Archive of SID

بهینه سازی تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز (سلولاز) قارچ *Aspergillus niger* (R4) و همسانه سازی ژن *egl*B

زهرا رجب خانی، محمدرضا زمانی*، مصطفی مطلبی و حبیب عنصری دیزج یکان

تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۸٦/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۱۷

چکیده

اندوگلوکاناز از آنزیمهای سلولازی می باشد که پیوندهای بتاگلوکوزیدی را به طور اتفاقی در ملکولهای سلولز قطع نموده وتولید قطعات کوتاه الیگوساکاریدی می کند. در این تحقیق، از جدایه R4 قارچ *Aspergillus niger* جهت مطالعه میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکانازی استفاده شد. بدین منظور اثر عوامل محیطی مختلف شامل منابع کربنی، القاء کننده ها، pH و زمان کشت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که CMC به عنوان بهترین منبع کربنی، لاکتوز به عنوان القاء کننده، pH برابر ۸ و روز دوم کشت به عنوان شرایط بهینه تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در این قارچ می باشند. همچنین جهت تکثیر و همسانه سازی ژن کد کننده آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز B (*egl*B) از جدایه انتخابی، استخراج DNA ژنومی به روش CTAB صورت گرفت. برای تکثیر این ژن از دو آغازگر اختصاصی (EGAF, EGAB) استفاده گردید و قطعه مورد انتظار به طول ۱۲۹۷ bp (با احتساب ترادف آنزیمهای برشی) به دست آمد. الگوی هضم آنزیمی (restriction pattern) توسط دو آنزیم *Hind*II و *Pst*I قطعه مذکور را تأیید کرد. پس از تأیید همسانه سازی *egl*B تکثیر شده در ناقل pUC19، ژن مذکور جهت تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه توالی DNA ژن *egl*B همسانه سازی شده با توالیهای مشابه ثبت شده در بانک ژن نشان داد که توالی ژن *egl*B به دست آمده در این تحقیق با توالی ژن *egl*B قارچ *A. niger* با شماره ثبت AJ224452 و قارچ *A. niger* CBS 513.88 با شماره ثبت XM001391932 و نیز توالی ژن *egl*C قارچ *A. kawachii* با شماره ثبت ABO55433 به ترتیب برابر ۹۳/٦، ۹٤/۲ و ۹۸/۸ درصد مشابهت نشان می دهد در صورتی که این ژن با ژن *egl*B قارچ *A. nidulans* با شماره ثبت AF420021 مشابهت چندانی از خود نشان نمی دهد.

واژه های کلیدی: *Aspergillus niger*، آنزیمهای سلولازی، بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز، سلولز، *egl*B

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٤٤٥٨۰۳٦۳، پست الکترونیک: zamani@nigeb.ac.ir

مقدمه

سلولز به عنوان فراوان ترین ماده آلی قابل تجزیه، پلیمری خطی از واحدهای گلوکز با پیوندهای گلیکوزیدی β(1→4) می باشد که می تواند به عنوان بهترین ذخیره برای تولید انرژی، غذا و مواد شیمیایی مورد نیاز انسان در نظر گرفته شود. در دیواره سلولی گیاهان، که قسمت اعظم آن از سلولز می باشد، این ماده در یک زمینه‌ای از پلی ساکاریدهای دیگر از جمله همی سلولز، لیگنین وپکتین قرار می گیرد واین موجب شده که دسترسی آنزیمهای تجزیه کننده به آن کمتر باشد. سلولز علاوه بر دیواره سلولی گیاهان، در جلبکها، بسیاری از قارچها و کیست برخی از پروتوزوئرها نیز وجود دارد (۲).

هیدرولیز سلولز به دو روش شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد. هیدرولیز شیمیایی توسط اسیدها و هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیمهای سلولازی انجام می گیرد. با توجه به مشکلات هیدرولیز اسیدی سلولز، محققان توجه

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتری به هیدرولیز آنزیمی نموده اند. محصولات هیدرولیز معمولاً قندهای احیایی به شکل گلوکز می باشند. مزیت هیدرولیز آنزیمی سلولز نسبت به روشهای هیدرولیز اسیدی، پایین بودن هزینه‌های آن بوده زیرا هیدرولیز آنزیمی در شرایط ملایم یعنی pH برابر ٤/٨ و دمای ٥٠-٤٥ درجه سانتی گراد انجام می گیرد وهمچنین در آن عمل شیمیایی(خورندگی) وجود ندارد. البته هزینه تولید آنزیمهای سلولازی امروزه نسبتاً بالا بوده ولی صنعت آنزیم توجه خاصی به آن داشته و درنظر دارد با استفاده از روشهای بیوتکنولوژی هزینه تولید آنها را کاهش دهد (١ و ٥).

