مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ٦، شماره ٢، پاییز و زمستان ٩٦
صفحه ٢٢١-٢١٣

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

بیان ژن بتا (۳–۱)(۴–۱)گلوکاناز درباکتری *Lactococcus lactis* با هدف تولید غذای پروبیوتیک دام

Expression of *β (1-3)(1-4) glucanase* gene in *Lactococcus lactis* to produce an animal probiotic feed

مرضیه محمدخانی [۱]، ندا میرآخورلی [۲] *، رحمان امامزاده [۳]، فریبرز خواجعلی [٤]

Marzieh Mohammadkhani[1], Neda Mirakhorli[2] *, Rahman Emamzade[3], Fariborz KhajAli[4]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی ۲- استادیار دانشگاه شهرکرد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد ۳- استادیار دانشگاه اصفهان گروه زیست شناسی، بیوشیمی ٤- استاد دانشگاه شهرکرد گروه علوم دام، تغذیه طیور

1. MSc of Agriculthural Biotechnology, 2. Department of Plant Breeding & biotechnology, Shahrekord University. 3- Department of Biology, Faculty of Science, Isfahan University. 4- Department of Poultry Nutrition of Shahrekord University. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nedamirakhorli@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ٩٤/١١/٢٦ – تاریخ پذیرش: ٩٥/١٠/٥)

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های غیربیماریزا و بی‌ضرری هستند که در روده انسان و حیوانات وجود دارند. این میکروارگانیسم‌ها نه‌تنها ایجاد بیماری نمی‌کنند، بلکه اثرات بسیار مطلوبی بر عملکرد و سلامت دام و طیور دارند. *Lactococcus lactis* گونه‌ای از این باکتری‌ها است که به عنوان کاندیدی برای تولید پروتئین‌های مفید بیولوژیکی انتخاب شده است. آنزیم لیکیناز، نوعی بتاگلوکاناز است که بتا (۱-۳) (۱-٤)گلوکان‌ها (لیکینان‌ها) را هیدرولیز می‌کند. لیکینان‌ها ترکیبات پلی‌ساکاریدی در دیواره سلول‌های گیاهان عالی خانواده پواسه هستند که ظاهرا منحصر به دیواره سلولی اندوسپرم گرامینه‌ها همچون جو، چاودار، سورگوم، برنج و گندم می‌باشند. هدف از این مطالعه بیان ژن لیکیناز در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس و تولید ترشحی این آنزیم به منظور دستیابی به مکمل غذایی برای طیور است که توانایی تجزیه بتاگلوکان جو را برای دستگاه گوارش طیور ایجاد کند. این امر امکان جایگزینی جو بجای ذرت در جیره غذایی طیور را فراهم می‌سازد. برای دستیابی به این منظور ژن *licBM2* کد کننده‌ی آنزیم بتا (۱-۳) (۱-٤) گلوکاناز به همراه سیگنال پپتید ترشحی و سایت های برشی در پلاسمید pNZ8149 کلون گردید. انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس با روش الکتروپوریشن صورت گرفته و غربالگری کلنی‌های ترانسفرم شده توسط توانایی رشد باکتری بر محیط انتخابی لاکتوز انجام شد. القای بیان ژن بوسیله‌ی القاگر نیسین صورت گرفت و بررسی میزان بیان ژن با اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی پروتئین نوترکیب مطالعه شد. با افزایش زمان القاء بیان ژن و میزان آنزیم تولید شده و فعالیت حاصل از آن افزایش می‌یابد. دستاورد این مطالعه کلون سازی و بیان موفق ژن *licBM2* در باکتری گرم مثبت لاکتوکوکوس لاکتیس و تولید پروبیوتیک با پروتئین نوترکیب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

بتاگلوکاناز،
پروبیوتیک،
تغذیه طیور،
لاکتوکوکوس لاکتیس

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]

مقدمه

ژن *licBM2* که یک ژن دستکاری شده است بر اساس آنزیم متحمل به حرارت لیکیناز (β(1-3) (1-4 glucunase) از باکتری *Clostridium thermocellum* بدست آمده است(Sotchenkove *et al*., 2005).

بتا (۳–۱) (٤–۱)گلوکان‌ها (لیکینان‌ها) ترکیبات پلی‌ساکاریدی دیواره‌ی سلول‌های گیاهان عالی خانواده پواسه و خصوصا دیواره سلولی اندوسپرم غلات همچون جو، چاودار، سورگوم، برنج و گندم می‌باشند. آنزیم‌های بتاگلوکاناز، هیدرولیز بتاگلوکان‌ها را انجام می‌دهند (Noman and Meltem, 2007).

