

مهندسی متابولیسم باسیلوس سوبتیلیس به منظور بررسی تولید اتانل: بیان اپی زومال در مقایسه با درج کروموزومی مسیر اتانولوژنیک هترولوگ

سارا رجایی¹، حسین شهبانی ظهیری^{2*}، مجید صادقی زاده³، کامبیز اکبری نوقابی⁴

1- دانشجوی دکتری رشته ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

2- دانشیار گروه زیست فناوری انرژی و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

3- استاد گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

4- دانشیار گروه زیست فناوری انرژی و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

* کرج، صندوق پستی 14965/161

shahbani@nigeb.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/7/18 پذیرش مقاله: 94/9/29)

چکیده- اتانل به عنوان یک سوخت زیستی تجدید پذیر، جایگزین مناسب و بی‌نقصی برای سوخت‌های فسیلی چالش برانگیز به نظر می‌رسد. باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس توانمندی‌های ذاتی مثبت متعددی برای تبدیل شدن به یک باکتری تولید کننده اتانل نشان می‌دهد، از جمله توانایی تخمیر طیف گسترده‌ای از قندهای حاصل از هیدرولیز زیست توده لیگنوسلولوزی. تبدیل این باکتری تجزیه کننده سلولز به یک باکتری تولید کننده اتانل، با روش‌های مهندسی متابولیک و از طریق وارد کردن اپرون تولید اتانل از باکتری زیموناس موبیلیس به دو فرم پلاسمیدی و اپی زومال، صورت گرفت و در نهایت سویه‌های SR1، SR21 و SR22 ایجاد شدند. در سویه‌های SR21 و SR22 ژن لاکتات دهیدروژناز نیز حذف شد، این سویه‌ها اهمیت تولید کوفاکتور NAD^+ و تأثیر آن بر رشد بی‌هوازی باکتری را نشان دادند. با توجه به نقش یون Fe^{2+} در فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز II و تأمین NAD^+ ، بررسی میزان تولید اتانل در سویه‌های نوترکیب در حضور این یون انجام شد و تأثیر مثبت آن در بهبود رشد سویه‌ها در شرایط بی‌هوازی نشان داده شد. بازده نهایی تولید اتانل توسط سویه‌های SR1، SR21 و SR22 به ترتیب 53/8٪، 86/7٪ و 83/9٪ بود.

کلیدواژگان: باسیلوس سوبتیلیس، اتانل، سوخت زیستی، پیرووات دکربوکسیلاز، الکل دهیدروژناز.

1- مقدمه

فسیلی هستند که استفاده از آنها با مشکلات متعددی همراه می‌باشد. از جمله می‌توان به محدودیت این منابع، تقاضای زیاد، گرانی و همچنین آلودگی‌های زیست‌محیطی اشاره کرد [1]. در نتیجه جایگزین کردن

بشر برای ادامه حیات به انرژی نیاز دارد. پیشرفت صنعتی و اقتصادی نیز وابسته به انرژی است. در حال حاضر رایج‌ترین منبع انرژی مورد استفاده در جهان سوخت‌های

سوخت‌های رایج فسیلی با سوخت‌های زیستی تجدید پذیر یکی از موضوعات مورد علاقه دانشمندان در حال حاضر است. برای تولید سوخت زیستی¹ از زیست‌توده² به عنوان ماده اولیه استفاده می‌شود. زیست‌توده شامل ترکیبات سلولزی و نشاسته ای مشتق از گیاهان است که به فراوانی در محیط زیست موجود هستند [2]. سوخت‌های زیستی که اکنون در جهان تولید می‌شوند عمدتاً شامل بیواتانل و بیودیزل است. در حال حاضر بالغ بر 89% از سوخت زیستی بیواتانل در کشورهای آمریکا و برزیل و با استفاده از ترکیبات نشاسته‌ای و نیشکر تولید می‌شود. سهم اروپا از تولید سوخت زیستی 5% است و سایر کشورها شامل هند، تایلند و چین نیز تقریباً 5% باقیمانده را تولید می‌کنند. اما همان‌طور که این اعداد نشان می‌دهد بیواتانل بیشتر از محل منابع غذایی تولید می‌شود، پس ضروری است که به سایر زیست‌توده‌ها از جمله منابع لیگنوسلولزی برای تولید اتانل توجه بیشتری شود. استفاده از منابع لیگنوسلولزی برای تولید سوخت زیستی از مزایای زیادی شامل ارزان و فراوان بودن، حذف ضایعات شهری و کشاورزی و در عوض تولید محصولات ارزشمند برخوردار می‌باشد [3].

در فرایند تولید اتانل دو آنزیم پیرووات دکربوکسیلاز و الکل دهیدروژناز ضروری هستند. ابتدا مونو ساکاریدهای حاصل از هیدرولیز زیست‌توده طی مسیرهای امبدن میرهاف (EMP) یا انتنرادراف (ED) به پیرووات تبدیل می‌شوند. سپس آنزیم پیرووات دکربوکسیلاز آنرا به استالدئید تبدیل می‌کند. استالدئید حاصل سوبسترای برای آنزیم الکل دهیدروژناز است که در حضور NADH آن را تبدیل به اتانل می‌کند [4]. تولید اتانل در میکرو ارگانیسم‌های مختلفی بررسی شده است و تا به امروز بهترین تولید کننده‌ها مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و باکتری *Zymomonas mobilis* هستند. هر چند *Z.*

mobilis با بازده و سرعت بالاتری می‌تواند اتانل تولید کند، اما محدودیت اصلی آن کوچک بودن دامنه سوبستراهای قابل تخمیر شامل گلوکز، فروکتوز و سوکروز می‌باشد. ترکیبات لیگنوسلولزی شامل سه بخش عمده هستند: سلولز (30-50%)، همی سلولز (25-35%) و لیگنین (10-20%). در کل حدود 70% زیست‌توده گیاهی را سلولز و همی سلولز تشکیل می‌دهند. اگر چه گلوکز مونومر اصلی در سلولز است، اما همی سلولز هتروپلی مری متشکل از گزیلوز، آرابینوز، گلوکز، گالاکتوز و مانوز است [3]. پس برای تبدیل ضایعات لیگنوسلولزی با بازده بالا به سوخت زیستی، به میکرو ارگانیسمی نیاز است که بتواند این طیف گسترده از قندها را تخمیر کند و با ابزار مهندسی متابولیک به یک تولید کننده خوب اتانل نیز تبدیل شود [5]. در این راستا باسیلوس سوبتیلیس³ که یک باکتری گرم مثبت است، انتخاب مناسبی به نظر می‌رسد؛ چرا که قادر است طیف وسیعی از قندها را مصرف کند. به علاوه، این باکتری خصوصیات مثبت دیگری مانند توان رشد در دمای بالا، pH پایین، و غلظت‌های بالای نمک، قند و الکل نیز دارد. از طرفی سیستم‌های ترشحی این باکتری موجب می‌شود تا پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در آن به خوبی به خارج سلول ترشح شوند که کاربری صنعتی و بیوتکنولوژیک این باکتری را افزایش می‌دهد [2]. مطالعات قبلی با استفاده از داده‌های ژنومی و آنالیز محصولات با روش‌های HPLC و NMR نشان داده‌اند که باسیلوس سوبتیلیس در شرایط بی‌هوازی قادر است گلوکز و پیرووات را به لاکتات، بوتان دی ال، استات و اتانل تخمیر کند [6,7].

