

بیان ژن بتا (۱-۳)(۱-۴) گلوکاناز در باکتری *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، فربرز خواجهعلی^۴

Marzieh Mohammadkhani¹, Neda Mirakhorli^{2*}, Rahman Emamzade³, Fariborz KhajAli⁴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی ۲- استادیار دانشگاه شهرکرد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد ۳- استادیار دانشگاه اصفهان گروه زیست‌شناسی، بیوشیمی ۴- استاد دانشگاه شهرکرد گروه علوم دام، تغذیه طیور

1. MSc of Agricultural 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: ۹۴/۱۱/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۵)

چکیده

واژه‌های کلیدی

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا و بی‌ضرری هستند که در روده انسان و حیوانات وجود دارند. این میکروارگانیسم‌ها نه تنها 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) (۱-۴) گلوکان‌ها (لیکینان‌ها) را هیدرولیز می‌کند. لیکینان‌ها ترکیبات پلی‌ساکاریدی در دیواره سلول‌های گیاهان عالی خانواده پواسه هستند که ظاهراً منحصراً 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 ترش‌گی این آنزیم به منظور دستیابی به مکمل غذایی برای طیور است که توانایی تجزیه بتاگلوکان‌ها 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* کدکننده آنزیم بتا (۱-۳) (۱-۴) گلوکاناز به همراه سیگنال پپتید ترش‌گی و سایت‌های برشی در پلاسمید pNZ8149 کلون گردید. انتقال پلاسمید نو ترکیب 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 بوسیله القاگر نیسین صورت گرفت و بررسی میزان بیان ژن با اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی پروتئین نو ترکیب مطالعه شد. با افزایش زمان القاء بیان ژن و میزان آنزیم تولید شده و فعالیت حاصل از آن افزایش می‌یابد. دستاورد این مطالعه کلون‌سازی و بیان موفق ژن *licBM2* در باکتری گرم مثبت لاکتوکوکوس لاکتیس و تولید پروبیوتیک با پروتئین نو ترکیب می‌باشد.

بتاگلوکاناز،

پروبیوتیک،

تغذیه طیور،

لاکتوکوکوس لاکتیس

مقدمه

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

بتا (۱-۳) (۱-۴) گلوکان‌ها (لیکینان‌ها) ترکیبات پلی‌ساکاریدی دیواره‌ی سلول‌های گیاهان عالی خانواده پواسه و خصوصاً دیواره سلولی اندوسپرم غلات همچون جو، چاودار، سورگوم، برنج و گندم می‌باشند. آنزیم‌های بتاگلوکاناز، هیدرولیز بتاگلوکان‌ها را انجام می‌دهند (Noman and Meltem, 2007).

استفاده از دانه‌هایی مانند جو در جیره غذایی طیور معمولاً از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است و اغلب توجه مرغداران را جلب می‌نماید. اما وجود مقادیر قابل توجهی از بتاگلوکان‌ها در جو 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 عملکرد 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 ۴ تا ۴۸ 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 نو ترکیب بدون نیاز به خالص سازی این مواد از میزبان پروبیوتیک است، این امر سبب صرفه‌جویی در هزینه‌های تولید پروتئین‌های نو ترکیب می‌شود که یک امتیاز ویژه برای تولید تجاری پروتئین نو ترکیب محسوب می‌شود.

در این تحقیق با استفاده از سیگنال پپتید *USP45* که پروتئین مورد نظر را وارد مسیر ترشحی می‌کند آنزیم نو ترکیب بتا (۱-۳) (۱-۴) گلوکاناز در باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس تولید گردید.

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 ۱ آمده 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 (۱-۳)(۱-۴) گلوکاناز (EC 3.2.1.73; lichenase) متحمل به گرما است که از باکتری *Clostridium thermocellum* بدست آمده است. این ژن در پلاسمید pBISN1-IN (EU886197) کلون گردیده و در دانشکدهی کشاورزی دانشگاه شهرکرد موجود است. سیگنال پپتید پروتئین ترشحی USP45 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 مقدار ۴۰ میکرولیتر از ذخیره باکتری به یک فالكون حاوی ۱۲ سی سی محیط M17 (biolife) تلقیح شد و در دمای ۳۰°C به مدت ۲۴ 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 الکتروفورز ۱٪ بارگذاری شد. محصول PCR که قطعه‌ای شامل توالی ژن *LicBM2* به همراه سیگنال پپتید و سایت‌های بررسی 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

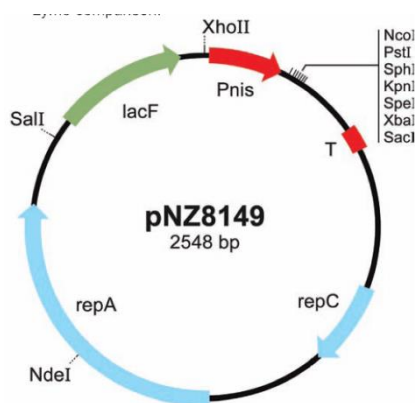
آنزیم‌های برشی *SacI* و *KpnI*، عمل لایگیشن بوسیلهی آنزیم T4 DNA Ligase انجام شد.

تهیه سلول مستعد جهت انتقال ژن توسط تکنیک الکتروپوریشن به باکتری *L. lactis* طی سه روز انجام شد. در روز اول ۴۰ میکرولیتر از ذخیره باکتری منجمد شده در گلیسرول در ۵ سی سی محیط کشت G/L-SGM17B (تهیه شده از پودر محیط کشت M17، گلیسین، سوکروز و گلوکز 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 سی سی از محیط کشت G/L-SGM17B تلقیح شده و در ۳۰°C رشد داده شد و در روز سوم ۵۰ سی سی محیط کشت در ۴۰۰ سی سی از همان محیط کشت رقیق شد و تا رسیدن به OD₆₀₀ = ۰.۳ در ۳۰°C رشد داده شد. سپس محیط کشت در فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری استریل تقسیم شده و در دمای ۴°C و دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۵ دقیقه سانتیفیوژ شدند. محلول روئی دور ریخته شده و سلولها با محلول ۰/۵ مولار سوکروز و ۱۰٪ گلیسرول در ۴°C شستشو شدند. در مرحله بعد سانتیفیوژ در دور ۴۰۰۰rpm 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 سانتیفیوژ بمدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و محلول روئی دور ریخته شده و سلولها با افزوده شدن محلول ۰/۵ مولار سوکروز و ۱۰٪ گلیسرول در ۴°C و دور ۴۰۰۰rpm به مدت ۲۵ دقیقه سانتیفیوژ شدند. در پایان سلولهای هر فالكون در ۵۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ مولار سوکروز و ۱۰٪ گلیسرول در ۴°C حل شده و در میکروتیوب‌هایی که از قبل روی یخ سرد شده بودند نگهداری شدند.

جدول ۱- توالی سیگنال پپتید USP45.

Table 1. Sequence of signal peptide USP45

Oligo name	Sequence 5'-3'
SP USP45	AAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTA 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	GTCAGGTACCGGAAAAAAGATTATCTCAG CTATTTTAATGTCTACAGTGATACTTTCTGCTGC AGCCCCGTTGTCCGGAGTTTACGCCGTAATAAC GCCTTTTGTTCAG
Reverse	GCAGAGCTCTAGCTCATCTTTACCGTTAGGATAG

کشت الیگر به صورت چمنی کشت داده شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰°C انکوبه شد.

محیط کشت الیگر با اضافه کردن ۰.۵٪ لاکتوز و ۰.۰۰۴٪ برموکروزول ارغوانی (PU0020 - Scharlau) 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 ۴۸ ساعت پلیت‌های کشت شده مورد بررسی قرار گرفتند و تک کلنی‌های مشاهده شده برای امکان تشخیص بهتر روی محیط الیگر به صورت خطی کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت رشد در دمای ۳۰°C، از خطوط زرد رنگ ایجاد شده

الکتروپوریشن: محیط کشت G/L-M17B با ۲۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۲ میلی‌مولار $CaCl_2$ تهیه یک ساعت قبل از استفاده محیط در انکوباتور ۳۰°C قرار داده شد. ۱۰ میکرولیتر پلاسמיד به همراه ۵۰ 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 ($U = 2000V$, $\tau = 5 msec$). پس از انجام الکتروپوریشن ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت G/L-M17B به کووت الکتروپوریشن اضافه شده و تمامی محتویات کووت به یک میکروتیوب جدید منتقل شد و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۰°C انکوبه شد. 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

نقطه‌ی جوش حرارت داده شد. ۰/۲ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی آنزیم بتاگلوکاناز ترش‌چی 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 لیکنان توسط آنزیم متوقف گردید. با فرو بردن لوله‌ها در حمام آب جوش پس از گذشت ۱۵ دقیقه رنگ آشکار شد. پس از سرد شدن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به هر لوله اضافه شد. تراکم نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. مقدار قندهای احیا کننده به صورت گلوکز با استفاده از نمودار استاندارد مشخص شد که بیانگر میزان فعالیت آنزیم نو ترکیب 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 (شکل ۲). همچنین پلاسمید pNZ8149 که بوسیله‌ی کیت استخراج پلاسمید شرکت Viogene استخراج شده بود نیز به منظور تایید استخراج روی ژل بارگذاری شد (شکل ۳).