استفاده ازدانه‌هایی مانند جو در جیره غذایی طیور معمولا ازلحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است و اغلب توجه مرغداران را جلب می‌نماید. اما وجود مقادیر قابل توجهی از بتاگلوکان‌ها درجو به کارگیری این دانه را با مشکل مواجه ساخته است. اطلاعات تجربی مربوط به دهه‌های اخیر نشان می‌دهد که افزودن آنزیم‌های بتاگلوکاناز میکروبی به جو درجیره غذایی می‌تواند برخی اثرات نامطلوب این دانه را کاهش دهد (Lamp *et al*., 2015).

بررسی تاثیر آنزیم‌های بتاگلوکاناز و زایلاناز بر عمکرد رشد و برخی از خصوصیات دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با گندم و جو نشان داد ترکیب گندم و جو به همراه آنزیم یک جایگزین مناسب برای ذرت در جیره جوجه‌های گوشتی می‌باشد. همچنین ثابت شده است که افزودن آنزیم‌های بتاگلوکاناز و پنتوناز به جیره غذایی بر پایه جو باعث بهبود افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی نسبت به جیره های بدون آنزیم می‌شود (Jacob and Pescatore, 2014).

امروزه با افزایش اهمیت سلامت غذایی انسان و دام، استفاده از غذاهای طبیعی مورد توجه ویژه قرار گرفته است. که از مهمترین آنها می‌توان به پروبیوتیک‌ها اشاره کرد (Park *et al*., 2016). یکی از راه‌های اضافه کردن آنزیم بتاگلوکاناز به غذای دام تولید این آنزیم در باکتری‌های پروبیوتیک و سپس افزودن این باکتری به غذای دام است. باکتری‌های اسیدلاکتیک (Lactic acid bacteria, LAB) در دستگاه گوارش بسیاری از حیوانات و انسان حضور دارند و پتانسیل استفاده از این باکتری‌ها در حال گسترش است به صورت وسیع در صنایع غذایی استفاده می‌شوند. *لاکتوکوکوس لاکتیس* گونه‌ای از باکتری‌های LAB است که به عنوان کاندیدی برای تولید پروتئین‌های مفید بیولوژیکی و تحویل DNA پلاسمیدی به سلولهای یوکاریوتی انتخاب شده است (Santos Pontes *et al*., 2011). *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان مدلی از باکتری‌های پروبیوتیک که ژنوم آن توالی‌یابی شده است برای دستکاری ژنتیکی و تولید و انتقال پروتئین‌های متعدد مانند واکسن و دارو به طور گسترده استفاده می‌شود. *لاکتوکوکوس لاکتیس* دستکاری شده پس از ورود به دستگاه گوارش و لانه گزینی در آن، طی ٤ تا ٤٨ ساعت پروتئین با فعالیت زیستی مورد نظر را آزاد می‌کند (Takiishi *et al*., 2012).

ویژگی بارز استفاده از سیستم بیانی پروبیوتیک، تولید آنزیم‌ها و پروتئین‌های نوترکیب بدون نیاز به خالص سازی این مواد از میزبان پروبیوتیک است، این امر سبب صرفه‌جویی در هزینه‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌شود که یک امتیاز ویژه برای تولید تجاری پروتئین نوترکیب محسوب می‌شود.

در این تحقیق با استفاده از سیگنال پپتید *USP45* که پروتئین مورد نظر را وارد مسیر ترشحی می‌کند آنزیم نوترکیب بتا (۱–۳)(۱–٤) گلوکاناز در باکتری پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید گردید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]

مواد و روش‌ها

باکتری، پلاسمیدها و ژن‌ها: باکتری *Lactococcus lactis* NZ3900– *lacF* و پلاسمید pNZ8149 از شرکت MoBiTec GmbH, Germany (Cat≠ VS-ELS03900-01)تهیه گردید که نقشه ژنتیکی آن در شکل ۱آمده است. پلاسمید pNZ8149 دارای ژن *lacF* است که به عنوان ژن انتخابگر عمل می‌کند. و باکتری حاوی این پلاسمید توانایی تجزیه لاکتوز را دارد و در محیط الیکر کلنی زرد رنگ تولید می‌کند.

ژن *LicBM2* یک ژن دستکاری شده، کد کننده‌ی آنزیم بتا (۳–۱)(٤–۱) گلوکاناز (EC 3.2.1.73; lichenase) متحمل به گرما است که از باکتری *Clostridium thermocellum* بدست آمده است. این ژن در پلاسمیدpBISN1-IN (EU886197) کلون گردیده و در دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شهرکرد موجود است. سیگنال پپتید پروتئین ترشحیUSP45 در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* جهت سیستم بیانی این مطالعه انتخاب گردید که توالی آن در جدول ۱ آورده شده است.

شرایط رشد باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس*: به منظور فعال سازی باکتری تهیه شده مقدار٤۰ میکرولیتر از ذخیره باکتری به یک فالکون حاوی ۱۲ سی‌سی محیط M17 (biolife) تلقیح شد و در دمای ۳۰°C به مدت ۲٤ ساعت در اتاقک رشد بدون شیکر قرار داده شد.