تا به امروز باکتری‌های مختلفی از جمله *Escherichia coli*، *B. subtilis* و *Geobacillus thermoglucosidarius* برای تولید اتانل مهندسی شده‌اند و باکتری‌های دیگر که با توجه به پتانسیل بالای تجزیه

¹ Biofuel² Biomass³ *Bacillus subtilis*

PCR برای جداسازی ژن‌های مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت. ژن‌های پیرووات دکربوکسیلاز (pdc) و الکل دهیدروژناز (adh) از ژنوم باکتری زی‌موموناس موبیلیس، به ترتیب با پرایمرهای pdcF,R و adhF,R تکثیر شدند (جدول 2). ژن pdc تکثیر شده و پلاسمید pHY300PLK با آنزیم‌های محدودگر² EcoRI و BamHI برش داده شدند و محصولات آنها در واکنش اتصال³ بوسیله آنزیم لیگاز به یکدیگر متصل شدند. سپس پلاسمید به دست آمده در این مرحله و محصول تکثیر شده ژن adh با آنزیم‌های BamHI و XbaI برش داده شدند و با کمک آنزیم لیگاز به یکدیگر متصل شدند که منجر به تشکیل پلاسمید (pHY-PA) گردید. پلاسمید اخیر برای انجام تراریختی⁴ سلول‌های مستعد⁵ باکتری *E. coli* مورد استفاده قرار گرفت.

2-2-2- پلاسمید غیر فعال کننده ژن لاکتات دهیدروژناز (pDH-ldh)

یک قطعه 325 نوکلئوتیدی از درون ژن لاکتات دهیدروژناز با استفاده از پرایمرهای IdhF و IdhR تکثیر شد. سپس قطعه تکثیر شده پس از برش با آنزیم‌های Hind III و XbaI در پلاسمید pDH88 همسانه‌سازی⁶ شد.

2-2-3- پلاسمید غیر فعال کننده لاکتات دهیدروژناز و درج کننده اپرون تولید اتانل (pDH-ldh-PA)

به این منظور یک قطعه ژنی به طول 2/9 کیلو بازی حاوی اپرون تولید کننده اتانل با استفاده از پرایمرهای pdc F و adhR و الگوی pHY-PA به وسیله آنزیم pfu DNA polymerase تکثیر شد.

زیست‌توده یا اتوتروف بودن برای این منظور انتخاب شده‌اند [2، 8-12].

در این مطالعه با بهره‌گیری از مزایای باسیلوس سوبتیلیس به عنوان یک باکتری سلولیتیک و با استفاده از ژن‌های تولید الکل از باکتری زی‌موموناس موبیلیس به عنوان یک باکتری هومواتانلوژنیک، سویه‌های مهندسی شده باسیلوس سوبتیلیس با قابلیت تولید اتانل ساخته شدند و میزان تولید اتانل در این سویه‌های تراریخته مورد مقایسه قرار گرفت.

2- مواد و روش‌ها

2-1- باکتری‌ها، پلاسمیدها و پرایمرهای مورد استفاده

مشخصات تمام باکتری‌ها و پلاسمیدهای استفاده شده در این مطالعه در جدول 1 گنجانده شده است. باسیلوس سوبتیلیس سویه WB600¹ در این مطالعه برای تولید الکل مورد استفاده قرار گرفت. تمام عملیات کلونینگ در سویه *E. coli DH5a* انجام پذیرفت. سپس پلاسمیدهای ساخته شده توسط کیت استخراج پلاسمید GeneAII[®] استخراج شدند و برای ترانسفورماسیون باسیلوس سوبتیلیس مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین لیست و توالی کلیه پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول 2 آورده شده است.

2-2- ساخت سازه‌های ژنتیکی

2-2-1- پلاسمید حاوی اپرون تولید کننده اتانل (pHY-PA)

برای استخراج DNA کروموزومی از باسیلوس سوبتیلیس و زی‌موموناس موبیلیس از کیت Roche[®] استفاده شد. کشت شبانه از این باکتری‌ها در محیط LB مایع تهیه گردید و از آن طبق دستورالعمل این کیت برای استخراج DNA استفاده شد. این DNA به عنوان الگو در روش

² Restriction enzyme

³ Ligation

⁴ Transformation

⁵ Competent cells

⁶ Cloning

¹ *Bacillus subtilis* WB600

جدول 1 پلاسمیدها و باکتری‌های استفاده شده

منبع	ویژگی‌های عمده	سویه یا پلاسمید
		پلاسمیدها
Takara Bio [13]	<i>E.coli</i> - <i>B.subtilis</i> shuttle vector, Tet ^r Am ^r	pHY300PLK
	Integration vector Cm ^r Am ^r	pDH88
مطالعه جاری	pHY300PLK carrying <i>pdC_{zm}adh_{zm}</i>	pHY-PA
مطالعه جاری	PDH88 carrying <i>ldh_{bs}</i> segment	pDH-ldh
مطالعه جاری	pDH-ldh carrying <i>pdC_{zm} adh_{zm}</i>	pDH-ldh-PA
		سویه‌ها
	cloning host	<i>E.coli</i> DH5α
ptcc1718 [14]	Ethanologenic strain	<i>Z.mobilis</i>
	<i>nprΔ aprAΔ eprΔbpfΔ mpr nprB</i>	<i>B.subtilis</i> WB600
مطالعه جاری	WB600 harboring pHY-PA	<i>B.subtilis</i> SR1
مطالعه جاری	WB600 Δldh	<i>B.subtilis</i> SR2
مطالعه جاری	SR2 harboring pHY-PA	<i>B.subtilis</i> SR21
مطالعه جاری	WB600 Δldh:: <i>pdC-adh</i>	<i>B.subtilis</i> SR22

جدول 2 پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه و توالی آنها

نام پرایمر	توالی
pdCF	ATTGAATTC CATATGAAGGAGG AGT AAG CAA TGA GTT ATA CTG TCG G
pdCR	ATAGGATCCCTAGAG GAG CTT GTT AAC AGG CTT ACG
adhF	ATAGGATCCAAGGAGG GTA TAG CTA TGG CTT CTT CAA CTT TTT ATA TTC
adhR	ATATCTAGACATATGTCAGA AAG CGC TCA GGA AGA GTT CTT CAA C
ldhF	ATAAAGCTTTCTTACGGAACATATGAAGACTGC
ldhR	ATATCTAGACGTGTACGTTTTTGAGGCGC
Knock ldhF	GTAGCTTTAATCGGAGCGGG
Knock ldhR	GCGACATCGTATAACGTTACTGG

به وسیله روش‌های هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفتند. سپس پلاسمید pHY-PA به روش الکتروپوریشن¹ و پلاسمیدهای pDH-ldh و pDH-ldh-PA به روش ترانسفورماسیون طبیعی² در باکتری *Bacillus subtilis* WB600 ترانسفورم شدند.

3-2-1- ترانسفورماسیون باسیلوس سوبتیلیس با الکتروپوریشن
ابتدا برای تهیه سلول مستعد طبق روش Guoqiang Cao

سپس پلاسمید pDH-ldh با آنزیم محدود کننده Hind III هضم شد. انتهای چسبنده پلاسمید خطی حاصل به وسیله آنزیم pfu DNA polymerase و افزودن dNTP به مدت 5 دقیقه در دمای 72 درجه به انتهای صاف تبدیل شد. قطعه تکثیر شده و پلاسمید pDH-ldh با انتهای صاف در یک واکنش اتصال با افزودن 5 واحد آنزیم T4 DNA ligase به یکدیگر متصل شدند.

3-2- ایجاد سویه‌های تولید کننده اتانل

پلاسمیدهای نوترکیب ساخته شده در این تحقیق همگی

¹ Electroporation

² Natural transformation

4-2- کشت باکتری و تخمیر

سویه‌های تراریخته باسیلوس سوبتیلیس از محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب (15 میکروگرم در میلی‌لیتر تتراسیکلین برای سویه‌های حاوی پلاسمیدهای سری pHY300PLK و 5 میکروگرم در میلی‌لیتر کلرامفنیکل برای سویه‌های حاوی پلاسمید درج شونده² سری (pDH88)) در محیط مایع LB به مدت یک شب کشت داده شدند. سپس از کشت شبانه در محیط کشت مایع LB-glucose 2% حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب با OD₆₀₀ اولیه 0/1 و 0/5 تلقیح شدند. هر آزمایش با اضافه کردن FeSO₄ (100 μM) به محیط کشت تکرار شد. کشت‌ها در فلاسک‌های 100 میلی‌لیتری درب‌دار محتوی 100 mL محیط کشت در انکوباتور 35 درجه با دور 100 rpm به مدت 48 ساعت گرماگذاری شدند. نمونه‌برداری جهت اندازه‌گیری رشد (OD₆₀₀)، الکل و گلوکز بعد از هر 24 ساعت انجام شد.

5-2- روش‌های سنجش کمی

میزان رشد باکتری با اندازه‌گیری میزان دانسیته نوری³ (OD) در طول موج 600nm اندازه‌گیری شد. میزان قند مصرف شده با استفاده از کیت گلوکز اکسیداز طبق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد. میزان اتانل تولید شده در هر آزمایش به روش کروماتوگرافی گازی (GC) اندازه‌گیری شد. شرایط انجام کروماتوگرافی گازی عبارتند از: ستون cp-wax 57CB به طول 25 متر، آشکارساز FID، دمای تزریق‌گر و آشکارساز 150 درجه سلسیوس، مدت زمان رانش 20 دقیقه با گاز هلیوم، و حجم تزریق 1 میکرولیتر. برای محاسبه میزان الکل ابتدا منحنی استاندارد نمونه‌های معلوم با کنترل داخلی متانل 0/5 درصد رسم شد و سپس بر اساس آن میزان الکل نمونه‌های مورد آزمایش با همان میزان متانل اندازه‌گیری شد.

[15] با اندکی تغییرات، از پیش کشت شبانه باکتری با OD₆₀₀ اولیه 0/1 به محیط مایع LB تلقیح شد. پس از رسیدن OD₆₀₀ به 1، ارلن به مدت 10 دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس باکتری در 6000 g به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری سه مرتبه در بافر الکتروپوریشن (مانیتول 0/5 مولار سوربیتول، 0/5 مولار مانیتول و 10% گلیسرول در آب دیونیزه) شستشو داده شد و مراحل سانتریفیوژ طبق بالا تکرار شد. در آخرین مرحله به بافر الکتروپوریشن 0/5 مولار ترهالوز اضافه شد و رسوب نهایی با غلظت نهایی 40 OD/mL در این بافر حل شد. سپس 150 ng از پلاسمید با 60 μL از سلول مستعد مخلوط شد. تنظیمات زیر برای دستگاه الکتروپوریشن اعمال شد: ظرفیت 25μF، مقاومت 200 Ω و ثابت زمان حدود 5 میلی ثانیه. پس از آن 1 میلی‌لیتر LB محتوی 0/5 مولار سوربیتول به سلول‌های ترانسفورم شده اضافه شد و بعد از 6 ساعت بازیابی¹ روی پلیت محتوی آنتی‌بیوتیک پخش شدند.

3-2-2- ترانسفورماسیون به روش طبیعی

برای ترانسفورماسیون پلاسمیدهای مشتق از pDH88 از روش ترانسفورماسیون طبیعی طبق روش Anagnostopoulos [16] استفاده شد. بعد از رسیدن کشت باکتریها به OD₆₀₀=1 سلول‌ها در دور 3000 g جمع‌آوری و در 10 میلی‌لیتر بافر TF I مجدداً سوسپانسیون شدند. سپس این سلول‌ها در در دمای 37 درجه با دور 40 تا رسیدن به دانسیته 2/6 گرماگذاری شدند. یک میلی‌لیتر از محیط TF I به TF II اضافه شد و بعد از 1/5 ساعت گرماگذاری در دمای 37 درجه با دور 40 ng 300 پلاسمید به 500 μL از TF II اضافه شد. سپس بعد از بازیابی، سلول‌های ترانسفورم شده روی پلیت محتوی کلرامفنیکل 5 μg/mL انتخاب شدند.

² Integrated plasmid³ Optical density¹ Recovery

2-6- روش‌های آماری

در این مطالعه هر آزمون با سه بار تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس ANOVA یک طرفه در سطح احتمال $P < 0.05$ صورت گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل 2010 رسم شدند و آنالیز واریانس با استفاده از نرم‌افزار 5 GraphPad Prism انجام شد.

3- نتایج و بحث**3-1- ساخت سویه‌های تولیدکننده اتانل**

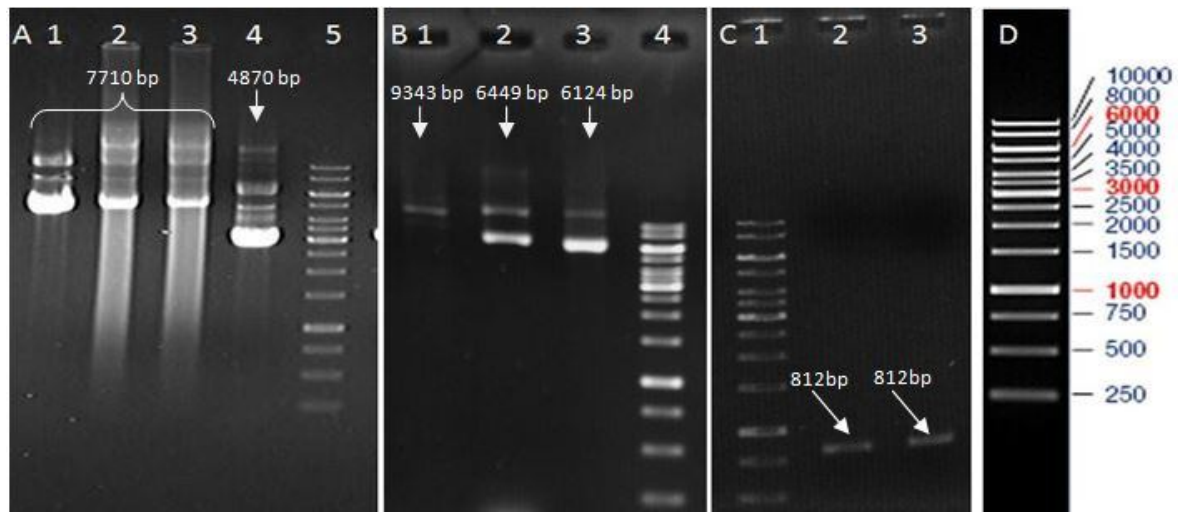
تمام پلاسمیدهای ساخته شده پس از استخراج از میزبان همسانه سازی یعنی *E. coli* در ژل آگارز از نظر وزن مولکولی با پلاسمید اولیه مقایسه شدند. (شکل‌های A-1 و B-1) و همین‌طور پلاسمیدها با روش هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شدند. سپس pHY-PA به روش الکتروپوریشن در سویه WB600 ترانسفورم شد. سویه حاصل یعنی SR1 که مقاوم به تتراسیکلین است از طریق استخراج پلاسمید مورد تأیید قرار گرفت. (شکل A-1) سویه‌های SR2 و SR22 از طریق ترانسفورماسیون طبیعی پلاسمیدهای pDH-ldh و pDH-ldh-PA حاصل شدند. برای اطمینان از درج شدن این پلاسمیدها در محل صحیح، ژنوم سویه‌های مقاوم به کلرامفنیکل، SR2 و SR22، استخراج شد و با پرایمرهای طراحی شده از نواحی بالادست و پایین‌دست ناحیه هومولوگ، یعنی پرایمرهای 3 و 4 شکل 2 یا همان Knock IdhF, R تکثیر انجام شد. پرایمر 3 به نحوی طراحی شد که تنها به ژنوم باکتری در ناحیه بالادست ناحیه هومولوگ متصل شود و پرایمر 4 فقط به ناحیه ای درون توالی lacI درون پلاسمید PDH88 متصل می‌شود. پس چنانچه پلاسمیدهای pDH-ldh و pDH-ldh-PA داخل ژنوم باکتری درج شوند، انتظار می‌رود تکثیر به وسیله این دو پرایمر صورت گیرد. تکثیر قطعه حدود 800 جفت بازی از طریق PCR با

ژنوم، محل صحیح درج شدن را تأیید می‌کند. برای اطمینان بیشتر، قطعات تکثیر شده از هر دو سویه تعیین توالی شدند. شکل 3 توالی ناحیه تکثیر شده را نشان می‌دهد. سپس هم‌ردیفی¹ توالی با ژنوم باسیلوس سوبتیلیس و پلاسمید pDH88 محل صحیح درج شدن را تأیید کرد. شکل C 1 الکترو فورز ژل آگارز و تکثیر قطعه مورد انتظار و شکل 2- A و B نمای شماتیک ناحیه مورد نظر جهت تکثیر را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل 2 مشاهده می‌شود پلاسمیدهای pDH-ldh و pDH-ldh-PA با مکانیزم کمپ بل² از طریق یک کراسینگ اور واحد وارد ژنوم می‌شوند [17,18]. از این طریق در سویه SR2، توالی ژن Idh با وارد شدن پلاسمید pDH-ldh به هم ریخته و در نتیجه محصول پروتئینی این ژن تولید نخواهد شد. از طرفی در سویه SR22 باز هم بیان ژن Idh صورت نخواهد گرفت، اما این بار در سازه وارد شده دو ژن پیرووات دکربوکسیلاز و الکل دهیدروژناز وارد شده‌اند. همان‌طور که در نمای شماتیک سازمان‌دهی ژنوم بعد از درج شدن pDH-ldh-PA مشاهده می‌شود (شکل B-2) ترتیب این ژن‌ها در سویه جدید به نحوی است که بالادست این دو ژن دو پروموتور واقع شده، هم پروموتور خود ژن لاکتات دهیدروژناز و هم پروموتور Pspac که با IPTG القا می‌شود.

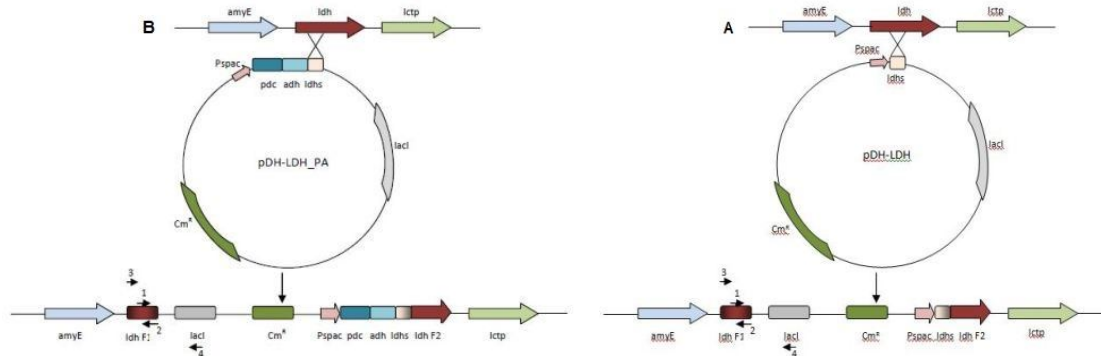
3-2- بررسی میزان رشد باکتری و تخمیر الکی

باسیلوس سوبتیلیس در شرایط بی‌هوازی می‌تواند گلوکز را به محصولاتی همچون لاکتات، استات و بوتان دی ال متابولیزه کند. رشد سویه WB600 در شرایط بی‌هوازی در محیط فوق کمتر از رشد در شرایط هوازی است اما تا رسیدن به $OD_{600}=2$ ادامه می‌یابد. حذف ژن لاکتات دهیدروژناز در سویه‌های SR2 و SR22 موجب تغییر متابولیسم باکتری شده و در رشد آن اختلال ایجاد می‌کند.

