Archiv

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

# Cloning and expression of recombinant endo 1,4 β xylanase in origami strain and evaluation of microbial enzyme supplementation effects on broiler performance

**Amin Sadeghi Alikelayeh**
*Corresponding author. PhD of Biotechnology, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran. E-mail: a.s.phd.biotech@gmail.com

**Mohsen Modareskia**
PhD Candidate, Department of Biotechnology, Institute of Science, High Technology and Environmental Sciences, University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: modares1982@gmail.com

**Sahar Shojaee**
PhD Candidate, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: sshojaee8@gmail.com

## *Abstract*

### Objective

Today, one of the ways to reduce production costs in poultry industrial units is to replace cost-effective grains such as wheat with corn in the poultry diet. However, the presence of non-starch polysaccharides in the cell wall of wheat has inevitably limited the uptake of nutrients by poultry. In this regard, one of the methods to remove non-starch polysaccharides is the use of xylanase enzyme additive in formulated diets based on wheat. For this purpose, the aim of this experiment was to clone the recombinant enzyme xylanase and investigate its effects on the performance of wheat-fed broiler chickens.

### Materials and methods

In current investigation, in the first step, xylanase gene, as a degradation enzyme of non-starch polysaccharides in wheat-based poultry diet, was cloned into plasmid pET-21a (+) in *E. coli* origami expression strain using heat shock method. IPTG inducer was used to induce gene

www.SID.ir

Archive of SID

expression and the expression result was observed on SDS-PAGE. Then, in the second step, the recombinant xylanase enzyme solution was added to the diet of one-hundred Ross 308 broilers in a completely randomized design. Then, the mean body weight gain (BWG), feed conversion ratio (FCR) and viscosity of jejunum contents were also measured.

**Results**

The results of present study showed that the recombinant xylanase gene was transferred to origami and the cloning results of PCR confirmed the presence of a specific band of 966 bp. SDS-PAGE also showed a recombinant protein with a molecular weight of 35 kDa. Furthermore, the results of adding recombinant xylanase enzyme to wheat-based diet showed an increase in the weight of broilers and a decrease in feed conversion ratio and viscosity in the final period and the whole period compared to the control group at a probability level of 5%.

**Conclusions**

The results of the current research showed that the production of recombinant enzyme xylanase and its addition as a dietary supplement in wheat-based diets could increase the yield of broilers by breaking down arabinosylans in the wheat cell wall and the presence of xylanase enzyme in the diet is known as one of the important factors in enhancing the growth of broilers.

**Keywords:** Cloning, Xylanase, Broiler Chickens, Wheat-Based Diets, Recombinant Protein.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Sadeghi Alikelayeh A, Modareskia M, Shojaee S (2021) Cloning and expression of recombinant endo 1,4 β xylanase in origami strain and evaluation of microbial enzyme supplementation effects on broiler performance. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 139-158.

*Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 139-158. DOI: 10.22103/jab.2021.18195.1343

Received: October 20, 2021. Accepted: November 20, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors



www.SID.ir

Archiv

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۲۲۲۸-۶۷۰۵ شاپا الکترونیکی: ۲۲۲۸-۶۵۰۰

# همسانه‌سازی و بیان آنزیم نوترکیب اندو ۱و٤ بتا زایلاناز در سویه origami و بررسی اثرات مکمل آنزیم میکروبی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی

**امین صادقی علیکلایه**

*نویسنده مسئول: دکتری تخصصی بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: a.s.phd.biotech@gmail.com

**محسن مدرس‌کیا**

دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، فناوری پیشرفته و محیطزیست، دانشگاه تحصیلات تکمیلی فناوری پیشرفته کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: modares1982@gmail.com

**سحر شجاعی**

دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: sshojaee8@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۹

## چکیده

**هدف:** امروزه، از جمله روش‌های کاهش هزینه تولید در واحدهای صنعتی مرغداری، جایگزین نمودن غلات مقرون به صرفه همچون گندم، به جای اقلام ذرت در جیره غذایی طیور می‌باشد. اما، وجود پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در دیواره سلولی گندم، در هر صورت جذب مواد غذایی توسط طیور را با محدودیت اجتناب ناپذیر مواجه نموده است. در این راستا، یکی از روش‌های حذف پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای استفاده از افزودنی آنزیم زایلاناز در جیره‌های فرموله شده مبتنی بر گندم می‌باشد. بدین منظور، هدف از این آزمایش همسانه‌سازی آنزیم نوترکیب زایلاناز و بررسی اثرات آن بر عملکرد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره بر پایه گندم می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، در گام نخست، ژن زایلاناز، به عنوان آنزیم تجزیه‌کننده پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای موجود در جیره طیور بر پایه گندم، درون پلاسمید pET-21a(+) در باکتری *E. coli* سویه بیانی origami با استفاده از روش شوک حرارتی کلون شد. جهت القای بیان ژن، از القاگر IPTG استفاده شد و نتیجه بیان بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید SDS-PAGE مشاهده گردید. سپس در گام دوم، محلول آنزیم نوترکیب زایلاناز به جیره غذایی مجموع ۱۰۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸

www.SID.ir

Archive of SID

در قالب طرح کاملاً تصادفی اضافه شد. در ادامه، همچنین میانگین افزایش وزن بدن، میزان ضریب تبدیل خوراک و ویسکوزیته محتویات ژژنوم نیز اندازه‌گیری شدند.

**نتایج:** نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که، ژن نوترکیب زایلاناز به سویه origami انتقال یافته و نتایج کلونی PCR حضور باند اختصاصی به طول ۹۶۶ جفت‌باز را تأیید نمودند. همچنین SDS-PAGE، پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی kDa ۳۵ را نشان داد. همچنین، نتایج حاصل از افزودن آنزیم نوترکیب زایلاناز به جیره بر پایه گندم، افزایش در وزن جوجه‌های گوشتی و کاهش میزان ضریب تبدیل خوراک و ویسکوزیته را در دوره پایانی و کل دوره نسبت به گروه کنترل در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج پژوهش حاضر، نشان داد که تولید آنزیم نوترکیب زیلاناز و افزودن آن به عنوان مکمل غذایی در جیره‌های بر پایه گندم، توانست با تجزیه آرابینوزایلان‌های موجود در دیواره سلولی گندم، سبب افزایش عملکرد جوجه‌های گوشتی گردد و وجود آنزیم زایلاناز در جیره ممکن است از عوامل مهم در تقویت رشد جوجه‌های گوشتی باشد.

