

غربالگری و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده سلولز از خاک و کلون سازی ژن مربوط به آنزیم اندوگلوکاناز

آرزو معرفت^۱، لیلا صادقی^۲، غلامرضا دهقان^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

۲- دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

۳- استاد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

* صندوق پستی ۵۱۶۶۱۶۴۷۱، تبریز، ایران

l.sadeghi@tabrizu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۱

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۲

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از بیوکاتالیست‌ها در صنعت اهمیت فراوانی پیدا کرده است. چون آنها واکنش‌های شیمیایی را با صرف کمترین انرژی و بالاترین بازده انجام می‌دهند. در این بین آنزیم‌های باکتریایی با توجه به روش آسان کلون‌سازی و بیان بالای پرتین‌ها در میزبان قابل دستورزی اهمیت خاصی دارند. آنزیم سلولاز فراوانترین پلیمر موجود در طبیعت را به واحدهای گلوکز هیدرولیز می‌کند. گلوکز تولید شده از این روش می‌تواند کاربردهای متنوع داشته باشد از جمله تولید سوخت زیستی، شیرین کننده در صنایع غذایی و تولید اتانول. با توجه به کاربرد گسترده این آنزیم، در سال‌های اخیر کلون‌سازی و تولید آن در میزبان‌های دستورزی شده گسترش یافته است. این مطالعه به منظور جداسازی، غربالگری و شناسایی سویه‌های بومی تولید کننده آنزیم اندوگلوکاناز از نمونه‌های خاک اطراف ریشه درخت افرا در منطقه شمال کشور انجام شد. سویه‌های جدا شده با استفاده از توالی یابی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. پس از شناسایی نوع باکتری (*Enterobacter hormaechei*)، تکثیر ژن آنزیم اندوگلوکاناز ابتدا توسط آغازگرهای دژنره و سپس توسط آغازگرهای اختصاصی دارای توالی‌های برشی انجام شد و الحاق ژن در پلاسمید مناسب با استفاده از آنزیم‌های برشی و الحاقی مناسب انجام شد. سپس پلاسمید نو ترکیب حاصل به میزبان *E. coli BL-21* منتقل شد و بیان پروتئین هدف با تحریک اوپران لک در غلظت ۱ mM IPTG انجام شد. ثابت‌های کینتیکی آنزیم از جمله V_{max} و K_m به ترتیب برابر با ۴۵ میکرومول در دقیقه و ۱/۴ میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شد. بهینه شرایط فعالیت آنزیم نو ترکیب تولید شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH ۷ می‌باشد.

کلید واژگان: آنزیم اندوگلوکاناز، سلولز، کربوکسی متیل سلولز، غربالگری، آغازگر دژنره، انتروباکتر هورمایچی

۱-مقدمه

امروزه با توجه به رشد روزافزون صنعت، نیاز به مصرف انرژی در کل جهان در حال افزایش است. به طوری که بیشتر کشورهای جهان برای استفاده از انرژی های تجدید پذیر یا سوخت های زیستی در حال رقابت هستند. کشورهایی که توانایی استفاده از سوخت های زیستی را دارند از شانس بالاتری در این رقابت برخوردار هستند. سلولز به عنوان یکی از فراوانترین پلیمرهای زیستی که در طبیعت یافت می شود می تواند به عنوان یک ماده ی اولیه تجدید پذیر و ارزان قیمت برای تولید سوخت های زیستی استفاده شود [۱].

سلولز هموپلیمری خطی است که از واحدهای D-گلوکز تشکیل شده است که با پیوند گلیکوزیدی $\beta 1,4$ به هم متصل شده اند. گروه های هیدروژنی متعدد بر روی گلوکز از یک رشته سلولزی با مولکول های اکسیژن از همان رشته و یا زنجیر کناری تشکیل پیوند هیدروژنی می دهند که این پیوندهای هیدروژنی درون و بین زنجیره ای، سلولز را به ماده ای با خاصیت مقاوم و سخت تجزیه پذیر تبدیل کرده است. تجزیه سلولز برای بهره برداری و تولید سوخت بیولوژیکی توسط کمپلکس آنزیمی سلولاز انجام می شود. سلولازها در واقع جز آنزیم های گروه ۵-گلیکوزیل هیدرولازها هستند، که پیوند $\beta 1,4$ را در سلولز هیدرولیز می کند. فرایند تجزیه سلولز توسط همکاری ۳ گروه آنزیمی اندوگلوکاناز، آگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز صورت می گیرد. اندوگلوکاناز بر روی پیوندهای بتاگلیکوزیدی داخلی به صورت تصادفی عمل می کند. آگزوگلوکاناز بر روی انتهای احیا کننده و غیر احیا کننده سلولز عمل می کند، در حالی که آنزیم بتاگلوکوزیداز با تاثیر بر روی میکروکریستالین های تولید شده توسط دو آنزیم قبل گلوکز تولید می کند [۲، ۳].

پژوهش های متعددی در مورد نقش و کاربرد آنزیم سلولاز در صنعت انجام شده است که بیانگر اهمیت بسیار بالای

این آنزیم در صنعت می باشد. از جمله کاربردهای گسترده ای که این آنزیم در صنعت دارد می توان به موارد زیر اشاره کرد: تولید شوینده های صنعتی، صنعت آبمیوه سازی، نساجی، کاغذ سازی، صنایع دارو سازی و تولید سوخت های زیستی مثل بیواتانول [۲].

بر اساس مطالعات پیشین آنزیم ها از منابع مختلفی به دست می آیند، اگر چه بیشتر آنزیم های تجاری دارای منشأ میکروبی می باشند اما تعداد کثیری نیز توسط منشأ حیوانی و گیاهی تامین می شود. بنابراین، میکروارگانیسم ها به دلیل ویژگی های مطلوبی که دارند یک منبع مهم در تامین آنزیم ها به حساب می آیند. از جمله این ویژگی های مطلوب می توان به سرعت رشد بالا در مدت زمان کوتاه، ثبات و پایداری پروتئین های تولیدی، تکثیر بسیار بالای باکتری ها اشاره کرد. آنزیم سلولاز توسط باکتری ها و قارچ های متعدد تولید می شود که طبق مطالعات پیشین انجام شده باکتری هایی از سویه باسیلوس، انتروباکتر و همچنین باکتری هایی همچون سلولوموناس، سلوویبریو، سیتوفاگا، رومینوکوکوس، میکروکوکوس و کلوستریدیوم از جمله باکتری های شناسایی شده در تجزیه سلولز هستند، در این مطالعه از منشأ پروکاریوتی برای جداسازی و شناسایی آنزیم اندوگلوکاناز از سویه های بومی استفاده شد [۴].

با در نظر گرفتن اهمیت بسیار بالای آنزیم اندوگلوکاناز و ویژگی های برجسته ای که برای این آنزیم مطرح شد، هدف پژوهش حاضر غربالگری باکتری های بومی مولد آنزیم اندوگلوکاناز از خاک اطراف ریشه درخت افرا از منطقه شمال کشور (چالوس) است. در ادامه باکتری جدا شده که حاوی ویژگی هیدرولیز سلولز است، توسط تکثیر و توالی یابی ژن 16S rRNA به عنوان یک ژن حفاظت شده، در حد جنس و گونه شناسایی شد [۵]. پس از شناسایی جنس و گونه باکتری مورد مطالعه با توجه به این که توالی نوکلئوتیدی ژن آنزیم اندوگلوکاناز باکتری هدف

از قبل شناسایی و در پایگاه داده ثبت نشده بود. بنابراین در ادامه برای شناسایی و ثبت توالی نوکلئوتیدی ژن آنزیم اندوگلوکاناز از باکتری غربال شده، طراحی آغازگرهای^۱ دژنره براساس توالی نوکلئوتیدی آنزیم اندوگلوکاناز در گونه‌های نزدیک به باکتری مورد مطالعه انجام شد. برای الحاق ژن آنزیم اندوگلوکاناز در ناقل pET21a آغازگرهای اختصاصی حاوی توالی برشی آنزیم‌های محدود کننده^۲ مناسب استفاده شد. سپس، با انتقال پلاسمید نو ترکیب در میزبان جدید *E.coli BL-21 (DE3)* امکان دست‌ورزی در ژن مورد نظر و نیز بیان انتخابی آن با افزودن ایزوپریل بتا دی پتوگالاکتوپیرانوزید (IPTG^۳) فراهم شد چرا که ژن هدف تحت کنترل اوپرون lac^۴ کلون شده است. پس از بیان و استخراج آنزیم نو ترکیب، ویژگی‌های کیتیکی آن مطالعه شد [۶، ۷].

