

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۲۸-۱۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۲

همسانه‌سازی ژن پیروات دکربوکسیلاز مؤثر در تولید بیواتانول در باکتری *اشرشیا کلای*

معمومه زینالی: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، masome.zeinali@yahoo.com
بهمین حسینی*: دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، ایـران، b.hosseini@urmia.ac.ir
سدا به جهانبخش: دانشیار اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، soodabehjahanbakhsh@yahoo.com
محمود رضازاد باری: دانشیار صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ایـران، mahmoud114@hotmail.com
میثم طباطبائی: استادیار بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، ایران، meisam_tabatabaei@abrii.ac.ir

چکیده

مقدمه: اتانول ساخته شده از زیست توده یکی از راهبردهای بی نظیر و سودمند از لحاظ اقتصادی و محیطی است و می‌تواند به عنوان یک سوخت پاک و ایمن، جایگزین سوخت‌های فسیلی شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش کلیدی‌ترین آنزیم مؤثر در مسیر تولید اتانول زیستی (پیروات دکربوکسیلاز) از *زایموموناس موبیلیس* انتخاب و در *اشرشیا کلای* به روش ذوب-انجماد همسانه‌سازی شد. برای همسانه‌سازی ژن مدنظر از آغازگرهای اختصاصی ژن پیروات دکربوکسیلاز و واکنش پی‌سی آر استفاده شد. سپس ژن پیروات دکربوکسیلاز و پلاسمید *pET 28a* را آنزیم‌های محدودکننده *Sal I* و *Xho I* برش دادند؛ محصولاتی که آنزیم لیگاز برش دادند در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد و در مدت ۱۶ ساعت به همدیگر متصل شدند.

نتایج: کشت باکتری‌ها در محیط کشت LB انتخابی نشان داد که تنها کلونی‌های حاوی پلاسمید *pET 28a* قادر به رشد هستند. نتایج کلونی پی‌سی آر با آغازگرهای اختصاصی باندهایی در اندازه تقریبی ۱۷۰۰ جفت باز را نشان داد. نتایج مربوط به پی‌سی آر پلاسمیدهای نو ترکیب توسط آغازگر رفت راه‌انداز T7 و آغازگر برگشت ژن پیروات دکربوکسیلاز، جهت صحیح درج ژن در داخل پلاسمید را ثابت کرد و باندهای ۱۸۸۵ جفت باز را نشان داد و نتایج هضم آنزیمی پلاسمید *pET 28a pdc* نو ترکیب توسط آنزیم‌های *Sal I* و *Xho I* باندهای مشابهی را آشکار کرد. در نهایت واکنش RT باندهای مورد انتظار ۱۷۰۰ جفت باز را نشان داد که حاکی از بیان ژن مورد نظر در این نمونه‌ها بود.

بحث و نتیجه‌گیری: از مهم‌ترین مشکلات در بیوسنتز اتانول، محدودیت عملکرد آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز اتانول از مواد اولیه نظیر ضایعات کشاورزی است؛ این آنزیم‌ها در تبدیل مواد اولیه پلی‌مری به مواد اولیه با ساختار ساده و قابل تخمیر نقش اساسی دارند. به نظر می‌رسد افزایش بیان ژن پیروات دکربوکسیلاز تحت کنترل پروموتور قوی T7 منجر به افزایش تولید محصول نهایی خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: اتانول زیستی، انتقال ژن، پلاسمید *pET 28a*، تخمیر، ژن پیروات دکربوکسیلاز

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در صنعت و افزایش سرعت شهرنشینی، نیاز به منابع انرژی پایدار را افزایش داده است. اتانول ساخته‌شده از زیست‌توده یکی از راهبردهای بی‌نظیر و سودمند از نظر اقتصادی و محیطی است و می‌تواند به عنوان یک سوخت پاک و ایمن، به عنوان جایگزینی برای سوخت‌های فسیلی ملاحظه و بررسی شود. در سراسر جهان مقدار زیادی از زیست‌توده‌های لیگنوسلولزی موجود است که می‌تواند به منظور استخراج و تولید اتانول زیستی استفاده شود (۱).

