Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Research article

Evaluation of trans-glutaminase enzyme production in native Streptomyces isolated from agricultural soils of Qom province

Somayeh Bahri Master's degree, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. so.bahri.69@gmail.com

Seyyed Soheil Aghaei Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran **(Corresponding author).** soheilaghaee@yahoo.com

Seyed Mohammad Hossein Razavian Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. mh_razavy@yahoo.com

Faezeh kabiri Ph.D., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. Kabiri_10@yahoo.com

Abstract

Purpose: Transglutaminase enzyme is a type of protease enzyme of acyltransferase type, the bonds formed by this enzyme cause strength and stability in the products of various industries. Actinobacteria have biotechnological applications due to their ability to produce secondary metabolites and enzymes. The present study was conducted with the aim of identifying and screening trans-glutaminase-producing actinobacterial strains from the soils of the rhizosphere area of native medicinal plants in Qom province.

Materials and Methods: In this research, 100 samples of soil from agricultural fields in Qom province were collected in completely sterile conditions and after preparing successive dilutions, they were cultured on ISP3 agar culture medium. Actinobacterial isolates were screened by transglutaminase enzyme specific identifier. Environmental factors including culture medium and shaker cycle were optimized on isolate growth and enzyme production. In order to identify and investigate the phylogeny of actinobacterial isolates, phenotypic and molecular methods were used.

Findings: Out of 40 actinobacterial isolates, 5 strains showed the ability to produce the enzyme, based on the halo of color change by the specific substrate N-Carbobenzoxy (CBZ). The selected isolate with the highest amount of enzyme production, in terms of 16S rRNA gene synonymy, was similar to Streptomyces genus.

Cite this article: Bahri S, Aghaei SS, Razavian SMH & Kabiri F. Evaluation of trans-glutaminase enzyme production in native Streptomyces isolated from agricultural soils of Qom province. *Applied Biology*. 2022; 12(48): 103-119.

Received: 2022/10/04 ; **Revised:** 2022/10/28 ; **Accepted:** 2022/11/16 ; **Published online:** 2022/11/20

© the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

Conclusion: The results of this study showed that Streptomyces isolate native to agricultural soils of Qom province has a significant ability to produce transglutaminase enzyme, which was studied for the first time. This isolate can be used in various food and pharmaceutical industries to produce transglutaminase enzyme.

Keywords: Transglutaminase, Enzyme, Actinobacteria, Streptomycete, Rhizosphere.

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

مقاله پژوهشی

ارزیابی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز در جدایه استرپتومیست بومی جدا شده از خاک‌های کشاورزی استان قم

سمیه بحری کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. so.bahri.69@gmail.com

سید سهیل آقایی استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران (نویسنده مسئول). soheilaghaee@yahoo.com

سید محمدحسین رضویان دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. mh_razavy@yahoo.com

فائزه کبیری دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. Kabiri_10@yahoo.com

چکیده

هدف: آنزیم ترنس گلوتامیناز نوعی آنزیم پروتئاز از نوع آسیل ترانسفراز است که پیوندهای تشکیل شده توسط این آنزیم سبب ایجاد استحکام و پایداری در محصولات صنایع مختلف می‌گردد. آکتینوباکتری‌ها به دلیل توانایی در تولید متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها، دارای کاربرد زیست فناورانه هستند. مطالعه حاضر با هدف شناسایی و غربالگری سویه‌های آکتینوباکتری مولد ترنس گلوتامیناز، از خاک‌های ناحیه ریزوسفری گیاهان دارویی بومی استان قم انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ۱۰۰ نمونه از خاک مزارع کشاورزی استان قم در شرایط کاملاً استریل جمع‌آوری گردید و پس از تهیه رقت‌های متوالی در سطح محیط کشت ISP3 آگار، کشت داده شد. جدایه‌های آکتینوباکتری توسط شناساگر اختصاصی آنزیم ترنس گلوتامیناز غربالگری شدند. فاکتورهای محیطی شامل محیط کشت و دور شیکر بر رشد جدایه و تولید آنزیم، بهینه‌سازی گردید. به منظور شناسایی و بررسی فیلوژنی جدایه آکتینوباکتری، از روش‌های فنوتیپی و مولکولی استفاده شد.

یافته‌ها: از میان ۴۰ جدایه آکتینوباکتری، ۵ سویه، براساس هاله تغییر رنگ توسط سوبسترای اختصاصی N-Carbobenzoxy (CBZ)، توانایی تولید آنزیم را نشان دادند. جدایه منتخب با بیشترین میزان تولید آنزیم، از نظر ترادف ژن 16S rRNA، با جنس استرپتومایسس شباهت داشت.

استناد به این مقاله: بحری س، آقایی س س، رضویان س م ح، کبیری ف. ارزیابی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز در جدایه استرپتومیست بومی جدا شده از خاک‌های کشاورزی استان قم. *بیولوژی کاربردی*. ۱۴۰۱؛ ۱۲(۴۸): ۱۰۳-۱۱۹.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۲ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۸/۰۶ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۸/۲۵ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۰۸/۲۹

© نویسندگان **ناشر:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که جدایه استرپتومیست بومی خاک‌های کشاورزی استان قم، دارای توانایی قابل ملاحظه‌ای برای تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز است که برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت. این جدایه می‌تواند در صنایع غذایی و دارویی مختلف جهت تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: ترنس گلوتامیناز، آنزیم، آکتینوباکتری، استرپتومیست، ریزوسفر.

۱. مقدمه

آنزیم ترنس گلوتامیناز نوعی آنزیم پروتئاز از نوع آسیل ترانسفراز بوده که موجب تشکیل پیوندهای کووالانسی بین پپتیدی در بین گروه‌های آمین آزاد اسید آمینه لیزین و گروه آسیل اسید امینه گلوتامین در انتهای زنجیره پروتئینی می‌شود. پیوندهای تشکیل شده توسط این آنزیم در مقابل حرارت و فعالیت پروتئولیتیکی بسیار مقاوم و پایدار هستند (۱). آنزیم ترنس گلوتامیناز قادر است ترکیبات پروتئینی دارای اسیدهای آمینه فوق را بدون حرارت‌دهی از حالت مایع به ژل تبدیل کند که باعث بهبود بافت محصول، پایداری حرارتی و افزایش ظرفیت نگهداری آب در پروتئین‌ها می‌گردد. بنابراین، آنزیم ترنس گلوتامیناز در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی اهمیت زیادی دارد. همچنین در مهندسی بافت، تولید پلی اتیلن گلیکول، آنتی بادی، صنایع نساجی و چرم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲) که باعث افزایش کیفیت محصول نهایی، کاهش هزینه‌ها و کاهش تولید محصولات جانبی سمی می‌شود (۳). با توجه به کاربرد زیاد آنزیم ترنس گلوتامیناز در صنایع مختلف، برای تولید این آنزیم از منابع مختلف گیاهی، حیوانی و میکروبی استفاده می‌گردد. منابع گیاهی از جمله نهاندانگان (۴) و منابع حیوانی از جمله کبد گاو و خوک به منظور بررسی تولید این آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته است (۵). به علت هزینه‌های بالای تولید این آنزیم از منابع حیوانی و گیاهی، امروزه منابع میکروبی برای تولید این آنزیم مورد توجه قرار گرفته‌اند. ترنس گلوتامیناز میکروبی، یک آنزیم خارج سلولی و در طیف گسترده‌ای از دما و اسیدیته فعالیت می‌کند (۶). این آنزیم در باکتری‌هایی مانند استرپتومایسس موبارینسیس[1] (۷)، استرپتومایسس نتروپسیس[2](۸)، استرپتومایسس فرادی[3] (۹) و استرپتومایسس هیگروسکوپیکوس[4] (۱۰) یافت شده است. آکتینوباکتری‌ها یکی از شاخه‌های بسیار گسترده میکروبی هستند و در اکوسیستم‌های مختلف آبی و خاکی منتشر شده‌اند که شامل جنس‌های بیماری‌زا (مایکوباکتریوم، کورینه باکتریوم، نوکاردیا، پروپیونی باکتریوم، تروفریما)، ساکنان خاک (میکرومونوسپورا، استرپتومیسس)، همزیست با گیاهان (فرانکیا[5]) و گونه‌های ساکن دستگاه گوارش (بیفیدوباکتریا) هستند. این باکتری‌ها گرم مثبت، دارای درصد بازهای آلی سیتوزین - گوانین بالا در

1. Streptomyces mobaraensis
2. Streptomyces netropsis
3. Streptomyces fradiae
4. Streptomyces hygroscopicus
5. Frankia

رشته DNA و اغلب رشته‌ای هستند که بهترین توانایی را در تولید متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف را دارند (۱۱). نمونه‌های زیادی از آکتینوباکتری‌ها، تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه هستند (۱۲). در میان آکتینوباکتری‌ها، گروه استرپتومایسس بیشترین اهمیت را از نظر اقتصادی دارد؛ زیرا ۵۰ تا ۵۵ درصد از آنتی‌بیوتیک‌هایی که به صورت بالینی مصرف می‌شوند، توسط استرپتومایسس‌ها تولید می‌شود (۱۳). همچنین بسیاری از علف‌کش‌ها، ضد قارچ‌ها، ضد تومورها و داروهای ضد احتقان را تولید می‌کنند (۱۴). آکتینوباکتری‌ها نقش عمده‌ای در جامعه میکروبی ریزوسفر دارند و بنابراین منطقه ریزوسفر به عنوان یکی از بهترین زیستگاه‌ها برای جداسازی این میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته می‌شود. آکتینوباکتری‌هایی که از اکوسیستم‌های مختلف جدا شده‌اند، تولیدکننده‌های بالقوه آنزیم ترنس گلوتامیناز هستند. تحقیقات نشان داده‌اند که با استفاده از باکتری استرپتومیسس مبارنسیس، مطالعات گسترده‌ای انجام شده تا بهره‌وری آنزیم افزایش یابد و همچنین اخیراً تحقیقات در زمینه ژن رمزگذاری بیوسنتز ترنس گلوتامیناز در میزبان مناسب انجام شده است (۵). به طور کلی حوزه کاربردهای آنزیم ترنس گلوتامیناز به چند شاخه اصلی تقسیم می‌شود، از جمله صنعتی، غذایی، دارویی، بیوتکنولوژی، چرم‌سازی که در مجموع تاثیر استفاده از آنزیم، افزایش کیفیت محصول نهایی و کاهش چشمگیر هزینه‌ها بوده و شاهد تولید محصولات جانبی سمّی نخواهیم بود (۵). از این‌رو، لزوم بدست آوردن سویه‌های بومی جدید آکتینوباکتری با توانایی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز، حس می‌شود. با توجه به کاربردهای مهم آنزیم ترنس گلوتامیناز در صنایع مختلف و توانایی بالای آکتینوباکتری‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه، با فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله آنزیم‌هایی با کاربردهای درمانی و صنعتی (۱۵)، هدف تحقیق حاضر تولید میکروبی آنزیم ترنس گلوتامیناز به کمک آکتینوباکتری‌های بومی جدا شده از خاک‌های کشاورزی استان قم است.

۲. مواد و روش‌ها

تمامی محیط کشت‌ها شامل آکتینومیست ایزولیشن آگار، ISP1، ISP2، ISP3، ISP9، LB، BHI و نوترینت آگار، از شرکت مرک آلمان استفاده شد. معرف اختصاصی آنزیم ترنس گلوتامیناز (CBZ) و تری کربوکسیلیک اسید (TCA) جهت شناسایی اختصاصی آنزیم از شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا استفاده شد.

در این تحقیق ۱۰۰ نمونه خاک از مزارع کشاورزی استان قم در ناحیه ریزوسفر گیاهان دارویی

از قبیل آویشن، علف چای، اسطوخودوس و نعنا جمع‌آوری شد و چند نمونه از خاک کشاورزی آویشن نیز از جهاد کشاورزی دریافت گردید. نمونه‌ها تحت شرایط استریل در دمای ثابت ۴- درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شد و در دمای مناسب نگهداری گردید.

برای جداسازی و خالص‌سازی آکتینوباکتری‌های خاک، ۱۰ گرم از نمونه خاک با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل در ارلن ۲۰۰ میلی لیتری مخلوط شد. سوسپانسیون خاک در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با دور ۱۸۰ دور در دقیقه، برای مدت ۳ تا ۷ روز گرماگذاری شد. سپس از مایع رویی سوسپانسیون خاک، رقت‌های متوالی تا رقت $۱۰^{-۶}$ تهیه شد. سپس به منظور به دست آوردن کلنی‌های خالص آکتینوباکتری، از هر رقت بر روی محیط کشت ISP3[1] کشت داده شد و در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۳ تا ۷ روز گرماگذاری گردید (۱۶).

سنجش کیفی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز به روش دیسک‌گذاری و استفاده از سوپرناتانت انجام شد (۱۷). در روش دیسک‌گذاری، ابتدا ۴۰ جدایه آکتینوباکتری در سطح محیط کشت ISP1 کشت داده شد. سپس دیسک‌های حاوی سوبسترای اختصاصی CBZ[2] (شرکت سیگما، آمریکا) بر روی کلنی جدایه‌های آکتینوباکتری به مدت ۶۰, ۱۲۰, ۱۸۰و ۲۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. جدایه‌های دارای هاله تغییر رنگ، به وسیله سوبسترای اختصاصی CBZ بررسی شد. جدایه‌ای که بیشترین قطر هاله را داشت، به عنوان جدایه منتخب در نظر گرفته شد. سنجش کیفی تولید آنزیم با استفاده از محلول رویی جدایه آکتینوباکتری نیز انجام گرفت. جدایه آکتینوباکتری به محیط ISP1 براث در حجم ۱۰۰ میلی لیتر، تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز با دور ۱۶۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. سپس محلول رویی جدایه آکتینوباکتری توسط سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد جدا شد. در نهایت با سنجش جذب نوری در ۵۲۵ نانومتر، جدایه‌ای با بیشترین میزان تولید آنزیم شناسایی گردید (۱۷).

سنجش کمّی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز نیز به روش دیسک‌گذاری و استفاده از محلول رویی جدایه منتخب آکتینوباکتری انجام شد. در روش دیسک‌گذاری، جدایه منتخب در محیط کشت ISP1 کشت داده شد. سپس دیسک‌های آغشته به مخلوط واکنش، با نسبت‌های ذکر شده در

1. International Streptomyces Project Medium 3
2. N-Carbobenzoxy

پروتوکل شرکت سیگما، با پنس استریل بر روی کشت جدایه‌های ترنس گلوتامیناز مثبت، به مدت ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری و میزان قطر هاله ایجاد شده، بررسی گردید. در روش سوپرناتانت، جدایه منتخب آکتینوباکتری به محیط کشت ISP1 تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز با دور ۱۶۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. سپس محلول رویی جدایه منتخب آکتینوباکتری توسط سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد جدا شد. بعد از اضافه نمودن مخلوط سوبسترا به محلول رویی، جذب نوری مخلوط واکنش به مدت ۴۰ دقیقه با فاصله‌های زمانی ۲ دقیقه در طول موج ۵۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری UV-vis (Cary100, Varian, Australia) بررسی شد (۱۸).

در مورد بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه آکتینوباکتری و تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز، فاکتورهایی نظیر تاثیر محیط کشت‌های مختلف، تاثیر دورهای مختلف شیکر بر رشد جدایه آکتینوباکتری و تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز در طول موج ۵۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری UV-vis بررسی شد (۱۹).

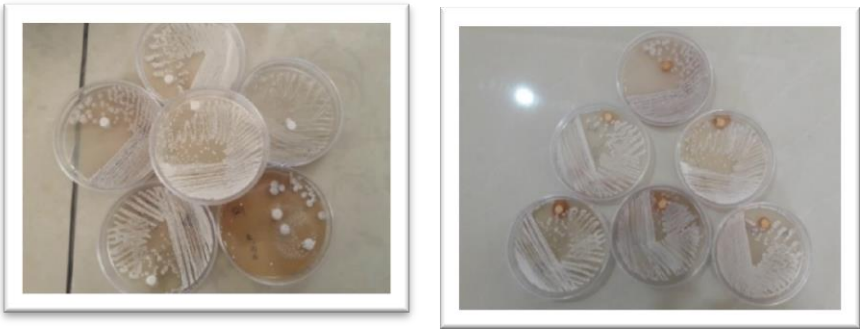
جهت بررسی فنوتیپی جدایه آکتینوباکتری تولیدکننده آنزیم ترنس گلوتامیناز، از خواص ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن استفاده گردید. بدین منظور، کشت سه روزه باکتری مورد نظر در محیط کشت ISP3 از نظر تیپ‌بندی ظاهری، شکل و رنگ کلنی‌ها بررسی شد (۲۰). جهت بررسی ژنوتیپی جدایه منتخب آکتینوباکتری (سویه M)، در ابتدا DNA باکتری توسط کیت استخراج ژنوم (Jena Bioscience GmbH, Germany) استخراج گردید. سپس کیفیت باند DNA با الکتروفورز بر روی ژل آگارز (۱) درصد مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تکثیر ژن ناحیه 16S rRNA از روش PCR و پرایمرهای (27F-5′-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3′), 1492R-5′-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′), استفاده گردید. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از (۱) میکرولیتر DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix, 2X (سیناژن، ایران)، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر و (۱) میکرولیتر از پرایمرها، انجام شد. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر،[1] با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و در

1. Eppendrorf Mastercycler gradient, Germany

ادامه واکنش تکثیری DNA در ۳۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه واسرشت ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت (۱) دقیقه، گسترش اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت (۱) دقیقه و در نهایت گسترش ثانویه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جهت آشکارسازی محصول PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱% استفاده گردید (۲۱). توالی‌یابی محصول PCR (تقریباً ۱۵۰۰ جفت باز) توسط پرایمرهای به‌کار رفته در واکنش PCR به شرکت Source bioscience ارسال و به روش تمام اتوماتیک Sanger dideoxy sequencing انجام گردید و در نهایت توالی بدست آمده با استفاده از برنامه Blasten در پایگاه NCBI BLAST Search tool در سایت http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST با توالی‌های 16S rRNA موجود مقایسه شد و درخت فیلوژنی رسم گردید.

۳. یافته‌ها

از محیط خاک‌های کشاورزی استان قم، ۴۰ سویه آکتینوباکتری گرم مثبت با مشخصات ظاهری سفید یا کرم رنگ، گچی و پودری شکل جداسازی و خالص‌سازی شد. در میان ۴۰ جدایه به دست آمده، تنها ۵ جدایه قادر به تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز به صورت خارج سلولی بود و با افزودن مخلوط شناساگر حاوی سوبسترای سنجش آنزیم ترنس گلوتامیناز، هاله تغییر رنگ مشاهده شد (شکل ۱).



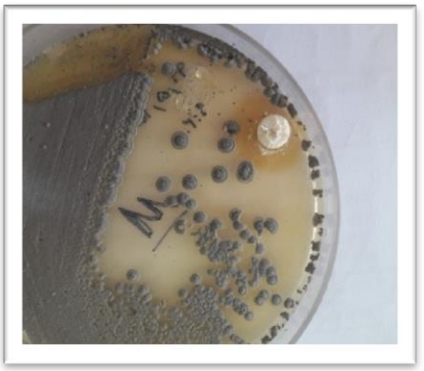
شکل ۱- سمت راست) پلیت‌های دیسک‌گذاری شده قبل از افزودن مخلوط واکنش، سمت چپ) پلیت‌های دیسک‌گذاری شده بعد از افزودن مخلوط واکنش و تغییر رنگ

جهت بررسی کیفی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز به روش دیسک‌گذاری، قطر هاله تغییر رنگ در پنج جدایه تولیدکننده آنزیم ترنس گلوتامیناز، در جدول (۱) نشان داده شده است. سویه M به

عنوان جدایه منتخب با بیشترین میزان تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز انتخاب گردید (شکل ۲).

جدول ۱- نتایج سنجش کیفی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز با روش دیسک‌گذاری (قطر هاله براساس میلی متر)

نام سویه	M	T	I	S	SH
قطر هاله	۰/۸	۰/۶	۰/۴	۰/۷	۰/۵



شکل ۲- تصویر جدایه منتخب (سویه M) با بیشترین قطر هاله تغییر رنگ

جهت بررسی کیفی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز با استفاده از محلول رویی، جذب نوری محلول رویی جدایه‌های تولیدکننده آنزیم ترنس گلوتامیناز در ۵۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در جدول (۲) نشان داده شده است. سویه M به عنوان جدایه منتخب با بیشترین میزان تولید آنزیم گزارش شد.

جدول ۲ - نتایج بررسی کیفی تولید آنزیم با تهیه محلول رویی

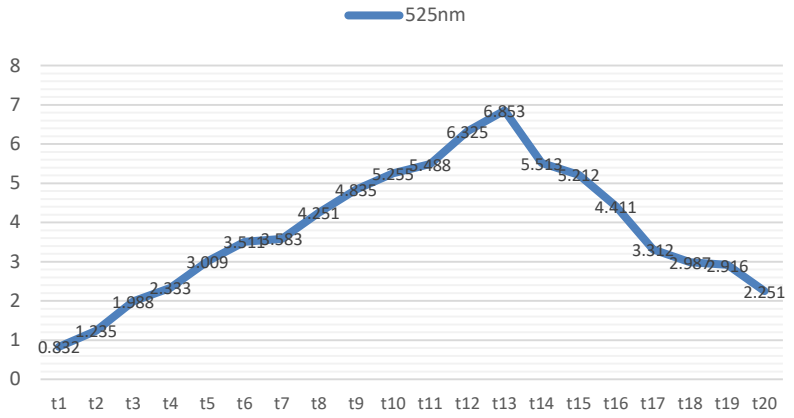
نام سویه	M	T	I	S	SH
طیف جذبی	۳/۲۳۱	۲/۶۷۳	۲/۲۴۹	۲/۱۳۳	۲/۷۸۸

با سنجش کمّی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز در جدایه منتخب به روش دیسک‌گذاری، در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بیشترین میزان هاله تغییر رنگ مشاهده گردید، که حاکی از بیشترین میزان تولید و فعالیت آنزیم ترنس گلوتامیناز است. در زمان‌های بعدی، بر اثر عوامل نامناسب محیطی از جمله دمای بالا که باعث غیرفعال شدن پروتئین‌ها می‌شود، آنزیم نیز غیرفعال شده و تغییر رنگ کمتری مشاهده گردید (جدول ۳).

جدول ۳- قطر هاله تغییر رنگ داده جدایه منتخب در زمان‌های متفاوت

زمان	۶۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه	۱۸۰ دقیقه	۲۴۰ دقیقه
قطر هاله	۰/۸	۰/۶	۰/۵۲	۰/۴۵

سنجش کمّی آنزیم ترنس گلوتامیناز با استفاده از محلول رویی جدایه منتخب در زمان‌های متفاوت در شکل (۳) نشان داده شده است. با گذشت ۱۰ دقیقه، میزان تولید براساس طیف جذبی رو به افزایش بود و پس از ۲۶ دقیقه (t13)، به بیشترین میزان خود رسیده و از آن به بعد کاهش یافته است.



شکل ۳- نتایج اسپکتروفتومتر به دست آمده از محلول رویی جدایه منتخب در زمان‌های متفاوت در طول موج ۵۲۵ نانومتر

بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه منتخب آکتینوباکتری و تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز، توسط فاکتورهایی همچون محیط کشت‌های مختلف و سرعت شیکر بررسی شد. همان‌طور که در جدول (۴ و ۶) نشان داده شده است، بهترین میزان رشد جدایه منتخب در محیط کشت ISP3 (کلنی‌هایی با رشد بیشتر و حجیم‌تر) با سرعت شیکر ۱۸۰ دور بر دقیقه است. نتایج جدول (۵ و ۷) نشان داد که بیشترین میزان تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز توسط جدایه منتخب آکتینوباکتری، درون محیط کشت ISP1 و با دور شیکر ۱۶۰ دور بر دقیقه است.

جدول ٤- میزان رشد کلنی جدایه منتخب آکتینوباکتری بر روی انواع محیط کشت

نام محیط کشت	میزان رشد
N.A	++
BHI Agar	–
TSI Agar	+
ISP 9	+++
ISP3	+++++
ISP 2	+++

جدول ٥- نتایج بررسی ارتباط تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز توسط جدایه منتخب آکتینوباکتری در محیط کشت‌های مختلف در طول موج ۵۲۵ نانومتر

سویه محیط	نوترین براث	LB براث	BHI براث	ISP1 براث
M	۲/۴۱۳	۲/۶۴۵	۱/۸۷۸	۳/۴۷۱

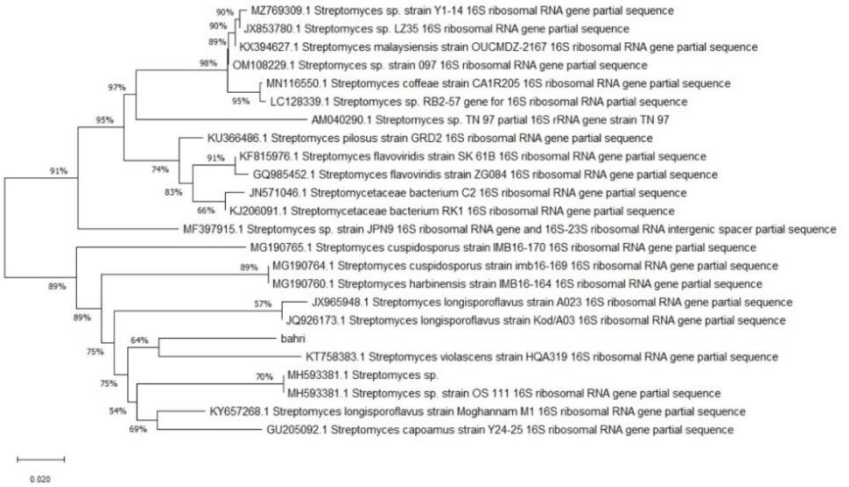
جدول ٦- تاثیر دور بر دقیقه شیکر بر میزان رشد باکتری در سرعت‌های مختلف در طول موج ۵۲۵ نانومتر

سرعت (rpm)	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰	۱۶۰	۱۸۰	۲۰۰
OD	۳/۱۲۵	۳/۴۸۹	۴/۲۵۱	۴/۵۹۹	۵/۸۸۱	۵/۱۱۲

جدول ۷- تاثیر دور بر دقیقه شیکر بر میزان نسبی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز در طول موج ۵۲۵ نانومتر

سرعت (rpm)	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰	۱۶۰	۱۸۰	۲۰۰
OD	۲/۱۳۳	۲/۷۷۴	۳/۶۶۵	۵/۴۱۸	۴/۳۶۸	۳/۵۱۲

پس از انجام توالی‌یابی، مقایسه هم‌ردیفی در پایگاه NCBI Blastn انجام شد. با میزان تشابه بدست آمده حاصل از Blastn، جدایه منتخب (سویه M، bahri) متعلق به گروه استرپتومایسس بود (شکل ۵).



شکل ۵- درخت فیلوژنی رسم شده با روش Neighbor-Joining با استفاده از نرم‌افزار MEGA X.
**** اعداد واقع در گره کلادها نمایانگر ارزش bootstrap (%) می‌باشند.**

٤. بحث

در سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری جهت تولید آنزیم ترانس گلوتامیناز توسط میکروارگانیسم‌ها شده است که دامنه استفاده گسترده‌تری نسبت به ترانس گلوتامیناز حیوانی و گیاهی دارند. آنزیم ترنس گلوتامیناز، آنزیمی است که تشکیل پیوندهای ایزوپپتیدی بین پروتئین‌ها را کاتالیز می‌کند و خاصیت اتصال متقابل آنها افزایش می‌یابد. کاربرد آنها در زمینه‌هایی از جمله تولید پنیر و سایر محصولات لبنی، گوشت فرآوری شده و تولیدات نانوایی، بسیار قابل توجه است. کاشیواگی و همکاران در پژوهشی نشان دادند که منابع مختلف تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز در طبیعت بسیار گسترده است و مهم‌ترین منابع برای تولید آن گیاهان، حیوانات و میکروب‌ها هستند (۱۸). یوکویاما و همکاران نیز در تحقیق اظهار داشتند که تولید و فعالیت آنزیم ترنس گلوتامیناز با منشاء حیوانی و گیاهی، تحت تاثیر عوامل بسیار متعدد درونی و بیرونی از جمله یون کلسیم هستند و این آنزیم را آنزیم وابسته به کلسیم می‌نامند (۲۲). امروزه یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز با منشاء میکروبی است که بسیار اقتصادی و پر بازده بوده که برای فعال‌سازی به یون‌های کلسیم نیاز ندارد. با بهره‌گیری از روش‌های مهندسی ژنتیک و محصولات تراریخته، با استفاده از روش انتقال ژن‌ها و بیان ژن‌های مورد نظر در میزبان مورد نظر، موفق به تولید ترنس گلوتامیناز میکروبی شده‌اند. در میان منابع میکروبی تولیدکننده آنزیم ترنس گلوتامیناز میکروبی، آکتینوباکتری‌ها

مورد توجه زیادی قرار گرفته است. آکتینوباکتری‌ها، باکتری‌های هوازی، غیرمتحرک، گرم مثبت و اغلب رشته‌ای هستند که بهترین توانایی را در تولید متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف دارند. نمونه‌های زیادی از راسته آکتینوباکتریال‌ها، تولیدکننده‌های قدرتمند هزاران متابولیت ثانویه دارای فعالیت بیولوژیکی هستند. از گونه‌های استرپتومایسس به طور گسترده‌ای در صنایع دارویی و آنزیمی استفاده می‌شود؛ زیرا به خوبی مشخص شده که از این باکتری‌ها می‌توان برای تولید آنزیم‌ها در مقیاس صنعتی بهره گرفت (۱۲). تاکنون تحقیقات بسیاری بر روی آکتینوباکتری‌ها از جهت تولید انواع متابولیت‌ها، به خصوص آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسورفاکتانت انجام شده است و در سال‌های اخیر با توجه به کاربردهای بسیار گسترده آنزیم ترنس گلوتامیناز، تحقیقات زیادی بر روی این میکرواورگانیسم‌ها و توانایی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز در آنها انجام شده است که البته پیشینه‌ای نه چندان طولانی دارند و اکثر تحقیقات در سال‌های اخیر انجام شده است (۵). در مورد بررسی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز از طریق آکتینوباکتری‌ها، در کشور ما پژوهش ثبت شده‌ای یافت نشد. در تحقیق حاضر برای اولین بار سویه‌هایی با توانایی تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز از نمونه‌های خاک کشاورزی بومی استان قم گزارش شد. استفاده از آنزیم‌های ترانس گلوتامیناز با منبع میکروبی باعث شده تا در صنایع غذایی و نساجی تحولات بسیاری شکل گیرد (۲). در تحقیق حاضر، شناسایی آنزیم ترنس گلوتامیناز توسط سوبسترای اختصاصی CBZ و روش تهیه محلول رویی باکتری، روشی تاییدی برای نتایج حاصل از طریق شناسایی رنگی بوده است (۲۳). در تحقیق حاضر نمونه‌ها از خاک‌های زراعی استان قم جمع‌آوری شد و در نهایت ۴۰ سویه آکتینوباکتری شناسایی گردید. با انجام تست‌های افتراقی و سنجش آنزیمی، ۵ سویه ترنس گلوتامیناز مثبت شناسایی و غربالگری شد. لین و همکاران در پژوهشی توانستند آنزیم ترانس گلوتامیناز را توسط باکتری استرپتومیسس لیویدانس سنتز کنند (۲۴). ماسدو و همکاران توانستند با استفاده از سویه استرپتومایسس آنزیم ترانس گلوتامیناز را سنتز کنند (۲۵). در راستای بهینه‌سازی تولید آنزیم، یوکویاما و همکاران نشان دادند که بهترین دور شیکر مناسب برای بیشترین میزان تولید آنزیم ترانس گلوتامیناز، ۱۶۰ دور بر دقیقه می‌باشد (۲۲)، این نتایج با تحقیق حاضر همخوانی دارد. در بررسی‌های مولکولی از طریق تکنیک PCR، شناسایی سویه منتخب انجام شد و در نهایت از طریق تفسیر NCBI BLAST دندروگرام فیلوژنی رسم گردید که طبق آن سویه مورد نظر با استرپتومایسس در یک شاخه قرار گرفت.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان دادند که جدایه استرپتومیست بومی خاک‌های کشاورزی استان قم، دارای توانایی قابل ملاحظه‌ای برای تولید آنزیم ترنس گلوتامیناز است که برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفته و گزارش شد.

٦. تشکر و سپاسگزاری

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری و واحد آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم که در جمع‌آوری داده‌های این پژوهش همکاری داشتند، تشکر می‌شود.

References

1. Abd-Rabo F, Ei-Dieb S, Abd-EI-Fattah A & Sakr S. Natural state changes of cows' and buffaloes' milk proteins induced by microbial transglutaminase. *J Am Sci.* 2010; 6(9): 612-20.
2. Bourneow C, Benjakul S & H-Kittikun A. Hydroxamate-based colorimetric method for direct screening of transglutaminase-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012; 28: 2273-7.
3. Bahrim G, Iancu C, Buţu N & Negoiţă TG. Production of a novel microbial transglutaminase using Streptomyces sp. polar strains. *Romanian Biotechnological Letters.* 2010; 15(2): 5197-203.
4. Serafini-Fracassini D & Del Duca S. Transglutaminases: widespread cross-linking enzymes in plants. *Annals of Botany*. 2008; 102(2): 145-52.
5. Duarte L, Matte CR, Bizarro CV & Ayub MAZ. Transglutaminases: part I—origins, sources, and biotechnological characteristics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020; 36: 1-18.
6. Buettner K, Hertel TC & Pietzsch M. Increased thermostability of microbial transglutaminase by combination of several hot spots evolved by random and saturation mutagenesis. *Amino Acids*. 2012; 42: 987-96.
7. Nagy V & Szakacs G. Production of transglutaminase by Streptomyces isolates in solid-state fermentation. *Letters in applied microbiology*. 2008; 47(2): 122-7.
8. Yu Y-J, Wu S-C, Chan H-H, Chen Y-C, Chen Z-Y & Yang M-T. Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from Streptomyces netropsis in Escherichia coli. *Applied microbiology and biotechnology*. 2008; 81: 523-32.
9. Liu X, Yang X, Xie F & Qian S. Cloning of transglutaminase gene from Streptomyces fradiae and its enhanced expression in the original strain. *Biotechnology letters.* 2006; 28: 1319-25.
10. Aidaroos H, Du G & Chen J. Microbial fed-batch production of transglutaminase using ammonium sulphate and calcium chloride by Streptomyces hygroscopicus. *Biotechnol Bioinf Bioeng*. 2011; 1(2): 173-8.
11. Zotchev SB. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *Journal of biotechnology*. 2012; 158(4): 168-75.
12. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K & Kim S-K. RETRACTED: Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiological research.* 2013; 168(6): 311-32.
13. Anandan R, Dharumadurai D & Manogaran GP. *An introduction to actinobacteria.* Actinobacteria-basics and biotechnological applications: IntechOpen, 2016.
14. Azman A-S, Othman I, Fang C-M, Chan K-G, Goh B-H & Lee L-H. Antibacterial, anticancer and neuroprotective activities of rare Actinobacteria from mangrove forest soils. *Indian journal of microbiology.* 2017; 57: 177-87.
15. Salwan R & Sharma V. *The role of actinobacteria in the production of industrial*

enzymes. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Elsevier, 2018: 165-77.
16. Cătălin I, Nicolae B & Gabriela B. Preliminary studies regarding transglutaminase synthesis by polar filamentous bacteria of the genus Streptomyces sp. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 2009(4): 12-5.
17. Kanaji T, Ozaki H, Takao T, Kawajiri H, Ide H, Motoki M & et al. Primary structure of microbial transglutaminase from Streptoverticillium sp. strain s-8112. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(16): 11565-72.
18. Kashiwagi T, Yokoyama K-i, Ishikawa K, Ono K, Ejima D, Matsui H & et al. Crystal Structure of Microbial Transglutaminase fromStreptoverticillium Mobaraense. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(46): 44252-60.
19. Junqua M, Duran R, Gancet C & Goulas P. Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997; 48: 730-734.
20. Itaya H & Kikuchi Y. Secretion of Streptomyces mobaraensis pro-transglutaminase by coryneform bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*. 2008; 78: 621-5.
21. Farris M & Olson J. Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Letters in applied microbiology*. 2007; 45(4): 376-81.
22. YokoyAMA K-i, Nakamura N, Seguro K & KuBoTA K. Overproduction of microbial transglutaminase in Escherichia coli, in vitro refolding, and characterization of the refolded form. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2000; 64(6): 1263-70.
23. Fuchsbauer HL. Approaching transglutaminase from Streptomyces bacteria over three decades. *The FEBS Journal*. 2022; 289(16): 4680-703.
24. Lin Y-S, Chao M-L, Liu C-H, Tseng M & Chu W-S. Cloning of the gene coding for transglutaminase from Streptomyces platensis and its expression in Streptomyces lividans. *Process Biochemistry*. 2006; 41(3): 519-24.
25. Macedo JA, Cavallieri ALF, Da Cunha RL & Sato HH. The effect of transglutaminase from Streptomyces sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. *International dairy journal.* 2010; 20(10): 673-9.