ساخت سازه نوترکیب: ژن *LicBM2* کلون شده در پلاسمید(EU886197) pBISN1-IN با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) توسط تکنیک PCR تکثیر شده و روی ژل الکتروفرز ۱٪ بارگذاری شد. محصول PCR که قطعه‌ای شامل توالی ژن *LicBM2* به همراه سیگنال پپتید و سایت‌های بررشی است با استفاده از کیت تخلیص Vivantis از ژل خالص سازی شد. پس از هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده توسط PCR و پلاسمید pNZ8149 با استفاده از آنزیم‌های برشی *Sac*I و *Kpn*I ، عمل لایگیشن بوسیله‌ی آنزیم *T4* DNA Ligase انجام شد.

تهیه سلول مستعد جهت انتقال ژن توسط تکنیک الکتروپوریشن به باکتری *L. lactis* طی سه روز انجام شد. در روز اول٤۰ میکرولیتر از ذخیره باکتری منجمد شده در گلیسرول در ۵ سی‌سی محیط کشت G/L-SGM17B (تهیه شده از پودر محیط کشت M17، گلایسین، سوکروز و گلوکوز ۵٪ فیلتر شده طبق پروتکل شرکت MoBiTec تلقیح شده و در دمای ۳۰°C رشد داده شد. در روز دوم محیط کشت روز قبل به ۵۰ سی‌سی از محیط کشت G/L-SGM17B تلقیح شده و در ۳۰°C رشد داده شدو در روز سوم ۵۰ سی‌سی محیط کشت در ٤۰۰ سی‌سی از همان محیط کشت رقیق شد و تا رسیدن بهOD_{600} = ۰/۳ در ۳۰°C رشد داده شد. سپس محیط کشت در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری استریل تقسیم شده و در دمای ٤°C و دور ٤۰۰۰ rpm به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول روئی دور ریخته شده و سلولها با محلول ۰/۵ مولار سوکروزو ۱۰٪ گلیسرول در ٤°C شستشو شدند. در مرحله بعد سانتریفوژ در دور ٤۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه انجام و محلول روئی دور ریخته شد. سپس سلولها در محلول ۰/۵ مولار سوکروز، ۱۰٪ گلیسرول و ۵۰ میلی‌مولار EDTA به حالت تعلیق در آورده شدند. این سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس سانتریفیوژ بمدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و محلول روئی دور ریخته شده و سلولها با افزوده شدن محلول ۰/۵ مولار سوکروز و۱۰٪ گلیسرول در ٤°C و دور ٤۰۰۰rpm به مدت۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان سلولهای هر فالکون در ۵۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ مولار سوکروزو ۱۰٪ گلیسرول در ٤°C حل شده و در میکروتیوب‌هایی که از قبل روی یخ سرد شده بودند نگهداری شدند.

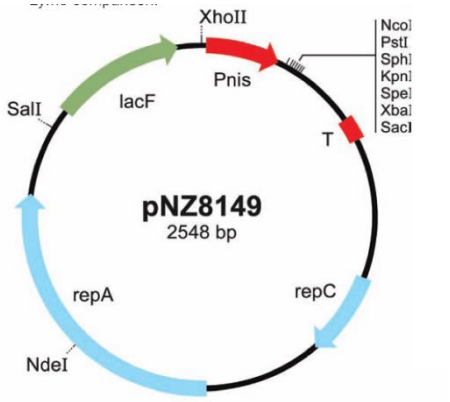
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]

جدول ۱- توالی سیگنال پپتید USP45.

Table 1. Sequence of signal peptide USP45

Oligo name	Sequence 5'-3'
SP USP45	AAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTA CAGTGATACTTTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCCGG AGTTTACGCC



شکل ۱- نقشه وکتور pNZ8149.

Fig1. Vector map of pNZ8149.

جدول ۲- توالی آغازگرها (آغازگر رفت حاوی سیگنال پپتید).

Table 1: Sequence of primers.

primer	Sequence 5'-3'
Forward	GTCAGGTACCGGAAAAAAAAGATTATCTCAG CTATTTTAATGTCTACAGTGATACTTTCTGCTGC AGCCCCGTTGTCCGGAGTTTACGCCGTAAATAC GCCTTTTGTTGCAG
Reverse	GCAGAGCTCTAGCTCATCTTTACCGTTAGGATAG