بیواتانول (اتانول زیستی، الکل اتیلیک زیستی) الکلی است دو کربنه^۱، شفاف بی‌رنگ با سمیت پایین و با خاصیت زیست تجزیه‌پذیری و آلودگی کمتر در محیط زیست است. در اثر سوختن اتانول، دی‌اکسید کربن و آب تولید می‌شود، مواد اولیه زیستی استفاده‌شده در تولید بیواتانول عمدتاً منشأ گیاهی دارند، از بعضی مواد اولیه با منشأ حیوانی نیز می‌توان بیواتانول تولید کرد (۲). بخش بزرگی از محصولات کشاورزی، ضایعات و پسماندهای محصولات کشاورزی، فرآورده‌های جانبی صنایع تبدیلی کشاورزی، محصولات و ضایعات فرآورده‌های جانبی جنگل و صنایع مربوط، و البته ضایعات و پسماندهای زیستی شهری و صنعتی برای تولید بیواتانول به کار گرفته می‌شوند (۳). افزایش عملکرد اتانول همگام با بهبود فرایندهای اقتصادی تولید و پیشرفت‌های تکنیکی، پارامترهای کلیدی در تولید اتانول هستند. دستیابی به عملکرد بالای اتانول بدین معنی است که باید سویه‌هایی تولید کرد که محصولات جانبی کمتری تولید کنند و قادر به متابولیزه کردن همه قندهای اصلی باشند (۴). یکی از اصلی‌ترین موانع در

پیشرفت تولید اتانول زیستی، کمبود میکروارگانیسم‌های صنعتی مناسب جهت تبدیل زیست‌توده به سوخت اتانول بوده است. تغییر و تبدیل کمی گلوکز به الکل به وسیله مخمرها و نیز تعدادی از باکتری‌ها انجام می‌گیرد. زیست‌توده‌های لیگنوسلولزی حاوی کربوهیدرات‌های پیچیده‌ای هستند که استفاده از میکروارگانیسم‌های همراه را ضروری می‌کند؛ برای اینکه مخمر قندهای غیرقابل تخمیر را تخمیر کند. مهم‌ترین این قندها زایلوز است. بیشترین موفقیت‌ها در زمینه مهندسی باکتری‌ها، هم در مقیاس آزمایشگاهی و هم در مقیاس صنعتی در باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلای*^۲، *زایموموناس موبیلیس*^۳ و *کلبسیلا اکسی توکا*^۴ مشاهده شده است. باکتری *اشرشیا کلای* و *کلبسیلا اکسی توکا* به‌طور طبیعی قادر به تخمیر طیف وسیعی از قندها است و بنابراین بیشتر تلاش‌ها در این دو میکروارگانیسم به منظور تولید اتانول متمرکز شده است (۵). در فرایندهای صنعتی، مخمرهای اصلی متعلق به جنس *ساکارومایسس سرویزیه*^۵ به کار گرفته می‌شوند. اگرچه مخمرها سهم بسزایی به‌عنوان تولیدکنندگان اتانول دارند، محدودیت‌هایی نیز نظیر طیف محدود مصرف ماده اولیه، تحمل پایین به الکل و تبعیت کمتر از دستکاری ژنتیکی دارند (۳). *زایموموناس موبیلیس* به‌عنوان یک باکتری گرم منفی می‌تواند به‌عنوان ارگانیسم جایگزین در تولید سوخت اتانول برای مقیاس‌های بزرگ در نظر گرفته شود که مقاومت آن به ۱۲۰ گرم/لیتر (در حدود ۱۲ درصد) می‌رسد (۶). گونه‌های وحشی *زایموموناس موبیلیس* تنها قادر به استفاده از گلوکز، فروکتوز و ساکارز هستند؛ برای حل این مشکل از راهبرد دستکاری ژنتیکی استفاده شده است. به همین منظور و برای برطرف کردن برخی از

مشکلات می‌توان از روش‌های زیر استفاده کرد:

۱. *زایموموناس موبیلیس* با ژن‌های مورد نظر که از سایر موجودات به *زایموموناس موبیلیس* انتقال یافته‌اند؛
۲. انتقال ژن‌های مورد نظر از *زایموموناس موبیلیس* به سایر گونه‌ها (۷).

ایجاد سویه‌هایی از *اشرشیا کلای* که به صورت انتخابی محصول اتانول را تولید می‌کردند از اولین موفقیت‌های مهندسی متابولیت بوده است. در این باکتری سویه‌های وحشی قندها را به مخلوطی از اتانول و اسید آلی تبدیل می‌کند. اتانول در این باکتری از پیروات و توسط آنزیم پیروات فورمات لیاز^۶ تولید می‌شود. این مسیر تخمیر، نامتوازن است زیرا یک مولکول NADH, H^+ برای هر پیروات ساخته شده از قند تولید می‌شود؛ درحالی که برای تبدیل پیروات به اتانول از طریق این مسیر به دو مولکول NADH, H^+ نیاز است. مخمرها و باکتری *موبیلیس*، پیروات را از طریق آنزیم *الکل دهیدروژناز*^۷ و پیروات دکربوکسیلاز^۸ به اتانول تبدیل می‌کنند که تنها یک مولکول NADH, H^+ برای تولید هر مولکول اتانول استفاده می‌کنند؛ بنابراین انتظار می‌رود که بیان ژن‌های پیروات دکربوکسیلاز و *الکل دهیدروژناز* در باکتری *اشرشیا کلای* باعث شوند میزان تولید اتانول در این باکتری به میزان قابل توجهی افزایش پیدا کند (۵). کندی^۹ و همکاران همسانه‌سازی ژن پیروات دکربوکسیلاز جداشده از مخمر را در باکتری *اشرشیا کلای* با موفقیت انجام دادند و افزایش تولید اتانول در باکتری *اشرشیا کلای* را به میزان ۱۵ گرم/لیتر نشان دادند، برای این منظور از راه‌اندازهای قوی استفاده استفاده شد (۸).