۲- مواد و روش‌ها

اکثر مواد استفاده شده در این مطالعه به جز موارد استثنا ذکر شده از شرکت MERK آلمان تهیه شدند. آنزیم Xho1، آنزیم Nde1 و Buffer Red(10X) از شرکت Thermo Scientific تهیه شدند و آنزیم T4 DNA Ligase، مسترمیکس حاوی آنزیم Taq polymerase و IPTG از شرکت سینا کلون ایران و تمام آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه توسط شرکت Bioneer سنتز شد، کیت‌های استخراج پلاسمید و کیت تخلیص قطعات DNA از شرکت Gene All کره تهیه شدند.

۲-۱ غنی سازی، غربالگری و شناسایی سویه‌های برتر مولد آنزیم اندوگلوکاناز

نمونه‌ی مورد مطالعه در این پژوهش از منطقه شمال کشور (شهر چالوس) و از خاک اطراف ریشه درخت افرا با عمق بیش از ۱۰ سانتی متر انتخاب شد [۸]. برای غنی سازی نمونه انکوباسیون در محیط کشت Luria broth

(LB) با ترکیبات ۱۰ گرم بر لیتر سدیم کلرید، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۱۰ گرم بر لیتر تریپتون به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمونه غنی شده برای جدا سازی به صورت تک کلنی در محیط LB جامد که علاوه بر ترکیبات فوق حاوی ۱۰ گرم بر لیتر آگار می‌باشد به صورت کشت ۴ منطقه‌ای کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. تک کلنی‌های حاصل از این کشت برای اطمینان از خلوص باکتری‌ها به یک محیط LB جامد منتقل و شماره گذاری شدند و سپس برای رشد، در شرایط ذکر شده انکوبه شدند [۹]. (برای اطمینان از خلوص نمونه‌ها، این عمل چندین مرحله تکرار شد).

برای غربالگری باکتری‌های مولد اندوگلوکاناز از محیط کشت حداقل که حاوی کربوکسی متیل سلولز (CMC)^۵ به عنوان تنها منبع کربن است استفاده شد، در این محیط کشت فقط باکتری‌های تولید کننده آنزیم اندوگلوکاناز توانایی رشد دارند [۱۰]. این محیط در حضور لوگول به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آید. یک محیط کشت جامد حاوی ۱۰ گرم بر لیتر از کربوکسی متیل سلولز (۱ درصد) و آگار تهیه شد و نمونه‌ها برای غربالگری به این محیط منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، با افزودن لوگول به محیط کربوکسی متیل سلولز باکتری‌های مولد اندوگلوکاناز از طریق ایجاد هاله روشن (هاله‌ی عدم حضور CMC) اطراف کلنی شناسایی شدند [۱۱، ۱۲].

۲-۲ شناسایی سویه‌های برتر با استفاده از تکثیر و توالی

یابی ژن 16S rRNA

برای شناسایی جنس و گونه باکتری غربال شده، توالی‌یابی ژن حفاظت شده 16S rRNA انجام شد. در این مطالعه برای استخراج DNA از روش Russel و Sambrook با

^۴ Lactose

^۵ CMC

^۱ Primer

^۲ Restriction Enzymes

^۳ Isopropyl-Beta-D- Thiogalactopyranoside

اندکی تغییر استفاده شد [۱۳]. توالی آغازگرهای 27F و 1492R مورد استفاده برای تکثیر ژن در جدول ۱ مشخص شده است [۱۴]. برای تکثیر ژن 16S rRNA از طریق PCR ترکیبی حاوی ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱۹ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ میکرومولار و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده (الگو) تهیه شد. نسبت افزودن آغازگرها به صورتی انجام می‌گیرد که در ترکیب نهایی حاصل غلظت هر یک ۴۰۰ پیکومولار باشد. برنامه PCR مورد استفاده در این مطالعه به شرح زیر است: مرحله اول مرحله دناتوراسیون اولیه که در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای باز شدن جفت رشته‌های اسید نوکلئیک صورت می‌گیرد، مرحله دوم شامل ۱ دقیقه دناتوراسیون که برای جلوگیری از اتصال دو رشته مکمل

در هر چرخه تکرار می‌شود. مرحله سوم دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای اتصال رشته آغازگر به رشته الگو می‌باشد و سپس مرحله چهارم که شامل دمای بهینه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای فعالیت آنزیم Taq پلیمرز است. لازم به ذکر هست که مراحل ۲-۳-۴ به صورت چرخه با ۲۵ بار تکرار انجام شد و در نهایت مرحله نهایی که مرحله تولید سازی رشته‌های ناقص سنتز شده است در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد [۱۵]. تمام محصولات حاصل از PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد جدا سازی و بررسی شدند، پس از تایید حضور باند در محدوده ۱۶۰۰ bp، قطعات تکثیر شده با استفاده از روش کار موجود در کیت Gene All تخلیص و برای تعیین توالی به شرکت Source bioscience ارسال شدند.

جدول ۱ مشخصات و ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش. سطر دوم و سوم جدول توالی و مشخصات مربوط به جفت آغازگرهای عمومی مورد استفاده برای تکثیر قسمت حفاظت شده ژن 16S rRNA می‌باشد [۱۴]. سطر چهارم و پنجم جدول توالی و مشخصات جفت آغازگرهای دژنره برای ژن اندوگلوکاناز انتروباکترها است (حرف Y نوکلئوتید متصل شونده به بازهای T, C, G, A, R برای اتصال به بازهای A, G, C, T, S برای اتصال به بازهای C, G می‌باشند). سطر ششم و هفتم جدول توالی و مشخصات جفت آغازگرهای اختصاصی برای ژن اندوگلوکاناز هدف فاقد سیگنال پپتید است. این آغازگرها دارای توالی برشی برای آنزیم‌های Nde 1 و Xho 1 (توالی برشی در این دو آغازگر با کشیدن خط زیر و حروف بزرگ مشخص شده است، انتهای چسبنده^۱ نیز با سایه به صورت مشخص شده است) هستند.

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول (باز)	ΔG (KCAL/MOL)	دمای اتصال (°C)	GC/.
27F آغازگر برگشت	5'-agagtttgatcctggctcag-3'	۲۰ باز	-۲/۲۴	۵۹/۵۸ °C	۵۰٪
1492R آغازگر رفت	5'-cggttacctgttacgactt-3'	۲۰ باز	-۲/۵۹	۵۸/۰۲ °C	۴۵٪
آغازگر رفت دژنره	5'-atgaaaRKctttcgKcGRtg-3'	۲۲ باز	-۲/۶۵	۶۲/۰۱ °C	۴۵٪
آغازگر برگشت دژنره	5'-tYaStgtgaacKtRcgcatcc-3'	۲۲ باز	-۳/۳۰	۶۲/۲۱ °C	۴۵٪
Nde 1 آغازگر رفت	5'-CATATGgtcgagcgttgatgctg-3'	۲۴ باز	-۷/۴۱	۶۷/۱۱ °C	۵۴٪
Xho1 آغازگر برگشت	5'-CTCAGTtagtgtgaacgtgcgcatcc-3'	۲۷ باز	-۲/۶۱	۶۸/۴۸ °C	۵۱٪

^۱ Flanking site

۲-۳ طراحی جفت آغازگر های دژنره و جفت

آغازگرهای حاوی توالی اختصاصی آنزیمهای برشی

برای ژن آنزیم اندوگلوکاناز سویه‌ی مورد مطالعه

با توجه به نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن 16S rRNA و بلاست توالی در سایت NCBI، شناسایی جنس و گونه نمونه فعال‌تر انجام شد ولی توالی ژن مربوط به آنزیم اندوگلوکاناز برای گونه شناسایی شده در پایگاه‌های داده ثبت نشده بود. پس با بررسی توالی‌های ژن آنزیم اندوگلوکاناز موجود در NCBI در بین گونه‌های نزدیک به باکتری مورد مطالعه، آغازگر دژنره برای تکثیر ژن اندوگلوکاناز هدف طراحی شد. از نرم‌افزار perl primer 2011 به منظور طراحی یک جفت آغازگر دژنره که توانایی تکثیر ژن اندوگلوکاناز را در ۵ گونه‌ی مشابه دارد استفاده شد و برای سنتز آغازگرها توالی به شرکت Bioneer ارسال شد. توالی آغازگرهای دژنره (رفت و برگشت) مورد استفاده در جدول ۱ مشخص است. برای تکثیر ژن آنزیم اندوگلوکاناز ترکیبات و برنامه PCR طبق مراحل قبل تهیه (با آغازگرهای دژنره) و انجام شد. محصول حاصل از PCR همانند مرحله قبل با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد و پس از تایید حضور باند تکثیر در محدوده ۱۱۰۰ bp محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص شد و برای توالی‌یابی به شرکت Source bioscience ارسال شد [۶].