الکتروپوریشن: محیط کشت G/L-M17B با ۲۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ و۲ میلی‌مولار $CaCl_2$ تهیه یک ساعت قبل از استفاده محیط در انکوباتور ۳۰°C قرار داده شد. ۱۰ میکرولیترپلاسمید به همراه۵۰ میکرولیتر سلول مستعد شده باکتری به کووت الکتروپوریشن منتقل شد(تمام مراحل بر روی یخ انجام می‌شود) و در دستگاه Gene pulser از شرکت Bio-Rad قرار داده شد(U 2000v τ = 5 msec). پس از انجام الکتروپوریشن ۱ میلی‌لیتراز محیط کشت G/L-M17B به کووت اکتروپوریشن اضافه شده و تمامی محتویات کووت به یک میکروتیوب جدید منتقل شد و به مدت۱/۵ ساعت در دمای ۳۰°C انکوبه‌شد. سپس میکروتیوب در دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و مقداری از محلول رویی دور ریخته شد و سلولهای رسوب کرده در مابقی محلول حل گردید و روی پلیت‌های حاوی محیط کشت الیکر به صورت چمنی کشت داده شد. سپس به مدت ٤٨ ساعت در ۳۰°C انکوبه شد.

محیط کشت الیکر با اضافه کردن ۵٪ لاکتوز و ۰/۰۰٤٪ برموکروزول ارغوانی(Scharlau – PU0020) تهیه می‌شود و به عنوان یک اندیکاتور به منظور تست توانایی تجزیه لاکتوز استفاده می‌شود. و حضور کلنی‌های زرد رنگ بر روی محیط کشت بیانگر باکتری تراریخته می‌باشد.

تایید کلونینگ: پس از ٤٨ ساعت پلیت‌های کشت شده مورد بررسی قرار گرفتند و تک کلنی های مشاهده شده برای امکان تشخیص بهتر روی محیط الیکر به صورت خطی کشت شدند. پس از ٢٤ ساعت رشد در دمای ۳۰°C، از خطوط زرد رنگ ایجاد شده

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]

به منظور استخراج پلاسمید و تایید کلونینگ، کشت شبانه در محیط کشت M17 و دمای ۳۰°C بدون شیکرتهیه شد. از کشت شبانه ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت در دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Viogene محصول کشور تایوان انجام شد. برای بهینه سازی این کیت به منظور استخراج پلاسمید از باکتری گرم مثبت ابتدا رسوب سلولی در ۳۰۰ سی‌سی آب مقطر استریل حاوی ۰/۷ میلی‌گرم آنزیم لیزوزیم حل شده و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷°C دمادهی شد و سپس مراحل استخراج طبق دستورالعمل کیت اجرا شد.

پس از استخراج پلاسمید به منظور تایید حضور قطعه ژنی مورد نظر، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده PCR انجام شد و محصول روی ژل ۱٪ آگارز بارگذاری گردید.

القای بیان پروتئین: محلول ذخیره نیسین با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیترتهیه شد(طبق پروتکل شرکت MoBiTec). به دلیل ناپایداری نیسین، دقیقا قبل از استفاده از نیسین غلظت ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. از کلنی زرد رنگ روی محیط الیکر کشت شبانه تهیه شد. ٤۰۰ میکرو لیتراز کشت شبانه به چهار فالکون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط M17 تازه منتقل شد و در دمای ۳۰°C تا رسیدن به OD_{600} =۰/٤ انکوبه شد. به سه فالکون ۵ میکرولیتر از محلول نیسین با غلظت ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و یکی از فالکون‌ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شد سپس تمام فالکون ها به انکوباتور۳۰°C منتقل شدند و در سه زمان مختلف ۲،۳ و ٤ ساعت از انکوبه شدند و رسوب سلولی بوسیله‌ی سانتریفیوژ از محیط کشت جدا شده و به فریزر ۲۰°C- منتقل شد.

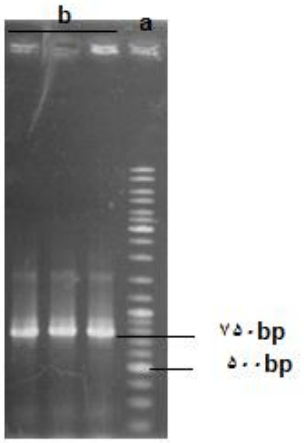
سنجش فعالیت آنزیم نوترکیب بتاگلوکاناز: به منظور سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز از روش احیاء قند (Miller, 1959) استفاده شد. جهت تهیه‌ی سوبسترا یک گرم آرد جو در ٦ میلی لیتر اتانول مرطوب شد و ۹۰ میلی‌لیتر بافر سیترات سدیم فسفات ۷۵میلی‌مولار با pH= ٤/٦ به آن اضافه شد و مخلوط بدست آمده تا نقطه‌ی جوش حرارت داده شد. ۰/۲ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی آنزیم بتاگلوکاناز ترشحی به ۱ میلی‌لیتر سوبسترا اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۰°C نگهداری شد. با اضافه کردن ۳ میکرولیتر معرف DNS واکنش هضم لیکینان توسط آنزیم متوقف گردید. با فرو بردن لوله‌ها در حمام آب جوش پس از گذشت ۱۵ دقیقه رنگ آشکار شد. پس از سرد شدن۱۰میلی لیتر آب مقطر استریل به هر لوله اضافه شد. تراکم نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. مقدار قندهای احیا کننده به صورت گلوکزبا استفاده از نمودار استاندارد مشخص شد که بیانگر میزان فعالیت آنزیم نوترکیب است.