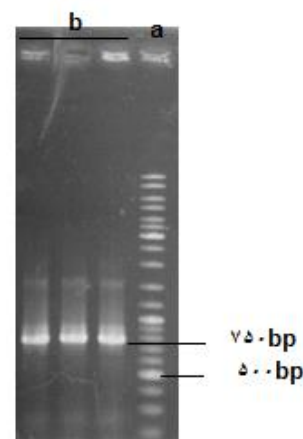
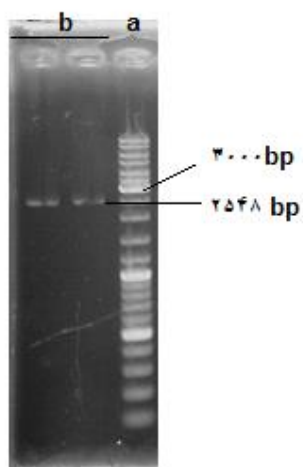
مراحل کلون سازی طبق پروتکل شرکت Mobitec انجام شد و کلنی های زرد رنگ روی محیط کشت الیکر مشاهده شدند و برای استخراج پلاسمید کشت خطی داده شدند (شکل ۴). به منظور تایید کلونینگ استخراج پلاسمید از کلونی های زرد رنگ انجام شد و واکنش PCR بوسیله‌ی پرایمرهای طراحی شده انجام گرفت و نتیجه روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد، (شکل ۵). سپس هضم آنزیمی بوسیله‌ی آنزیم‌های *SacI* و *KpnI* به منظور تایید حضور ژن در پلازمید انجام شد (شکل ۶).

به منظور استخراج پلاسمید و تایید کلونینگ، کشت شبانه در محیط کشت M17 و دمای ۳۰°C بدون شیکرتیه 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 سی سی آب مقطر استریل حاوی ۰/۷ میلی گرم آنزیم لیزوزیم حل شده و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷°C دما دهی 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.

الفای بیان پروتئین: محلول ذخیره نیسین با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد (طبق پروتکل شرکت MoBiTec). به دلیل ناپایداری نیسین، دقیقاً قبل از استفاده از نیسین غلظت ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. از کلنی زرد رنگ روی محیط الیکر کشت شبانه تهیه شد. ۴۰۰ میکرو لیتر از کشت شبانه به چهار فالكون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط M17 تازه منتقل شد و در دمای ۳۰°C تا رسیدن به $OD_{600} = 0.4$ انکوبه شد. به سه فالكون ۵ میکرولیتر از محلول نیسین با غلظت ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و یکی از فالكون‌ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شد سپس تمام فالكون ها به انکوباتور ۳۰°C منتقل شدند و در سه زمان مختلف ۲، ۳ و ۴ ساعت از انکوبه شدند و رسوب سلولی بوسیله‌ی سانتریفیوژ از محیط کشت جدا شده و به فریزر ۲۰°C منتقل شد.

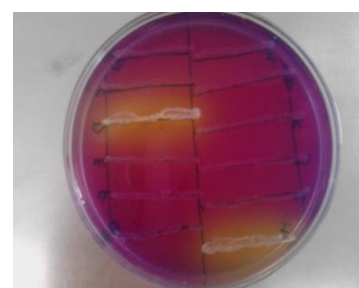
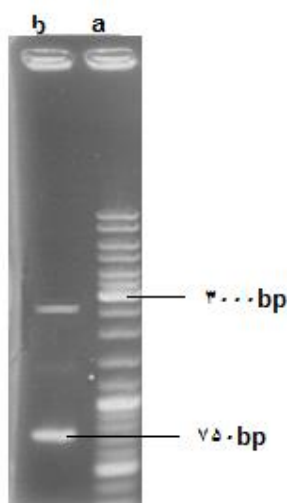
سنجش فعالیت آنزیم نو ترکیب بتاگلوکاناز: به منظور سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز از روش احیاء قند (Miller, 1959) استفاده شد. جهت تهیه‌ی سوبسترا یک گرم آرد جو در ۶ میلی لیتر اتانول مرطوب شد و ۹۰ میلی‌لیتر بافر سیترات سدیم فسفات ۷۵ میلی‌مولار با pH= ۴/۶ به آن اضافه شد و مخلوط بدست آمده تا



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR: a: سایز مارکر یک کیلوبازی. b: باند bp ۷۵۰ ژن *LicBM2* به همراه توالی سیگنال پپتید *USP45* و جایگاه های برش آنزیم های *SacI* و *KpnI*.

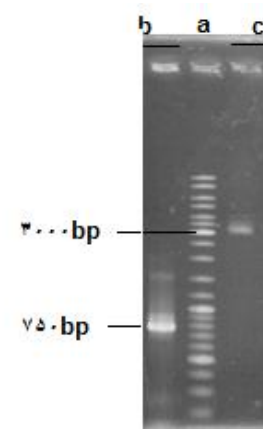
شکل ۳- a: سایز مارکر یک کیلوبازی. b: باند bp ۲۵۴۸ پلاسمید pNZ8149.

Fig3. Gel electrophoresis, pNZ8149(2548bp)



شکل ۴- کشت خطی باکتری *L. lactis* ترانسفرم شده روی محیط کشت الیکر، باکتری ترانسفرم شده روی محیط الیکر کلنی زرد رنگ تشکیل می دهد.

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



شکل ۵- a: سایز مارکر یک کیلوبازی. b: پلاسمید pNZ8149 استخراج شده از کلنی های 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.

شکل ۶- هضم آنزیمی توسط آنزیم های برشی *SacI* و *KpnI* و تایید حضور

ژن بتاگلوکاناز در وکتوربیانی pNZ8149. a: سایز مارکر یک کیلوبازی. b: پلاسمید pNZ8149 با ۲۵۴۷ جفت بازو ژن *LicBM2* با ۷۵۰ جفت بازو.

Fig6. Gel electrophoresis, enzyme digestion by *SacI* & *KpnI*, pNZ8149(2548bp) and *LicBM2* gene (750bp).

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

Table 3. t test analysis of active protein in bacteria ($\mu\text{gr}/\mu\text{l}$)

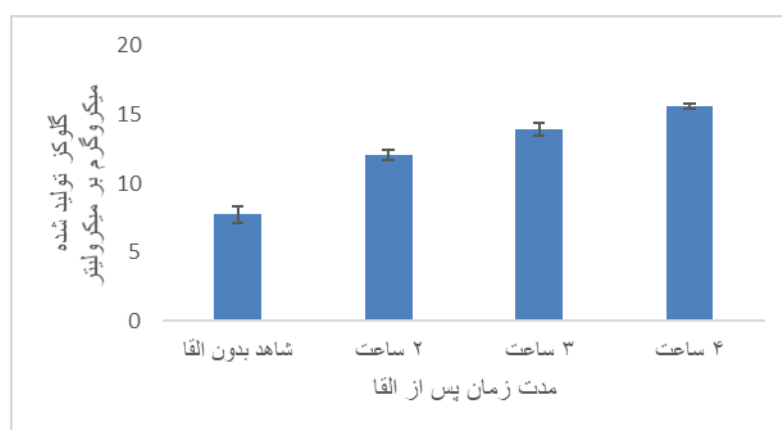
تیمار	تعداد نمونه	آزمون t
باکتری با پلاسمید	۸	۱/۸۲۱ *
باکتری بدون پلاسمید	۸	

جدول ۴- تجزیه واریانس فعالیت آنزیمی پرتئین نو ترکیب.

Table 4. Variance analysis of protein activation.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	f
تیمار	۳	۳۴/۵۹	۵۶/۷۷ **
خطا	۸	۰/۶۰۹	
کل	۱۱		

**معنی دار در سطح ۱٪



شکل ۷- نمودار فعالیت آنزیمی (میکروگرم بر میکرولیتر) ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از القا.

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

بدون القا)، ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از القا مورد مطالعه قرار گرفتند و فعالیت آنزیمی بررسی شد. همانطور که در جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) دیده می شود اثر تیمار که همان افزایش زمان القاست در سطح ۱٪ معنی دار است. نتایج حاصل از مطالعات فوق نشان داد که میزان فعالیت آنزیم با افزایش زمان القا افزایش می یابد و در ۴ ساعت پس از القا بالاترین عدد ۱۶ میکروگرم بر میکرو لیتر را نشان می دهد (شکل ۷).

بیان ژن بتاگلوکاناز: پس از القای بیان ژن بتاگلوکاناز در باکتری، با استفاده از نمونه های پروتئینی به دست آمده، آزمون احیاء قند انجام گرفت. معنی دار شدن آزمون t در سطح ۰.۵٪، نشان داد که اختلاف معنی داری در میزان آنزیم لیکیناز موجود در باکتری دارای پلاسمید و باکتری بدون پلاسمید وجود دارد (جدول ۳). به منظور بررسی تاثیر زمان بر میزان بیان آنزیم بتاگلوکاناز سه زمان مختلف پس از القا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تیمارهای شاهد (

تاکنون تحقیقات فراوانی در رابطه با استفاده از آنزیم ها و پروبیوتیک ها در جیره های غذایی جهت بالا بردن ارزش تغذیه ای و بهداشت غذای طیور گوشتی انجام گرفته است. این آنزیم ها و میکروارگانیسم ها علاوه بر افزایش ارزش غذایی یک جیره ی کم هزینه و ارزان، از تکثیر و رشد باکتری های بیماری زا در دستگاه گوارش طیور جلوگیری کرده و موجب افزایش میکروفلور مفید سیستم گوارش نیز می شوند (pedroso et al., 2013).

استفاده از انواع آنزیم ها در جیره های غذایی طیور جهت کاهش اثرات ویسکوزیته ی انواع پلی ساکاریدهای غلاتی همچون جو و گندم، متداول می باشد. از جمله این آنزیم ها که به طور وسیع در جیره های غذایی بکار می رود، آنزیم لیکیناز در جیره های 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 می دهد. جو از لحاظ مقدار پروتئین خام، اسیدهای آمینه، ویتامین ها و مواد معدنی مختلف و عدم آلودگی به قارچ و کپک ها 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 جوجه های 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 ویژه ای از آنزیم ها هستند که هیدرولیز بتاگلوکان ها را انجام می دهند، این دسته از آنزیم ها در بین ریزسازواری های و حیوانات پراکندگی و گسترده دارند ولی از این میان گلوکانازهای میکروبی امیدبخش بوده و مورد توجه می باشند (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 می باشد، این پروتئین یک کمپلکس چند آنزیمی خارج سلولی است که پیوندهای بتا (۴-۱) مجاور پیوندهای بتا (۱-۳) در بتاگلوکان ها (لیکینان) را هیدرولیز می کند اما بر پیوندهای (۳-۱) و یا (۴-۱) معمولی اثری ندارند. انواع آنزیم های خانواده گلوکاناز در بسیاری از موجودات یافت می شوند، این در

حالی است که لیکیناز و لیکینان در بسیاری از موجودات پروکاریوتی و یوکاریوتی وجود ندارند، به همین دلیل لیکیناز مقاوم به حرارت را می توان به عنوان یک آنزیم در بسیاری از موجودات 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 (۳-۱) (۱-۳) ۴) گلوکان (لیکینان) ترکیب پلی ساکاریدی از دیواره 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 کاملاً 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 می کند (Pertilla et al., 2001).

کلون سازی و انتقال انواع ژن های بتاگلوکاناز به همراه ژن های سلولاز در باکتری های پروبیوتیک از جمله لاکتوکوکوس لاکتیس، باعث افزایش توان هضم باکتریایی سلولز و بتاگلوکان در جیره غذایی شده و مقدار ویسکوزیته ی غذای طیور را کاهش داده و جذب مواد غذایی را بالا می برد (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 پروبیوتیک ها، جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک ها در جیره غذایی است و پروبیوتیک هایی با فعالیت فوق العاده ی آنزیمی باعث کاهش بیشتر هزینه های تولید می شود (Liu et al., 2001). نتیجه ی این تحقیق رسیدن به مکمل پروبیوتیک غذایی طیور با فعالیت فوق العاده ی آنزیمی با سطح ایمنی نسبی و کاهش هزینه تولید این مکمل از طریق حذف مرحله خالص سازی آنزیم نوترکیب بوده است.

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-controlled 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 reduicing 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 Genetics.* 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.

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

Marzieh Mohammadkhani¹, Neda Mirakhorli² *, Rahman Emamzade³, Fariborz KhajAli⁴

1. MSc of Agricultural 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 (Lechitin) 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