¹ Alignment² Campbell-like



شکل 1 - A- ستون 1 پلاسمید pPHY-PA استخراج شده از سویه *E. coli DH5α*، ستون 2 و 3 همان پلاسمید به ترتیب استخراج شده از *B. subtilis SR1* و *B. subtilis SR21*، ستون 4 پلاسمید pPHY300PLK به عنوان کنترل و ستون 5 مارکر اندازه. B- ستون 1 پلاسمید pDH-ldh-PAT، ستون 2 پلاسمید pDH-ldh، ستون 3 پلاسمید pDH88 و ستون 4 مارکر اندازه. C- ستون 1 مارکر اندازه، ستون 2- قطعه تکثیر شده توسط پرایمرهای 3 و 4 از سویه SR22 و ستون 3 قطعه تکثیر شده توسط پرایمرهای 3 و 4 از سویه SR22 و D- مارکر اندازه که اندازه هر باند آن نشان داده شده است.



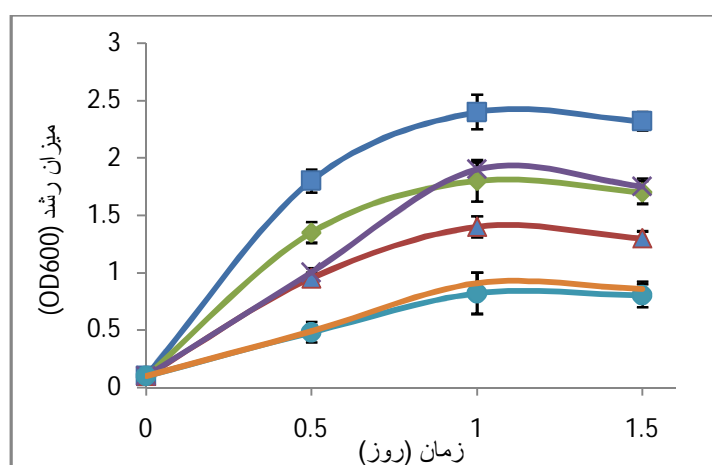
شکل 2 راست (A) سازماندهی ژنوم باسیلوس سوبتیلیس قبل و بعد از درج شدن پلاسمید pDH-ldh در محل ناحیه هومولوگش درون ژن لاکتات دهیدروژناز در داخل ژنوم باکتری. چپ (B) - سازماندهی ژنوم باسیلوس سوبتیلیس قبل و بعد از درج شدن پلاسمید pDH-ldh در محل ناحیه هومولوگش درون ژن لاکتات دهیدروژناز در داخل ژنوم باکتری.

```
TACTTGC GTTATTAACCAAGGAATCACAGATGAGCTTGGTCATTGATGTAATAAAGAAAAAGCAATGGGCGATGTGATGGA TTTAAACCAAGGAAAG
GCGTTTGGCCACAACCCGGTCAAAAACATCTTACGGAAACATAGAAAGACTGCAAGGATGCTGATATTGCTGCAATTTGCGCCGGAGCAAACAAAAACCTG
GTGAGACACGCCCTTGAATAGTAGAAAAAGAACTTGAAGATTTTCAAAGGCATCGTTAGTGAAGTCATGGCGAGCGGATTTGACGGCATTTCCTTAGTCGC
GACAAATCCGGTTGATATCCTGACTTACGCAACATGGAATTCAGCGGCCCTGCCAAAAGAGCGGGTGATTGGAAGCGGCACAACACTTGATTTCTGCGAGA
TTCCGTTTCATGCTGAGCGAATACTTTGGCGCAGCGCCTCAAACGTACACGTAGATTTGTTAACTTAGATCTTTATC GATTTGTCATGCAAGCTAATTCCG
GTGAAACAGGTCATCATTTCTCCGAAAAAAGCGTTGCAATTTAAATCTTACATATGTAATACTTTCAAAGACTACATTTGTAAGATTTGATGTTTGAGT
CGGCTGAAAGATCGTACGTACCAATATTGTTTCGTGATTGTTCAAGCCATAACACTGTAGGGATAGTGGAAAGAGTGCTTCACTGTTACGATCAATCA
AATATCAAACGGAGGGAGACGATTTTGTGAAACAGTAACGTTTACGATGTCCACAAAATATAAAAATTTTTTTTTTTTTT
```

شکل 3 توالی ناحیه تکثیر شده از ژنوم سویه های SR22 و SR22 توسط جفت آغازگر R ldhF Knock

برای فعالیت خود احتیاج به یون Fe^{2+} دارد [20,19]. از این رو به نظر می‌رسد نقص ایجاد شده در رشد باکتری در محیط LB/Glc ناشی از عدم فعالیت بهینه این آنزیم و در نتیجه تأمین نشدن NAD^+ لازم برای ادامه مسیر گلیکولیز باشد. لذا بررسی بیشتر تولید اتانل و رشد سویه‌های نوترکیب در همان محیط کشت و با افزودن 100 میکرومولار نمک $FeSO_4$ صورت گرفت. همان‌طور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، افزودن 100 میکرو مولار سولفات آهن به محیط کشت موجب بهبود 26، 71 و 98 درصدی در رشد سویه‌های مورد بررسی در شرایط بی‌هوازی شد و نتایج حاصل، پیش‌بینی‌ها را تأیید کردند. رومرو و همکارانش [2] در سویه خود نقصی که در رشد باکتری به علت حذف ژن لاکتات دهیدروژناز اتفاق می‌افتد را ناشی از نقش این آنزیم در اکسیداسیون $NADPH$ و $NADH$ دانستند. این تیم مدعی هستند چون ژن لاکتات دهیدروژناز عامل تأمین $NADP^+$ است ولی الکل دهیدروژناز نمی‌تواند این کوانزیم را تأمین کند و تنها NAD^+ را تأمین می‌کند، بنابراین رشد باکتری و مصرف گلوکز دچار اختلال می‌شود.

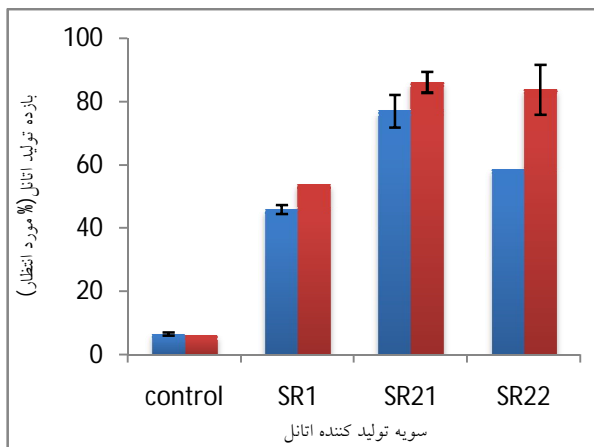
در این شرایط باکتری در بهترین شرایط حداکثر به $OD_{600}=0/8$ می‌رسد و بعد از 24 ساعت وارد فاز سکون و سپس مرگ می‌شود. آنزیم لاکتات دهیدروژناز مستقیماً یک مولکول پیرووات را به لاکتات احیا و به ازای آن یک مولکول $NADH$ را به NAD^+ اکسیده می‌کند و با تأمین NAD^+ نقش مهمی را در متابولیسم بی‌هوازی ایفا می‌کند، پس در نبود آن رشد بی‌هوازی دچار یک نقص اساسی می‌شود [18]. مطالعات قبلی نشان داده بودند که مسیر طبیعی تولید اتانل در باسیلوس سوبتیلیس به صورت کارآمد عمل نمی‌کند [2]. انتظار می‌رود که بیان ژن‌های پیرووات دکربوکسیلاز و الکل دهیدروژناز II از باکتری زی‌موموناس موبیلیس در این باکتری راندمان تولید الکل را افزایش دهد و از طریق تأمین NAD^+ نقصی که در رشد بی‌هوازی باکتری در اثر حذف ژن لاکتات دهیدروژناز بوجود آمده را جبران کند. شکل 4 نشان می‌دهد که رشد سویه‌های SR22 و SR21 در محیط LB/GLC نسبت به سویه SR1 کندتر صورت می‌گیرد و این سویه‌ها تقریباً در $OD_{600}=0/8$ به فاز سکون می‌رسند، این میزان کاهش رشد در نتایج سایر محققان نیز نشان داده شده است [6]. مطالعات قبلی نشان داده اند که آنزیم الکل دهیدروژناز II



شکل 4 منحنی رشد سویه‌های نوترکیب *B. subtilis* در شرایط بی‌هوازی در محیط LB حاوی 2% گلوکز. ● و خط نارنجی صاف به ترتیب سویه‌های SR1، SR21 و SR22 نشان می‌دهند و ▲، ◆ به ترتیب نشان دهنده میزان رشد سویه‌های SR1، SR21 و SR22 می‌باشند در محیط LB حاوی 2% گلوکز و 100 میکرومولار سولفات آهن.

الکل تولید شده نسبت به میزان الکل مورد انتظار محاسبه شد.

جدول 3 میزان مصرف گلوکز، میزان تولید اتانل و در نهایت بازده و بهره‌وری هر یک از سویه‌ها را در مدت 48 ساعت نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل 5 مشاهده می‌شود میزان تولید الکل در سویه WB600 ناچیز است. سویه‌های مهندسی شده‌های SR1، SR21 و SR22 در محیط کشت حاوی 20(g/L) گلوکز و فاقد سولفات آهن، بعد از 48 ساعت به ترتیب 4/7، 1/6 و 0/9 اتانل تولید می‌کنند و بازده مطابق آنچه است که در شکل 5 مشاهده می‌شود. همین سویه‌ها در محیط حاوی سولفات آهن به علت بهبود قابل توجهی که در رشد بی‌هوازی دارند با بهره‌وری بالاتری الکل تولید می‌کنند به نحوی که به ترتیب 5/5، 3/1 و 1/5 گرم در لیتر اتانل تولید می‌کنند. از آنجا که به نظر می‌رسد ضعف اصلی سویه‌های نوترکیب عدم رشد بهینه در شرایط بی‌هوازی است، تأثیر افزایش سباز تلخیص بر میزان تولید اتانل نیز سنجیده شد.



شکل 5 بازده تولید اتانل بعد از 48 ساعت رشد توسط سویه‌های WB600 (کنترل)، SR1، SR21 و SR22. در هر سویه ستون سمت راست (قرمز) مربوط به محیط LB حاوی 2% گلوکز و 100 میکرومولار سولفات آهن و ستون سمت چپ (آبی) مربوط به محیط LB حاوی 2% گلوکز می‌باشد. ($P < 0.0001$)

به همین علت با همسانه سازی یک ترانس هیدروژناز که تعادلی را بین NAD^+ و $NADP^+$ برقرار می‌کند، توانستند رشد باکتری را در شرایط بی‌هوازی در حدود 22% بهبود ببخشند. اما در مطالعه مورد نظر در ترکیب محیط کشت از یون آهن استفاده نشده و نقش این یون در عملکرد آنزیم الکل دهیدروژناز نادیده گرفته شده و این امر مقایسه تحقیق حاضر را با نتایج آنها مشکل می‌سازد.

به طور کلی اثر Fe^{2+} بر رشد سویه‌های SR21 و SR22 که فاقد آنزیم لاکتات دهیدروژناز هستند، قابل توجه‌تر است؛ چرا که در سویه SR1 به علت وجود لاکتات دهیدروژناز NAD^+ مورد نیاز جهت رشد باکتری تأمین می‌شود. به طور کلی رشد سویه SR1 بیشتر از سویه‌های SR21 و SR22 است ولی به علت فعالیت لاکتات دهیدروژناز و رقابت آن با پیرووات دکربوکسیلاز بازده تولید اتانل در این سویه کمتر است. علی‌رغم نقش کم‌رنگ‌تر Fe^{2+} در رشد سویه SR1 نسبت به دو سویه دیگر، نقش این ماده در افزایش 17 درصدی بازده اتانل را نمی‌توان نادیده گرفت. در سویه‌های SR21 و SR22 که در تأمین NAD^+ مشکل دارند، افزودن یون فروس رشد را 71 و 98 درصد بهبود می‌بخشد و از طریق افزایش تعداد سلول‌های تولید کننده و افزایش فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز موجب بهبود 10 و 42 درصدی بازده تولید الکل در این سویه‌ها می‌شود.