همسانه‌سازی ژن پیروات دکربوکسیلاز در باکتری *کلبسیلاکسی توکا* M5A1، آشکار کرد که در نهایت

غلظت اتانول از تخمیر مالت بیش از ۴۰ گرم بر لیتر با کارایی ۴ گرم از اتانول مربوط به زایلوز و ۵ گرم از اتانول مربوط به گلوکز برای هر گرم قند به دست آمد. حداکثر کارایی حجمی در هر ساعت برای دو قند ۰/۲ گرم بر لیتر بود (۹).

گودن^{۱۰} و همکاران ژن پیروات دکربوکسیلاز را از باکتری *زایموموناس* به باکتری *ساینوباکتریا سلولوتریکم*^{۱۱} منتقل کردند (این باکتری ها اتوتروف هستند و گلیکوژن اصلی ترین منبع ذخیره کربنی آن‌ها است). در مقایسه با سویه‌های وحشی، سویه‌های نوترکیب با سرعت رشد یکسان در طول ۱۴۵ ساعت رشد افزایش ۱۵۰ درصدی مصرف سلولز و افزایش ۱۸۰ درصدی در وزن خشک سلول‌ها را در پی داشت. غلظت محصولات تخمیر استات و اتانول به ترتیب ۹۳ و ۵۳ درصد افزایش پیدا کرد. این مطالعات ثابت کرد که تخمیر سلولز که فراوان‌ترین پلیمر موجود در زمین است، می‌تواند توسط مهندسی ژنتیک به مقدار زیادی بهبود یابد (۱۰). جیانگ^{۱۲} و همکاران و رن^{۱۳} و جیانگ ژن‌های پیروات دکربوکسیلاز را از مخمر *ساکاروما یسس سرویزیه*^{۱۴} و باکتری *زایموموناس موبیلیس* جداسازی و سپس در پلاسمیدهای بیانی با قدرت بالا (pZM-22b و pSC-22b) قرار دادند. نتایج SDS-PAGE نشان‌دهنده افزایش بیان پیروات دکربوکسیلاز بود و پروتئین هدف به میزان ۶/۱۸ درصد افزایش یافت و ۹/۳۷ درصد از کل پروتئین‌های محلول در سویه میزبان را به خود اختصاص داده بود (۱۱ و ۱۲). به نظر می‌رسد یکی از مهم‌ترین مشکلات در بیوسنتز اتانول از مواد زیستی محدودیت عملکرد آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز اتانول باشد. این آنزیم‌ها در تبدیل مواد اولیه به محصول نهایی در

باکتریایی مهندسی شده است و دارای جایگاه نشانگر انتخابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین است (پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی - کرج).

طراحی آغازگرهای^{۱۷} مناسب: در این مرحله براساس الگوی توالی مورد نظر انتخاب شده از بانک اطلاعاتی NCBI، با استفاده از انواع نرم افزارهای طراحی آغازگر نظیر Vector NTI، OLIGO6، و Fast PCR آغازگرهای مناسب جهت جداسازی ژن پیروات دکربوکسیلاز طراحی شدند. در طراحی آغازگرهای مورد نظر، جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *Xho I* و *Sal I* به ترتیب در ابتدای ۵' آغازگر رفت و برگشت طراحی شد. دلیل این کار وجود این جایگاه‌های برشی در جایگاه برشی پلاسمید است که ورود ژن به داخل آن به صورت صحیح را تضمین می‌کند. (پیش از این نبود جایگاه برشی این دو آنزیم در داخل ژن پیروات دکربوکسیلاز با نرم‌افزار Vector NTI و سایت nebcutter^{۱۸} تأیید شده بود). پس از طراحی آغازگرها، توالی آن‌ها به همراه آغازگر رفت راه‌انداز T7 سنتز شد (تکاپو زیست^{۱۹} - تهران).