در نهایت با توجه به نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن آنزیم اندوگلوکاناز و مطالعات انجام شده، پس از مشخص شدن توالی ژن آنزیم اندوگلوکاناز طراحی آغازگرهای جدید بار دیگر با در نظر گرفتن موارد زیر انجام شد. ابتدا بررسی‌های لازم برای انتخاب آنزیم‌های برشی مناسب توسط نرم‌افزار تحت وب NEB cutter انجام شد تا توالی آنزیم‌های برشی مناسب انتخاب شود و توالی نوکلئوتیدی ژن آنزیم اندوگلوکاناز فاقد توالی برشی آنزیم‌های برش دهنده باشد. همچنین، توالی نوکلئوتیدی که سبب ترشح

پروتئین پس از سنتز به خارج از باکتری می‌شود (توسط سیگنال پپتید) توسط نرم‌افزار تحت وب Signal Ip شناسایی و از ابتدای توالی نوکلئوتیدی حذف شد (به اندازه ۲۴ نوکلئوتید از ابتدا توالی)، تا پروتئین پس از سنتز در داخل سیتوپلاسم میکروارگانیسم میزبان باقی بماند. بنابراین، برای ورود ژن آنزیم اندوگلوکاناز به درون ژنوم پلاسمید توالی‌های اختصاصی دو آنزیم برش دهنده Nde1 و Xho1 به ترتیب در انتهای ۵' آغازگرهای رفت و برگشت قرار گرفتند (جدول ۱). در نتیجه طراحی آغازگرهای جدید که حاوی توالی‌های اختصاصی آنزیم‌های برشی فوق بودند انجام شد و برای سنتز به شرکت Bioneer ارسال شد، سپس PCR برای تکثیر ژن آنزیم اندوگلوکاناز با جفت آغازگرهای جدید حاوی توالی‌های برشی انجام شد [۱۳، ۱۶].

۲-۴ الحاق ژن در ناقل پلاسمیدی و انتقال به داخل

باکتری

برای الحاق ژن در ناقل پلاسمیدی، پلاسمید pET 21a و محصول PCR حاصل از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی حاوی توالی آنزیم‌های برش دهنده تهیه شد. سپس، ناقل پلاسمیدی pET 21a و محصول PCR به صورت جداگانه توسط آنزیم‌های برش دهنده xho1 و Nde1 تیمار شدند. به ترکیب واکنش آنزیم‌های برشی، ۱۷ میکرولیتر پلاسمید یا محصول PCR، ۸ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر آنزیم Nde1، ۱ میکرولیتر xho1 و ۳ میکرولیتر از بافر Red (بافر مربوط به آنزیم‌های برشی که هر دو آنزیم دارای فعالیت معقول در این بافر می‌باشند) اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۲ ساعت تیمار شدند، تا انتهای چسبنده ایجاد شود. سپس، هر دو محصول تیمار شده با استفاده از کیت، تخلیص شدند و با کمک انتهای چسبنده‌ای که دو آنزیم برشی در محصول PCR و در پلاسمید ایجاد کردند عمل الحاق ژن به درون پلاسمید ناقل انجام شد.

واکنش الحاق با مجاورت دو محصول تیمار شده به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد و سپس آنزیم DNA لیگاز T4 به ترکیب فوق اضافه شد و ترکیب حاصل به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، در طی این مدت با ایجاد پیوند فسفودی استری در انتهای چسبنده توسط آنزیم لیگاز اتصال ژن به وکتور انجام شد [۱۷].

سپس انتقال پلاسمید pET 21a نوترکیب (ناقل ژن اندوگلوکاناز) به درون سلول‌های مستعد *E.coli BL21* انجام شد. اولین قدم در انتقال پلاسمید به میزبان تهیه سلول‌های مستعد هست که در این مطالعه با استفاده از روش شیمیایی (کلاسیم کلراید) تولید سلول‌های مستعد (*E.Coli BL-21* (DE3) انجام شد و محصول واکنش مرحله الحاق با استفاده از روش شوک حرارتی به داخل *E.Coli BL-21*(DE3) انتقال یافت [۱۸]. باکتری‌های حاصل از انتقال پلاسمید به میزبان در ابتدا به محیط LB مایع منتقل و به مدت ۱ ساعت انکوبه شد، سپس در دور $5000 \times g$ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل به محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. ناقل pET 21a توانایی رشد در محیط آمپی‌سیلین‌دار را دارد و تست مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین برای تایید انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری انجام شد. در نهایت برای بررسی صحت کلون‌سازی آزمایشاتی همچون کلنی PCR، هضم پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های برشی و مقایسه اندازه آن قبل و بعد از دریافت ژن انجام شد [۱۱].

۲-۵ بیان و جداسازی پروتئین نوترکیب

تک کلنی نوترکیب حاصل از انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان به یک محیط LB مایع حاوی (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) آمپی‌سیلین بر روی شیکر rpm ۱۰۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد و از

کشت حاصل به نسبت ۱ به ۱۰۰ به محیط کشت مایع حاوی غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین تلقیح انجام شد و با شیکر rpm ۱۰۰ به مدت حدوداً ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، تا OD کشت در طول موج ۵۸۰ نانومتر بین ۰/۴ تا ۰/۷ باشد. در این مرحله ۳ میلی‌لیتر از نمونه به عنوان نمونه قبل از القاء بیان از محیط کشت جداسازی شد و به بقیه نمونه IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار برای تحریک اوپران لک اضافه شد و سپس به مدت ۶ ساعت برای بیان ژن نوترکیب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد [۷].

برای استخراج آنزیم نوترکیب انباشته شده در سیتوپلاسم باکتری در محیط کشت، ابتدا سانتریفیوژ در دور $4000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و رسوبگیری انجام شد. رسوب حاصل که حاوی نمونه باکتریایی می‌باشد در ۵۰۰ میکرولیتر بافر Tris با pH ۷ حل شد. در نهایت باکتری‌های حل شده در بافر به صورت دو مرحله‌ای به مدت ۳۰ دقیقه در سونیکیتور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (روی یخ) توسط امواج ماورای صوتی لیز شد تا پروتئین‌ها و مواد موجود در داخل باکتری وارد بافر شوند، سپس نمونه حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دور $20000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد که در نهایت مایع رویی حاوی عصاره سلولی و آنزیم استخراج شده می‌باشد که برای انجام بررسی‌های بعدی از جمله SDS-PAGE، بررسی فعالیت آنزیم و سنجش میزان پروتئین تولیدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا ساختار طبیعی پروتئین‌ها حفظ شود.

۲-۶ بررسی میزان بیان پروتئین با SDS-PAGE

نمونه‌های قبل و پس از القاء بیان توسط IPTG به دو حالت رسوب و محلول که در مرحله‌ی بیان پروتئین نوترکیب تهیه شدند، در ژل پلی‌آکریل‌امید ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۴ ساعت الکتروفورز شدند. سپس، ژل پلی‌آکریل‌امید ابتدا توسط رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی

شد و در نهایت با محلول رنگ‌بر، رنگ‌زدایی شد تا باندهای پروتئین ظاهر شوند [۱۹].

۷-۲ بررسی فعالیت آنزیم نوترکیب با معرف دی‌نیتروسالسیلیک اسید (DNS)

برای بررسی فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز نوترکیب از معرف DNS استفاده شد. معرف DNS برای بررسی حضور و تخمین میزان قندهای احیاکننده آزاد شده از هیدرولیز CMC استفاده می‌شود. ترکیبات این معرف شامل ۶ گرم سدیم پتاسیم تارتات، ۰/۲ گرم دی‌نیتروسالسیلیک اسید و ۰/۱ گرم سود در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد. سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از ۳۰ میکرولیتر آنزیم نوترکیب و ۲۰۰ میکرولیتر محلول CMC ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس، ۲۳۰ میکرولیتر معرف DNS به ترکیب فوق اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری جوشان قرار گرفت. سپس، نمونه به مدت ۳ دقیقه به روی یخ منتقل شد تا کمپلکس رنگی حاصل ماندگاری بالاتری داشته باشد و در نهایت جذب نمونه در ۵۴۰ نانومتر پس از رقیق سازی سنجیده شد (انتهای احیا کننده تولید شده در اثر فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد).

همچنین، هیدرولیز CMC ۱ درصد در شرایط دمایی (۱۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد) و pHهای مختلف (۳-۹) بررسی شد. برای محاسبه پارامترهای کینتیکی آنزیم رسم نمودار استاندارد گلوکز با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز انجام شد که در نهایت شیب نمودارها همان ضریب جذب مولی گلوکز برای محاسبه فعالیت آنزیم استفاده شد. همچنین، برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین موجود در نمونه از روش برادرفورد استفاده شد [۱۳، ۲۰].

۸-۲ بررسی بیو انفورماتیکی و مدل‌سازی ساختار آنزیم اندوگلوکاناز

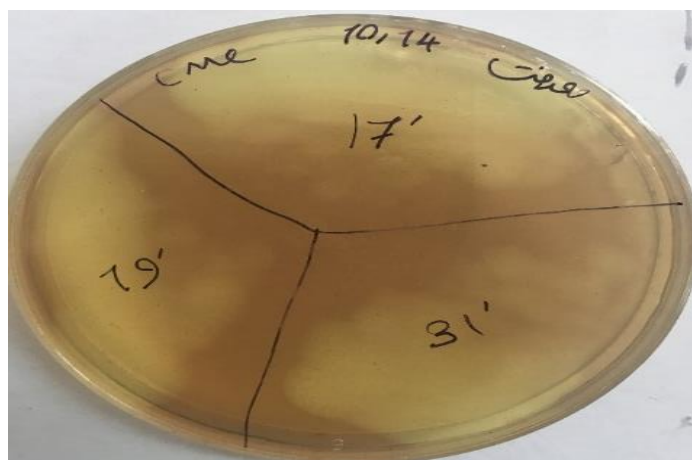
برای بررسی pI و اندازه تقریبی پروتئین نوترکیب تولید شده در میزبان جدید از برنامه تحت وب ExPasy IP

استفاده شد. همچنین، برای مدل‌سازی آنزیم از برنامه تحت وب Swiss model استفاده شد که با الگو قرار دادن آنزیم‌های مشابه برای آنزیم مورد مطالعه مدل سازی انجام می‌دهد. شبیه‌ترین پروتئین از نظر توالی که ساختار کریستالوگرافی مشخصی دارد به عنوان الگو انتخاب شد. ساختار مدل ساخته شده توسط نرم‌افزار chimera (۱۲/۱) بررسی و تصاویر آن تهیه شد [۲۱، ۲۲].

۳- نتایج

سلولز به عنوان یکی از فراوانترین مواد آلی در طبیعت به راحتی می‌تواند توسط یک هیدرولیز آنزیمی به ماده با ارزشی به نام گلوکز تبدیل شود. گلوکز و الیگوساکاریدهای کوچک برای تولید سوخت زیستی و الکل قابلیت استفاده بالایی دارند. هدف از این مطالعه غربالگری و شناسایی باکتری‌های مولد آنزیم اندوگلوکاناز و کلون‌سازی ژن مسئول تولید این آنزیم در یک میزبان قابل دستورزی است. برای بررسی حضور باکتری‌های مولد اندوگلوکاناز، از خاک اطراف ریشه درخت افرا استفاده شد چرا که باکتری‌های تجزیه کننده سلولز در محیط اطراف ریشه گیاهان زندگی می‌کنند.

همچنین، برای غربالگری باکتری‌های مولد اندوگلوکاناز از محیط کشت اختصاصی CMC که یک محیط حداقل می‌باشد استفاده شد، CMC در تماس با لوگول به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آید و به این ترتیب حضور و مصرف آن را در محیط می‌توان تشخیص داد [۸، ۱۰]. قسمت‌هایی از این محیط که باکتری‌ها رشد کرده باشند و CMC محیط مصرف شود در تماس با لوگول رنگ‌پذیری ندارند در نتیجه هاله‌های عدم حضور CMC به وجود می‌آیند که از قطر این هاله‌ها در صورت کشت با حجم یکسان از باکتری، نمونه باکتری فعال‌تر مشخص می‌شود (شکل ۱) [۸].



شکل ۱ تست رنگ آمیزی محیط کشت حداقل CMC با لوگول، حضور هاله‌های روشن اطراف کلنی‌های رشد کرده نمایانگر عدم حضور CMC و هیدرولیز آن در محیط می‌باشد. توانایی تولید آنزیم اندوگلوکاناز توسط باکتری باعث هیدرولیز CMC محیط می‌شود.

توجه به مطالعاتی که انجام شد و همچنین با توجه به این که توالی ژن آنزیم اندوگلوکاناز باکتری غربال شده در این پژوهش از قبل توالی‌یابی و ثبت نشده بود، طراحی جفت آغازگرهای دژنره (جدول ۱) با توانایی تکثیر ژن آنزیم اندوگلوکاناز سویه‌های باکتریایی نزدیک به سویه‌ی مورد مطالعه، انجام شد. همچنین، تکثیر ژن آنزیم اندوگلوکاناز سویه‌ی مورد مطالعه با PCR انجام شد (شکل ۲ ب) [۱۶].

پس از شناسایی نمونه فعال‌تر با تست لوگول تکثیر توالی ناحیه حفاظت شده ژن 16S rRNA مربوط به سویه برتر انجام شد (شکل الف ۲)، این ژن حفاظت شدگی بالایی دارد و از توالی آن می‌توان به گونه و سویه باکتری پی برد (شکل ۳). با بررسی‌های انجام شده جنس و گونه‌ی باکتری مورد مطالعه در این پژوهش تشابه ۹۹ درصد با *Enterobacter hormaechei subsp. Hoffmannii* دارد.

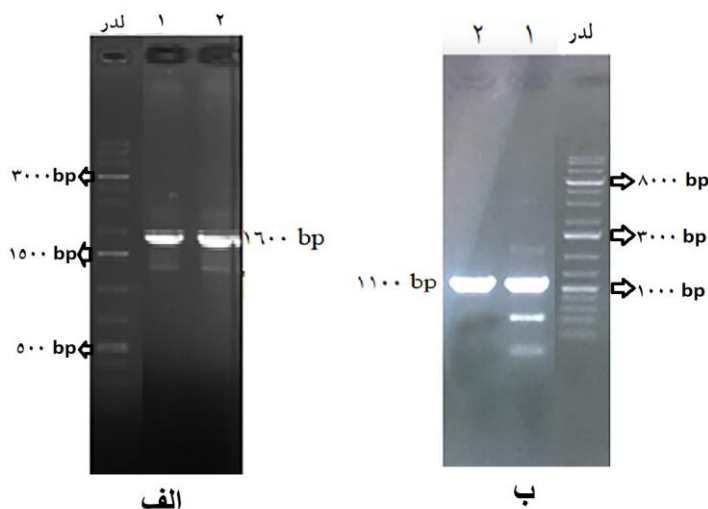
Nt sequence

```
5'/atgaaatctttcgcggtatgtgtagtcgcagcgttgatgctggcgggcggaatctgatgccgcctgtcgtctggcctgctgggagacgttcaagcaggattata
tgagcgaaagtggcgcgctcattgatccagtgacgcgcgcaaatcaccacctccgaaggcgaagctatggactgttcttgcctggcagcaaacgatcgca
agacgttcgatctgctgctgacatggacgcgcgataaccttgccgagggggttagcccaacatctcccgctgggtatggggaagacgacaacacct
ggcggttatcgaccctaactccgcgtccgatccgatatctggattgctgctgctggaagccggcgctgtggaaaaatcccattacacgcgcacgg
gtaagcgctgttgacgcgcattgccagtgaggagtggtgaagggtgccgggctgggttctatgctgctgccgggtaagtcgggtttgccgaagagagtgtctg
gcgcttcaacccagctacgtccgcgcagcttgcgagctattcaccgtttcggcgcaccgtggacaacgctccgtgaaccaacctgctgctgctggag
accgcgcgaagaggtttcccgaaactgggtgaaataaccgaaaaaggcggtggcagtggaagcaggatacgaccctgatcggcagttacgatgcgattcgc
gtctatctgtgggtaggatgatgaacgataacgatccgaaaaagccggctactggcgcttcaagcccatggcgaccaccacaatcaacaaggcttaccgc
cggaaaaagtgagcgtacgcaccgggaacgtaccggagatgggcccgtaggggtttctgctccctgcttccattttacaagaacgggacgcgcagggcgtgc
aacgccagcgtgtcgccgatggtttccgataacaatgcttattacagctacgttctgacctcttggacaagggtgggatcagcatcgttttcaccgcgcga
ggtgaattactaccgattggggccaggaatgcgcacgttcacactaa 3'
```