**کلیدواژه‌ها:** همسانه‌سازی، زایلاناز، جوجه‌های گوشتی، جیره بر پایه گندم، پروتئین نوترکیب

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** صادقی علیکلایه امین، مدرس‌کیا محسن، شجاعی سحر (۱۴۰۰) همسانه‌سازی و بیان آنزیم نوترکیب اندو ۱و۴ بتا زایلاناز در سویه origami و بررسی اثرات مکمل آنزیم میکروبی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۳۹-۱۵۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.
© the authors

## مقدمه

بر اساس مطالعات باستان‌شناسی West and Zhou قدمت تکثیر و پرورش ماکیان در ایران به عنوان یکی از مهمترین دستاوردهای بشری به دوران قبل از میلاد مسیح باز می‌گردد. در آن زمان به دلیل گستردگی مرزهای زمینی و دریایی در امپراطوری بزرگ ایران (پرشیا) و نیاز به ارسال اقلام به سایر مناطق، توسعه قابل توجهی در حمل و نقل محصولات، بویژه در صنعت طیور صورت پذیرفته است (Mohammadifar and Mohammadabadi 2018; Mohammadifar and Mohammadabadi 2017; Mohammadifar et al. 2014; Moazeni et al. 2010). طبق اعلام سازمان بهداشت


www.SID.ir

Archive of SID

جهانی حدود یک سوم پروتئین مصرفی انسان باید از منابع پروتئین حیوانی مانند: گوشت گاو، گوسفند، شتر، خوک و طیور تأمین گردد. رشد چشم‌گیر صنعت پرورش طیور در چند سال اخیر، تولیدکنندگان این حوزه را با چالش تأمین خوراک مواجه نموده است. ذرت یکی از مهمترین اقلام در جیره طیور را تشکیل می‌دهد. مطالعات نشان می‌دهند به دلیل استفاده از ذرت در صنایع مختلفی مانند: تولید بیودیزل و اتانول، سبب افزایش قیمت ذرت و کاهش عرضه این محصول در سراسر جهان گردیده است (Wang et al. 2011). یکی از روش‌های پیشنهاد شده جهت کاهش هزینه تولید در واحدهای پرورش طیور، جایگزین نمودن گندم به عنوان یک منبع مهم انرژی در جیره‌های غذایی می‌باشد (Fajardo et al. 2012). نتایج پژوهش Abdollahi et al (2018) حد مجاز استفاده از گندم را ۴۰ درصد از کل جیره بیان نمودند. با این حال، به علت وجود ترکیبات ضدتغذیه‌ای پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای (NSP)[1] به ویژه وجود آرابینوزایلان‌های موجود در لایه آلورون، کارایی استفاده از گندم در جیره طیور را با محدودیت مواجه نموده است (Sadeghi Alikelayeh et al. 2020). آرابینوزایلان‌ها سبب افزایش میزان ویسکوزیته محتویات روده، کاهش قابلیت هضم مواد مغذی و کاهش عملکرد رشدی طیور تغذیه شده با جیره بر پایه گندم می‌شوند. علاوه بر این، وجود عوامل ضدتغذیه‌ای NSP در رژیم غذایی طیور می‌تواند فرآیند تخمیر روده را با کاهش میکروفلور روده تسریع کند، که ممکن است برای هضم و جذب مواد مغذی مضر باشند. امروزه، هیچ تردیدی در مفید بودن استفاده از مکمل‌های آنزیم‌های میکروبی تجزیه‌کننده NSP در جیره‌های غذایی طیور بر پایه گندم وجود ندارد. در این راستا، مطالعات نشان داده‌اند که افزودن آنزیم زایلاناز به جیره‌های غذایی گندم می‌تواند با هیدرولیز نسبی NSPهای موجود در گندم، ویسکوزیته مواد غذایی روده را کاهش دهد و در نتیجه باعث بهبود هضم مواد مغذی و عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی گردد. نتایج مطالعات Gao et al (2008) نشان دادند که استفاده از افزودنی آنزیم زایلاناز به دلیل تجزیه پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای به پری‌بیوتیک‌ها سبب افزایش عملکرد سیستم‌ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌شود. پری‌بیوتیک‌ها، کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم موجود در مواد غذایی هستند که جهت تحریک رشد باکتری‌های مفید پروبیوتیک در بدن ضروری است (Vandeplas et al. 2010).

افزایش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک بویژه اسیدلاکتیک درون روده طیور علاوه بر تقویت سیستم‌ایمنی میزبان، سبب بهبود عملکرد جذب مواد مغذی، کاهش جهش‌های ژنتیکی، جلوگیری از تخریب مخاط روده، مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش عملکرد رشدی طیور می‌گردد (Jha et al. 2020). زایلانازها به صورت طبیعی در قارچ‌ها، باکتری‌ها و مخمرها به میزان بسیار اندکی تولید می‌شوند و در صنایع مختلفی مانند: تولید سوخت زیستی، تولید خمیر کاغذ و صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Vieco-Saiz et al. 2019). یکی از روش‌های افزایش میزان آنزیم زایلاناز، تولید آنزیم در میکروارگانیسم‌های باکتریایی به روش مهندسی ژنتیک می‌باشد. به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم

[1] Non Starch Polysaccharide




www.SID.ir

Archive of SID

ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی[2] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن مـی باشـد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مـورد نیـاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). سـاز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقـت و چندبعدی می باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انـواع بافـت‌هـا بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصـولات ژن کـه در همـان بافـت و نیـز در سـایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیـان آن ژن مـی‌شـود (Mohammadabadi 2021). یکـی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016). با وجود مطالعات صورت گرفته در مورد مزایایی استفاده از مکمل‌های مولتی‌آنزیم تجاری زایلانـاز در جیره‌های طیور بر پایه گندم، با این حال، اطلاعات محدودی در مورد اثرات اسـتفاده مسـتقیم از محلـول باکتریـایی حـاوی آنـزیم نوترکیب زایلاناز و اثرات آن بر جیره طیور گوشتی در دسترس است. بنابراین، هدف از این مطالعه ارزیـابی اثـرات آنـزیم نوترکیـب زایلاناز تولید شده به روش مهندسی ژنتیک بر عملکرد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با گندم می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

**باکتری، پلاسمید و ژن هدف:** در این مطالعه، باکتری‌های *E. coli* سویه بیانی origami مورد اسـتفاده قـرار گرفـت. پلاسمید pET-21a (+) (شکل ۲) حاوی ژن نشانگر انتخابی آمپی‌سیلین و پروموتر T7 جهت بیان پروتئین‌های نوترکیب به کار بـرده شـد. ژن هـدف زایلانـاز (Gene ID: 28831157)، کدکننـده آنـزیم انـدو ۱و۴ بتـا زایلانـاز مـی‌باشـد کـه از قـارچ *Phialocephala scopiformis* بدست آمده است.