نتایج

تکثیر ژن *LicBM2* بهمراه توالی سیگنال پپتید *USP45* و جایگاه های برش آنزیم‌های برشی *SacI* و *KpnI* با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و PCR انجام شد. حضور باند ۷۵۰ bp در محصول PCR صحت واکنش را تایید می‌کند (شکل۲). همچنین پلاسمید pNZ8149 که بوسیله‌ی کیت استخراج پلاسمید شرکت Viogene استخراج شده بود نیز به منظور تایید استخراج روی ژل بارگذاری شد (شکل ۳).

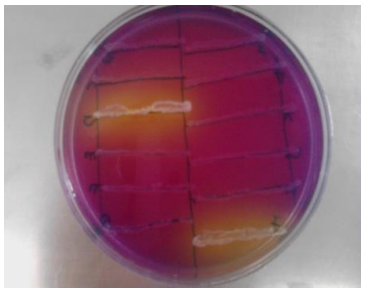
مراحل کلون سازی طبق پروتکل شرکت Mobitec انجام شد و کلنی های زرد رنگ روی محیط کشت الیکر مشاهده شدند و برای استخراج پلاسمید کشت خطی داده شدند (شکل ٤). به منظور تایید کلونینگ استخراج پلاسمید از کلونی های زرد رنگ انجام شد و واکنش PCR بوسیله‌ی پرایمرهای طراحی شده انجام گرفت و نتیجه روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد، (شکل ۵). سپس هضم آنزیمی بوسیله‌ی آنزیم‌های*Sac*I و *Kpn*I به منظور تایید حضور ژن در پلازمید انجام شد (شکل ٦).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]



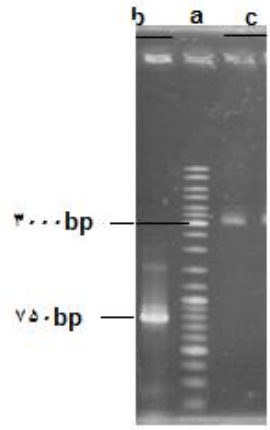
شکل۲- الکتروفورز محصول PCR : a : سایز مارکر یک کیلوبازی. b : باند bp ۷۵۰ ژن *LicBM2* به‌همراه توالی سیگنال پپتید *USP45* و جایگاه های برش آنزیم‌های *SacI* و *KpnI*.

Fig2. Gel electrophoresis of PCR production, *LicBM2 gene*, *USP45signal peptide and SacI*, *KpnI* sites (750 bp).



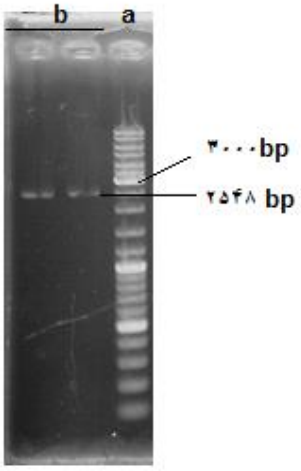
شکل٤- کشت خطی باکتری *L. lactis* ترانسفرم شده روی محیط کشت الیکر، باکتری ترانسفرم شده روی محیط الیکر کلنی زرد رنگ تشکیل می‌دهد.

Fig 4. *L. lactis* culture. Yellow colonies are transformed.



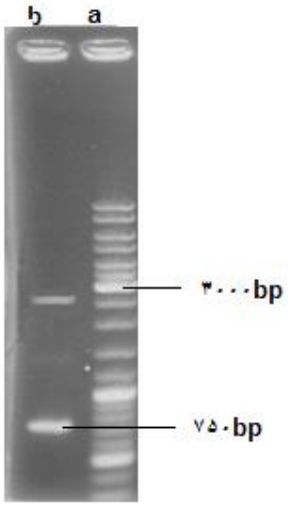
شکل٥- a. سایز مارکر یک کیلوبازی. b. پلاسمید pNZ8149 استخراج شده از کلنی‌های زرد رنگ، حاوی ژن *LicBM2* .c.محصول واکنش PCR ژن *LicBM2* در باکتری ترانسفرم شده.

Fig5. Gel electrophoresis, b: pNZ8149, extracted of transformed bacteria. C: PCR production, *LicBM2* gene.



شکل۳- a : سایز مارکر یک کیلوبازی. b : باند bp ۲۵٤۸پلاسمید pNZ8149.

Fig3. Gel electrophoresis, pNZ8149(2548bp)



شکل٦- هضم آنزیمی توسط آنزیم های برشی*Sac*I و *Kpn*I و تایید حضور ژن بتاگلوکاناز در وکتوربیانی pNZ8149 a . سایز مارکر یک کیلوبازی. b. پلاسمید pNZ8149 با ۲۵٤۷ جفت بازو ژن *LicBM2* با۷۵۰ جفت باز.