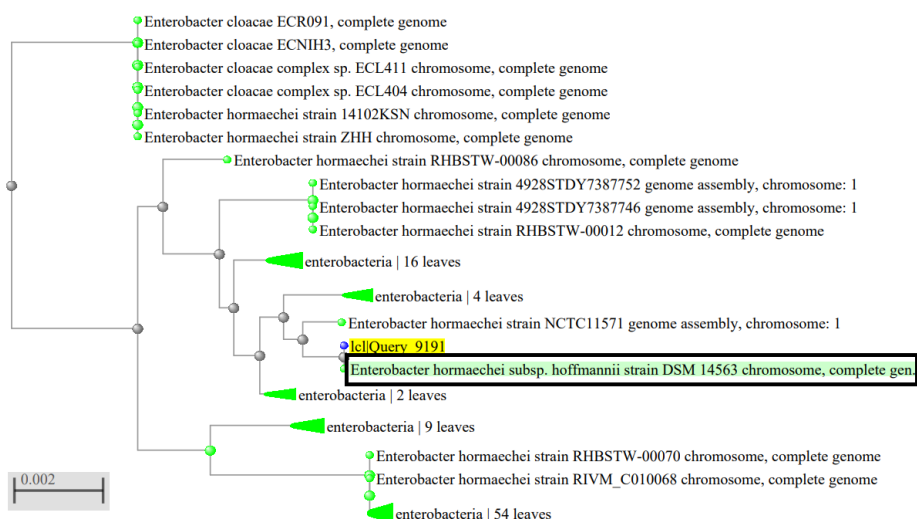
aa Sequence

```
MKIFRGCVVAAALMLAAANLHAACRWPWETFKQDYMSESGRVIDPSDARKITTSEGSYGLFFALAA
NDRKTFDLLLLTWTRDNLAEGDLAQHLPWLWGKKDDNTWAVIDPNSASDADIWIAWSLLEAGRLWK
NPDYTRTGKALLTRIASEEVVKVPGLGSM LLPGKVGFAEESVWRFNP SYLPPQLASYFTRFGAPWTTLR
ETNLRLLLETPKGFSPNWVKYQKKGWQLKQDTTLIGSYDAIRVYLWVGMMNDNDPQKARLLARF
```

KPMATTTIKQGLPPEKVDVATGKRTGDGPVGFSA SLLPFLQERDAQAVQRQRVADRFPDNNAYYSYVL
TLFGQGWDQHRFRFTAQGELLPDWGQECARSH-



شکل ۲ (الف) محصول حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA با آغازگرهای عمومی در چاهک ۱ و ۲ ژل قرار گرفت و باندی به اندازه ۱۶۰۰ bp در ستون‌های این دو چاهک قابل مشاهده است و ستون لدر برای تشخیص اندازه باند محصول PCR در عکس مشخص است (به علت تراکم بالای باندهای لدر، باندهایی که دارای غلظت بالا هستند در ستون لدر مشخص شدند). (ب) در ستون مربوط به چاهک ۱ باند ژن آنزیم اندوگلوکاناز حاصل از PCR با آغازگرهای دژنره می‌باشد که محصول دارای چند باند است و باند با اندازه ۱۱۰۰ جفت باز (اندازه ژن اندوگلوکاناز سویه‌ی مورد مطالعه) با استفاده از ستون لدر مشخص شد، سپس استخراج و خالص‌سازی باند با استفاده از کیت انجام شد که در نهایت نمونه خالص شده در ستون مربوط به چاهک ۲ مشخص است.



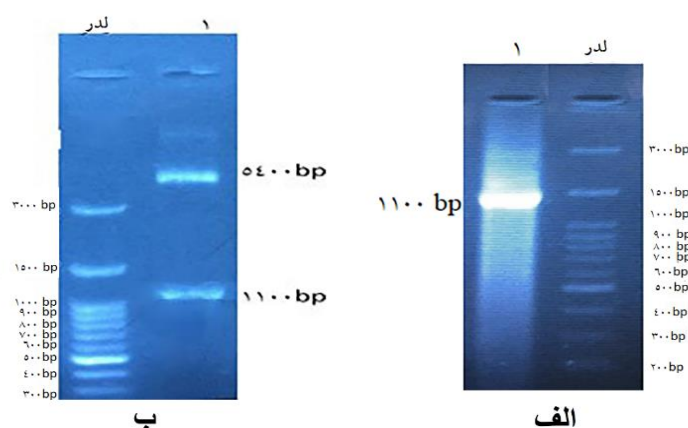
شکل ۳ سویه‌ها و جنس‌های نزدیک به باکتری مورد مطالعه که توسط NCBI معرفی شدند در این تصویر به صورت یک درخت نمایش داده شده که توالی مورد مطالعه با عنوان Query_9191 مشخص شده و نزدیکترین سویه به باکتری مورد مطالعه در داخل کادر قرار گرفته و با هایلایت شده مشخص است. در این تصویر هر چقدر از شاخه سویه مورد مطالعه به سمت گره‌ها و شاخه‌های دیگر می‌رویم درصد تشابه

کاهش می‌یابد، همچنین هر چقدر فاصله بین شاخه‌ی سویه مورد مطالعه با دیگر شاخه‌ها کمتر باشد تشابه بیشتر است. (هر مثلث در تصویر خود شامل لیستی از چندین سویه انتروباکترها می‌باشد).

در نهایت پس از انجام آزمایشات متوالی و توالی‌یابی ژن آنزیم اندوگلوکاناز، توالی نوکلئوتیدی ژن آنزیم اندوگلوکاناز باکتری مورد مطالعه در NCBI ثبت شد و با شماره دسترسی MN562264 قابل مشاهده می‌باشد. برای بررسی صحت و تایید عمل کلون‌سازی در هر مرحله آزمایشاتی انجام شده است که هر کدام به ترتیب بیان‌کننده صحت انجام مراحل کلون‌سازی می‌باشند. توالی نوکلئوتیدی^۱ و توالی آمینواسیدی^۲ ژن آنزیم اندوگلوکاناز مورد مطالعه در این پژوهش به ترتیب زیر می‌باشد.

در آزمایش تایید کلون سازی، پلاسمید نوترکیب ناقل ژن اندوگلوکاناز به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد و محصولی به طول ۱۱۰۰ bp تولید کرد که نشان دهنده صحت کلون‌سازی است (شکل ۴ - الف). برای تایید نهایی عمل کلون‌سازی، پلاسمید نوترکیب استخراج شده با دو آنزیم برش دهنده مورد مطالعه در این پژوهش Xho1 و Nde1 در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت تیمار شد. براساس نتایج حاصل از جداسازی با الکتروفورز بر روی ژل ۱٪ آگارز پس از تیمار با آنزیم‌های

پس از تایید و اطمینان از صحت کلون‌سازی، حضور ژن در پلاسمید نوترکیب بررسی شد و باند موجود در ستون چاهک ۱ شکل ۴-الف نشان دهنده حضور ژن آنزیم اندوگلوکاناز با وزن مولکولی حدود ۱۱۰۰ bp در پلاسمید نوترکیب است. همچنین ویژگی‌های کینتیکی آنزیم نوترکیب تولید شده در این پژوهش بررسی و اندازه‌گیری شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از نمودار استاندارد گلوکز استفاده شد که شیب این نمودار (ضریب جذب مولی) برابر ۰/۰۷ با واحد ۱ بر میکرومولار سانتی متر بود.



شکل ۴ نتایج حاصل از بررسی‌های لازم برای تایید صحت کلون‌سازی (الف) در این تصویر نتیجه PCR از پلاسمید نوترکیب (الگو در PCR) با آغازگرهای ژن اندوگلوکاناز است که باندی با اندازه ۱۱۰۰ bp بر روی ژل آگارز مشاهده شد، که تاییدی بر حضور ژن آنزیم

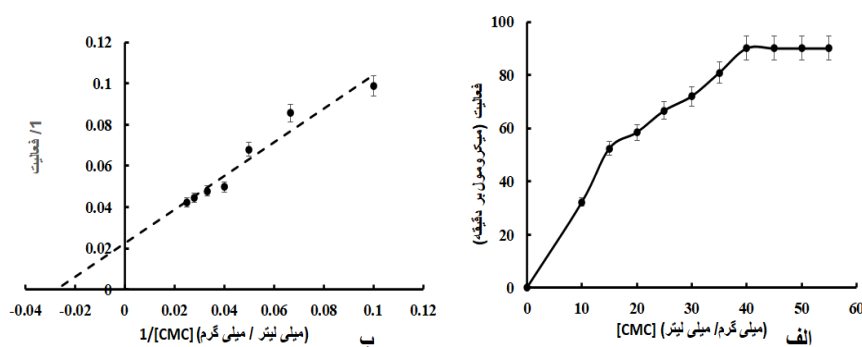
² aa Sequence

¹ Nt sequence

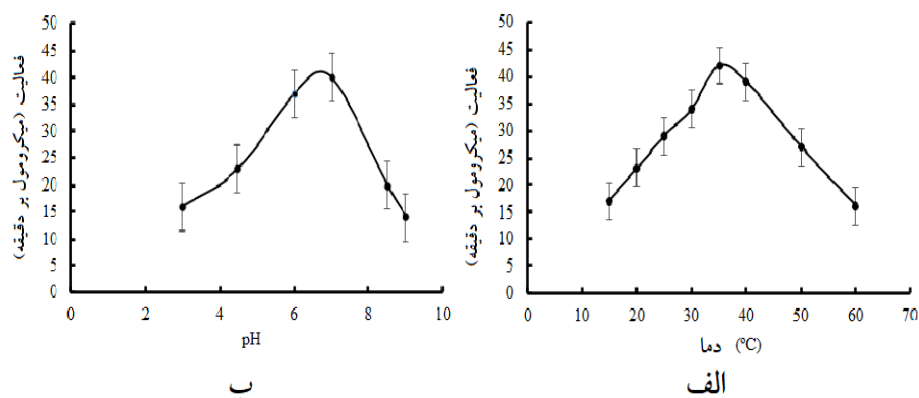
اندوگلوکاناز در توالی پلاسמיד نو ترکیب است. ب) پلاسמיד نو ترکیب استخراج شده با آنزیم های برشی مورد استفاده در این مطالعه تیمار شد و در نتیجه ی آن دو باند پلاسמיד خالی و ژن آنزیم اندوگلوکاناز بر روی ژل آگارز مشاهده شد.

طبق روش ذکر شده انجام شد. میزان فعالیت آنزیم در بازه ی دمایی (۱۵-۶۰ درجه سانتی گراد) اندازه گیری شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بالاترین میزان فعالیت برای آنزیم ثبت شد (شکل ۶). همچنین، بررسی تاثیر فاکتور pH بر فعالیت آنزیم در بازه ی (۳-۹) انجام شد و نتایج نشان داد آنزیم در pH برابر با ۷ بالاترین میزان فعالیت خود را دارد. با توجه به نتایج حاصل آنزیم در شرایط متعادل دارای بالاترین فعالیت است و نیازی به ایجاد شرایط خاصی از نظر دما و pH نیست.

در نهایت با استفاده از نمودارهای میکائلیس-متن و لاینیر برک V_{max} برابر با ۴۵ میکرومول در دقیقه و K_m برابر با ۱/۴ میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شد (شکل ۵). فاکتورهای دما و pH بر روی فعالیت همه ی آنزیم ها تاثیر مستقیم دارد. بهینه سازی این دو فاکتور موثر بر فعالیت آنزیم می تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم و در نتیجه افزایش هیدرولیز سلولز شود. بنابراین، در این مطالعه برای بررسی تاثیر جداگانه دو فاکتور دما و pH بر روی میزان فعالیت آنزیم، سنجش فعالیت در دماها و pH های مختلف



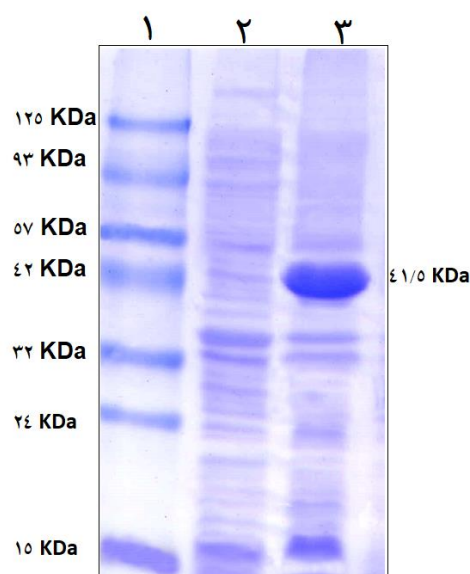
شکل ۵ (الف): نمودار مربوط به منحنی میکائلیس-متن و (ب) نمودار لاینیر برک برای محاسبه و بررسی ویژگی های کینتیکی آنزیم.



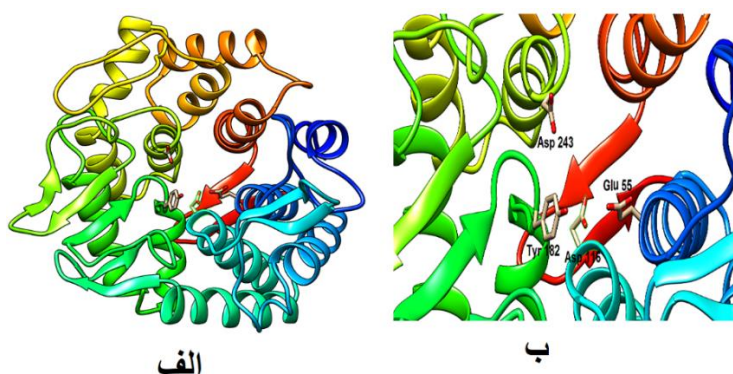
شکل ۶ نتایج حاصل از فعالیت آنزیم در شرایط دمایی و pH های متفاوت برای شناسایی شرایط بهینه فعالیت آنزیم مورد مطالعه (الف) شرایط بهینه ی دمایی برای فعالیت آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت که بیشترین فعالیت آنزیم در دما ۳۷ درجه سانتی گراد مشاهده شد. (ب) فعالیت آنزیم در pH های متفاوت سنجش شد و در محدوده ۶ تا ۷ بیشترین فعالیت مشاهده شد.

۱ استفاده شد، که حضور باند پروتئینی نوترکیب در نمونه پس از القاء با اندازه ۴۱/۵ KDa مشاهده شد، در حالی که این باند در نمونه‌های قبل القاء بیان دیده نمی شود (شکل ۷).

همچنین، با استفاده از روش برادرفورد مقدار پروتئین کل در هر واکنش آنزیمی ۶/۹ میلی گرم محاسبه شد و فعالیت ویژه‌ی آنزیم نوترکیب در شرایط بهینه برابر با ۶/۵ میکرومول در دقیقه در هر میلی گرم پروتئین به دست آمد. برای بررسی میزان بیان و حضور پروتئین نوترکیب در نمونه‌های قبل و پس از القاء بیان، از روش SDS-PAGE



شکل ۷ بررسی میزان بیان و حضور آنزیم نوترکیب به روش SDS-PAGE: ستون ۱ مربوط به لدر به عنوان استاندارد وزن مولکولی است و ستون ۲ مربوط به پروتئین‌های باکتری قبل از القاء بیان آنزیم مورد مطالعه توسط IPTG است. ستون ۳ نشان دهنده القاء بیان آنزیم پس از تلقیح IPTG در محیط کشت باکتری نوترکیب است که باند پر رنگ در ستون ۳ با اندازه‌ی ۴۱/۵ KDa مربوط به آنزیم مورد مطالعه است (که این باند در نمونه قبل از القاء بیان در ستون ۲ وجود ندارد).



شکل ۸ الف) مدل‌سازی آنزیم اندوگلکاناز مورد مطالعه توسط Swiss model و تصویر برداری با chimera ب) تصویر نزدیک از جایگاه فعال آنزیم که آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال آنزیم، محل اتصال سوبسترا را نشان می‌دهد.

همچنین، با توجه به مطالعات بیوانفورماتیک انجام شده مشخص شد، که اندازه‌ی پروتئین نوترکیب حدوداً ۸۱/۵ KDa (که منطبق با اندازه باند بر روی ژل SDS-PAGE است) و pI مربوط به این توالی پروتئینی ۸/۹۶ محاسبه شد. همچنین، برای بررسی دقیق‌تر مباحث مربوط به مکانیسم عمل آنزیم برای پژوهش‌های بعدی مدل‌سازی آنزیم مورد مطالعه نیز انجام شد (شکل ۸).

۴- بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه شناسایی گونه‌های باکتریایی تولید کننده آنزیم اندوگلوکاناز دارای عملکرد بالا از خاک اطراف ریشه درخت افرا در منطقه شمال کشور (چالوس) است. چرا که این آنزیم قادر است سلولز را که یک منبع تجدید پذیر طبیعی است به کربوهیدرات‌های ساده‌تر تبدیل کند تا در تولید سوخت زیستی، اتانول و گلوکز به عنوان یک ماده با ارزش استفاده شود [۲۳]. پس از غربالگری و شناسایی سویه برتر، توالی ژن اندوگلوکاناز از باکتری *Enterobacter hormaechei subsp. Hoffmannii* تکثیر شد و ژن آنزیم اندوگلوکاناز در یک میزبان با یک اوپراتور قابل کنترل و قابل دستورزی کلون شد و بیان انبوه این آنزیم توسط سیستم باکتریایی انجام شد. با اعمال تغییراتی در توالی ژن آنزیم و حذف سیگنال پپتید (۲۴) نوکلئوتید در ابتدای توالی نوکلئوتیدی آنزیم یا همان ۸ آمینو اسید ابتدای توالی پروتئینی آنزیم) از ترشح آنزیم به محیط اطراف و رقیق شدن آن در محیط کشت میزبان ثانویه جلوگیری شد. با توجه به این که توالی ژن آنزیم اندوگلوکاناز باکتری *Enterobacter hormaechei subsp. Hoffmannii* از قبل در NCBI ثبت نشده بود، بنابراین، طراحی آغازگرهای دژنره برای تکثیر ژن اندوگلوکاناز گونه‌های نزدیک به باکتری مورد مطالعه انجام شد (آغازگرهای دژنره طراحی شده توانایی تکثیر ژن اندوگلوکاناز در گونه‌های نزدیک بهم را دارند). محصول PCR، تکثیر ژن اندوگلوکاناز به طول ۱۱۰۰ bp بود. در

نهایت برای الحاق ژن در پلاسمید، توالی برشی به دو انتهای ژن توسط آغازگرهای دارای توالی آنزیم‌های برشی افزوده شد. با انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان ثانویه تکثیر و بیان ژن آنزیم اندوگلوکاناز انجام شد. در نتیجه با استخراج آنزیم از میزبان ثانویه، غلظت بالایی از آنزیم برای بررسی شرایط بهینه فعالیت آنزیم در دسترس است. در این مطالعه پلاسمید pET 21a به عنوان یک ناقل مناسب برای تولید انبوه، تکثیر و بیان بالای این ژن استفاده شد. این ناقل پلاسمیدی که جز ناقل‌های بیانی می‌باشد و پروموتور آن T7 است که یکی از کارآمدترین پروموتورهای کلون سازی می‌باشد و بیان نسبتاً بالایی را در پی دارد. در مرحله‌ی استخراج آنزیم روش یخ‌زدگی و یخ‌زدایی پی‌درپی به جز روش سونیکیتور یا لیز کردن با امواج صوتی امتحان شد، ولی کارآرایی روش سونیکیتور بالاتر بود. در روش یخ‌زدگی بیشتر آنزیم به صورت رسوب از دسترس خارج می‌شد و غلظت آنزیم در محلول استخراج شده بسیار پایین بود. همچنین سنجش میزان فعالیت آنزیم نوترکیب بر روی خمیر کاغذ (سوبسترا مناسب برای استفاده در صنعت) توسط تست DNS انجام شد. خمیر کاغذ از کاغذهای باطله در آزمایشگاه تهیه شد و پس از هیدرولیز آنزیمی میزان Vmax و فعالیت ویژه آنزیم به ترتیب ۳۲ میکرومول در دقیقه و ۲/۳ میکرومول در دقیقه در هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. بنابراین، براساس موارد مصرف و اهمیتی که برای آنزیم اندوگلوکاناز بیان شد، توانایی آنزیم نوترکیب تولید شده در هیدرولیز سوبسترای همچون خمیر کاغذ بسیار حائز اهمیت است، زیرا ضایعاتی مانند کاغذ باطله را به مونوساکاریدها و دی‌ساکاریدهایی که کاربردهای متنوعی دارد هیدرولیز می‌کند. با توجه به اهمیت آنزیم سلولاز در صنعت مطالعات زیادی در برای جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم‌های مولد سلولاز انجام شده است که منشا میکروارگانیسم‌های جداسازی شده با یکدیگر متفاوت

است. سیلوانیا و همکاران (۲۰۱۵) موفق به تولید سلولاز بوسیله باکتری ترموفیل باسیلوس SMIA2 شدند و این باکتری را از نمونه های خاک در برزیل جداسازی کردند. این سویه قادر به استفاده از نیشکر و ذرت خیس شده به عنوان سوبسترا بودند و فعالیت ویژه آنزیم ۰/۸۳ میکرومول در دقیقه در هر میلی گرم پروتئین گزارش شده است. در این مطالعه از سوبسترای متفاوتی مثل ضایعات کاغذ استفاده و فعالیت ویژه مورد سنجش قرار گرفت چرا که ضایعات کاغذ از نظر صنعتی سوبسترای مناسبتری می باشد چون نیاز به تیمار فیزیکی و شیمیایی قبلی ندارد و فعالیت ویژه آنزیم نوترکیب در این شرایط بالاتر از فعالیت ویژه آنزیم طبیعی است [۲۴]. مزیت آنزیم نوترکیب تولیدی در این پژوهش نسبت به مطالعات قبل فعالیت ویژه بالاتر آنزیم در شرایط بهینه (۶/۵ میکرومول در دقیقه در هر میلی گرم پروتئین) است، علت بالا بودن فعالیت آنزیم در این مطالعه نسبت به مطالعات دیگر حذف سیگنال پپتید و جلوگیری از ترشح آنزیم به محیط بیرون و از دسترس خارج شدن آنزیم است و با ایجاد شرایط بهینه، فعالیت آنزیم افزایش می یابد. همچنین میزان آنزیم نوترکیب حاصل از این پژوهش ۸ ساعت پس از تحریک بیان با IPTG به حداکثر مقدار خود می رسد، که نسبت به سویه های طبیعی این زمان بسیار کوتاه است. چون *E.coli* BL21 توانایی تکثیر بسیار بالا در مدت زمان کم را دارد. در مطالعه ای که توسط پاست و همکاران (۱۳۹۱) انجام شد سویه های مختلفی از جنس باسیلوس که تولید کننده سلولاز بودند از خاک جنگل جداسازی و شناسایی شدند. باکتری *Bacillus Subtilis* که با روش Gram's iodine و DNS شناسایی شد دارای بیشترین فعالیت ویژه (۳/۸ میکرومول در دقیقه در هر میلی گرم پروتئین) پس از ۹۶ ساعت انکوبه در بین سویه های دیگر این جنس است. [۲۵] رجب خانی و همکاران (۱۳۸۸) در طی یک پژوهش موفق به کلون سازی ژن سلولاز از قارچ *A.niger* در ناقل

pUC19 شدند، که فعالیت آنزیم نوترکیب ۴۸ ساعت پس از اعمال تحریک لاکتوزی به حد قابل سنجش می رسد، سپس در طی یک روند نزولی کاهش حضور آنزیم مشاهده می شد [۹]. آنزیم تولید شده در این مطالعه از این مزیت برخوردار است که در بازه زمان کوتاه (۸ ساعت) پس از القاء بیان با IPTG یا لاکتوز حداکثر فعالیت را نشان می دهد. فاکتورهای دما و pH بر روی فعالیت همه آنزیم ها از جمله آنزیم مطالعه شده در این پژوهش تاثیر دارند. با توجه به مطالعه ای که توسط Singh و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد، بهینه ترین شرایط فعالیت آنزیم سلولاز جدا شده از *Aspergillus heteromorphus* در شرایط دمایی ۶۰ و pH برابر با ۴/۸۵ گزارش شد [۲۶]. در طی مطالعاتی که توسط اکبریان و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز از باکتری *آلیسیکلو باسیلوس / اسیدوکلاداریوس* با روش Response Surface (RSM) Methodology بهینه سازی شد و بالاترین فعالیت آنزیم در شرایط دمایی ۶۴/۵ و pH برابر با ۶/۳۵ گزارش شد [۲۷]. شکل ۶-الف فعالیت آنزیم در دماهای مختلف را نشان می دهد و نتایج نشان می دهد بهینه فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد است. فعالیت هیدرولازی آنزیم در pH های مختلف نیز اندازه گیری شد و نتایج نشان می دهد بهترین pH برای فعالیت آنزیم ۱۷ است (شکل ۶-ب). که این شرایط نسبت به شرایط آنزیم های مطالعه شده قبلی متعادل تر است و نیازی به افزایش دما یا ایجاد شرایط pH ای خاص ندارد بنابراین، استفاده از آن در صنعت ساده تر است.

برای انجام بررسی های بیشتر در آینده پیشنهاد می شود میزان بیان آنزیم نوترکیب و فعالیت آن در میزبان های بیانی مختلف بررسی شود چرا که ممکن است تغییر میزبان با کاهش میزان آنزیم در رسوب، مقدار آن در محلول را

[۸] عصاره، ر. شهبانی ظهیری، ح. عشقی، س. (۲۰۱۴) جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه کننده سلولز از خاک. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۷(۱)، ۹۹-۱۱۰.

[۹] رجب خانی، ز. زمانی، م. مطلبی، م. و عنصری، د. (۱۳۸۸) بهینه‌سازی تولید آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز (سلولاز) قارچ *Aspergillus niger* (R4) و همسانه‌سازی ژن eglB. زیست شناسی ایران. ۲۲(۴).

[10] Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., and Gulati, A. (2008) A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*. 57(5), 503-507.

[11] Green, M.R. and Sambrook, J. (2021) Cloning and transformation with plasmid vectors. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2021(11), pdb.top101170.

[12] Thomas, L., Ram, H. and Singh, V.P. (2018) Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus* sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus*. *Brazilian journal of microbiology*. 49, 429-442.

[13] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

[14] Yakhchali, B. (2020) Isolation, molecular identification and optimization of amylase production of marine actinomycete (Acx1) from Shadegan estuary. *Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology)*. 32(4), 591-605.

[15] Amin, Y.K. (2021) Single-nucleotide polymorphisms in MTHFR gene related to recurrent abortion. *Applied Nanoscience*. 1-7.

[16] Langeveld, S. A., Dore, J. M., Memelink, J., Derks, A. F., van der Vlugt, C. I., Asjes, C. J., and Bol, J. F. (1991) Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of General Virology*. 72(7), 1531-1541.

[17] Aslanidis, C., and De Jong, P. J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic acids research*. 18(20), 6069-6074.

[18] Eskandari, V. (2020) An improved method for induction of competency in *Escherichia coli* DH5α. *Archives of Pharmacy Practice*. 1, 23.

افزایش دهد. پیشنهاد می‌شود شرایط بازتازوردگی^۱ برای بازیافت پروتئین غیرفعال موجود در رسوب بررسی شود چرا که با انجام موفق این کار مقدار آنزیم تولید شده در هر بیان چندین برابر می‌شود. در نهایت پیشنهاد می‌شود پس از تولید آنزیم، آزمایشاتی در برای تعیین فاکتورهای موثر بر فعالیت آنزیم با استفاده از روش‌های آماری مثل روش تاگوچی یا Response Surface (RSM) Methodology انجام شود.

تقدیر و تشکر

این پژوهش بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه تبریز بوده است که انجام آن با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز انجام شد.

۵- منابع

[1] Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Christopher, L. P., and Sani, R. K. (2010) Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource technology*. 101(22), 8798-8806.

[2] Guder, D. G., and Krishna, M. S. R. (2019) Isolation and characterization of potential cellulose degrading bacteria from sheep rumen. *J Pure Appl Microbiol*. 13(3), 1831-1839.

[3] Nevell, T. P., and Zeronian, S. H. (1985) Cellulose chemistry and its applications.

[4] Helal, G. A., Khalil, R. R., Galal, Y. G., Soliman, S. M., and Abd Elkader, R. S. (2022) Studies on cellulases of some cellulose-degrading soil fungi. *Archives of Microbiology*. 204(1), 1-16.

[۵] آراسته، ا. سریری، ر. نجفی یاسوری، ف. صالحزاده،

ع. و نجفیان، م. (۱۳۹۰) بررسی اثر سلولاز جداسازی شده

از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* بر کیفیت چای شمال ایران.

زیست فناوری میکروبی. ۳(۱۰).

[6] Guo, J. , Starr, D. and Guo, H. (2020) Classification and review of free PCR primer design software. *Bioinformatics*. 36(22-23), 5263-5268.

[7] Marbach, A., and Bettenbrock, K. (2012) lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of biotechnology*. 157(1), 82-88.

¹ Refolding

Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp: SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic journal of biotechnology*. 18(2), 110-115.

[۲۵] پاست، س. ناظمی، ع. خاتمی‌نژاد، م. میری نرگسی، م. موسوی، س. صالحی، آ. (۱۳۹۱) جداسازی و شناسایی ملکولی سویه‌های با سیلوس تولید کننده سلولاز از خاک جنگل. مجله علمی-پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی. ۴(۱۲)، ۶-۱.

[26] Singh, R., Kumar, R., Bishnoi, K., & Bishnoi, N. R. (2009) Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 48(1), 28-35.

[۲۷]. اکبریان، م. پاژنگ، م. امانی قدیم، ع. یونسی، ف. (۲۰۱۶). بهینه‌سازی فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز Cel9A از باکتری *آلیسیکلوپا سیلوس / سیدوکالداریوس* با روش رویه پاسخ (RSM). زیست‌فناوری، ۷(۱)، ۷۰-۸۰.

[19] Manns, J.M. (2011) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Current protocols in microbiology*. 22(1), A. 3M. 1-A. 3M. 13.

[20] Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., and Sastri, C. V. (2020) Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International journal of biological macromolecules*. 156, 180-185.

[21] Reddy, A. R., Venkateswarulu, T. C., Babu, D. J., and Indira, M. (2015) Homology Modeling Studies of Human Genome Receptor Using Modeller, Swiss-Model Server and Esypred-3D Tools. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. (1), 1-6.

[22] Lin, L., Kan, X., Yan, H., and Wang, D. (2012) Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*. 15(3), 2-2.

[23] Park, J. W., Park, K., Song, H., and Shin, H. (2002) Saccharification and adsorption characteristics of modified cellulases with hydrophilic/hydrophobic copolymers. *Journal of biotechnology*. 93(3), 203-208.

[24] Ladeira, S. A., Cruz, E., Delatorre, A. B., Barbosa, J. B., and Leal Martins, M. L. (2015)

Screening and identification of native cellulose-degrading bacteria from soil and cloning of endoglucanase enzyme gene

Arezu Marefat¹, Leila Sadeghi^{2*}, Gholamreza Dehghan³

1.MSC, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2.Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3.Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

l.sadeghi@tabrizu.ac.ir

Receipt: 2022/02/21

Accepted: 2023/03/12

Abstract

In recent years, biocatalysts have widespread application in industry because they can do chemical reactions with the lowest energy and highest efficiency. Bacterial enzymes are more useful in this field due to simple cloning and expression process in the manipulated host. By considering specific role of endoglucanase enzymes in cellulose hydrolyzing reactions, these types of enzymes are more applicable in related industries. The produced glucose through enzymatic hydrolysis could be used in different industries such as biofuel and ethanol production and in the food industry as sweetener. Therefore, cloning and production of Endoglucanase in manipulated hosts has been developed in recent years. This study was performed to isolate, screen and identify native endoglucanase -producing strains from soil around the roots of the maple tree. Isolated strains were identified using 16S rRNA gene sequencing. After identifying of the bacteria (*Enterobacter hormaechei*), Endoglucanase enzyme gene was amplified using degenerate primers at first and then by specific primers with restriction enzymes sequences. DNA fragment and plasmid vector were treated by specific restriction enzymes and then ligated to each other. Then recombinant plasmid transferred to the *E. coli* BL-21 as expression host and kinetic properties of recombinant enzyme were evaluated. Expression of the target protein was done by stimulating the Lac operon by using 1 mM of IPTG and the kinetic features of the recombinant enzyme such as Vmax and Km evaluated as 45 $\mu\text{mol/min}$ and 1.4 mg/ml respectively. The optimum conditions for enzyme activity tend to be 37°C at a pH of 7.

Keywords: Endoglucanase enzyme; Cellulose; Carboxy methyl cellulose; Screening; Degenerated primers; *Enterobacter hormaechei*