**شرایط رشد باکتری *E. coli*:** جهت رشد و بیان باکتری *E. coli* از محیط کشت‌های مایع و جامد لوریا–برتانی (LB) حاوی: عصاره مخمر (۵ g/l)، تریپتون (۱۰ g/l) و NaCl (۵ g/l) استفاده و در دمای ۳۷°C درون انکوباتور کشت شـبانه صـورت پذیرفت. همچنین جهت تشخیص باکتری نوترکیب، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مقدار ۱۰۰ (µg/ml) به محیط کشت اضـافه شـد (Bilgin et al. 2018).

[2] DNA

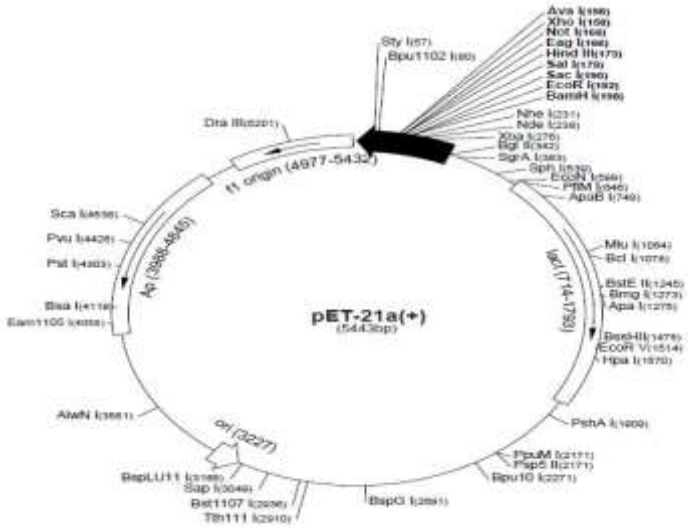

www.SID.ir

Archive of SID

**طراحی سازه بیانی:** با استفاده از نرم‌افزار SnapGene® (4.2.11v) طراحی سازه بیانی به طول ۹۶۶ جفت‌باز حاوی ژن زایلاناز به همراه توالی آنزیم‌های محدودگر *Ava* I و *Bam*H I انجام شد و قطعه توالی هدف از شرکت سیناژن درون پلاسمید pET-21a (+) ارسال گردید (شکل ۱) (Sadeghi Alikelayeh et al. 2020; Liu 2013).

**شکل ۱. سازواره بیانی حاوی ژن زایلاناز به همراه توالی آنزیم‌های برشی *Ava* I و *Bam*H I**

**Figure 1. Expressive Construct including xylanase gene along with *Ava* I and *Bam*H I restriction enzymes sequences**




**شکل ۲. نقشه پلاسمید pET-21a (+) برگرفته از شرکت Novagen**

**Figure 2. Vector pET-21a (+) map retrieved from Novagen company**

**انتقال پلاسمید به سویه بیانی *Origami*:** مراحل تهیه سلول مستعد و انتقال پلاسمید به باکتری *E. coli* سویه بیانی origami طبق روش Zafar et al (2016) صورت پذیرفت. در این روش ابتدا مقدار ۵ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب pET-21a (+) حاوی ژن زایلاناز به میکروتیوب‌های حاوی سلول مستعد باکتری *E. coli* انتقال و جهت افزایش نفوذپذیری غشای باکتری مقدار ۱ میکرولیتر محلول DMSO نیز به آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰°C- قرار داده شدند. سپس به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۴۲°C در دستگاه بلوک حرارتی قرار گرفتند و بلافاصله به مدت ۵ دقیقه درون یخ قرار داده شدند. در ادامه مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع فاقد آنتی‌بیوتیک به هر یک از نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C، درون انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۹۰rpm دمادهی شدند و بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت گردیدند.




www.SID.ir

Archive of SID

**تأیید ترانسفورماسیون:** کلونی‌های نوترکیب رشد یافته بر روی محیط کشت انتخابی حاوی آمپی‌سیلین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (رفت: 5´-CACGTGCCGTTGTCTAAGTTTGAATTTCT-3´ و برگشت: 5´-GGATCCTAACGTAACAGTGTGGTAAGAG-3´) و بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تأیید گردیدند. همچنین صحت حضور قطعه نوترکیب زایلاناز پس از استخراج پلاسمید با استفاده از کیت *AccuPrep* Kit® شرکت Bioneer کره‌جنوبی با استفاده از روش هضم دوگانه آنزیم‌های محدودگر صورت پذیرفت (Cao et al. 2011).

**القای بیان پروتئین:** جهت القای بیان پروتئین نوترکیب زایلاناز از القاگر IPTG (۱ mM) در دمای ۳۷°C استفاده شد. بدین منظور از کلون‌های نوترکیب رشد یافته بر روی محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع کشت شبانه انجام شد. پس از رسیدن به مقدار غلظت بهینه ($OD_{600}$=۰/۴)، مقدار ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت را به عنوان شاهد (بدون القاگر) برداشته و به باقی‌مانده محیط کشت، القاگر IPTG اضافه شد. پس از استخراج پروتئین کل، نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز SDS-PAGE بارگذاری شدند (Laemmli 1970). محلول القا شده پروتئین نوترکیب زایلاناز به عنوان مکمل افزودنی آنزیم به جیره طیور بر پایه گندم اضافه گردید.

**پرورش طیور و اعمال جیره‌نویسی مبتنی بر مکمل‌سازی آنزیم نوترکیب ساخته شده:** مراحل اجرای این پژوهش در تیرماه ۱۳۹۸ بصورت طرح کاملاً تصادفی (CRD) با تعداد ۱۰۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس در ۵ تکرار و ۲ تیمار به ترتیب شامل: شاهد و محلول محیط کشت مایع LB حاوی آنزیم نوترکیب زایلاناز (۲۲۰۰ U/ml)، در واحد مرغداری دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد به مساحت ۳۰۰ متر مربع در مدت ۴۲ روز به اجرا درآمد. با توجه به اینکه آنزیم زایلاناز مقاوم به حرارت است، قبل از اضافه نمودن محلول محیط کشت مایع LB حاوی آنزیم نوترکیب زایلاناز به جیره، ابتدا محلول باکتری القا شده بوسیله IPTG درون حمام بن‌ماری تا دمای ۶۵°C به مدت ۲۰ دقیقه حرارت دیده شد تا باکتری سویه origami از بین روند. قبل از شروع پرورش طیور، تمامی تجهیزات مرغداری بوسیله محلول ساولون ضدعفونی شدند. تنظیمات دمای سالن با استفاده از سیستم گرمایشی دمنده واقع در داخل سالن انجام گرفت. تنظیم ساعات روشنایی بصورت: ۱ ساعت تاریکی برای ۳–۷ روزگی، ۴ ساعت تاریکی شبانه برای ۸–۲۱ روزگی و ۶ ساعت تاریکی شبانه از ۲۲–۴۲ روزگی استفاده شد. جهت انجام این آزمایش ۱۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر سویه راس ۳۰۸ به طور تصادفی در ۱۰ پن به ابعاد ۲×۱/۵×۰/۷ متر توزیع گردیدند. جوجه‌ها تا سن ۱۰ روزگی از خوراک‌های آماده تغذیه شدند (Buchanan et al. 2007). شروع آزمایش در سالن مرغداری دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد از سن ۱۱ روزگی بود به این صورت که از ۱۱ تا ۲۴ روزگی دوره رشد و از ۲۵ تا ۴۲ روزگی دوره پایانی در نظر گرفته شد. آب و خوراک به صورت آزاد در کل دوره پرورش در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت. ترکیب مواد مغذی موجود


Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

در جیره بر پایه گندم طبق انجمن تحقیقات ملی (NRC) سال ۱۹۹۴ برای دوره رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی) و دوره پایانی (۲۵ تـا ۴۲ روزگی) جوجه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

**جدول ۱. ترکیب جیره‌های مورد استفاده در آزمایش (بر حسب درصد)**

**Table 1. Composition of diets used in the experiment (in percentage)**

| ماده خوراکی<br>Ingredients (%) | دوره رشد (۱۱–۲۱ روزگی)<br>Grower (Days 11-21) | دوره پایانی (۲۲–۴۲ روزگی)<br>Finisher (Days 22-42) |
|---|---|---|
| گندم Wheat | 40 | 63.27 |
| کنجاله سویا Soybean meal (44% CP) | 45.9 | 18.96 |
| روغن مایع گیاهی Vegetable oil | 6.45 | 8.76 |
| پودر ماهی Fish meal | 4 | 6.03 |
| پودر صدف Oyster shells | 1.14 | 1.05 |
| دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate | 1.07 | 0.65 |
| جوش شیرین Sodium bicarbonate | 0.23 | 0.22 |
| نمک Salt | 0.14 | 0.11 |
| دی ال- متیونین DL-methionine | 0.33 | 0.31 |
| ال- لیزین L-lysine | 0.09 | 0.07 |
| ال- ترئونین L-threonine | 0.15 | 0.07 |
| مکمل ویتامینی Vitamin premix[1] | 0.25 | 0.25 |
| مکمل معدنی Mineral premix[2] | 0.25 | 0.25 |
| ترکیبات شیمیایی Chemical composition | | |
| انرژی قابل متابولیسم Metabolizable energy (kcal/kg) | 3000 | 3100 |
| پروتئین خام Crude protein (%) | 21.55 | 19.4 |
| کلسیم Calcium (%) | 1 | 0.9 |
| فسفر قابل دسترس Available phosphorus (%) | 0.45 | 0.36 |
| لیزین Lysine (%) | 1.25 | 1.09 |
| متیونین + سیستئین Methionine + Cysteine (%) | 0.9 | 0.72 |

[1] هر کیلوگرم مکمل ویتامینی شامل: ۳۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین $D_3$، ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین $K_3$، ۹۰۰ میلی‌گرم ویتامین $B_1$، ۳۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین $B_2$، ۵۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین $B_3$، ۱۵۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین $B_5$، ۱۵۰ میلی‌گرم ویتامین $B_6$، ۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین $B_9$، ۷/۵ میلی‌گرم ویتامین $B_{12}$، ۲۵۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین و ۵۰۰ میلی‌گرم بیوتین بود.

[2] هر کیلوگرم مکمل معدنی شامل: ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۲۵۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۵۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۵۰۰ میلی‌گرم ید و ۱۰۰ میلی‌گرم سلنیوم بود.

[1]Vitamin premix provided per kg of diet: vitamin A (all-trans-retinyl acetate), 2.72 mg; vitamin D3 (cholecalciferol), 0.05 mg; vitamin E (all-rac-α-tocopherol acetate), 4 mg; vitamin K3 (menadione), 2 mg; thiamine, 1.8 mg; riboflavin, 6.6 mg; nicotinic acid, 9.8 mg; calcium pantothenate, 29.7 mg; pyridoxine, 1.18 mg; folic acid, 1 mg; cobalamin, 0.015 mg; D-biotin, 0.1 mg; choline chloride, 500 mg.

[2]Mineral premix provided per kg of diet: 76 mg Mn (as MnO2); 66 mg Zn (as ZnSO4); 40 mg Fe (as FeSO4·7H2O); 4 mg Cu (as CuSO4·5H2O); 0.64 mg I (as NaI); 0.2 mg Se (as Na2SeO3·5H2O).

جیره‌نویسی توسط نرم‌افزار UFFDA و طبق کاتالوگ سویه راس ۳۰۸ تنظیم شد (Abdollahi et al. 2018). در طـول دوره تعداد و وزن تلفات و مشخصات مربوط به گروه آزمایشی مربوطـه ثبـت گردیـد تـا افـزایش وزن و میـزان خـوراک مصـرفی جوجه‌های تلف شده در محاسبات اعمال گردد. همچنین آنزیم نوترکیب مقاوم به حرارت زایلاناز حاصل بدون نیاز به خالص‌سازی و




www.SID.ir

Archive of SID

تنها پس از القا بوسیله القاگر شیمیایی IPTG و القای تیمار دمایی ۶۵ درجه سانتی‌گراد بوسیله حمام بن‌ماری جهت حذف باکتری *E. coli* صورت پذیرفت (Sadeghi Alikelayeh et al. 2020).

**کشتار و نمونه برداری:** وزن‌کشی جوجه‌ها، اندازه‌گیری مقدار مصرف خوراک، افزایش وزن زنده، میزان تلفات و ضریب تبدیل خوراک در پایان هر هفته انجام شدند. صفات عملکردی شامل: میزان خوراک مصرفی هر دوره، افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک (FCR) مورد بررسی قرار گرفتند. در روز ۴۲ام از هر تکرار ۲ قطعه جوجه به صورت تصادفی بر اساس میانگین وزن کل جوجه‌ها در هر پن انتخاب و بعد از وزن‌کشی انفرادی با روش جابجایی مهره گردنی کشتار صورت پذیرفت. محتویات درون ژژنوم به درون فالکون ریخته و جهت بررسی میزان ویسکوزیته بر اساس واحد سانتی‌پوآز (cPs) به آزمایشگاه منتقل گردید (Brenes et al. 2019). نتایج حاصل از نمونه‌برداری نیز با استفاده از آزمون مقایسه میانگین دانکن و در سطح احتمال معنی‌داری ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار R محاسبه گردید.