Fig6. Gel electrophoresis, enzyme digestion by *Sac*I& *Kpn*I, pNZ8149(2548bp) and *LicBM2* gene (750bp).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]

جدول ۳- آزمون t میزان پروتئین فعال در باکتری (میکروگرم در میکرولیتر).

Table 3. t test analysis of active protein in bacteria (µgr/µl)

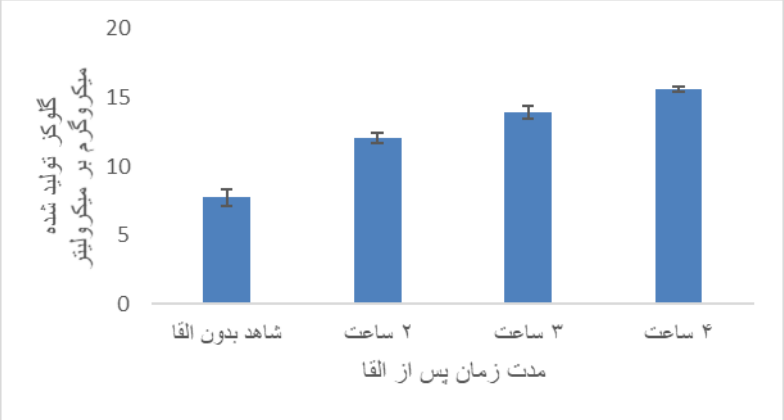
تیمار	تعداد نمونه	آزمون t
باکتری با پلاسمید	۸	۱/۸۲۱*
باکتری بدون پلاسمید	۸	

جدول٤- تجزیه واریانس فعالیت آنزیمی پرئتیین نو ترکیب.

Table4. Variance analysis of protein activation.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	f
تیمار	۳	۳٤/۵۹	۵٦/۷۷ **
خطا	۸	۰/٦۰۹	
کل	۱۱		

**معنی دار در سطح ۱٪



شکل۷- نمودار فعالیت آنزیمی (میکروگرم بر میکرولیتر)۲،۳ و ٤ ساعت پس از القا.

Fig7. Enzyme activity histogram: 2,3 and 4 hours after gene excretion induction.

بیان ژن بتاگلوکاناز: پس از القای بیان ژن بتاگلوکاناز در باکتری، با استفاده از نمونه‌های پروتئینی به دست آمده، آزمون احیاء قند انجام گرفت. معنی دار شدن آزمون t در سطح ۵٪ ، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم لیکیناز موجود در باکتری دارای پلاسمید و باکتری بدون پلاسمید وجود دارد (جدول۳). به منظور بررسی تاثیر زمان بر میزان بیان آنزیم بتاگلوکاناز سه زمان مختلف پس از القا مورد بررسی قرارگرفت. بدین منظور تیمارهای شاهد (بدون القا)، ۲ ، ۳ و ٤ ساعت پس از القا مورد مطالعه قرار گرفتند و فعالیت آنزیمی بررسی شد. همانطور که در جدول تجزیه واریانس(جدول٤) دیده می‌شود اثر تیمار که همان افزایش زمان القاست در سطح ۱٪ معنی‌دار است. نتایج حاصل از مطالعات فوق نشان داد که میزان فعالیت آنزیم با افزایش زمان القا افزایش می‌یابد و در ٤ ساعت پس از القا بالاترین عدد ۱٦ میکروگرم بر میکرو لیتر را نشان می‌دهد (شکل۷).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]

تاکنون تحقیقات فراوانی در رابطه با استفاده از آنزیم ها و پروبیوتیک‌ها در جیره‌های غذایی جهت بالا بردن ارزش تغذیه‌ای و بهداشت غذای طیور گوشتی انجام گرفته‌است. این آنزیم‌ها و میکروارگانیسم‌ها علاوه بر افزایش ارزش غذایی یک جیره‌ی کم هزینه و ارزان، از تکثیر و رشد باکتری‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش طیور جلوگیری کرده و موجب افزایش میکروفلور مفید سیستم گوارش نیز می‌شوند(pedroso *et al*., 2013).

استفاده از انواع آنزیم‌ها در جیره‌های غذایی طیور جهت کاهش اثرات ویسکوزیته‌ی انواع پلی ساکاریدهای غلاتی همچون جو و گندم، ، متداول می‌باشد. از جمله این آنزیم ها که به طور وسیع در جیره‌های غذایی بکار می‌رود، آنزیم لیکیناز در جیره‌های غذایی دارای جو است. استفاده از جو در جیره غذایی طیور به جای ذرت سبب کاهش هزینه تولید و پرورش طیور شده و نیاز به واردات ذرت را کاهش می‌دهد. جو از لحاظ مقدار پروتئین خام، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مواد معدنی مختلف و عدم آلودگی به قارچ و کپک‌ها نسبت به ذرت برتری دارد، اما به علت داشتن پلی ساکاریدهای بتاگلوکان که در جو از جنس لیکینان هستند، مصرف آن در جیره طیور به خصوص جوجه‌های گوشتی دارای محدودیت می باشد. کاهش قابلیت هضم مواد مغذی و انرژی قابل سوخت و ساز ناشی از مصرف جو در جیره طیور، به دلیل کاهش زمان عبور غذا از دستگاه گوارش در اثر وجود لیکینان است. بتاگلوکانازها گروه ویژه‌ای از آنزیم‌ها هستند که هیدرولیز بتاگلوکان‌ها را انجام می‌دهند، این دسته از آنزیم‌ها در بین ریزسازوارهای و حیوانات پراکندگی و گستردگی دارند ولی از این میان گلوکانازهای میکروبی امیدبخش بوده و مورد توجه می‌باشند (Zhao *et al*., 2012).

آنزیم لیکیناز کد شده توسط ژن دستکاری شده *LicBM2* از آنجا که از باکتری *Clostridium thermocellum* بدست آمده است، مقاوم به حرارت می‌باشد، این پروتئین یک کمپلکس چند آنزیمی خارج سلولی است که پیوندهای بتا(٤-١) مجاور پیوندهای بتا(١-٣) در بتاگلوکان‌ها (لیکینان) را هیدرولیز می‌کند اما بر پیوندهای(٣-١) و یا (٤-١) معمولی اثری ندارند. انواع آنزیم‌های خانواده گلوکاناز در بسیاری از موجودات یافت می‌شوند، این در حالی است که لیکیناز و لیکینان دربسیاری از موجودات پروکاریوتی و یوکاریوتی وجود ندارند، به همین دلیل لیکیناز مقاوم به حرارت را می‌توان به عنوان یک آنزیم در بسیاری ازموجودات پروکاریوتی و یوکاریوتی بکار برد بدون اینکه به لحاظ ایمنی زیستی منعی در استفاده از این آنزیم وجود داشته باشد(Sotchenkove *et al*., 2005). از طرفی بتا (٣-١) (١-٤)گلوکان (لیکینان) ترکیب پلی‌ساکاریدی از دیواره‌ی سلولی گیاهان عالی خانواده پواسه است و در دیواره سلولی اندوسپرم غلات تجاری همچون جو، چاودار، سورگوم، برنج و گندم وجود دارد. بنابراین آنزیم تولید شده در این تحقیق کاملا اختصاصی عمل کرده و پس از اضافه شدن به جیره غذایی دارای جو، لیکینان موجود در جو را تجزیه کرده و گلوکز موجود در آن را برای طیور قابل استفاده می‌کند(Pertilla *et al*., 2001).

کلون سازی و انتقال انواع ژن‌های بتاگلوکاناز به همراه ژن‌های سلولاز در باکتری‌های پروبیوتیک از جمله *لاکتوکوکوس لاکتیس*، باعث افزایش توان هضم باکتریایی سلولز و بتاگلوکان در جیره‌ی غذایی شده و مقدار ویسکوزیته‌ی غذای طیور راکاهش داده و جذب مواد غذلیی را بالا می‌برد(Liu *et al*., 2005)

برای اضافه نمودن آنزیم بتاگلوکاناز تولید شده در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس نیازی به استخراج این پروتئین از میزبان نبوده و با بکارگیری سیگنال پپتید ترشحی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است کافی است باکتری پروبیوتیک نوترکیب به جیره غذایی اضافه شود و در این صورت آنزیم بتاگلوکاناز در محیط حاوی باکتری ترشح خواهد شد. این ویژگی سبب خواهد شد تولید تجاری این آنزیم با صرفه اقتصادی بیشتری صورت گیرد. استفاده از پروبیوتیک‌ها، جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره‌ی غذایی است و پروبیوتیک‌هایی با فعالیت فوق‌العاده‌ی آنزیمی باعث کاهش بیشتر هزینه‌های تولید می‌شود(Liu et al., 2001). نتیجه‌ی این تحقیق رسیدن به مکمل پروبیوتیک غذایی طیور با فعالیت فوق‌العاده‌ی آنزیمی با سطح ایمنی نسبی و کاهش هزینه تولید این مکمل از طریق حذف مرحله خالص سازی آنزیم نوترکیب بوده است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]

منابع

Jacob, J. P., and A. J. Pescatore. 2014 Barley beta- glucan in poultry diets. Ann Transl Med. 2(2): 20..

Lamp, A. E., A. M. Evans, and J. S. Moritz. 2015. The effects of pelleting and lucanase supplementation in hulled barley based diets on feed manufacture, broiler performance, and digesta viscosity. The Journal of Applied Poultry Research. 24 (3): 295–303.

Liu, J. H., C. F. Tsai, J. W. Liu, K.-J. Cheng, and C. L. Cheng. 2001. The catalytic domain of a Piromyces rhizinflata cellulase expressed in Escherichia coli was stabilized by the linker peptide of the enzyme. Enzyme Microbiol. Technol. 28:582-589.

Liu, J. R., B. Yu, F. H. Liu, K. J. Cheng, and X. Zhao. 2005. Expression of rumen microbial fibrolytic enzyme genes in probiotic Lactobacillus reuteri. Appl Environ Microbiol. 71 (11):6769-6775.

Mierau, L, and M. kleerebezem. 2005. 10 years of the nisin-conttrolled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis. Applied microbiology and biotechnology 68:705-717.

Miller. GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of rediucing sugar. Anal. Chem. 31:420-428.

Noman, O,. and A. meltem. 2007. Expression of the β-(1,3-1,4)-Glucanase Gene in Streptococcus salivarius subsp. Thermophiles. Reserch article, Cukurova university, Adana-turkey 31: 319-324.

Park, Y. H., F. Hamidon, C. Rajangan, K. P. Soh, C. Y. Gan, T. S. Lim, W. N. W. Abdullah, and M. T. 2016. Liong. Application of Probiotics for the Production of Safe and High-quality Poultry Meat. Korean 36 (5):567-

Pedroso, A. A., A. L. Hurley-Bacon, A. S. Zedek, T. W. Kwan, A. P. O. Jordan, G. Avellaneda, C. L. Hofacre, B. B. Oakley, S. R. Collett, J. J. Maurer, and M. D. Lee. 2013. Can Probiotics Improve the Environmental Microbiome and Resistome of Commercial Poultry Production? Int J Environ Res Public Health. 2013 10 (10):4534-4559.

Perttila, S., J. Valaja, K. Partanen, T. Jalava, T. Kiiskinen, and S. Palander. 2001. Effects of preservation method and beta-glucanase supplementation on ileal amino acid digestibility and feeding value of barley for poultry. Br Poult Sci. 42 (2):218-229.

Pontes, D. S., M. S. de Azevedo, J. M. Chatel, P. Langella, V. Azevedo, and A. Miyoshi. 2011.Lactococcus lactis as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. Protein Expr Purif. Oct;79(2):165-175.

Sotchenkove, D.V, I.V. Goldenkova, N. Mirakhorli, L.Volkova. V. 2005. Modification of the sunflower defensin SD2 gene sequence and its expression in bacterial and yeast cells. Russian Jurnal of Genetices. 41:1194-1201.

Takiishi, T,. H. Korf, T. L. Van Belle. 2012. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigenspecific tolerance using genetically modified Lactococcus lactis in mice. The Journal of clinical investigation 122(5): 1717-1725.

Zhao, J., P. Shi, T. Yuan, H. Huang, Z. Li, K. Meng, P. Yang, B. Yao. 2012. Purification, gene cloning and characterization of an acidic β-1,4-glucanase from Phialophora sp. G5 with potential applications in the brewing and feed industries. J Biosci Bioeng. Oct;114(4) 379-384.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]

Expression of *β (1-3)(1-4) glucanase* gene in *Lactococcus lactis* to produce an animal probiotic feed

Marzieh Mohammadkhani[1], Neda Mirakhorli[2] *, Rahman Emamzade[3], Fariborz KhajAli[4]

1. MSc of Agriculthural Biotechnology, 2. Department of Plant Breeding & biotechnology, Shahrekord University. 3- Department of Biology, Faculty of Science, Isfahan University. 4- Department of Poultry Nutrition of Shahrekord University. Iran

*Corresponding Author: nedamirakhorli@yahoo.com

Abstract

Probiotics are bacteria with beneficial effects to humans and animals. Gram-positive Lactococcus lactis can be genetically engineered to efficiently produce a large variety of proteins. Glucanase enzymes, are capable to hydrolyze β-glucans (a non-starch polysaccharide). β(1,3)-(1,4) glucan (Lechinan) is a characteristic hemicellulose in primary cell walls of grasses such as barley, rye, sorghum, rice and wheat. The purpose of this study is to express the lechinase enzyme in *Lactococcus lactis* to achieve a feed supplement for hydrolyzation of barley β-glucan to replace corn by barley in poultry diets. licBM2 gene encoding lechinas enzyme with a secretion signal peptide was cloned in pNZ8149 plasmid. Then recombinant plasmids were transferred to *Lactococcus lactis* using electroporation method and the transformed colonies were selected via their ability to grow on lactose containing medium. The expression of transgene was induced using of Nisin in the medium. Our results showed that by increasing of the induction time, the expression of lechinase gene and consequently the production of enzyme in the medium were increased.

Keywords: *Lactococcus lactis,* probiotic, β-glucanase, Poultry Nutrition

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.1.5]