میزان الکل تولید شده بعد از 48 ساعت در سویه‌های مهندسی شده SR1، SR21 و SR22 با روش کروماتوگرافی گازی اندازه‌گیری شد و میزان تولید با سویه WB600 به عنوان کنترل مقایسه شد. برای محاسبه بازده¹ تولید الکل با توجه به اینکه هر مولکول گلوکز قادر به تولید 2 مولکول اتانل است، انتظار می‌رود به ازای هر 1(w/v)% گلوکز 0/51(w/v)% اتانل در محیط کشت تولید شود. بر همین اساس بازده تولید الکل با معادله میزان

¹ Yield

جدول 3 مقایسه میزان، بازده و بهره‌وری تولید الکل توسط سه سویه مهندسی شده SR21, SR1 و SR22 و سویه کنترل در محیط کشت‌های فاقد و حاوی یون فروس

سویه	میزان قند مصرف شده (گرم%)		میزان اتانل مورد انتظار (گرم%)		اتانل تولید شده (گرم%)		بازده (%)		بهره‌وری (گرم/لیتر/ساعت)	
	LB/Glc	LB/Glc/Fe ²⁺	LB/Glc	LB/Glc/Fe ²⁺	LB/Glc	LB/Glc/Fe ²⁺	LB/Glc	LB/Glc/Fe ²⁺	LB/Glc	LB/Glc/Fe ²⁺
WB600	2.0	2.0	1.02	1.02	0.01	0.01	1.27	1.86	0.002	0.004
SR1	2.0	2.0	1.02	1.02	0.47	0.55	45.99	53.82	0.098	0.114
SR21	0.4	0.7	0.20	0.35	0.16	0.31	78.28	86.66	0.033	0.064
SR22	0.3	0.35	0.15	0.17	0.09	0.15	58.70	83.87	0.019	0.031

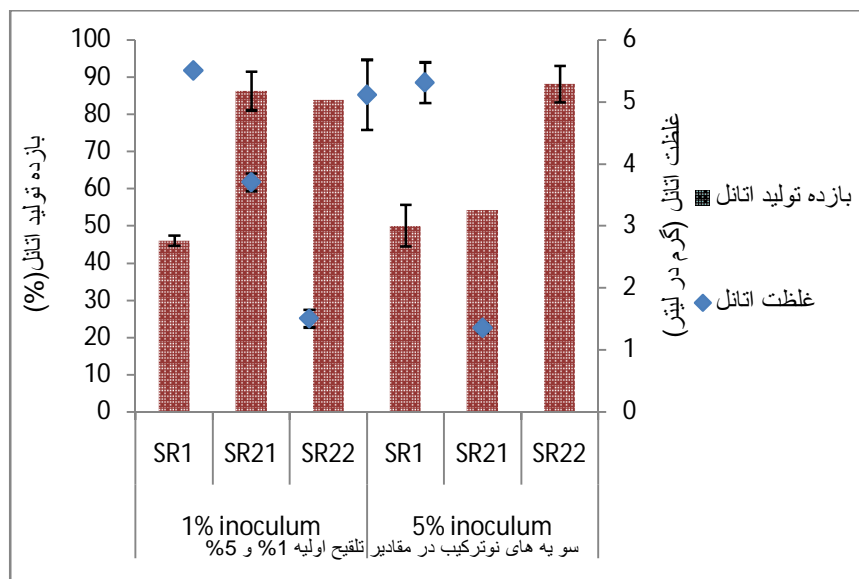
از سوی دیگر در فرایندهای بیوتکنولوژی و تولید سوخت‌های زیستی مقوله زمان هم مقوله ارزشمندی است [12]. پس با در نظر گرفتن زمان، اگر بهره‌وری¹ بر حسب بازده تولید در ساعت محاسبه شود، مشاهده می‌شود که این میزان افزایش در مقدار تولید اتانل هر چند از نظر بازده نسبت به مقدار نظری ارزشمند است، اما بهره‌وری آن 0/041 (g/L/h) است؛ اما در سویه‌های SR21, SR1 و SR22 مقادیر بهره‌وری به ترتیب 0/114, 0/064 و 0/031 گرم در لیتر در ساعت بوده و دور نمای کاربردی خوبی دارند.

4- جمع‌بندی نتایج

باکتری باسیلوس سوبتیلیس با توانمندی‌های بالقوه ای که دارد میزان مناسبی برای تولید سوخت‌های زیستی به شمار می‌آید. سویه‌های نوترکیب در این مطالعه با راندمان و بهره‌وری مناسبی نسبت به مطالعات قبلی اتانل تولید می‌کنند. هر چند بیشترین بازده و بیشترین بهره‌وری مربوط به سویه‌های SR1 و SR21 بود اما محدودیت کاربرد سویه‌های حاوی پلاسمید در بیوتکنولوژی به علت مسائل زیست محیطی موجب می‌شود سویه SR22 بیشتر مورد توجه قرار گیرد. در مطالعات قبلی در باکتری اشرشیا کلی نیز نشان داده شده بود که درج شدن اپرون تولید اتانل درون ژنوم باکتری موجب کاهش تولید الکل می‌شود [21].

همان‌گونه که شکل 6 نشان می‌دهد افزایش سایز تلقیح به 5% تنها در سویه SR21 موجب افزایش تولید اتانل می‌شود. بنابراین به طور کلی افزایش سایز تلقیح تأثیری بر بهبود رشد سویه‌ها و بازده تولید اتانل ندارد. در بررسی مشابهی که رومرو و همکارانش [2] انجام دادند در برترین سویه مهندسی شده در مدت زمان مشابه مقدار اتانل تولید شده تقریباً 2 (g/L) بوده است. بنابراین میزان اتانل تولید شده در سویه‌های حاوی پلاسمید از سویه‌های این محققان بیشتر است. به نظر می‌رسد این افزایش بیان به علت افزایش تعداد نسخه‌های ژن و همین‌طور بیان بیشتر ژن باشد. در سویه SR22 نیز یک پروموتور قابل القاء با IPTG در بالادست اپرون تولید الکل واقع شده است. میزان تولید از محل این پروموتور در حد قابل ملاحظه‌ای نسبت به بیان از محل پروموتور بی‌هوازی خود ژن لاکتات دهیدروژناز افزایش پیدا کرده است (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). بنابراین افزایش تعداد نسخه‌های ژن و همچنین افزایش بیان از طریق به کار گرفتن یک پروموتور قابل القاء می‌تواند نقش به‌سزایی در بالا بردن راندمان تولید الکل داشته باشد. در مطالعه رومرو و همکارانش مقدار نهایی تولید الکل بعد از 9 روز به 8/9 گرم در لیتر رسیده که بیشترین مقدار گزارش شده در باسیلوس سوبتیلیس است. در بررسی حاضر با توجه به اینکه باکتری بعد از 72 ساعت وارد فاز مرگ می‌شد و تفاوت چشمگیری در میزان تولید در روز دوم و سوم مشاهده نشد، روند تولید اتانل بیش از سه روز ادامه داده نشد.

¹ Productivity



شکل 6 مقایسه بازده و غلظت تولید اتانل توسط سویه های SR1، SR21 و SR22 در محیط LB حاوی 2% گلوکز و 100 میکرومولار سولفات آهن در شرایط تلقیح اولیه 1% و 5% ($P < 0.0001$)

5- منابع

- [1] Lin, H., Wang, Q., Shen, Q., Zhan, J., and Zhao, Y. (2013) Genetic engineering of microorganisms for biodiesel production. *Bioengineered* 4:5, 292–304.
- [2] Romero, S., Enrique Merino, E., Boli'var, F., Gosset, G., and Alfredo Martinez, A. (2007) Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *AEM*. 73, 5190-5198.
- [3] Limayem, A., Ricke, S.C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*. 38, 449-467.
- [4] Zhang, B., Yang, Q., Xiangdong Zhang, X., and Song, J. (2007) Mechanism and oesearch progress of ethanol fermentation related genes *pdc* and *adhII* involved in fuel ethanol production. *KMITL Sci. Tech. J.* 7:S2, 171.
- [5] Zambare, V.P., Bhalla, A., Muthukumarappan, K., Sani, R.J., and Christopher, L.P. (2011) Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile. *Extremophiles*. 15, 611–618.
- [6] Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P., and Clark, D.P. (1997) Characterization of Anaerobic Fermentative Growth of *Bacillus*

این نتایج نشان می‌دهد که اثر بار متابولیک پلاسמיד بر رشد باکتری کم اهمیت‌تر از تعداد نسخه‌های ژن و مقدار بیان ژن از محل یک پروموتور قوی است. از سوی دیگر با در نظر گرفتن کاربرد نهایی سویه نوترکیب در تولید اتانل از ضایعات لیگنوسلولزی که به کندی و با غلظت کم گلوکز را در اختیار باکتری قرار می‌دهند، سویه SR22 گزینه مطلوبی به نظر می‌رسد، چرا که با کمتر شدن میزان قند اولیه در دسترس باکتری جهت تخمیر در صورت بالا بودن کفایت¹ همه سویه‌ها اختلافات بهره‌وری و راندمان کمتر خواهد شد.

صرف‌نظر از بهره‌وری محاسبه شده در قسمت نتایج، کوتاه شدن زمان تولید از نقطه نظر کاهش میزان مصرف انرژی لازم برای کشت باکتری نیز می‌تواند حائز اهمیت باشد؛ بنابراین تولید سوخت زیستی اتانل توسط سویه SR22 با بهره‌وری 0/031 (g/L/h) نسبت به سویه BS37 [2] با بهره‌وری 0/041 (g/L/h) می‌تواند توجیه اقتصادی بهتری داشته باشد.

¹ Efficiency

- subtilis Expression-Secretion System with a Strain Deficient in Six Extracellular Proteases. *Journal of Bacteriology*. 173:16, 4952-4958.
- [15] Cao,G., Xiaohui Zhang,X., Zhong,L., and Lu,Z. (2011) A modified electro-transformation method for *Bacillus subtilis* and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. *Biotechnol Lett*. 33,1047–1051.
- [16] Anagnostopoulos,C., and Spizizen,J. (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 81, 741-746.
- [17] Paoletti,L., Lu,Y-J., Schujman,G.E., Mendoza,D., and Charles O. Rock,C.O. (2007) Coupling of Fatty Acid and Phospholipid Synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 189:16, 5816–5824.
- [18] Sun,G., Sharkova, Chesnut,R., Birkey,S., Duggan,M.F., Sorokin,A., Pujic,P., Ehrlich,S.D., and Hulet,F.M. (1996) Regulators of Aerobic and Anaerobic Respiration in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 178:5, 1374-1385.
- [19] Mackenzie,K.F., Eddy,C.K., and Ingram,L.O. (1989) Modulation of Alcohol Dehydrogenase Isoenzyme Levels in *Zymomonas mobilis* by Iron and Zinc. *Journal of Bacteriology*. 171:2, 1063-1067.
- [20] Scopes,R.K.(1983) An iron-activated alcohol dehydrogenase. *FEBS*. 156, 303-307.
- [21] Ohta,K., Beall,D.S., Mejia,J.P., Shanmugam, K.T., and Ingram,L.O. (1991) Genetic Improvement of *Escherichia coli* for Ethanol Production: Chromosomal Integration of *Zymomonas mobilis* Genes Encoding Pyruvate Decarboxylase and Alcohol Dehydrogenase II. *AEM*. 57:4, 893-900.
- subtilis*: Identification of Fermentation End Products and Genes Required for Growth. *Journal of Bacteriology*. 179:21, 6749–6755.
- [7] Ramos,H.C., Hoffmann,T., Marino,M., Nedjari,H., Presecan-Siedel,E., Dreesen,O., Glaser,P., and Jahn,D. (2000) Fermentative Metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and Regulation of Gene Expression. *Journal of Bacteriology*. 182:11, 3072–3080.
- [8] Arfman,N., Worrell,V., and Ingram,L.O. (1992) Use of the tac Promoter and lacP for the Controlled Expression of *Zymomonas mobilis* Fermentative Genes in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*. 174:22, 7370-7378.
- [9] Ingram,L.O. Conway,T., Clark,D.P., Sewell,G.W., and Preston,J.F. (1987) Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli*. *AEM*, 53:10, 2420-2425.
- [10] Deng,M.D., and Coleman,J.R. (1999) Ethanol Synthesis by Genetic Engineering in *Cyanobacteria*. *AEM*, 65:2,523-528.
- [11] Cripps,R.E., Eley,K., Leak,D.J., Rudd,B., Taylor,M., Todd,M., Boakes,S., Martin,S., and Atkinson,T. (2009) Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metabolic Engineering*. 11, 398–408.
- [12] Dien,B.S., Cotta,M.A., and Jeffries,T.W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol*. 63, 258–266.
- [13] Henner,D.J. (1990) Inducible expression of regulatory genes in *Bacillus subtilis*. *Methods in enzymology*. 185, 223-228.
- [14] Wu,X-C., Lee,W., Tran,L., and SUI-LAM Wong,S-L. (1991) Engineering a *Bacillus*