## نتایج و بحث

**تأیید ترانسفورماسیون:** پس از مشاهده کلونی‌های سفید رنگ نوترکیب بر روی محیط کشت انتخابی آمپی‌سیلین (شکل ۳)، نتایج حاصل از کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، قطعه ۹۶۶ جفت‌بازی را بصورت تک‌باند بر روی ژل آگارز ۱ درصد تأیید نمود. همچنین هضم پلاسمید نوترکیب (+) pET-21a موجود در سویه origami توسط آنزیم‌های محدودگر *Ava* I و *Bam*H I نیز حضور باند اختصاصی ژن زایلاناز را نشان دادند (شکل ۴).

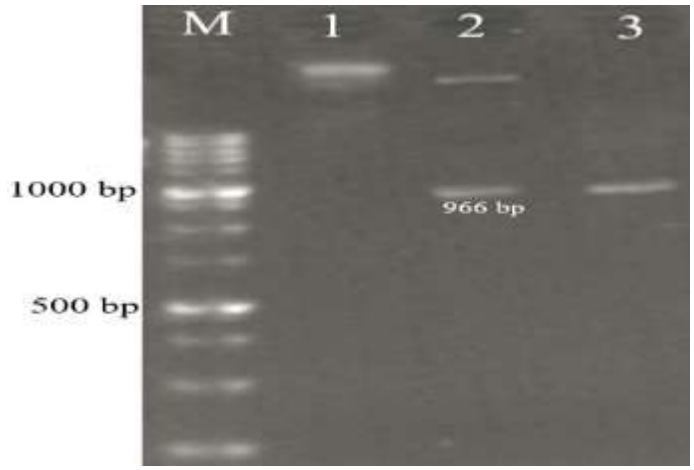
**شکل ۳. کلونی نوترکیب باکتری *E. coli* سویه Origami بر روی محیط کشت انتخابی حاوی آمپی‌سیلین**
**Figure 3. Recombinant clone of *E. coli* strain Origami on selective culture medium**



Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID




**شکل ٤. محصول کلونی PCR و هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب (+) pET-21a**

**مارکر ۱۰۰ جفت‌باز پلاس *Thermo fisher* (M) _ پلاسمید نوترکیب (۱) _ هضم دوگانه آنزیم‌های محدودگر (۲) محصول کلونی PCR (۳)**

**Figure 4. PCR colony product and Dual digestion of recombinant plasmid pET-21a (+) *Thermo fisher* (M) plus 100 bp marker _ Recombinant plasmid (1) _ Dual digestion of restriction enzymes (2) _ PCR colony (3)**

**القای بیان ژن در باکتری *E. coli***: القای پروتئین از باکتری نوترکیب در دمای ۳۷°C و به مدت ۶ ساعت پس از القا توسط IPTG انجام شد. نمونه‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE تفکیک شدند. نتایج بصورت تک‌باند مشاهده شد و وجود پروتئین با وزن مولکولی ۳۵ kDa را تأیید نمود (شکل ۵). پژوهشی که بر روی کلونینگ ژن زایلاناز در پلاسمید pET-32c(+) انجام شده است میزان زمان بهینه القای IPTG را ۶ ساعت تعیین نمودند (Bhardwaj et al. 2019). در مطالعه‌ای Bilgin et al (2018) توانستند ژن *xyn*2A را با طراحی آغازگرهای اختصاصی از قارچ *Neocallimastix* استخراج نموده و در پلاسمید pET-22b در باکتری *E. coli* سویه BL21 با وزن مولکولی ۲۹ kDa کلون نمایند. Wang et al (2011) نیز کلونینگ ژن زایلاناز (*xyn*10A) استخراج شده از قارچ *آسپرژیلوس* را بررسی نمودند. طی این مطالعه ژن هدف در پلاسمید pET-21a باکتری *E. coli* سویه origami کلون شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE وجود باند پروتئینی ۳۵ kDa را تأیید نمودند.

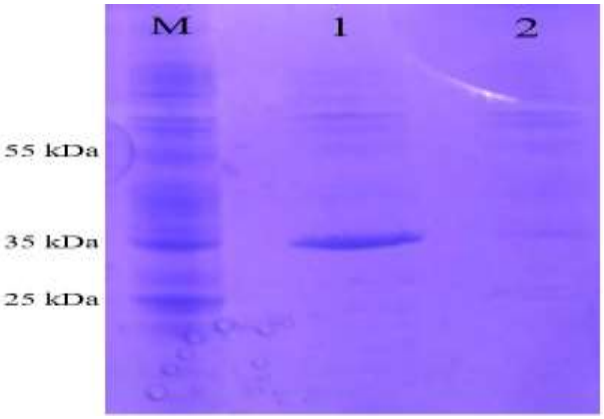
**میزان مصرف خوراک:** یکی از شاخص‌های مهم عملکردی، میزان مصرف خوراک توسط طیور می‌باشد که از حاصل تفاضل میانگین وزن خوراک ابتدای هر دوره با میانگین وزن خوراک انتهای دوره محاسبه می‌گردد. نتایج حاصل از اثرات تیمارهای آزمایشی بر میانگین میزان خوراک مصرفی (گرم) جوجه‌های نر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در جدول ۲ ارائه گردیده است. طبق اطلاعات مندرج در جدول میان تیمارهای مورد ارزیابی در دوره‌های سنی مختلف، رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی)، دوره پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی) و کل دوره (۱۱– ۴۲ روزگی) هیچ اختلاف معنی‌داری را در مقادیر خوراک مصرفی نشان ندادند. نتایج پژوهش‌های Abdollahi et al (2018) و Serranom et al (2020) که بر روی تأثیر آنزیم تجاری رووابیو حاوی آنزیم زایلاناز در



www.SID.ir

Archive of SID

جیره‌های بر پایه گندم در جوجه‌های رقم راس داشتند نیز، مطابق پژوهش حاضر هیچگونه اختلاف معنی‌داری را در مقدار خوراک مصرفی بیان نکردند.