تواریزش پلاسمید به روش ذوب-انجماد: به سلول‌های شایسته‌ای که با استفاده از روش CaCl_2 تهیه شده بودند (۱۴) به صورت تدریجی ۵ میکرولیتر از DNA پلاسمید اضافه شد و ۳۰ دقیقه بر روی یخ نگهداری شدند. با افزایش دما به ۴۲ درجه سانتی‌گراد شوک حرارتی وارد شد و دوباره به روی یخ انتقال داده شدند، در مرحله بعد محیط کشت تازه LB (به منظور رشد باکتری‌ها) اضافه و به مدت ۲ ساعت با دور ۲۰۰ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری انجام شد. در نهایت سلول‌های تراریخته و سلول‌های فاقد پلاسمید به محیط کشت حاوی کانامایسین LB منتقل شدند و

باکتری نقش اساسی دارند. با توجه به بررسی منابع و نیز بررسی فرایند تولید، به نظر می‌رسد افزایش بیان^{۱۵} ژن پیروات دکربوکسیلاز تحت کنترل راه‌اندازهای قوی منجر به افزایش تولید محصول نهایی خواهد شد. محصول ژن پیروات دکربوکسیلاز نقش کلیدی در مسیر تولید بیواتانول دارد و در تغییر مسیر مصرف پیروات به سمت تولید بیواتانول مهم‌ترین آنزیم است به همین منظور، همسانه‌سازی ژن به عنوان مقدمه دست‌ورزی سنتز بیواتانول از مواد اولیه سلولزی ضروری است و با این هدف ژن پیروات دکربوکسیلاز در باکتری *Zymomonas mobilis* شناسایی شد و با استفاده از روش‌های همسانه‌سازی ژن در باکتری *Aerobacter* همسانه‌سازی شد.

مواد و روش‌ها

پلاسمید و باکتری‌های مورد نیاز و شرایط رشدی: باکتری *Zymomonas mobilis* سویه ATCC جهت استخراج ژنوم، و باکتری *Aerobacter* سویه های *Dh5a* و *BL21* جهت تهیه سلول‌های شایسته، نگهداری، تکثیر پلاسمیدهای اصلی و نو ترکیب و انتقال ژن استفاده شدند (مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی^{۱۶} ایران - تهران). سویه‌های باکتری *Aerobacter* کلای به صورت مایع و جامد در محیط کشت LB در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط تقریباً خنثی از نظر اسیدیته (حدود ۵/۷) کشت شدند. باکتری *Zymomonas* در محیط کشت رشد باکتری شامل: پیتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۱۰ گرم، گلوکز ۲۰ گرم، آگار ۱۵ گرم و pH= ۵/۵ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت شد (۱۳). جهت انتقال ژن پیروات دکربوکسیلاز از پلاسمید *pET28a+* استفاده شد، این پلاسمید یک پلاسمید

بودند، متوسط دمای ذوب آن‌ها یعنی ۵۶ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد و ۲ درجه پایین‌تر از آن (۵۴ درجه سانتی‌گراد) به عنوان دمای اتصال اولیه انتخاب شد و پروفیل‌های دمایی مختلف برای دماهای بالاتر و پایین‌تر از آن، جهت مشاهده نتیجه بهتر اعمال شد.

هضم دوگانه آنزیمی ژن پیروات دکربوکسیلاز و

پلاسمید *pET28a* توسط آنزیم‌های *Xho I* و *Sal I*: جهت هضم دوگانه ژن و پلاسمید توسط آنزیم‌های *Sal I* (فرمتاز^{۲۴} - آمریکا) و *Xho I* (فرمتاز - آمریکا) بایستی شرایط مطلوب بافری برای این دو آنزیم به طور هم‌زمان ایجاد می‌شد که جهت ایجاد شرایط مطلوب برای این دو آنزیم از بافر تانگو (فرمتاز - آمریکا) استفاده شد، مخلوط واکنش که شامل آب، DNA، بافر تانگو و آنزیم‌های *Sal I* و *Xho I* بود و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۵).

اتصال ژن پیروات دکربوکسیلاز به پلاسمید *pET28a*

توسط آنزیم *T4 DNA Ligase*: ۳ میکرولیتر از پلاسمید *pET* و ۱۰ میکرولیتر از ژن پیروات دکربوکسیلاز هضم و پس از خالص‌سازی به کمک کیت وی و انتیس^{۲۵} (وی و انتیس - آلمان)، در یک تیوب جدید اضافه شد. بافر لیگاسیون، آب و یک میکرولیتر از آنزیم لیگاز (فرمتاز - آمریکا) اضافه شد و تیوب‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳).

انتخاب سلول‌های نو ترکیب در محیط انتخابی

حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین: در این مرحله جهت انتخاب سلول‌های نو ترکیب حاوی پلاسمید مورد نظر، سلول‌ها بر روی محیط کشت LB جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم آنتی بیوتیک کانامایسین کشت و کلونی‌های تشکیل یافته در محیط انتخابی جهت انجام آنالیزهای بعدی استفاده شدند.

به مدت یک شب در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری^{۲۰} شدند (۱۵).

استخراج پلاسمید: استخراج پلاسمید به روش مینی

پرب^{۲۱} انجام شد (۱۶)، در این روش ابتدا به رسوب باکتری‌های کشت داده شده، محلول شماره ۱ سرد اضافه شد و تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شدند. محلول شماره ۱ شامل گلوکز استریل، EDTA، Tris-HCl و آب دوبار تقطیر است. این محلول در حفظ فشار اسمزی، تنظیم pH و تضعیف لایه لیپیدی نقش مهمی دارد. سپس محلول شماره ۲ اضافه شد و ویال‌ها ۵ دقیقه در یخ نگهداری شدند. این محلول، شامل SDS (سبب تخریب اجزای لیپیدی و پروتئینی می‌شود) و NaOH (سبب محافظت کروموزوم‌های تک‌رشته‌ای و دورشته‌ای پلاسمیدها می‌شود) است. بعد از ۵ دقیقه محلول شماره ۳ اضافه شد و مجدداً به یخ انتقال یافتند، محلول شماره ۳ شامل استات پتاسیم، اسید استیک و آب است. این محلول در تنظیم pH، رسوب پروتئین، لیپید و DNA کروموزومی که به شکل توده سفیدرنگ قابل مشاهده هستند، نقش مهمی دارد. پس از سانتریفوژ هم، حجم مایع شفاف به دست آمد و محلول کلروفرم ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) به منظور حذف پروتئین‌ها استفاده شد (۱۷)، به منظور رسوب باکتری‌ها از الکل ۹۶ درصد استفاده شد و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند، نهایتاً پلاسمید رسوب کرد و مایع رویی دور ریخته شد، درستی استخراج پلاسمید با استفاده از الکتروفورز ژل ۱ درصد، رنگ آمیزی شد و با اتیدیوم بروماید بررسی شد (۱۸).

پی‌سی‌آر و بهینه‌سازی شرایط پی‌سی‌آر جهت

جداسازی ژن‌های مورد نظر: با توجه به اینکه دمای ذوب دو آغازگر (رفت^{۲۲} و برگشت^{۲۳}) نزدیک به هم

روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA تام براساس دستورالعمل کیت Total RNA Extraction Kit استخراج شد و به وسیله الکتروفورز و اسپکتروفوتومتری کمیت و کیفیت آن تعیین شد.

RNA تام استخراج شده، براساس دستورالعمل کیت Titan on tube RT-PCR (Roche، آلمان) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن پیروات دکربوکسیلاز (آغازگر استفاده شده در PCR) در آنالیز RT-PCR استفاده شد. همچنین آغازگرهای اختصاصی ۱۸S rRNA برای تکثیر رونوشت آن به عنوان کنترل داخلی به کار رفت. برای سنتز cDNA دورشته‌ای به طور هم‌زمان در یک ویال طبق جدول ۱ انجام و محصول RT-PCR حاصل در ژل آگارز ادرصد بررسی شد.

نتایج

نتایج کشت هوازی باکتری اشرشیا کلای در محیط کشت LB و کشت بی‌هوازی باکتری زایموموناس موبیلیس در محیط کشت مایع و جامد مخصوص این باکتری نشان داد که شرایط برای رشد و تکثیر آن‌ها بهینه است و به راحتی تشکیل کلونی دادند (شکل ۱).

جدول ۱- برنامه تکثیر آغازگرهای اختصاصی برای RT-PCR

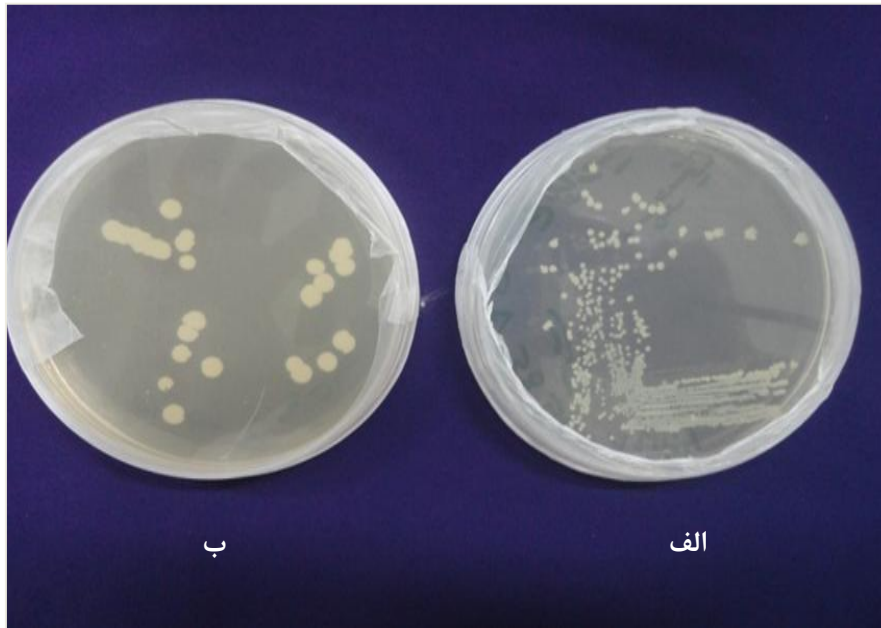
چرخه	مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
1X	واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۱۰
	واسرشت‌سازی	۹۴	۶
	اتصال	۵۴	۲
35X	بسط	۷۲	۴۰
	واسرشت‌سازی	۹۴	۱
	اتصال	۵۴	۲
	بسط	۷۲	۵

انتخاب پلاسمید نوترکیب و تأیید وجود ژن های مورد نظر از طریق پی‌سی‌آر: از کلونی‌های رشد یافته در محیط انتخابی، کلونی پی‌سی‌آر انجام شد. برای این منظور کلونی باکتری به عنوان الگوی تکثیر DNA به مخلوط واکنش اضافه شد و پی‌سی‌آر با آغازگرهای رفت و برگشت ژن پیروات دکربوکسیلاز انجام شد.

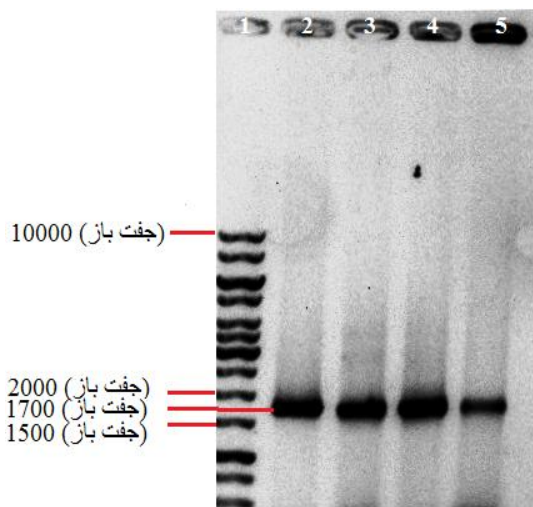
هضم دوگانه پلاسمیدهای نوترکیب جهت تأیید وجود ژن مورد نظر: در این مرحله پلاسمیدهای استخراجی از کلونی‌هایی با پی‌سی‌آر مثبت جهت هضم آنزیمی استفاده شدند. برای این منظور، مشابه روش بالا هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Xho I* و *Sal I* انجام شد.

انجام پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگر راه‌انداز رفت T7 و آغازگر برگشت ژن پیروات دکربوکسیلاز: در این مرحله به منظور تأیید صحیح بودن جهت ژن وارد شده، به جای استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت ژن پیروات دکربوکسیلاز از آغازگر رفت راه‌انداز T7 و آغازگر برگشت ژن پیروات دکربوکسیلاز برای انجام پی‌سی‌آر استفاده شد.

آنالیز RT-PCR: به منظور تأیید بیان ژن پیروات دکربوکسیلاز در باکتری اشرشیا کلای *pET 28a pdc* از آنالیز RT-PCR استفاده شد، بدین منظور باکتری‌ها به صورت سه برابر با $OD_{600} = 0.3$ رشد کردند، جهت تحریک عوامل رونویسی برای آغاز رونویسی از پروموتور T7، گزیلوز ۵٪ (w/v) به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت سه ساعت در این شرایط نگهداری شدند. پس از سه ساعت نمونه‌ها سانتریفوژ شدند (با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و سلول‌های به دست آمده در ویال‌های ۱ میلی‌لیتری حاوی محلول تثبیت کننده RNA قرار گرفتند و به مدت یک



شکل ۱- تشکیل کلونی باکتری در محیط کشت LB در شرایط دمایی ۳۷ و ۳۰ درجه سانتی گراد، الف: باکتری *زایموموناس موبیلیس* ب: اشرشیا کلای



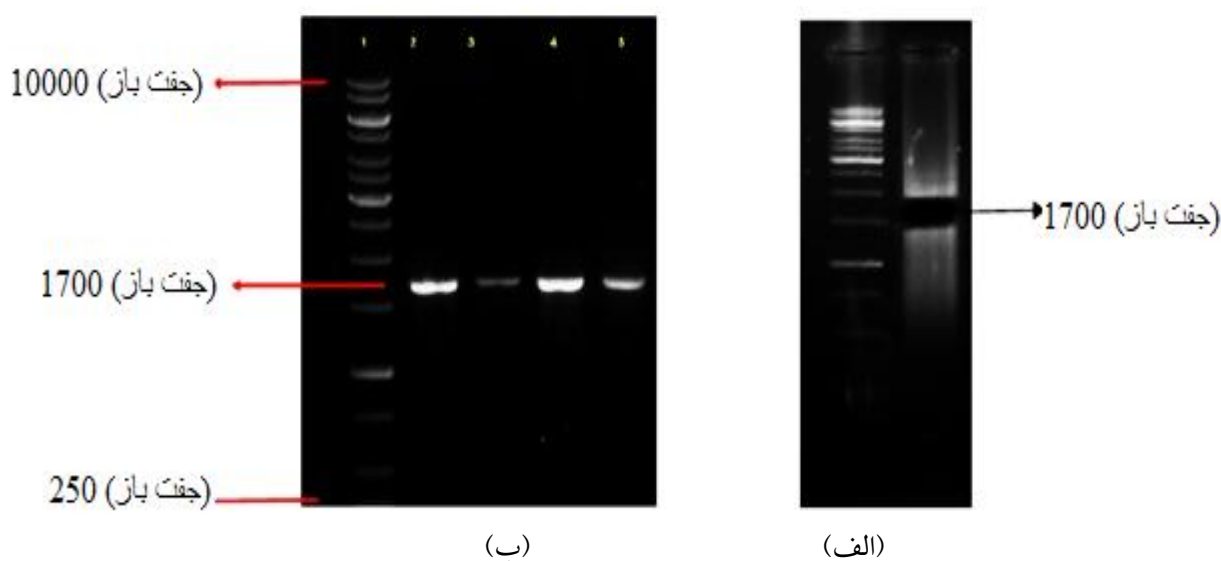
شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد جداسازی ژن پیروات دکربوکسیلاز از ژنوم باکتری *زایموموناس موبیلیس* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *pdc* با استفاده از پی سی آر، پروفیل های دمایی مختلف پی سی آر (چاهک ها به ترتیب ۱- مارکر ۱۰۰۰۰ جفت باز و چاهک های ۲ تا ۵ باندهای مربوط به محصولات پی سی آر ژنوم باکتری *زایموموناس موبیلیس* با آغازگرهای طراحی شده در دماهای مختلف که به ترتیب دماهای ۵۲، ۵۴، ۵۶ و ۵۸ درجه سانتی گراد است).

جداسازی ژن پیروات دکربوکسیلاز توسط

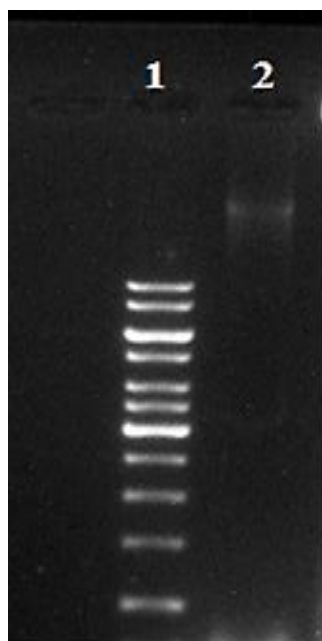
پی سی آر: نتایج الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد محصولات پی سی آر تکثیر باندهایی با اندازه تقریبی ۱۷۰۰ جفت باز را نشان داد (شکل ۲). با توجه به باندهای مشاهده شده در ژل الکتروفورز، این نتایج آشکار کرد که تمامی دماهای اعمال شده باعث تکثیر ژن های مورد نظر به صورت اختصاصی می شوند (شکل ۲).

خالص سازی ژن پیروات دکربوکسیلاز از ژل

آگارز: نتایج الکتروفورز خاص سازی ژن پیروات دکربوکسیلاز از ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که این ژن به خوبی از ژل خالص و باندهای آن به صورت مشخص بر ژل قابل مشاهده است. باندها عاری از هرگونه آلودگی و بدون شکستگی بودند (شکل ۳).



شکل ۳- خالص‌سازی ژن پیرووات دکربوکسیلاز از ژل آگارز ۱درصد: الف. برش ژن پیرووات دکربوکسیلاز از روی ژل آگارز. ب. محصول خالص‌سازی ژن پیرووات دکربوکسیلاز از ژل بر روی ژل آگارز ۱درصد (چاهک به‌ترتیب ۱- مارکر ۱۰۰۰۰ جفت‌باز، ۲، ۳، ۴ و ۵ ژن خالص‌سازی‌شده از ژل)



شکل ۴- الکتروفورز ژل آگارز ۱درصد استخراج پلاسمید (۱- مارکر ۱۰۰۰۰ جفت‌باز، ۲- پلاسمید *pET 28a*)

استخراج پلاسمید به روش مینی پرب پس از افزایش تعداد کپی آن: الکتروفورز ژل آگارز ۱درصد استخراج موفق پلاسمید *pET 28a* از باکتری اشرشیا کلای را به روش مینی پرب آشکار کرد (شکل ۴).

هضم دوگانه پلاسمید *pET 28a* و ژن پیرووات دکربوکسیلاز توسط آنزیم‌های *Xho I* و *Sal I*: در این مرحله ابتدا به منظور تأیید عملکرد صحیح آنزیم‌های برشی *Xho I* و *Sal I*، پلاسمید *pET 28a* توسط هر کدام از این آنزیم‌ها به صورت تکی برش یافت. در صورت عملکرد صحیح این آنزیم‌ها پلاسمید از یک نقطه برش می‌خورد و به صورت خطی در می‌آید که در این صورت اندازه آن (حدود ۵۰۰۰ جفت‌باز) نیز روی ژل قابل مشاهده می‌شد (شکل ۵ و ۶).

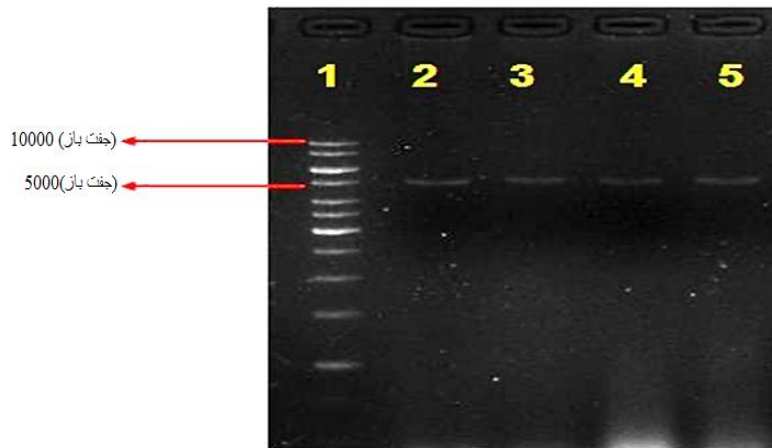
کشت در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، کلون‌های رشد یافته در این محیط به عنوان سلول‌های نو ترکیب حاوی پلاسمید مورد نظر شناسایی و جهت انجام ادامه آزمایش‌ها آنالیز شدند. تمامی باکتری‌هایی که حاوی هر یک از این پلاسمیدها هستند، قادر به رشد در محیط حاوی کانامایسین هستند (شکل ۸)؛ بنابراین در مراحل بعدی برای تعیین باکتری نو ترکیب حاوی ژن مورد مطالعه، به صورت صحیح غربال باکتری‌های مورد نظر انجام شد.

همسانه‌سازی ژن پیروات دکربوکسیلاز در پلاسمید

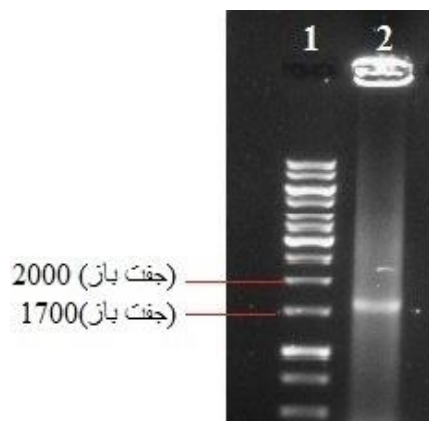
pET 28a پس از انجام واکنش اتصال آنزیمی توسط آنزیم لیگاز، ژن پیروات دکربوکسیلاز و ناقل *pET 28a* برش یافته توسط آنزیم‌های *Sal I* و *Xho I* توسط آنزیم لیگاز به همدیگر متصل و سازه نو ترکیب *pET 28a pdc* ایجاد شد (شکل ۷).

تراویز باکتری اشرشیا کلای توسط پلاسمید

نو ترکیب *pET 28a pdc* پس از تراویز سلول‌های شایسته، باکتری‌ها با استفاده از روش ذوب-انجماد و



شکل ۵- نتایج الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمید *pET 28a* توسط آنزیم‌های *Sal I* و *Xho I* (چاهک شماره ۱- مارکر ۱۰۰۰۰ جفت باز، چاهک ