نساجی و داروسازی نیز کاربرد دارند [28]. آنزیم‌های زایلاناز قادرند که با کاهش هزینه‌های مصرفی و تقلیل مشکلات زیست محیطی موجب افزایش پتانسیل محصولات کاغذی شده و محصولات با ارزش افزوده زیاد تولید کنند. استفاده از زایلاناز در رنگ‌بری کاغذ بدون لزوم ایجاد تغییر در فرایند آب‌گیری خمیر، موجب صرفه‌جویی در هزینه مواد شیمیایی شده و امکان استفاده مناسب‌تر از تجهیزات سرمایه‌های موجود را فراهم می‌کند. استفاده از این آنزیم سرعت رنگ‌بری را افزایش داده و از طریق رفع تنگناهای موجود در بخش تولید دی اکسیدکلر، بازده رنگ‌بری را بهبود می بخشد. کاربرد-های دیگر این آنزیم در صنعت کاغذ سازی عبارت‌اند از افزایش بازده در فرایند تولید خمیر به روش کرافت، کاهش زمان پالایش، تغییر خواص و افزایش انعطاف‌پذیری الیاف و ایجاد پیوند بین زنجیرهای جانبی یا گروه‌های عاملی که همگی تأکیدی بر نقش پررنگ زایلاناز در صنعت کاغذسازی است[29].

پیدا کردن آنزیم‌های جدید از محیط‌های طبیعی با شرایط حاد (مثل چشمه‌های آب جوشان، یخچال‌های طبیعی، ...) و همچنین تولید آنزیم‌های مهندسی شده جهت بهبود ویژگی‌های کاتالیتیک، با دستیابی به پیشرفت‌های به تازگی پروتئومیکس، ژنومیکس، متاژنومیکس، تکنولوژی DNA نوترکیب و سیستم بیان پروتئین امروزه به سهولت امکان پذیر است.[30].

جهت بررسی میکروارگانیسم‌ها از محیط‌های مختلف، تعداد قابل توجهی از آنها قابلیت کشت شدن در محیط آزمایشگاه را ندارند و در نتیجه بررسی آنها امکان‌پذیر نیست. ژنوم این میکروارگانیسم‌ها غنی از انواع آنزیم‌هاست که به دلیل عدم توانانی کشت شدن در آزمایشگاه ناشناخته مانده‌اند. روش متاژنومیکس یا استخراج مستقیم ژنوم از محیط‌های طبیعی، به خوبی این مشکل را برطرف ساخته و امکان دستیابی به آنزیم‌های جدید را فراهم ساخته است.

یکی از منابع متاژنومیکس دستگاه گوارش نشخوارکنندگان است [31]. این حیوانات مانند شتر، گاو، گوسفند، بز و ... گیاه‌خوار بوده و با فرایند نشخوار و تخمیر می‌توانند انرژی ذخیره شده در منابع گیاهی را به مواد مغذی تبدیل کنند. فرایند تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های هم‌زیست در دستگاه گوارش نشخوارکننده انجام می‌شود. دستگاه گوارش این جانوران اغلب به صورت چهارقسمتی و شامل سیرابی، نگاری، هزارلا و شیردان است که باکتری‌های مؤثر در تخمیر در بخش سیرابی (شکمبه) تجمع دارند.

با توجه به محتوای بسیار متنوع متاژنوم میکروبی در محیط‌های شکمبه و به دلیل آمادگی تکاملی برخی از اعضای جمعیت میکروبی برای پذیرش تغییرات

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

شدید در محیط، کشف آنزیم‌های جدید با تحمل زیاد به دامنه شدید دما محتمل است. ویژگی‌های پایداری دمایی آنزیم‌ها با مقاومت آنها به واسرشته کننده‌های شیمیایی، غلظت‌های بالاتر سوبسترا و سرعت واکنش و ویسکوزیته کمتر بسیار مرتبط است. خواص پایداری دمایی آنزیم‌های گرمادوست بین آنزیم‌های فرا گرمادوست و انواع با گرایش گرمای متوسط است و دمای بهینه فعالیت این آنزیم‌های مقاوم به گرما بین 60 تا 80 درجه سانتی‌گراد است [31].

در این پژوهش هدف اصلی انتخاب آنزیم‌های زایلاناز با ساختار پایدار و ویژگی‌های خاص جهت معرفی به صنعت با روش بیوانفورماتیکی و پیشگویی ساختار و عملکرد آنزیم می‌باشد. با روش‌های محاسباتی بیوانفورماتیکی از بین 7000 توالی آنزیمی که از متاژنوم شکمبه گوسفند به‌دست آمده، 5 توالی زایلاناز قلیادوست و مقاوم به حرارت انتخاب شد. از بین این توالی‌ها یک توالی زایلاناز کلون و در باکتری *E.coli* بیان شد. پس از خالص‌سازی، این آنزیم PersiXyn5 نام‌گذاری شده و جهت تعیین ساختاربیوشیمیایی و بیوفیزیکی آنزیم آزمایش‌های مختلفی انجام شد. در نهایت جهت مشاهده عملکرد آنزیم در صنعت، هیدرولیز آنزیم در دمای بالا بر روی مقوا صورت گرفت.

1-2 مواد و روش‌ها

تهیه نمونه از محتویات شکمبه گوسفند، جداسازی سلول‌های میکروبی و استخراج DNA

با توجه به اینکه فلور میکروبی شکمبه تابعی از نوع علوفه تغذیه شده، سن، وضعیت سلامت و شرایط محیطی محل چرای حیوان است، حیوانات مورد آزمایش به‌گونه‌ای انتخاب شدند که ازلحاظ سنی به بلوغ رسیده باشند و ازلحاظ جسمی نیز سالم و عاری از هرگونه بیماری باشند. بلافاصله پس از نمونه‌برداری، فالکون‌های حاوی نمونه به تانک ازت مایع به آزمایشگاه انتقال داده شد.

سلول‌های میکروبی موجود در نمونه با سانتریفوژ رسوب داده شدند و DNA سلول های میکروبی با استفاده از کیت QIAamp DNA Stool Mini Kit و بر اساس پروتوکل مربوط به استخراج انجام گرفت. DNA استخراج شده پس از تأیید کنترل کیفیت نمونه، توسط شرکت درمان نگار به شرکت نووژن[6] جهت انجام توالی یابی متاژنومی ارسال شد.

پیش‌بینی محاسباتی ساختار آنزیم های زایلاناز به‌دست آمده از آنالیز متاژنوم و جداسازی توالی های کاندید با عملکرد مناسب

به‌منظور تولید آنزیم نوترکیب، روش‌های محاسباتی و بیوانفورماتیکی به گونه‌ای مؤثر انجام شد به این صورت که با کاربرد این روش‌ها انبوه توالی‌های مورد جستجو پالایش یافته و به تعداد بسیار کمتری از از توالی‌های کارامد کاهش پیدا کردند. محاسبه پارامترهای بیوفیزیکی-بیوشیمیایی این آنزیم‌ها توانست تا حدود زیادی به تعیین سطح فعالیت آنزیم کمک کند. این کار با شناسایی توالی‌های هومولوگ توالی مورد نظر که قبلاً تعیین ساختار شده‌اند آغاز شد. پس از آن چندین قالب از روی توالی‌های مورد نظر ساخته شد. سپس با روش‌های محاسباتی و با کمک قالب‌های مورد نظر ساختار سوم آنزیم شبیه‌سازی شود و چندین گزینه برای آن به دست آمد و در این مرحله ساختارهای به دست آمده اعتبار سنجی شد و بهترین ساختارها

6. Novogene

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

به‌عنوان گزینه‌های صنعتی مناسب احتمالی انتخاب و به‌عنوان ورودی جهت کلون کردن انتخاب شد [32].

با مرور کامل مقالات موجود 63 توالی آنزیم زایلاناز فعال و مقاوم به حرارت از خانواده GH10 شناسایی و توالی آنها از NCBI[7] بارگیری شد. به این ترتیب مجموعه‌ای از توالی آمینواسیدی آنزیم‌های زایلاناز مقاوم به حرارت و فعال در محیط بازی تهیه شد. داده‌های خام به‌دست آمده از آنالیز نمونه متاژنوم شکمبه‌ی گوسفند، با نرم افزار FASTQC بررسی و تأیید شد و با استفاده از نرم‌افزار MetaGeneMark ژن‌های آنزیم‌های زایلاناز شناسایی شد [33].

برای به‌دست آوردن آنزیم‌های زایلاناز منتخب، مجموعه توالی آمینواسیدی آنزیم‌های زایلاناز مقاوم به حرارت و فعال در محیط بازی که از مرور مقالات به‌دست آمده بود را با مجموعه آنزیم‌های زایلاناز به‌دست آمده از آنالیز متاژنوم Blast شد [34].

به این ترتیب مجموعه‌ای از توالی‌های آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت و فعال در محیط بازی به‌دست آمد که برای پیش‌بینی ساختار سه بعدی آنها از نرم افزار Phyre2 [35] و جهت تعیین جایگاه فعال آنزیم از PROSITE استفاده شد [36].

تکثیر و کلونینگ ژن آنزیم PersiXyn5 در پلاسمید

با استفاده از ده توالی منتخب مرحله قبل، برای جداسازی ژن‌های کاندید از DNA استخراج شده از شکمبه گوسفند، ده جفت پرایمر اختصاصی از روی توالی‌های ژن‌های زایلاناز توسط نرم‌افزار Oligo7 برای تکثیر قطعه ژنی موردنظر توسط واکنش PCR طراحی شد. پس از تکثیر قطعه ژنی موردنظر، سایز محصول PCR با استفاده از ژل الکتروفورز آگارز 1% تخمین زده شد.

جهت تولید آنزیم نوترکیب PersiXyn5 از پرایمرهای (5'-TAATAGCATATGATGAAGAAAAGAAACGTGATG-3') F و R TGATAGGCGGCCGCTTAACGATATAGGCC (5'- GATG -3') که به ترتیب شامل محل‌های برش *Nde*I و *Not*I بودند، برای واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR شامل یک چرخه 95 °C به مدت 5 دقیقه، 35 چرخه 94 °C به مدت 40 ثانیه، 56 °C به مدت 45 ثانیه، 72 °C به مدت 2 دقیقه و سپس یک چرخه 72 °C به مدت 10 دقیقه بود. محصول PCR با ژل 1/5 درصد آگارز تشخیص داده شد و قطعه ژن مورد نظر با کمک Gel Extraction Mini Kit (BioRon, Germany) رقیق و خالص‌سازی شد. محصول خالص شده توسط دو آنزیم *Nde*I و *Not*I هضم شده و سپس در وکتور بیانی pET28a الحاق[8] شد. پلاسمید نوترکیب جهت بیان آنزیم زایلاناز به باکتری *E.coli* BL21 (DE3) منتقل شد. طی کشت در محیط انتخابی کلنی‌های نوترکیب انتخاب‌شده و در محیط مایع LB حاوی آنتی‌بیوتیک رشد داده شدند. استخراج پلاسمید از سلول‌های تراریخت توسط کیت استخراج از شرکت ترمو[9] انجام شد. بعد از استخراج پلاسمید از این سلول‌ها، پلاسمیدها با آنزیم‌های برشی اختصاصی هر ژن برش داده‌شده و الگوی برشی بر روی ژل الکتروفورز آگارز 1% جهت تأیید ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب بررسی شد. همچنین جهت تأیید بیشتر بار دیگر PCR بر روی پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد.

بیان پلاسمید حاوی ژن آنزیم PersiXyn5 در باکتری *E.coli* و خالص سازی آنزیم

7. National Center for Biotechnology Information

8. Clone

9. Thermo scientific Spin Miniprep Kit

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

پس از رشد سلول‌های BL21 حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط کشت Luria-Bertoni (LB) حاوی 50µg ml−1 کانامایسین در دمای 37 °C رشد کردند و وقتی شدت نور(OD) محیط کشت در طول موج 600 nm به 0.7 رسید، سلول‌ها جهت بیان پروتئین با isopropyl-β-thiogalactopyranoside (IPTG) با غلظت 0/3 mM تیمار شدند. سپس سلول‌ها 20 ساعت در دمای 20 °C قرار داده شدند و سپس با 25 دقیقه سانتریفیوژ با سرعت 4000×g رسوب داده شدند. استخراج پروتئین نوترکیب و خالص‌سازی آن در حالت Native و فاز محلول برای تخلیص توسط کروماتوگرافی تمایلی جدا شد. پروتئین‌های فاز محلول بر روی ستون Ni^{+2} بارگذاری شدند. توالی ژن این آنزیم در پایگاه ملی اطلاعات بیوتکنولوژی(NCBI) با کد MN821011 ثبت شد.

پروتئین‌های متصل به نشان هیستیدین به کمک Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Hilden, Germany) خالص‌سازی شد و پروتیین خالص شده با روش الکتروفورز SDS مورد بررسی قرار گرفت. بعد از اتمام زمان بارگذاری پروتیین‌ها بر روی ژل، رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو به مدت چهار ساعت و سپس رنگ‌زدایی صورت گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PersiXyn5 و تعیین شاخص‌های سینتیکی

فعالیت زایلاناز به روش Bailey et al [37] مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، نسبت معینی از آنزیم و سوبسترای اختصاصی آن در دما و زمان مشخصی انکوبه شده و سپس فعالیت آنزیم با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. آنزیم زایلاناز همراه با سوبستراهای اختصاصی زایلان در شرایط دما و pH مشخص انکوبه شد. بعد از اتمام واکنش آنزیم-سوبسترا برای توقف واکنش و سنجش میزان قند تولید شده 120 میکرولیتر معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید[10] (DNS) اضافه و به مدت 5 دقیقه در دمای 100 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مقدار جذب در طول موج 540 نانومتر اندازه‌گیری شد.

زایلان توسط آنزیم زایلاناز هیدرولیز شده و قندی به نام زایلوز تولید می‌شود که می‌تواند محلول DNS را تبدیل به ماده‌ای با رنگ قهوه‌ای روشن کند. رابطه‌ای خطی بین میزان قند تولید شده از هیدرولیز و شدت رنگ تولیدی وجود دارد؛ بنابراین فعالیت آنزیم زایلاناز در محلول واکنش را می‌توان توسط سنجش میزان رنگ محلول به روش اسپکترو فتومتری تعیین نمود. میزان فعالیت آنزیم به میزان قند زایلوز تولیدی بستگی دارد. هر چه میزان قند تولیدی بیشتر باشد نشان‌دهنده فعالیت بیشتر آنزیم در تجزیه سوبسترا و تولید محصول است.

یک واحد آنزیمی (Unit): مقدار آنزیمی است که در مدت زمان 1 دقیقه 1 میکرو مول محصول تولید کند.

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

بنابراین ابتدا یک منحنی استاندارد برای میزان قند تولیدی و جذب ایجادشده از واکنش با DNS تهیه شد[38] .

به‌منظور محاسبه شاخص‌های کینتیکی K_m و V_{max} و فعالیت ویژه، آنزیم PersiXyn5 در غلظت‌های مختلف زایلان (10-0,1 mg/mL) و در دمای 80 درجه سانتی گراد و بافر با pH 8 انکوبه شد. پس از بررسی فعالیت آنزیمی با استفاده از روش DNS ، شاخص های کینتیکی با استفاده از نمودار Lineweaver-Burk محاسبه شدند.

10. 3,5-Dinitrosalicylic acid

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

تعیین pH، دمای بهینه فعالیت و پایداری دمایی آنزیم PersiXyn5

برای تعیین دمای بهینه برای فعالیت آنزیمی PersiXyn5، 20 میکرولیتر از آنزیم و 60 میکرولیتر از زایلان 1 درصد وزنی-حجمی با pH 7 به عنوان سوبسترا در دماهای 90-30 درجه سانتی‌گراد تیمار شد و بعد از طی زمان 20 دقیقه فعالیت آنزیمی به روش DNS مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای تعیین pH بهینه فعالیت آنزیمی، همین نسبت از آنزیم و زایلان 1 درصد وزنی- حجمی تهیه شده با بافرهایی با pH های 4 تا 9 به مدت 20 قیقه در دمای بهینه تیمار شدند و فعالیت با روش DNS بررسی شد. میزان پایداری دمایی زایلاناز PersiXyn5 با قرار دادن آنزیم به مدت 1 و 2 ساعت در دماهای مختلف (60، 70، 80 و 90 درجه سانتی گراد) و سپس بررسی فعالیت به روش DNS ارزیابی شد.

بررسی هیدرولیز بافت مقوایی توسط آنزیم PersiXyn5

برای بررسی اثر هیدرولیزی آنزیم PersiXyn5 بر پالپ مقوا، ابتدا مقوا به اندازه‌های کوچک بریده شد و توسط مخلوط‌کن به صورت پودر درآمد. سپس 30 میلی‌گرم از پودر تهیه شده در 2 میلی‌لیتر بافر فسفات با pH 8 در دمای 50 درجه سانتی تیمار شد و در زمان‌های معینی از آن نمونه برداری شده و میزان قند احیاکننده آزاد شده در 96 ساعت با روش DNS مورد بررسی قرار گرفت.

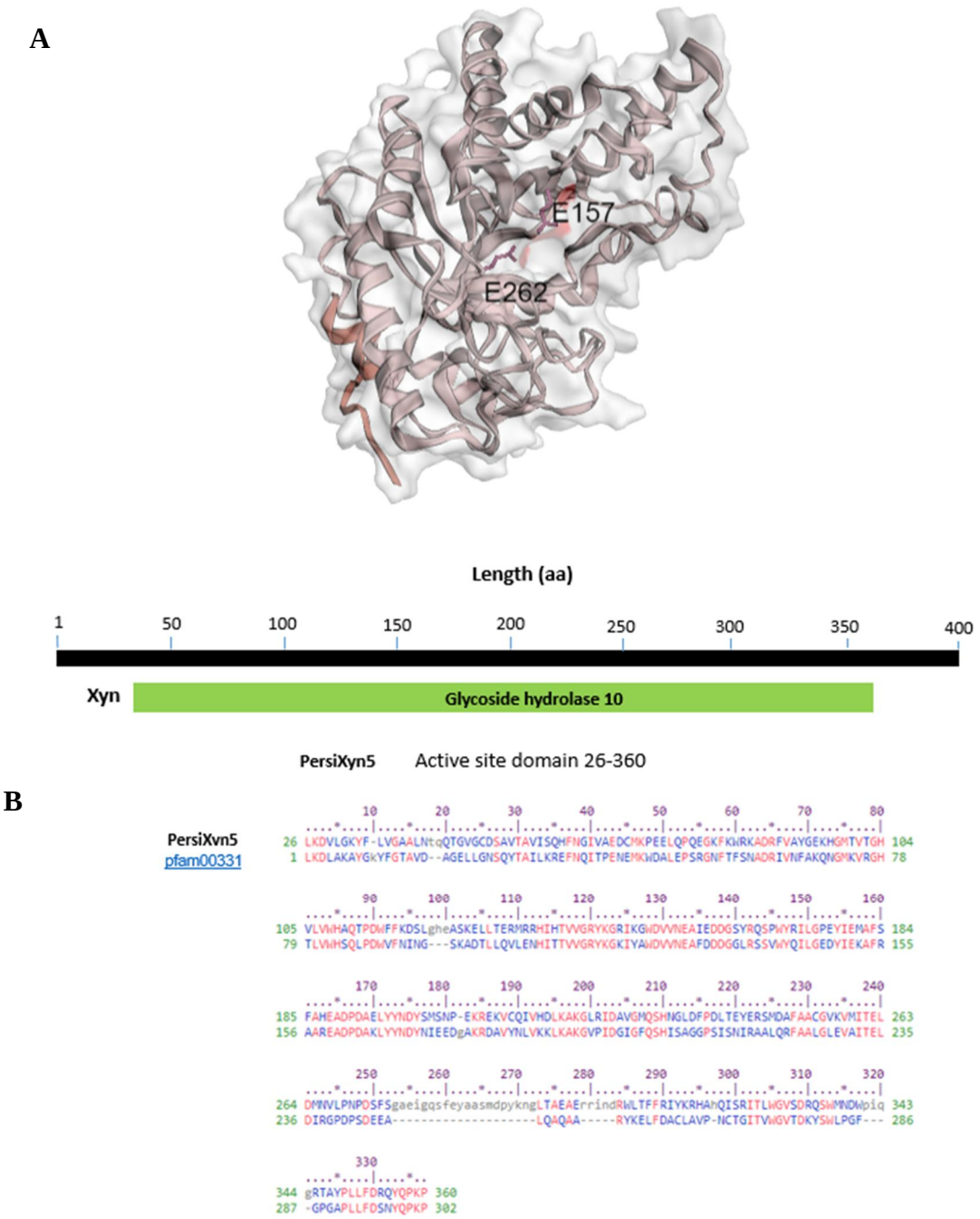
1-3 نتایج و بحث

انتخاب و پیش‌بینی بیوانفورماتیکی ساختار سه بعدی آنزیم PersiXyn5

ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی‌شده برای PersiXyn5 در شکل 1 نشان داده‌شده است. مشابه‌ترین ساختار در PDB که در Phyre2 به‌عنوان الگوی اولیه استفاده شد مربوط به یک زایلاناز مقاوم به حرارت و قلیادوست از *Bacillus sp* با کد PDB (2FGL) و با درصد هم‌پوشانی توالی 100درصد است.

بر اساس پیش‌گویی ساختار آنزیم، دو جایگاه فعال در موقعیت‌های 157 و 262 وجود دارد که در بردارنده‌ی دو آمینواسید گلوتامیک هستند. این جایگاه‌های رایج در خانواده‌ی GH 10 مشخصه بارز این خانواده آنزیمی می باشد.زایلانازها مختص پروتون و نوکلئوفیل هستند. در شکل 1 ساختار سه‌بعدی PersiXyn5 شامل جایگاه‌های فعال و دمین فعال با نرم‌افزار EzMol نمایش داده‌شده است [39].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]



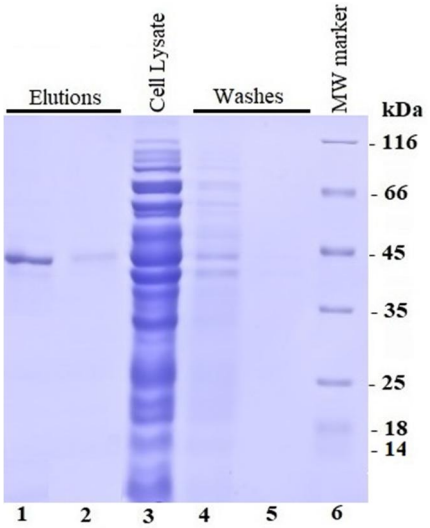
شکل1- A پیش‌گویی ساختار سه بعدی آنزیم PersiXyn5 با استفاده از نرم افزار Phyre2، B: نمایش جایگاه‌های فعال و ساختار دمین آنزیم PersiXyn5 با استفاده از نرم‌افزار EzMol.

تکثیر، کلونینگ و بیان ژن آنزیم PersiXyn5

با بررسی بیوانفورماتیکی داده‌های متاژنوم به دست آمده از DNA استخراج شده از باکتری‌های نمونه‌های شکمبه گوسفند، توالی ژن زایلاناز انتخاب شد و برای آن پرایمر طراحی شد و این قطعه ژنی توسط PCR تکثیر شد. محصول تکثیر شده در پلاسمید الحاق شده و

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

پلاسمیدهای حاوی این قطعه ژنی جهت بیان آنزیم به باکتری *E.coli* منتقل شدند و پروتین بیان شده خالص شد. شکل 2 تأیید کننده بیان و خالص سازی این ژن با طول قطعه 43kDa در روش SDS-PAGE می‌باشد.



شکل2- بیان و خالص سازی پروتئین زایلاناز نوترکیب PersiXyn5 با طول قطعه 43kDa (ژل SDS-PAGE)

اندازه گیری فعالیت ویژه آنزیم PersiXyn5 و تعیین شاخص‌های سینتیکی

تاکنون مطالعات متعددی در زمینه‌ی یافتن زایلانازهای مقاوم به حرارت به خصوص انواع باکتریایی و به دست آمده از گونهی *Bacillus* sp انجام شده و نشانگر پایداری بالای این زایلانازها در شرایط ناملایم نظیر دما و pH بالا و حضور عوامل بازدانده فعالیت آنزیم می‌باشد [40,41]. ویژگی‌های متعدد آنزیم PersiXyn5 نیز تحت عنوان زایلاناز مقاوم به گرما و پایدار مورد بررسی قرار گرفت.

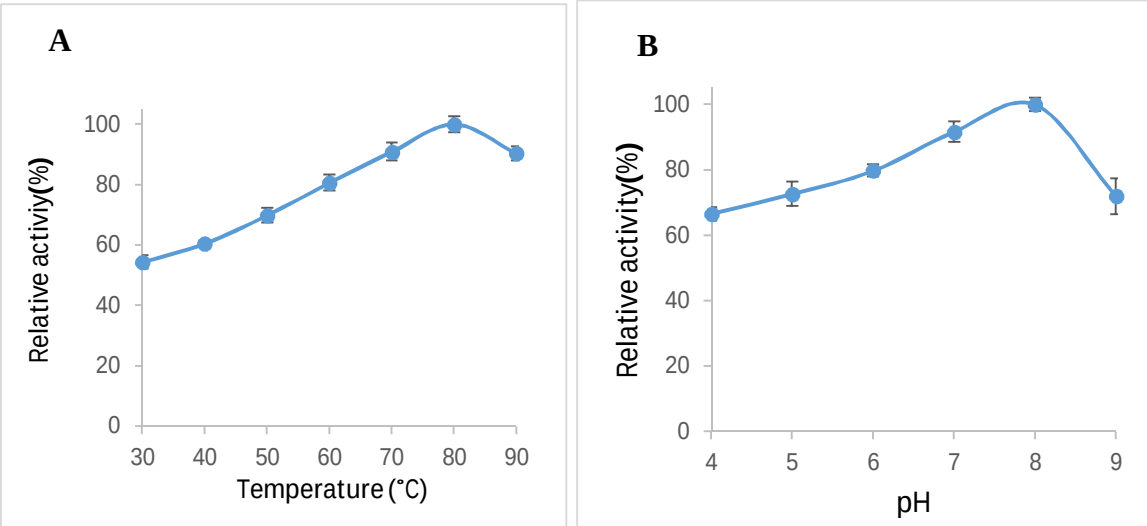
با اندازه‌گیری میزان قند زایلوز تولید شده طی هیدرولیز غلظت‌های مختلف سوبسترایوب زایلان توسط PersiXyn5، مشخصات سینتکی آنزیم ارزیابی شدند. ضمن اندازه‌گیری فعالیت بر غلظت‌های مختلف سوبسترا، نمودار Lineweaver-Burk رسم شد و با کمک این نمودار شاخص‌های K_m و V_{max} برای این آنزیم به ترتیب 0.543 mg/mL و 187.48 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ محاسبه شد. همچنین میزان فعالیت ویژه‌ی آنزیم برابر با 1359.91 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ به دست آمد. این مقادیر مشابه آنزیم‌های زایلاناز مقاوم به حرارت به دست آمده از متاژنوم طی روش‌های محاسباتی می‌باشد [32,42]. از طرف دیگر محاسبه شاخص‌های سینتیکی نشان داد که این آنزیم زایلاناز قلیادوست و مقاوم به حرارت کارایی مناسبی در صنعت کاغذ سازی خواهد داشت [45–43].

تعیین pH، دمای بهینه فعالیت و پایداری دمایی آنزیم PersiXyn5

فعالیت آنزیمی زایلاناز در pH و دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت و همان‌طور که در شکل 3 مشاهده می‌شود دمای بهینه فعالیت آن 80 درجه سانتی‌گراد و pH بهینه برای فعالیت این آنزیم 8 است. با توجه به شکل 3 آنزیم PersiXyn5 90 درصد از فعالیت خود را در دمای 90 درجه سانتی گراد و 72 درصد از بیشینه فعالیت خود را در pH 9 حفظ کرد. در مقام مقایسه این مقادیر بیش از آنزیم‌های زایلاناز قلیادوست و مقاوم به حرارت گزارش شده می باشد. به گونه‌ای که در گزارشی آنزیم زایلانار نوترکیب با دما و pH بهینه برابر با 60 درجه سانتی گراد و

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

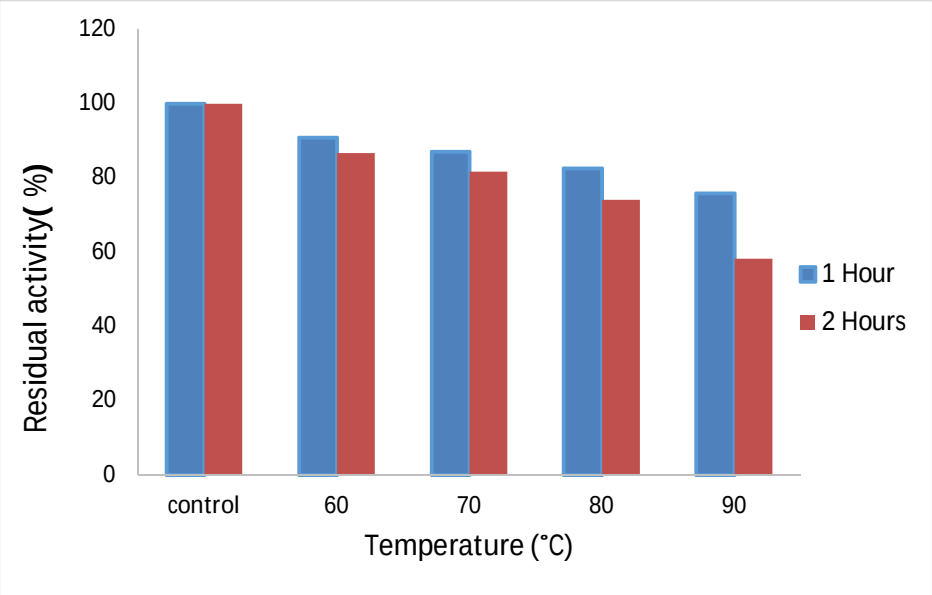
7/5 توانست کمتر از 20 درصد از فعالیت خود را در 80 درجه سانتی‌گراد حفظ کند [46]. همچنین در مطالعه دیگری که آنزیم زایلاناز نوترکیب مقاوم به حرارت به دست آمده از داده های متاژنومی تحت بررسی شرایط بهینه فعالیت قرار گرفته بود، تنها توانست 20 درصد از فعالیت خود را در 90 درجه سانتی‌گراد و کمتر از 20 درصد از بیشینه‌ی فعالیت خود را در pH 9 حفظ کند [47].



شکل3- دما (A) و pH (B) بهینه ی فعالیت آنزیم زایلاناز نوترکیب PersiXyn5

پایداری دمایی آنزیم زایلاناز با قرار دادن آنزیم به مدت 1 و 2 ساعت در دماهای مختلف و سپس اندازه-گیری فعالیت بررسی شد و نتایج نشان داد که آنزیم زایلاناز مورد مطالعه نه تنها بعد از تیمار شدن در دماهای 50، 60، 70، 80 و 90 درجه سانتی‌گراد غیرفعال نمی-شود بلکه پس از 2 ساعت تیمار در 90 درجه سانتی‌گراد، 58 درصد فعالیت خود را حفظ می‌کند. شکل 4 نتایج این بررسی را نشان می‌دهد. میزان پایداری آنزیم PersiXyn5 به‌عنوان یک آنزیم قلیادوست و مقاوم به حرارت در مقایسه با زایلانازهای گزارش شده با ویژگی مشابه، بسیار بالاتر بود به این ترتیب که در گزارشی میزان پایداری آنزیم زایلاناز معرفی شده پس از 2 ساعت در دمای 90 درجه سانتی‌گراد کمتر از 20 درصد بود [48]. درمطالعه دیگری پس از 1/5 ساعت انکوباسیون آنزیم در دمای 90 درجه سانتی گراد، کمتر از 10 درصد از فعالیت آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت باقی ماند [49]. مشابه آن، در گزارش دیگری که به بررسی ویژگی‌های مقاوم به حرارت آنزیم زایلاناز قلیا دوست پرداخته بودند مشخص شد که این آنزیم کمتر از 30 درصد از فعالیت نسبی خود را پس از 1 ساعت در دمای 90 درجه سانتی گراد حفظ کرد [50]. این مسئله بار دیگر مقاومت حرارتی بالای آنزیم PersiXyn5 مورد مطالعه را تأیید کرد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]



شکل4- بررسی پایداری دمایی آنزیم زایلاناز نوترکیب PersiXyn5 در مدت 1 و 2 ساعت تیمار در دماهای 50، 60، 70، 80 و 90 درجه سانتی‌گراد

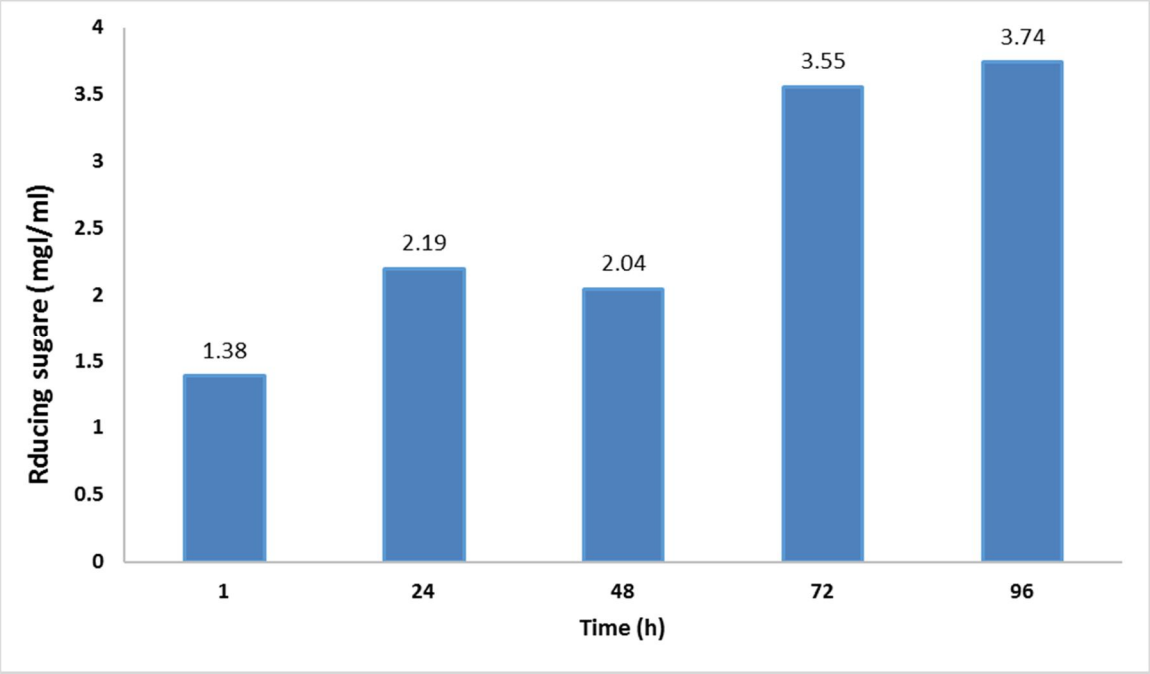
بررسی هیدرولیز مقوا توسط آنزیم PersiXyn5

زایلانازهای مقاوم به دمای بالا و پایدار در شرایط قلیایی نقش عمده‌ای در تجزیه مواد لیگنوسلولزی در صنایع مختلف و به خصوص صنعت کاغذسازی دارند[34]. نقش عمده این آنزیم‌ها در غالب در مرحله رنگبری و سفیدسازی کاغذ می‌باشد. این آنزیم‌ها موجب کاهش انرژی مورد نیاز برای پالایش خمیر کاغذ شده و با بهبود استخراج لیگنین و ایجاد تغییراتی در پیوند میان لیگنین و کربوهیدرات‌ها موجب حذف رسوب زایلان در الیاف کاغذ می‌شوند. در واقع این آنزیم‌ها با حذف ترکیبات زایلان موجب افزایش دسترسی عوامل رنگبری به درون الیاف کاغذ می‌شوند. زایلانازها همچنین بازده ترمودینامیکی تولید خمیرها را افزایش می‌دهند[51].

با توجه به این نکات و جایگاه ویژه زایلانازها در صنعت کاغذسازی، اثر هیدرولیزی آنزیم زایلاناز مورد مطالعه بر پالپ مقوا مورد بررسی قرار گرفت که شکل 5 نتیجه این بررسی را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود زایلاناز نوترکیب توانایی خوبی در هیدرولیز پالپ مقوا از خود نشان داده است. میزان قند آزاد شده از بافت مقوا طی 96 ساعت تیمار در 50 درجه سانتی‌گراد، افزایش یافت. هم‌چنین پس از 96 ساعت هیدرولیز میزان 3,74 mg/ml قند احیا توسط آنزیم تولید شد.

گزارشات قبلی نشان داده‌اند که زایلاناز نوترکیب حاصل از گونه‌های باکتریایی توانایی مناسبی در تجزیه پالپ کاغذ داشته اند[52]. از سوی دیگر، مطالعات دیگر در این حیطه نشان داده است که آنزیم‌های زایلاناز نوترکیب قدرت بالایی در فرایند جوهرزدایی، بازیافت و رنگبری روزنامه با توجه به اثر مناسب آن در سلامت محیط زیست دارند[53]. پژوهش‌های مشابه دیگر توانایی آنزیم های لیگنوسلولوزیک شامل زایلاناز و سلولاز را در تیمار پالپ کاغذ بازیافتی و جوهرزدایی بررسی کرده‌اند که تاییدی بر توانایی بالای این خانواده از آنزیم‌ها در صنعت تولید کاغذ است[54].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]



شکل5- میزان قند آزاد شده از هیدرولیز پالپ مقوا توسط آنزیم زایلاناز نوترکیب PersiXyn5 طی 96 ساعت در دمای 50 درجه سانتی‌گراد

1-4 نتیجه‌گیری

جمعیت‌های میکروبی منابع غنی از آنزیم‌هایی با گستره وسیعی از عملکرد در شرایط مختلف هستند. از آنجا که انتخاب یک آنزیم با ویژگی‌های دلخواه با روش‌های مرسوم آزمایشگاهی تقریبا غیر ممکن است؛ این مطالعه با تمرکز بر صرفه‌جویی در وقت و هزینه تلاش کرده است تا با استفاده از جست‌وجوی محاسباتی، یک آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت را تحت بررسی‌های بیوانفورماتیکی از متاژنوم شکمبه گوسفند شناسایی و انتخاب کرده تا پس از کلون، بیان و خالص سازی، مورد بررسی‌های بیوشیمیایی قرار گیرد. از آنجا که طی آزمون-های انجام شده آنزیم مورد نظر 58 درصد از فعالیت خود را در دمای بالا (90 درجه‌سانتی گراد) حفظ کرده و مقاومت مناسبی در محیط قلیایی نشان داد، می‌توان بیان کرد که این نتایج گواه تاکیدی بر فعالیت مناسب زایلاناز در شرایط قلیایی و دمای بالا است که موجب گسترش استفاده‌ی آن در صنایع مختلف به خصوص صنعت کاغذسازی می‌گردد. لذا با بررسی توان آنزیم مورد مطالعه در هیدرولیز مقوا پتانسیل آن در صنعت کاغذ سنجش شد. زایلاناز مورد بررسی طی 96 ساعت تیمار در 50 درجه سانتی‌گراد توانست کارایی بی‌نظیری را در تولید قندهای احیا ضمن تجزیه‌ی ساختار مقوا به نمایش بگذارد. این یافته‌ها استفاده از آنزیم زایلاناز نوترکیب مورد مطالعه را در بسیاری صنایع مختلف و به خصوص صنعت کاغذ-سازی با توجه به نقش بارز این نوع آنزیم‌ها در فرایند رنگ‌بری، رسوب‌زدایی و بهبود خواص الیاف کاغذ و تاکید بر کاهش آلاینده‌های زیستی و هزینه‌های مصرفی تأیید کرد.

منابع

[1] W. V. Dashek, Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology, 2018. https://doi.org/10.1201/9781351074483.

[2] R. Maheshwari, G. Bharadwaj, M.K. Bhat, Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes, Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2000). https://doi.org/10.1128/mmbr.64.3.461-488.2000.

[3] B. Battan, J. Sharma, S.S. Dhiman, R.C. Kuhad, Enhanced production of cellulase-free

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00006-6.

[13] M. Morrison, P.B. Pope, S.E. Denman, C.S. McSweeney, Plant biomass degradation by gut microbiomes: more of the same or something new?, Curr. Opin. Biotechnol. (2009). https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.004.

[14] M.R. Rondon, R.M. Goodman, J. Handelsman, The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity, Trends Biotechnol. 17 (1999) 403–409.

[15] A. Verenium, Pioneer of 21st Century Bioscience, is Working to Transform Industries, Available Online Www. Diver-Sa. Com (Access 1 July, 2013). (2013).

[16] T. Uchiyama, K. Miyazaki, Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening, Curr. Opin. Biotechnol. 20 (2009) 616–622. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.010.

[17] M. Ferrer, A. Beloqui, K.N. Timmis, P.N. Golyshin, Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (2008). https://doi.org/10.1159/000142898.

[18] J.A. Gilbert, C.L. Dupont, Microbial Metagenomics: Beyond the Genome, Ann. Rev. Mar. Sci. (2011). https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811.

[19] Y. Hu, G. Zhang, A. Li, J. Chen, L. Ma, Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from a soil-derived metagenomic library with an efficient approach, Appl. Microbiol. Biotechnol. 80 (2008) 823.

[20] X.C. Mo, C.L. Chen, H. Pang, Y. Feng, J.X. Feng, Identification and characterization of a novel xylanase derived from a rice straw degrading enrichment culture, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2010). https://doi.org/10.1007/s00253-010-2712-2.

[21] F. Warnecke, P. Luginbühl, N. Ivanova, M. Ghassemian, T.H. Richardson, J.T. Stege, M. Cayouette, A.C. McHardy, G. Djordjevic, N. Aboushadi, R. Sorek, S.G. Tringe, M. Podar, H.G. Martin, V. Kunin, D. Dalevi, J. Madejska, E. Kirton, D. Platt, E. Szeto, A. Salamov, K. Barry, N. Mikhailova, N.C. Kyrpides, E.G. Matson, E.A. Ottesen, X. Zhang, M. Hernández, C. Murillo, L.G. Acosta, I. Rigoutsos, G. Tamayo, B.D. Green, C. Chang, E.M. Rubin, E.J. Mathur, D.E. Robertson, P. Hugenholtz, J.R. Leadbetter, Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite, Nature. 450 (2007) 560–565. https://doi.org/10.1038/nature06269.

thermostable xylanase by Bacillus pumilus ASH and its potential application in paper industry, Enzyme Microb. Technol. 41 (2007) 733–739.

[4] L. Gebicka, E. Banasiak, Flavonoids as reductants of ferryl hemoglobin., Acta Biochim. Pol. 56 (2009) 509–13.

[5] J.S. Eun, K.A. Beauchemin, H. Schulze, Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage, J. Dairy Sci. (2007). https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71629-6.

[6] X. Li, Y. She, B. Sun, H. Song, Y. Zhu, Y. Lv, H. Song, Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable xylanase from Streptomyces rameus L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp, Biochem. Eng. J. (2010). https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.006.

[7] F. Woldesenbet, A.P. Virk, N. Gupta, P. Sharma, Effect of microwave irradiation on xylanase production from wheat bran and biobleaching of eucalyptus kraft pulp, Appl. Biochem. Biotechnol. (2012). https://doi.org/10.1007/s12010-012-9663-2.

[8] B.R. Goluguri, C. Thulluri, M. Cherupally, N. Nidadavolu, D. Achuthananda, L.N. Mangamuri, U. Addepally, Potential of thermo and alkali stable xylanases from Thielaviopsis Basicola (MTCC-1467) in biobleaching of wood kraft pulp, Appl. Biochem. Biotechnol. (2012). https://doi.org/10.1007/s12010-012-9765-x.

[9] M. Ayyachamy, T.M. Vatsala, Production and partial characterization of cellulase free xylanase by Bacillus subtilis C 01 using agriresidues and its application in biobleaching of nonwoody plant pulps, Lett. Appl. Microbiol. (2007). https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02223.x.

[10] D. Verma, T. Satyanarayana, Production of cellulase-free xylanase by the recombinant Bacillus subtilis and its applicability in paper pulp bleaching, Biotechnol. Prog. (2013). https://doi.org/10.1002/btpr.1826.

[11] V.B. Damiano, D.A. Bocchini, E. Gomes, R. Da Silva, Application of crude xylanase from Bacillus licheniformis 77-2 to the bleaching of eucalyptus Kraft pulp, World J. Microbiol. Biotechnol. (2003). https://doi.org/10.1023/A:1023244911314.

[12] N. Kulkarni, A. Shendye, M. Rao, Molecular and biotechnological aspects of xylanases, FEMS Microbiol. Rev. (1999).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

Identification and characterization of a novel thermostable xylanase from camel rumen metagenome, Int. J. Biol. Macromol. 126 (2019) 1295–1302. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.041.

[33] J. Gharechahi, G.H. Salekdeh, Biotechnology for Biofuels A metagenomic analysis of the camel rumen ' s microbiome identifies the major microbes responsible for lignocellulose degradation and fermentation, Biotechnol. Biofuels. (2018) 1–19. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1214-9.

[34] S. Ariaeenejad, M. Maleki, E. Hosseini, K. Kavousi, A.A. Moosavi-Movahedi, G.H. Salekdeh, Mining of camel rumen metagenome to identify novel alkali-thermostable xylanase capable of enhancing the recalcitrant lignocellulosic biomass conversion, Bioresour. Technol. 281 (2019) 343–350. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.059.

[35] L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass, M.J.E. Sternberg, The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, Nat. Protoc. 10 (2015) 845.

[36] N. Hulo, A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, B.A. Cuche, E. De castro, C. Lachaize, P.S. Langendijk-Genevaux, C.J.A. Sigrist, The 20 years of PROSITE, Nucleic Acids Res. (2008). https://doi.org/10.1093/nar/gkm977.

[37] M.J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, J. Biotechnol. 23 (1992) 257–270. https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J.

[38] R.D. Kamble, A.R. Jadhav, Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of Bacillus in solid state fermentation, Int. J. Microbiol. 2012 (2012).

[39] A. Marchler-Bauer, Y. Bo, L. Han, J. He, C.J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, R.C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, F. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R.A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, L.Y. Geer, S.H. Bryant, CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures, Nucleic Acids Res. 45 (2017) D200–D203. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1129.

[40] N. Boucherba, M. Gagaoua, A.B. Darenfed, C. Bouiche, K. Bouacem, Biochemical properties of a new thermo - and solvent - stable xylanase recovered using three phase partitioning from the extract of Bacillus oceanisediminis strain SJ3, Bioresour. Bioprocess. (2017). https://doi.org/10.1186/s40643-017-0161-9.

[22] R. Li, R. Kibblewhite, W.J. Orts, C.C. Lee, Molecular cloning and characterization of multidomain xylanase from manure library, World J. Microbiol. Biotechnol. 25 (2009) 2071–2078.

[23] Y. Kobayashi, Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology : Need for basic and applied science, (2006) 375–385. https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00362.x.

[24] W.J.A.N.P.C. Zhenming, Y.E.J.L.I.U. Jianxin, Construction and Analysis of Fosmid Library of Rumen Microbiota of Hu Sheep [J], Chinese J. Anim. Nutr. 2 (2010) 18.

[25] Z. Qiu, P. Shi, H. Luo, Y. Bai, T. Yuan, P. Yang, S. Liu, B. Yao, A xylanase with broad pH and temperature adaptability from Streptomyces megasporus DSM 41476, and its potential application in brewing industry, Enzyme Microb. Technol. (2010). https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.02.003.

[26] A. Walia, P. Mehta, S. Guleria, C.K. Shirkot, Modification in the properties of paper by using cellulasefree xylanase produced from alkalophilic cellulosimicrobium cellulans CKMX1 in biobleaching of wheat straw pulp, Can. J. Microbiol. (2015). https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0178.

[27] H. Liao, S. Sun, P. Wang, W. Bi, S. Tan, Z. Wei, X. Mei, D. Liu, W. Raza, Q. Shen, Y. Xu, A new acidophilic endo-β-1,4-xylanase from Penicillium oxalicum: Cloning, purification, and insights into the influence of metal ions on xylanase activity, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (2014). https://doi.org/10.1007/s10295-014-1453-0.

[28] M.L.T.M. Polizeli, A.C.S. Rizzatti, R. Monti, H.F. Terenzi, J.A. Jorge, D.S. Amorim, Xylanases from fungi: Properties and industrial applications, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2005). https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7.

[29] A. Walia, S. Guleria, P. Mehta, A. Chauhan, J. Parkash, Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review, 3 Biotech. 7 (2017) 11.

[30] J.L. Adrio, A.L. Demain, Microbial enzymes: tools for biotechnological processes, Biomolecules. 4 (2014) 117–139.

[31] J. Gharechahi, H.S. Zahiri, K.A. Noghabi, G.H. Salekdeh, In-depth diversity analysis of the bacterial community resident in the camel rumen, Syst. Appl. Microbiol. 38 (2015) 67–76.

[32] S. Ariaeenejad, E. Hosseini, M. Maleki, K. Kavousi, A.A. Moosavi-Movahedi, G.H. Salekdeh,

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

Liu, F. Lu, 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 (2015) 1877–1886. https://doi.org/10.1007/s10529-015-1857-6.

[48] B.R. Goluguri, C. Thulluri, U. Addepally, P.R. Shetty, Novel alkali-thermostable xylanase from Thielaviopsis basicola (MTCC 1467): Purification and kinetic characterization, Int. J. Biol. Macromol. 82 (2016) 823–829. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.055.

[49] L. Ping, M. Wang, X. Yuan, F. Cui, D. Huang, W. Sun, B. Zou, S. Huo, H. Wang, Production and characterization of a novel acidophilic and thermostable xylanase from Thermoascus aurantiacu, Int. J. Biol. Macromol. (2017). https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.130.

[50] B. Kumar, B. Massarat, A.Á.P.Á.A. Á, Studies on an alkali-thermostable xylanase from Aspergillus fumigatus MA28, (2011) 161–171. https://doi.org/10.1007/s13205-011-0020-x.

[51] D. Sharma, R. Chaudhary, J. Kaur, S.K. Arya, Greener approach for pulp and paper industry by Xylanase and Laccase, Biocatal. Agric. Biotechnol. (2020). https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101604.

[52] A. Sridevi, A. Sandhya, G. Ramanjaneyulu, G. Narasimha, P.S. Devi, Biocatalytic activity of Aspergillus niger xylanase in paper pulp biobleaching, 3 Biotech. (2016). https://doi.org/10.1007/s13205-016-0480-0.

[53] V.K. Nathan, M.E. Rani, G. Rathinasamy, K.N. Dhiraviam, Low molecular weight xylanase from Trichoderma viride VKF3 for bio-bleaching of newspaper pulp, BioResources. 12 (2017) 5264–5278.

[54] N.V. Kumar, M.E. Rani, R. Gunaseeli, N.D. Kannan, Paper pulp modification and deinking efficiency of cellulase-xylanase complex from Escherichia coli SD5, Int. J. Biol. Macromol. 111 (2018) 289–295.

[41] K. Wang, R. Cao, M. Wang, Q. Lin, R. Zhan, H. Xu, S. Wang, Biotechnology for Biofuels A novel thermostable GH10 xylanase with activities on a wide variety of cellulosic substrates from a xylanolytic Bacillus strain exhibiting significant synergy with commercial Celluclast 1 . 5 L in pretreated corn stover hydrolysis, Biotechnol. Biofuels. (2019) 1–13. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1389-8.

[42] S. Ariaeenejad, M. Maleki, E. Hosseini, K. Kavousi, A.A. Moosavi-Movahedi, G.H. Salekdeh, Mining of camel rumen metagenome to identify novel alkali-thermostable xylanase capable of enhancing the recalcitrant lignocellulosic biomass conversion, Bioresour. Technol. 281 (2019). https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.059.

[43] C. Ding, M. Li, Y. Hu, High-activity production of xylanase by Pichia stipitis: Purification, characterization, kinetic evaluation and xylooligosaccharides production, Elsevier B.V, 2018. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.128.

[44] S. Kumar, I. Haq, J. Prakash, S. Kumar, Purification , characterization and thermostability improvement of xylanase from Bacillus amyloliquefaciens and its application in pre-bleaching of kraft pulp, 3 Biotech. 7 (2017) 1–12. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0615-y.

[45] C. Somboon, S. Boonrung, S. Katekaew, J. Ekprasert, Purification and characterization of low molecular weight alkali stable xylanase from Neosartorya spinosa UZ-2-11 Mycoscience Puri fi cation and characterization of low molecular weight alkali stable xylanase from Neosartorya spinosa UZ-2-11, Mycoscience. 61 (2020) 128–135. https://doi.org/10.1016/j.myc.2020.01.004.

[46] P. V Giridhar, T.S. Chandra, Production of novel halo-alkali-thermo-stable xylanase by a newly isolated moderately halophilic and alkali-tolerant Gracilibacillus sp . TSCPVG, 45 (2010) 1730–1737. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.012.

[47] M.S.H. Zheng, L.M.J. Sun, X.Z.J.Z.Y.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Identification, cloning, and expression of the novel recombinant xylanase with stable structure from the sheep rumen microbiota

Shohreh Ariaeenejad[1*], Morteza Maleki[2], Safura Nooshi Nedamani[3], Kaveh Kavousi[4], Ghasem Hosseini salekdeh[5]

1- Ph.D. Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. sh.ariaee@abrii.ac.ir

2- Ms. Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. 4444morteza@gmail.com

3- Ms. Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. safura.nedamani@ut.ac.ir

4- Ph.D. Laboratory of Complex Biological Systems and Bioinformatics (CBB), Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran - - Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. Kkavousi@ut.ac.ir

5- Ph.D. Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. h_salekdeh@abrii.ac.ir

Received: 2020/9/7 Accepted: 2021/1/11

Abstract

Enzymes play an essential role in catalyzing the reactions for multiple industrial applications. One of these critical industries with a worldwide application is paper and pulp, which is cost-effective in increasing attention. Xylanases are potential enzymes that proved their abilities in a broad range of applications, specifically in the paper and pulp industry as a biobleaching agent and dye removal biocatalyst. In these decades, the production of novel enzymes from natural sources is conceivable, especially with applying the culture-independent method of metagenome. This practical approach provides the opportunity to identify the novel enzymes from uncultivable microbial diversities. Concerning the importance of the thermostable enzymes for industrial applications and their better action in harsh conditions, this study aimed to identify novel thermostable xylanase from metagenomic data of sheep rumen by applying the in-silico screening. The thermostable xylanase was extracted from the ruminal DNA and after cloning and expression named PersiXyn5. The enzymes' kinetic parameters, including Km, Vmax, and its specific activity, were examined. The enzyme was optimally active at 80 ℃ and pH 8 and could retain 58% of its maximum activity after 2h of incubation at 90 ℃. The thermostable, alkali PersiXyn5 was an efficient enzyme in the paper industry and poultry feed and fuel applications.

Keywords: Novel xylanase, In-silico screening, Metagenome, Thermostability

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-05]