**شکل ۵. پروتئین نوترکیب از باکتری *E. coli* سویه origami بر روی SDS-PAGE**
**مارکر پروتئینی ۱۵۰ کیلودالتون (PM2700) (M) _ پروتئین نوترکیب زایلاناز با وزن مولکولی ۳۵ kDa (۱) _ شاهد فاقد القاگر IPTG (۲)**

**Figure 5. Recombinant protein extraction from *E. coli* strain *origami* on SDS-PAGE**
**150 kDa protein marker (PM2700) (M) _ Recombinant xylanase protein with 35 kDa MW (1) _ Control without IPTG inducer (2)**

**جدول ۲. میانگین مصرف خوراک (گرم) جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره بر پایه گندم**

**Table 2. Mean of feed intake (g) of broilers fed with wheat-baised diets**

| تیمارها<br>Treatments | دوره رشد(۱۱ تا ۲۴ روزگی)<br>Grower (Days 11-24) | دوره پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی)<br>Finisher (Days 25-42) | کل دوره (۱۱ تا ۴۲ روزگی)<br>Total (Days 11-42) |
|---|---|---|---|
| شاهد Control | 868.32 | 2966.89 | 3835.21 |
| آنزیم نوترکیب زایلاناز Recombinant xylanase | 867.97 | 3006.09 | 3874.06 |
| اشتباه معیار میانگین SEM[1] | 6.66 | 42.67 | 45.71 |
| سطح معنی‌داری *P*-value | 0.99 | 0.87 | 0.91 |

[1] SEM= Standard Error of Mean

**شاخص وزن بدن:** نتایج مربوط به اثرات میزان تغییرات وزن بدن در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که در جدول ملاحظه می‌گردد شاخص وزن بدن در دوره‌ی رشد ۱۱ تا ۲۴ روزگی تفاوت معنی‌داری را نشان نداند اما میانگین وزن بدن در دوره پایانی ۲۵ تا ۴۲ روزگی و کل دوره تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد میان گروه‌های تحت آزمایش نشان دادند. در این پژوهش جیره‌های بر پایه گندم تلقیح شده با باکتری نوترکیب حرارت دیده سویه origami حاوی آنزیم زایلاناز حداکثر میزان وزن بدن را نسبت به گروه شاهد نشان دادند و کمترین میزان وزن بدن مربوط به تیمار شاهد گزارش گردید. آنزیم نوترکیب


Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

زایلاناز توانست حداکثر کارایی جهت تجزیه انواع پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای (NSPs) را نشان دهد و افـزایش قابلیـت جـذب مواد مغذی را برای جوجه‌های گوشتی مهیا نماید. پلـی‌سـاکاریدهای غیرنشاسـته‌ای بـویژه آرابینـوزایلان‌هـا سـبب کـاهش ارزش تغذیه‌ای گندم می‌شوند. پلی ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای با افزایش میزان ویسکوزیته مواد هضمی، مانع از جذب مواد مغذی توسط طیور می‌گردند. علاوه بر این، افزایش ویسکوزیته ممکن است سرعت عبور مواد غذایی را درون روده طیـور کـاهش داده و سـبب کاهش مصرف خوراک و نهایتاً کاهش وزن جوجه‌ها گردد که نتایج این پژوهش نیز این موضوع را تأیید نمودند. در مطالعه‌ای کـه توسط Yang et al (2019) انجام شد گزارش کردند که افزودن مکمل‌های آنزیمی حاوی زایلاناز و لیکیناز به جیره‌های بر پایـه گندم و جو سبب افزایش متابولیسم ظاهری، کاهش ویسکوزیته و بهبود ضریب تبدیل خوراک (FCR) گردیـده اسـت. همچنـین، نتایج پژوهش Hong and Adeola (2018) بیان نمودند که پاسخ به مکمل‌های آنزیمی به سن طیور بستگی دارد و در سـنین ۴ تا ۶ هفتگی بیشترین واکنش به آنزیم را از خود نشان می‌دهند که با نتایج پژوهش حاضر قرابت دارد.

**جدول ۳. میانگین وزن بدن (گرم) جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره بر پایه گندم**

**Table 3. Mean of body wieght of broilers fed with wheat-baised diets**

| تیمارها Treatments | دوره رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی) Grower (Days 11-24) | دوره پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی) Finisher (Days 25-42) | کل دوره (۱۱ تا ۴۲ روزگی) Total (Days 11-42) |
|---|---|---|---|
| شاهد Control | 566.11 | 1194.23[b] | 1760.34[b] |
| آنزیم نوترکیب زایلاناز Recombinant xylanase | 560.15 | 1554.85[a]* | 2115[a]* |
| اشتباه معیار میانگین SEM[1] | 8.67 | 47.4 | 48.65 |
| سطح معنی‌داری *P*-value | 0.45 | 0.03 | 0.05 |

[a-b] اعداد با حروف متفاوت در هر ستون با هم تفاوت معنی‌دار دارند ($P < ۰/۰۵$)

[a-b] Means within same column with different superscripts differ (P<0.05)

[1] SEM= Standard Error of Mean

**ضریب تبدیل خوراک (FCR):** نتایج ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره بر پایه گندم در جدول ۴ نشان داده شده است. طبق نتایج حاصله، میزان ضریب تبدیل خوراک در دوره پایانی و کل دوره در جیره‌های تیمار شده با آنزیم نوترکیب زایلاناز اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد نسبت به تیمـار شـاهد نشـان دادنـد. ضـریب تبـدیل خوراک، فاکتور مهمی از تأثیر میزان خوراک مصرف شده توسط طیور و تبدیل آن به وزن بدن طیـور را نشـان مـی‌دهـد. در ایـن شاخص هرچه میزان ضریب تبدیل خوراک کوچکتر باشد بهبود بهره‌وری عملکرد را نشان می‌دهد. نتایج ایـن پـژوهش نشـان داد افزودن آنزیم نوترکیب زایلاناز به جیره‌های بر پایه گندم می‌تواند سبب کاهش ضریب تبدیل خوراک و در نتیجه افزایش عملکـرد جوجه‌های گوشتی گردد. طبق پژوهش‌های صورت گرفته توسط Fajardo et al (2012) با افزایش سن جوجه‌ها به دلیل تکامل سیستم هاضمه و افزایش میزان ترشح آنزیم‌های گوارشی میزان تأثیرگذاری آنزیم با منشاء خارجی افزایش‌یافتـه و سـبب افـزایش


www.SID.ir

Archive of SID

بهره‌وری از خوراک توسط طیور می‌گردد و نیاز به مصرف خوراک را کاهش می‌دهد. همچنین افزایش میزان پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای موجود در جیره بر پایه گندم سبب افزایش میزان ویسکوزیته و عدم جذب مواد مغذی توسط طیور می‌گردد و بسیاری از مواد مغذی بدون جذب از بدن خارج می‌گردند لذا فرآیند تبدیل جذب مواد غذایی با مشکل مواجه شده و به دلیل عدم جذب مناسب، فرآیند پروتئین‌سازی نیز بخوبی عمل نمی‌کند و کاهش رشد طیور را به همراه دارد که با نتایج پژوهش حاضر در تطابق است. از طرفی افزایش ویسکوزیته مواد هضمی، ارتباط مؤثر بین آنزیم‌های ترشحی با منشاء داخلی و سوبسترا را کاهش داده و متعاقباً عدم جذب کامل مواد مغذی را سبب می‌شود (Burkholder et al. 2011). Ghorbani et al (2019) طی مطالعه‌ای که بر روی نقش آنزیم‌ها بر انواع جیره‌های غذایی داشتند بیان کردند که استفاده از آنزیم زایلاناز در جیره بر پایه گندم علاوه بر کاهش ویسکوزیته مواد هضمی درون دستگاه گوارش سبب بهبود ضریب تبدیل خوراک نیز شده است. افزودن مکمل‌های آنزیمی مانند زایلاناز علاوه بر کاهش میزان ویسکوزیته سبب کاهش ماندگاری مواد غذایی در دستگاه گوارش شده و از اتلاف انرژی قابل متابولیسم، جهت هضم مواد غذایی جلوگیری بعمل می‌آورد. بهبود در انرژی قابل متابولیسم مواد غذایی سبب استفاده بهینه از مواد مغذی مانند: پروتئین، کربوهیدرات و چربی شده و به افزایش وزن بدن طیور کمک می‌کند (Brenes et al 2019).

**جدول ٤. میانگین ضریب تبدیل خوراک (FCR) جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره بر پایه گندم**

**Table 4. Mean of feed conversion ratio (FCR) of broilers fed with wheat-baised diets**

| تیمارها<br>Treatments | دوره رشد(۱۱ تا ۲۴ روزگی)<br>Grower (Days 11-24) | دوره پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی)<br>Finisher (Days 25-42) | کل دوره (۱۱ تا ۴۲ روزگی)<br>Total (Days 11-42) |
|---|---|---|---|
| شاهد Control | 1.53 | 2.48[a]** | 2.17[a]* |
| آنزیم نوترکیب زایلاناز<br>Recombinant xylanase | 1.55 | 1.93[b] | 1.83[b] |
| اشتباه معیار میانگین SEM[1] | 0.02 | 0.05 | 0.04 |
| سطح معنی‌داری *P*-value | 0.11 | 0.01 | 0.05 |

[a-b] اعداد با حروف متفاوت در هر ستون با هم تفاوت معنی‌دار دارند ($P < ۰/۰۵$)

[a-b] Means within same column with different superscripts differ (P<0.05)

[1] SEM= Standard Error of Mean

**ویسکوزیته:** نتایج پژوهش حاضر نشان داد، استفاده از آنزیم نوترکیب زایلاناز اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد در کاهش میزان ویسکوزیته مواد هضمی درون ژژنوم نشان داده است (جدول ۵). Junqueira et al (2020) با مطالعه بر روی استفاده از مکمل‌های آنزیمی گلوکاناز و زایلاناز بر جیره‌های بر پایه جو و گندم نشان دادند استفاده از آنزیم‌های تجاری به دلیل حذف انواع مختلفی از پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای موجود در دیواره سلولی غلات و تبدیل آن‌ها به مونوساکاریدها و



www.SID.ir

Archive of SID

دی‌ساکاریدهای قابل هضم، سبب سهولت جذب مواد غذایی، کاهش ویسکوزیته، بهبود ضریب تبدیل خوراک، افزایش سیستم‌ایمنی و بهبود عملکرد رشدی سویه راس ۳۰۸ شدند. طبق اطلاعات حاصله از نتایج پژوهش پیش‌رو، در بررسی صورت گرفته از تغییرات میزان ویسکوزیته محتویات روده بر اساس واحد پوآز با استفاده از دستگاه ویسکومتر، تیمار آزمایشی آنزیم نوترکیب زایلاناز با مقدار ۲/۴۴ سانتی‌پوآز، کمترین میزان ویسکوزیته را نسبت به تیمار شاهد نشان داد.

**جدول ۵. میانگین ویسکوزیته ژژنوم جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره بر پایه گندم**

**Table 5. Mean of jejunum viscosity of broilers fed with wheat-baised diets**

| Treatments تیمارها | ویسکوزیته (سانتی پوآز) Viscosity (cPs) |
|---|---|
| Control شاهد | 3.5[a]* |
| Recombinant xylanase آنزیم نوترکیب زایلاناز | 2.44[b] |
| SEM[1] اشتباه معیار میانگین | 0.08 |
| *P*-value سطح معنی‌داری | 0.05 |

[a-b] اعداد با حروف متفاوت در هر ستون با هم تفاوت معنی‌دار دارند ($P < ۰/۰۵$)

[a-b] Means within same column with different superscripts differ (P<0.05)

[1] SEM= Standard Error of Mean

**نتیجه‌گیری:** تاکنون تلاش و تحقیقات فراوانی در رابطه با استفاده از آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در جیره‌های غذایی طیور گوشتی بر پایه گندم طراحی و اجرا شده است. امروزه صنعت پرورش طیور به این باور رسیده است که آنزیم‌ها، افزودنی‌های غذایی با ارزشی هستند که می‌توان مورد استفاده قرار گیرند. آنزیم زایلاناز، آرابینوزایلان‌های موجود در دیواره سلولی گندم را به قندهای ساده مانند گلوکز تجزیه کرده و محدودیت استفاده از گندم در جیره غذایی طیور را برطرف می‌سازد. استفاده از گندم در جیره غذایی طیور به جای ذرت، سبب کاهش هزینه تولید طیور شده و نیاز به واردات ذرت را کاهش می‌دهد. در پژوهش حاضر، ابتدا با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، طراحی سازه بیانی ژن زایلاناز صورت پذیرفت. سپس، انتقال و بیان ژن مقاوم به حرارت زایلاناز موجود در پلاسمید pET-21a (+) در باکتری گرم منفی *E. coli* سویه‌ی origami به طور موفقیت‌آمیزی صورت پذیرفت. نتایج حاصل از کلونی PCR و هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب، وجود باند اختصاصی ژن زایلاناز به طول ۹۶۶ جفت‌باز را بر روی ژل آگارز یک درصد تأیید نمود. همچنین SDS-PAGE وجود پروتئین نوترکیب زایلاناز با وزن مولکولی ۳۵ kDa نشان داد. در ادامه، با تلقیح باکتری حرارت دیده شده حاوی ژن نوترکیب زایلاناز به جیره جوجه‌های گوشتی نر سویه راس ۳۰۸ بر پایه گندم، افزایش وزن بدن و کاهش در ضریب تبدیل خوراک (FCR) و ویسکوزیته محتویات روده کوچک را نسبت به تیمار شاهد نشان داد که بیانگر تأثیر آنزیم نوترکیب زایلاناز بر تجزیه پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای موجود در جیره طیور بر پایه گندم می‌باشد. امروزه کاهش هزینه تولید در صنعت طیور با استفاده از جیره‌هایی با هزینه کمتر، بسیار مورد استقبال جامعه جهانی قرار گرفته است. نتایج پژوهش حاضر بیان نمود با تولید آنزیم نوترکیب زایلاناز در باکتری علاوه بر حذف باکتری‌های




www.SID.ir

Archive of SID

بیماری‌زا با استفاده از القای حرارت، می‌توان از مزایای اضافه نمودن آنزیم نوترکیب به عنوان مکمل غـذایی بـر پایـه گنـدم بهـره جست و هزینه تولید واحدهای صنعتی پرورش طیور گوشتی را با جایگزین نمودن گندم بجای ذرت کاهش داد.