سلولاز ها آنزیمهایی هستند که به صورت کمپلکسی از سه گروه آنزیمی و به طور سینرژیسمی با همدیگر عمل کرده و می توانند پیوند های گلیکوزیدی (٤→ ١)ß را در سلولز هیدرولیز نمایند. این آنزیمها عبارتند از بتا ١ و ٤ اندوگلوکاناز، سلوبیوهیدرولاز و بتا گلوکوزیداز. آنزیم بتا ١ و ٤ اندوگلوکاناز که بنام CMCase نیز نامیده می شود، پیوندهای بتاگلوکوزیدی را به طور اتفاقی از وسط ملکولهای سلولز قطع کرده وتولید قطعات کوتاه الیگوساکاریدی می نماید (١٧).

گونه های مختلف *Aspergillus* یکی از مفیدترین منابع آنزیمهای سلولازی می باشند و صنعت آنزیم توجه خاصی به تولید آنزیمهای سلولازی توسط *A. niger*، از طریق شناسایی وتولید گونه های برتر از نظر تولید آنزیم نموده است. در *A. niger*، مانند قارچهای هوازی دیگر آنزیمهای سلولازی به صورت داخل سلولی، متصل به دیواره سلول و ترشحی بوده و میزان تولید آنزیمهای سلولازی ترشحی از دو نوع دیگر بیشتر می باشد (٤ و ٩).

در این تحقیق، شرایط بهینه تولید آنزیم بتا ١ و ٤ اندوگلوکاناز توسط قارچ *Aspergillus* مورد بررسی قرار گرفته و توالی کامل ژن کد کننده این آنزیم (*egl*B) تکثیر و همسانه سازی گردید.

مواد و روشها

قارچ *Aspergillus* و محیط کشت نگهداری: جهت نگهداری قارچ *Aspergillus niger* (R4) از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) استفاده گردید. برای تهیه این محیط پودر PDA به میزان ٣٩ گرم در لیتر در آب حل و پس از سترون کردن مورد استفاده قرار گرفت.

تولید و سنجش فعالیت آنزیم بتا ١و٤ اندوگلوکاناز: برای به دست آوردن پروتئینهای ترشحی حاوی آنزیم بتا ١ و ٤ اندوگلوکاناز مورد نیاز در این تحقیق، جدایه R4 قارچ *A. niger* در ارلنهای ٢٥٠ میلی لیتری حاوی ١٠٠ میلی لیتر محیط کشت مایع Mandels (١١) تلقیح و سپس محیط کشت به انکوباتور منتقل گردید. دستگاه روی حالت Shaker (١٥٠ دور در دقیقه) و دمای ٣٠ درجه سانتی گراد تنظیم شد، درفواصل ٤٨ ساعته از آنها نمونه برداری و با استفاده از کاغذ صافی سترون، محیط کشت از صافی عبور داده شد. از محیط کشت صاف شده به عنوان محلول حاوی پروتئینهای ترشحی استفاده گردید. برای بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم از منابع کربنی مختلف (Filter paper، Avicel و CMC) به میزان یک درصد (w/v)، pH ٥، ٦، ٧، ٨ و ٩ ، زمانهای کشت (تا ١٢ روز با فواصل ٢ روز برای نمونه برداری) و استفاده از لاکتوز (٢ درصد) به عنوان عامل القاء کننده استفاده شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم بتا ١ و ٤ اندو گلوکاناز به یک میلی لیتر محلول ٠/٧ درصد CMC (به عنوان سوبسترا) ٥٠٠ میکرولیتر نمونه آنزیمی و ٥٠٠ میکرولیتر بافر سیترات ٠/٠٥ مولار با pH برابر ٤/٨ اضافه شد. مخلوط حاصله به مدت یک ساعت در دمای ٥٠ درجه سانتی گراد نگهداری و برای توقف واکنش آنزیمی ٢ میلی لیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید DNS به آن اضافه گردید (٢١). سپس نمونه ها به مدت ١٠ دقیقه در آب جوش قرار داده شده تا در اثر احیاء معرف DNS توسط قند احیا شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز انجام پذیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

برای پایداری رنگ معرف یک میلی لیتر محلول تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم ٤٠ درصد به آن اضافه و جذب نوری آن در طول موج ٥٥٠ نانومتر خوانده شد. در این آزمایش از گلوکز به عنوان استاندارد استفاده گردید.

یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که برای آزاد شدن یک میکرومول قند احیاء شده به صورت گلوکز در مدت یک دقیقه لازم می باشد. برای اندازه گیری مقدار پروتئین از روش Bradford (1976) (۳) استفاده شد که در آن از پروتئین Bovine serum albomin (BSA) به عنوان استاندارد استفاده گردید. فعالیت ویژه آنزیمی (U/mg)، به صورت مقدارفعالیت آنزیم(U/ml) به مقدار کل پروتئین (mg/ml) موجود در محیط، تعریف می شود.

روش استخراج DNA : برای تهیه میسلیوم قارچ، ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع MY (yeast extract 0.2%, malt extract 2%) سترون شده بودند توسط اسپور تلقیح شده و در دمای ۳۰– ۲۵ درجه سانتی گراد همراه با هوادهی به مدت یک هفته انکوبه شدند. پس از جمع آوری میسلیومهای در محیط کشت (یک هفته پس از تلقیح) آنها را با آب مقطر سترون شده شستشو داده ، سپس با کاغذ صافی واتمن شماره یک آبگیری شده و در ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میسلیوم منجمد شده قارچ توسط ازت مایع به صورت پودر درآمده و استخراج DNA ژنومی آن به روش CTAB انجام شد (٦). DNA به دست آمده در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و در ۲۰– درجه سانتی گراد برای استفاده بعدی نگهداری گردید.

شرایط انجامPCR **اختصاصی:** PCR اختصاصی پس از بهینه سازی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲ میلی مولار MgSO4، ۳۰ نانوگرمDNA، ۰/۳ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTP، و ۲/۵ واحد آنزیم pfu-DNA polymerase و ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) (۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl، pH=۸/۸ ، ۱۰۰ میلی مولار KCl ، ۱۰۰ میلی مولار $(NH4)_2SO_4$ ، ۱ درصد تریتون X۱۰۰ و یک میلی گرم در میلی لیتر از BSA) صورت گرفت. سپس واکنش برای ۳۰ دور، شامل دمای ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه، دمای ٥٤ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه انجام گردید. بعد از اتمام ۳۰ دور، واکنش در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

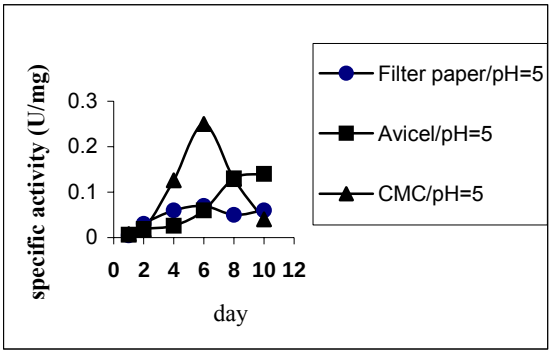
استخراج پلاسمید و همسانه سازی: استخراج پلاسمید به روش Alkaline lysis صورت گرفت (١٦). برای همسانه سازی ژن تکثیر شده از ناقل pUC19 استفاده شد. ناقل مذکور و قطعه تکثیر شده توسط PCR با آنزیمهای اختصاصی پیش بینی شده در دو طرف قطعه تکثیر شده هضم گردید. Ligation توسط آنزیم T4 DNA ligase انجام شد. باکتری *E. coli* (DH5α) با استفاده از کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار به حالت مستعد شده درآمده و به مدت یک ساعت همراه با DNA مربوطه جهت transformation در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس باکتریها پس از شوک حرارتی ٤۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه در محیط SOB (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$) حاوی ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آمپی سیلین گسترش داده شدند. در این مرحله کلونیهای سفید رنگ حاصله به عنوان کلونهای حاوی قطعات مورد نظر انتخاب گردید. قطعه همسانه سازی شده پس از تأیید توسط الگوی هضم آنزیمی، جهت تعیین توالی (توسط شرکت SeqLab Gottingen, Germany) مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک: بررسی مشابهت توالی ژن *eglB* با اطلاعات موجود در بانک ژنی توسط برنامه نرم افزاری Blast انجام شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن

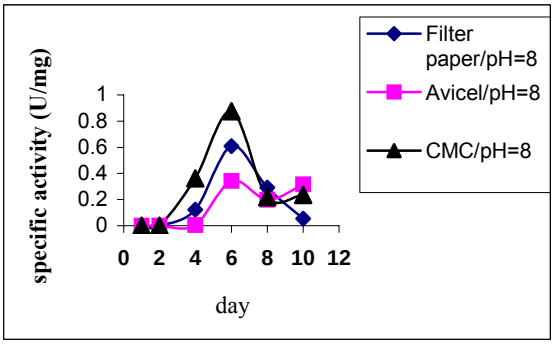
www.SID.ir

Archive of SID

eglB با توالیهای ثبت شده در بانک ژنی توسط برنامه نرم افزاری CLUSTAL W انجام گرفت.



شکل ۱- اثر منبع کربن در فعالیت ویژه آنزیم اندوگلوکاناز در pH=۵

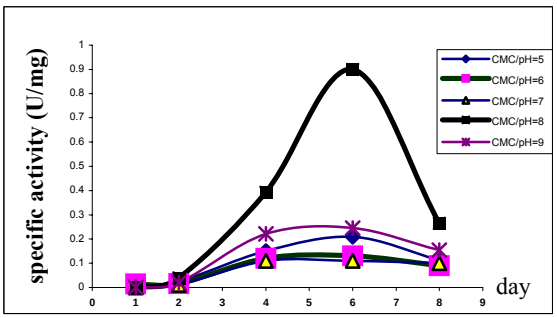


شکل ۲- اثر منبع کربن در فعالیت ویژه آنزیم اندوگلوکاناز در pH=۸

نتایج

بررسی میزان تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز : در این تحقیق جهت بررسی و مطالعه تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز از جدایه R4 قارچ *A . niger* استفاده گردید. عوامل مختلفی نظیر دما، pH، زمان کشت، نوع منبع کربن و عوامل القاء کننده می توانند بر میزان تولید آنزیمهای سلولازی توسط قارچها مؤثر باشند. در این تحقیق جهت بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز، نقش عوامل فوق مورد مطالعه قرار گرفت. برای رسیدن به شرایط بهینه جهت تولید این آنزیم ابتدا منبع کربنی در pH های ۵ و ۸ هر ٤۸ ساعت به مدت ده روز مورد بررسی قرار گرفت.

مقایسه نتایج به دست آمده با استفاده از سه منبع کربنی مختلف (CMC, Avicel, Filter paper) نشان می دهد که در هر دو pH بیشترین فعالیت ویژه آنزیمی درحضور CMC و در روز ششم می باشد (شکل ۱ و۲). سپس فعالیت ویژه آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز با حضور CMC در pH های مختلف بررسی گردید. بررسی نتایج به دست آمده نشان می دهد که ماکزیمم فعالیت ویژه این آنزیم در روز ششم، در حضور CMC ، و pH= ۸ می باشد (شکل ۳). در مرحله بعد اثر لاکتوز به عنوان عامل القاء کننده بر روی فعالیت ویژه آنزیم در حضور CMC و pH= ۸ در روزهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. دراین بررسی مشخص گردید لاکتوز به عنوان یک عامل القاء کننده مناسب برای تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز می باشد. زیرا علاوه بر افزایش تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز باعث تسریع در تولید آن نیز می گردد (شکل ٤)، به نحوی که تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در روز دوم کشت (به جای روز ششم) به حداکثر میزان خود (حدود ۲/۳ برابر نسبت به حالت غیر القاء) می رسد.

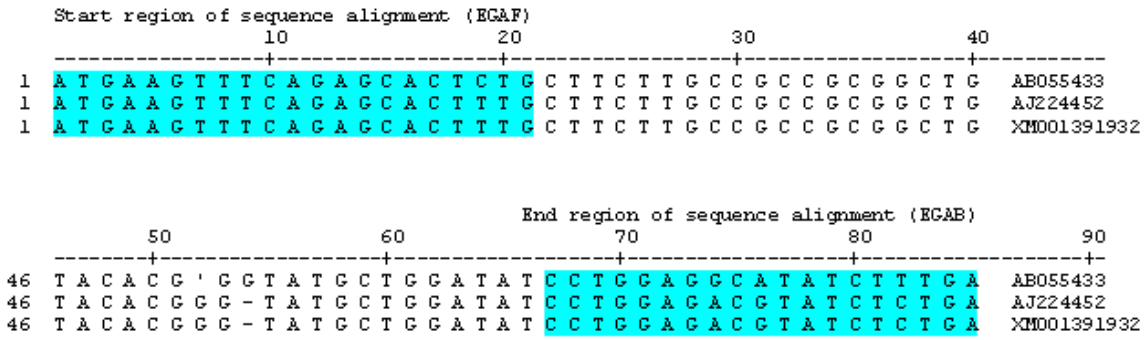


شکل ۳- فعالیت ویژه آنزیم اندوگلوکاناز در pH های مختلف

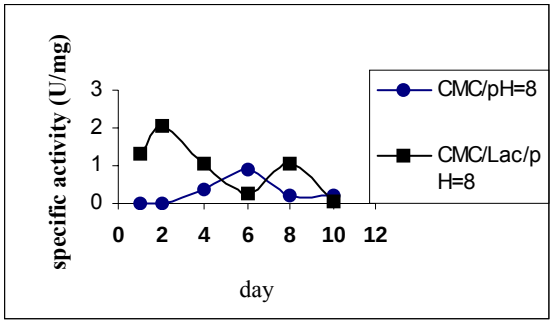
بررسی نتایج به دست آمده از شرایط فوق نشان می دهد که احتمالاً بهترین شرایط برای کشت جدایه ها و تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در محیط کشت، عبارت از CMC به عنوان منبع کربن، ٤۸ ساعت در pH برابر ۸ و لاکتوز به عنوان القاء کننده می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٥- طراحی آغازگرهای اختصاصی EGAF و EGAB : همردیفی ترادف نوکلئوتیدی سه ژن اندوگلوکاناز موجود در بانک ژنی، ژن *eglC* قارچ *A. kawachii* (ABO55433)، ژن *eglB* قارچهای *A. niger* (AJ224452, XM001391932)، محل آغازگرها به صورت سایه دار مشخص شده است.



شکل ٤- اثر لاکتوز در فعالیت ویژه آنزیم اندوگلوکاناز در حضور CMC در pH=۸

تکثیر و همسانه سازی ژن *eglB* از جدایه R4 قارچ *A. niger*

جهت تکثیر ژن *eglB* جدایه R4 قارچ *A. niger* طراحی آغازگر با استفاده از همردیف کردن توالیهای ژن *eglB* موجود در بانک ژن انجام شد (شکل ٥). براساس مشابهت موجود در این توالیها، آغازگرهای اختصاصی EGAF/EGAB طراحی گردید. به منظور تکثیر این ژن از DNA ژنومی این جدایه که به روش CTAB استخراج شده بود و آنزیم *pfu* پلی مراز استفاده گردید. طول DNA تکثیر شده توسط این آغازگرها با احتساب توالی مربوط به جایگاههای آنزیمی bp ۱۲۹۷ مورد انتظار می باشد (۲۰). بررسی قطعه تکثیر شده فوق در شرایط بسیار اختصاصی، نشان می دهد که این آغازگرها، DNA با طول مورد انتظار را تکثیر می نمایند (شکل ٦).

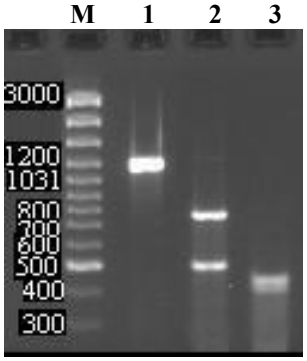
با توجه به اینکه، حتی در شرایط PCR اختصاصی، احتمال دارد آغازگرها قطعاتی خارج از محدوده ژن مورد نظر را تکثیر کنند، به منظور تأیید محصول PCR ، الگوی هضم آنزیمی DNA تکثیر شده با آنزیمهای برشی مناسب، مورد مطالعه قرار گرفت. قطعه حاصل از هضم محصولات PCR، بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. نتایج به دست آمده از الگوی هضم آنزیمی DNA تکثیر شده با آنزیمهای *Hind*II و *Pst*I، صحت قطعه مذکور را مورد تأیید قرار داد (شکل ٦). با توجه به نتایج حاصل از الگوی هضم آنزیمی با استفاده از عمل دو آنزیم فوق می توان نتیجه گیری نمود که قطعه‌ای که به طول حدود kb ۱/۲ توسط آغازگرهای EGAF/EGAB تکثیر گردیده است ، همان قطعه مورد انتظار از ژن *eglB* می باشد. این قطعه تمامی ORF (Open Reading Frame) ژن مذکور را دارا می باشد.

با توجه به اینکه در دو آغازگر مورد استفاده EGAF و EGAB به ترتیب جایگاههای هضم آنزیمی *BamH1* و *EcoR1* برای همسانه سازی در ناقل pUC19 طراحی شده اند. لذا قطعه تکثیر شده همراه با ناقل مربوطه با آنزیمهای *EcoRI* و *BamHI* هضم و مخلوط ligation آنها به سلولهای مستعد تازه تهیه شده باکتری *E. coli* DH5α منتقل گردید. پلاسمید حاوی DNA تکثیر شده از

www.SID.ir

Archive of SID

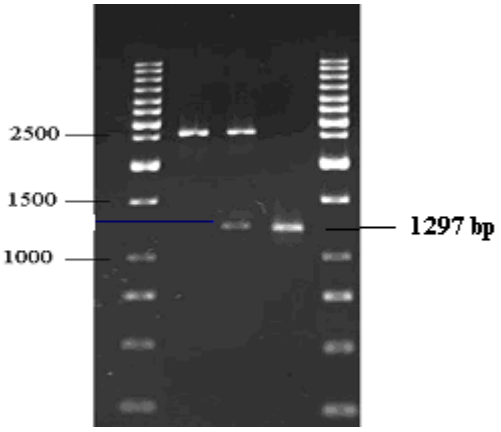
کلونیهای سفید رنگ به دست آمده در محیط کشت انتخابی حاوی آنتی بیوتیک، استخراج گردید. جهت شناسایی سریع پلاسمیدهای نوترکیب از الگوی DNA هضم نشده کلونیهای سفید رنگ استفاده گردید. همچنین همسانه شدن قطعه تکثیر شده توسط الگوی هضم آنزیمی مورد بررسی و تأیید قرار گرفت (شکل ۷). پلاسمید تأیید شده به نام pZR1 نامگذاری و پس از خالص سازی برای تعیین توالی استفاده گردید.



شکل ٦- تکثیر ژن *egl*B جدایه R4 قارچ *A. niger* و الگوی هضم آنزیمی آن: ۱) ژن تکثیر شده *egl*B با استفاده از دو آغازگر EGAF/EGAB (حدود ۱/۲ kb) ، ۲) هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Pst*I ، ۳) هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Hind*II ، M) مارکر DNA . هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده را مورد تأیید قرار می دهد.

بررسی مشابهت توالی به دست آمده از این ژن با ژنهای مشابه در NCBI نشان داد که توالی ژن *egl*B به دست آمده در این تحقیق با توالی ژن *egl*B قارچ *A. niger* با شماره ثبت AJ224452 و قارچ *A. niger* CBS 513.88 با شماره ثبت XM001391932 و نیز توالی ژن *egl*C قارچ *A. kawachii* با شماره ثبت ABO55433 به ترتیب برابر ۹۳/٦، ۹٤/۲ و ۹۸/۸ درصد مشابهت نشان می دهد در صورتی که مشابهت این ژن با توالی ژن *egl*B قارچ *A. nidulans* با شماره ثبت AF420021 به میزان ۸/۷ درصد می باشد (شکل ۸).

M 1 2 3 M



شکل ۷ – تأیید سازه pZR1: ۱) ناقل pUC19 هضم شده با آنزیم *Eco*RI، ۲) سازه pZR1 هضم شده با آنزیمهای *Eco*RI و *Bam*HI، ۳) محصول PCR ژن *egl*B ، M) مارکر DNA

بحث

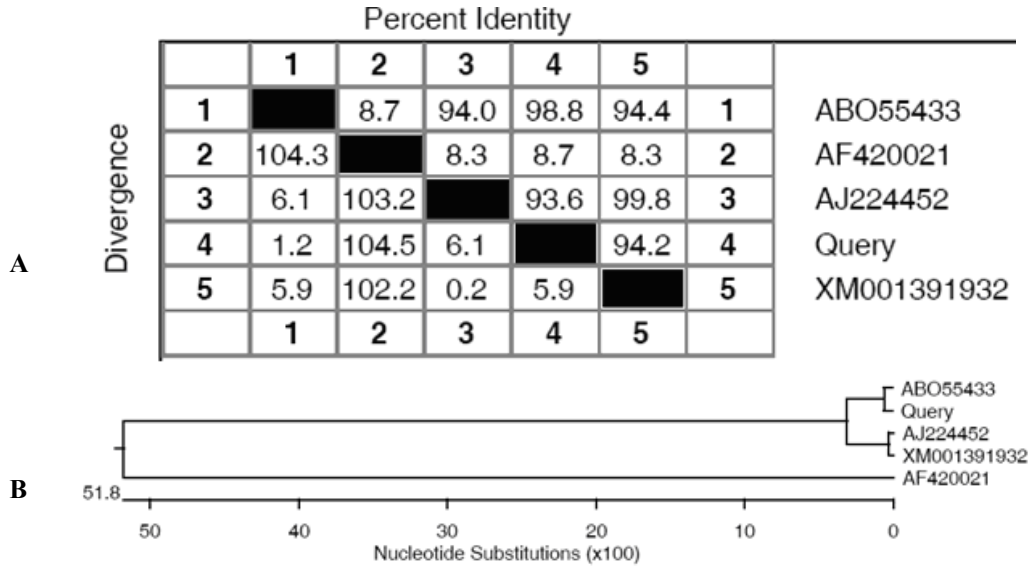
سلولز فراوان ترین ماده آلی قابل تجزیه می باشد که سالیانه حدود 10^{11} تن از آن در طبیعت تولید می گردد (۱۰). مصرف انرژی در دهه های اخیر به طور پیوسته‌ای با افزایش جمعیت جهان، افزایش یافته است ونفت خام به عنوان منبع اصلی انرژی با افزایش تقاضا روبرو شده است به همین دلیل بیشتر کشور ها با مشکل سوخت مواجه می باشند. از موارد عمده استفاده از مواد سلولزی، تولید الکل و گلوکز با استفاده از آنزیمهای سلولازی می باشد (۷، ۱۳ و ۱۵). تحقیقات وسیعی برای تبدیل مواد سلولزی به اتانل به عنوان یک منبع انرژی قابل تجدید صورت گرفته است. تبدیل سلولز به اتانل شامل دو فرآیند می باشد که عبارتند از: هیدرولیز سلولز به قندهای قابل تخمیر، و تخمیر این قندها به اتانل. با توجه به مشکلات هیدرولیز اسیدی سلولز، امروزه توجه بیشتری به هیدرولیز آنزیمی سلولز که به وسیله آنزیمهای سلولازی انجام می‌گیرد معطوف شده است.

باکتریها وقارچها از تولید کننده های آنزیمهای سلولازی می باشند. اگر چه برخی از باکتریها مانند *Colestridioum thermocellum* و *Bacteroides cellulosolvens* آنزیمهای سلولازی با فعالیت بالا تولید می کنند، اما میزان تولید

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم آنها کم می باشد. لذا امروزه در صنعت از قارچها جهت تولید آنزیمهای سلولازی استفاده می کنند. برخی از قارچهایی که برای تولید آنزیمهای سلولازی گزارش شده‌اند، شامل *Sclerotium rolfsii, P. chrysosporhoum* و گونه هایی از جنسهای *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Schizophyllum* و *Penicillium* می باشند (۱۸ و ۱۹). گونه های مختلف *Aspergillus* یکی از مفیدترین منابع آنزیمهای سلولازی از جمله آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز می باشند (۹).



شکل ۸ – A) درصد مشابهت توالی نوکلئوتیدی ژن *egl*B جدایه R4 قارچ *A. niger* (Query)، با توالی ژن *egl*B قارچهای *A. niger* (XM001391932, AJ224452) و قارچ *A. nidulans* (AF420021) و نیز ژن *egl*C قارچ *A. kawachii* (ABO55433) ، B) دندروگرام حاصل از آنالیز توالیهای نوکلئوتیدی ژنهای *egl*B و *egl*C.

در این تحقیق از جدایه بومی (R4) قارچ *A. niger* جهت مطالعه تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز استفاده گردید. بررسی شرایط بهینه تولید این آنزیم نشان داد که آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در pH برابر ۸، CMC به عنوان منبع کربن، لاکتوز به عنوان القاء کننده پس از ٤۸ ساعت به میزان حداکثر تولید می شود. افزودن لاکتوز به عنوان القاء کننده به محیط کشت قارچ باعث می شود که تولید این آنزیم به جای روز ششم در روز دوم به حداکثر میزان تولید خود برسد. بعد از روز دوم تولید این آنزیم از یک روند کاهشی برخوردار بوده و تا روز ششم به حداقل میزان خود می رسد. به نظر می آید که تولید زیاد آنزیم در روز دوم و آزاد شدن گلوکز به میزان فراوان موجب مهار تولید آنزیم در روزهای بعدی شده است. این نتایج با گزارش Busto و همکاران (۱۹۹۵) (٤) مطابقت نشان می دهد.

استفاده از آغازگرهای اختصاصی که از همردیف کردن توالیهای موجود در NCBI طراحی شده بودند قادر بوده تا ژن کامل *egl*B را از جدایه R4 قارچ *A. niger* تکثیر نموده که توسط الگوی هضم آنزیمی نیز تأیید گردید. بررسی مشابهت توالی ژن همسانه شده با سایر توالیهای بانک ژنی نشان داد که این توالی با توالی ژنهای *egl*B از قارچ *A. niger* (۲۰) و قارچ *A. niger* CBS 513.88 (۱٤) و نیز توالی ژن *egl*C از قارچ *A. kawachii* (۸) مشابهت نسبتاً زیادی را از خود نشان می دهد در صورتی که با ژن *egl*B از قارچ *A. nidulans* (۱۲) دارای مشابهت

www.SID.ir

Archive of SID

بسیار کمی می باشد (حدود ۸/۷ درصد). از این ژن همسانه شده که مورد تأیید نیز قرار گرفته است می توان با استفاده از ناقل بیانی یوکاریوتی جهت بیان و تولید آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز در میزبان مناسب یوکاریوتی استفاده نمود.

منابع

1- Archer, D., and J. F. Peberdy. 1997. The molecular biology of secreted enzyme production in fungi. Crit. Rev. Biotechnol. 17:273-306

2- Beguin, P. 1990. Molecular Biology of Cellulose Degradation. Annu. Rev. Microbiol. *44*: 219-248.

3- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and sensitive Method for the quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein -Dye Binding. Analytical Biochemistry *72*: 248-254.

4- Busto, M. D., Ortega, N., and Mateos, P. M. 1995. Induction of B-Glucosidase in fungal and soil Bacterial cultures. Soil Biol. Biochem. *27* (7): 949-954.

5- Dipardo, J. 1999. Outlook for Biomass Ethanol Production and Demand. The National Energy Modeling System: An Overview, DOE/EIA-0581, 49.

6- Doyle, J. J. and Doyle, J.L.. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. **19**:11-15.

7- Gusakov, A.V.,Sinitsyn, A.P.,Markov, A.V.,Sinitsyna, O.A.,Ankudimova, N.V.,Berlin, A.G. 2001. Study of protein adsorption on indigo particles confirms the existence of enzyme-indigo interaction sites in cellulase molecules. Journal of Biotechnology.,**87**: 83-90

8- Ito K., H. Shimoi, K. Iwashita, Y. Hara, and Y. Hinoki. 2001. Clomimg and characterization of endoglucanase genes from an industrial fungus *Aspergillus kawachii*. Direct submission to NCBI.

9- Kang, S. W., Ko, E. H., Lee, J. S., and Kim, S. W. 1999. Over-production of -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. *Biotechnology Letters 21*: 647–650.

10- Kim,J.O., Park, S.R., Lim, W.J., Ryu, S.K., Kim, M.K., An, C.L., Cho, S.J., Park, Y.W., and Kim, M.K. 2000. Cloning and characterization of thermostable endoglucanase (Cel8Y) from the hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* VF5. Biochemical and Biophysical Research communications. 279: 420-426.

11- Linko, M. 1977. An evoluation of enzymatic hydrolysis of cellulostic materials. Adv. Biochem. Eng. *5*: 27-46.

12- Lockington R. A., L. Rodbourn, S. Barnett, C.J. Carter, and J.M. Kelly 2002. Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans.* Fungal Genetic Biology. 37(2): 190-196.

13- Park, J.W., Park, K., Song, H., Shin, H. 2002. Sacchrificatin and adsorptin characteristics of modified cellulases with hydrophilic/hydrophobic copolymers. Journal of Biotechnology.,**93**: 203-208

14- Pel H.J., J.H. de Winde, D.B. Archer, P.S. Dyer, and G. Hofmann. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. Nat. Biotechnol. 25(2): 221-231.

15- Persson, I., Tjerneld F., Hahn-Hagerdahl B., 1991. Fungal cellulytic enzyme production: a review. Process Biochem. **26**: 65-74.

16- Sambrook, J. and Russell , D.W. 2000. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NewYork, NY.

17- Schulein, M. 2000. Protein engineering of cellulase, Biochemica et Biophysica Acta : 239-252

18- Sun, Y., and Cheng, J. (2001). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. Bioresource Technology *38*: 1-11.

19- Thygesen, A., Thomsen, A. B., Schmidt, A. S., Jŕgensen, H., Ahring, B. K., and Olsson, L. 2003. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. Enzyme and Microbial Technology *32*: 606-615.

20- van Peij N.N., M.M. Gielkens, R.P. de Vries, J. Visser, and L.H. de Graaff. 1998. The transcription activator XInR regulates both xylanolytic and endoglucanases gene expression in *Aspergillus niger*. Applied Environmental Microbiology. 64(10): 3615-3619.

21- Wood, T. M. and Bhat M. 1998. Methods for measuring cellulase activities. Methods Enzymol. 160:87-112.

www.SID.ir

Archive of SID

Optimized conditions for production of β-1,4 endoglucanase enzyme in *Aspergillus niger* (R4) and cloning of *egl*B gene

Rajabkhani Z., Zamani M.R., Motallebi M., and Onsori H.

National Research Center for Genetic Engineering & Biotechnology (NRCGEB), Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Endoglucanase is a subgroup of cellulases that are able to cut cellulose at accessible points along its length and produces oligosaccharide fragments. In this research β-1,4 endoglucanase activity of isolate R4 of *Aspergillus niger* was assayed under various environmental conditions, including carbone source, pH, inducer and culture period. The results showed that isolate R4 showed the highest enzyme specific activity in optimum conditions as follow: CMC as carbone source, pH=8, lactose as inducer and culture period of 2 days. For amplification and study of β-1,4 endoglucanase gene , CTAB method used for DNA extraction. The expected PCR product with 1297 bp was amplified using *pfu* DNA polymerase and two specific primers (EGAF/EGAB). The amplified fragment was confirmed by restriction pattern using *Pst*I and *Hind*II. The amplified DNA fragment was cloned into pUC19 and sequenced. Homology between this sequence and other reported related genes in GenBank are discussed.

Key words: β-1,4 Endoglucanase- Aspergillus, cellulose, cellulases enzymes.

www.SID.ir