**سپاسگزاری:** بدینوسیله نگارندگان بر خود لازم می‌دارند تا از حمایت‌هـای مـادی و معنـوی معاونـت پژوهشـی دانشـگاه شهرکرد و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران ستاد توسعه زیست فناوری کمال تشکر و قدردانی را بجا آورند.

## منابع

احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۱-۱۶۷.

محمدی فر آمنه، فقیه ایمانی سید علی، محمدآبادی محمد رضا، سفلایی محمد (۱۳۹۲) تأثیر ژن ۳TGFβ بر ارزش های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس. مجله بیو تکنولوژی کشاورزی ۵(۴)، ۱۳۶-۱۲۵.

## References

Abdollahi MR, Ravindran V, Wester TJ et al. (2018) Influence of feed form and conditioning temperature on performance, apparent metabolisable energy and ileal digestibility of starch and nitrogen in broiler starters fed wheat-based diet. Anim Feed Sci Tech 168, 88-99.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator- Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. Iran J Appl Anim Sci 9, 635-642.



www.SID.ir

Archive of SID

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

Bhardwaj N, Kumar B, Verma P et al. (2019) A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. Bioresour Bioprocess 6, 40.

Bilgin S, Ulusu Y, Kudus H et al. (2018) Cloning, Expression and characterization of xylanase (*xyn-akky1*) from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli.* Sakarya Uni J Sci 6, 1508-1517.

Brenes A, Smith M, Guenter W et al. (2019) Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat- and barley based diets. Poultry Science J Nut 125, 947-955.

Buchanan NP, Kimbler LB, Parsons AS et al. (2007) The effects of non-starch polysaccharide enzyme addition and dietary energy restriction on performance and carcass quality of organic broiler chickens. J App Poult Res 10, 1-12.

Burkholder KM, Thompson KL, Einstein ME et al. (2011) Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella* Enteritidis colonization in broilers. Poult Sci 87, 1734-1741.

Cao G, Zhang X, Zhong L et al. (2011) A modified electro-transformation method for *Bacillus subtilis* and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. Biotechnol Lett 33, 1047-1051.

Fajardo P, Pastrana L, Endez J (2012) Effects of feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid on the performance and fecal microflora of broiler chickens. Sci World J 23, 1-9.

Gao F, Jiang Y, Zhou GH et al. (2008) The effects of xylanase supplementation on performance, characteristics of the gastrointestinal tract, blood parameters and gut microflora in broilers fed on wheat-based diets. Anim Feed Sci Tech 142, 173-184.

Ghorbani MR, Fayazi J, Chaji M (2019) Effect of dietary phytase and NSP-degrading enzymes in diets containing rapeseed meal on broiler performance and carcass characteristics. Res J Biological Sci 4, 258-264.

Hong D, Adeola O (2018) Addition of enzyme to starter and grower diets for ducks. Poult Sci 81, 1842-1849.

Jha R, Das R, Oak S et al. (2020) Probiotics (direct-fed microbial) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: A systematic review. Animals 10, 1-18.

Junqueira L, Carneiro J, Kelly O et al. (2020) Basic Histology, 8th Ed, Editora Guanabara kogan S.A. pp. 289-296.


www.SID.ir

Archive of SID

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Liu C (2013) Strategies for designing transgenic DNA constructs. Methods Molecular Biology 1027, 1-16.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (Foeniculum vulgare) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. Small Rumin Res 193, e106276.

Moazeni S, Mohammadabadi MR, Sadeghi M (2010) Association between UCP gene polymorphisms and growth, breeding value of growth and reproductive traits in mazandaran indigenous chicken. Open J. Anim. Sci 6, 1-8.

Mohammadabadi MR (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 12 (4), 167-181 (In Persian).

Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 12 (1), 177-192 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (in Persian).

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2017) The effect of uncoupling protein polymorphisms on growth, breeding value of growth and reproductive traits in the fars indigenous chicken. Iran J Appl Anim Sci 7, 679-685.

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2018) Melanocortin-3 receptor (mc3r) gene association with growth and egg production traits in fars indigenous chicken. Malays Appl Biol 47, 85–90.

Mohammadifar A, Faghih Imani SA, Mohammadabadi MR (2014) The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. J. Agric. Biotech 5, 125-136 (In Persian).

Sadeghi Alikelayeh A, Mirakhorli N, Akbari MR, Shareghi Brojeni B (2020) Cloning and expression of recombinant xylanase enzyme (xynA) in E. coli. Agric Biotechnol J 4, 1-22.



www.SID.ir

Archive of SID

Serranom M, Frikha PM, Corchero J (2020) Influence of feed form and source of soybean meal on growth performance, nutrient retention, and digestive organ size of broilers, 2. Battery Poult Sci 92, 693-708.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50.

Vandeplas S, Dauphin RD, Thonart P et al. (2010) Effect of the bacterial or fungal origin of exogenous xylanases supplemented to a wheat-based diet on performance of broiler chickens and nutrient digestibility of the diet. Can J Anim Sci 90, 221-228.

Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R et al. (2019) Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. Front Microbiol 11, 10-57.

Wang J, Zhang H, Wu M (2011) Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, Auxyn10A, from Aspergillus usamii. Biotechnol Lett 33, 1029-1038.

Wang W, Yan-long J, Yi-chun L et al. (2018) Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells. Sci Rep 7, 10416.

Yang J, Zhan K, Zhang M et al. (2019) Effects of the use of a combination of two *Bacillus* species on performance, egg quality, small intestinal mucosal morphology, and caecal microbiota profile in aging laying hens. Probio Anti Pro 3, 43-76.

Zafar A, Aftab MN, Din ZU et al. (2016) Cloning, expression and purification of xylanase gene from *Bacillus licheniformis* for use in saccharification of plant biomass. Appl Biochem Biotechnol 178, 294–311.


www.SID.ir

Archive of SID



Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir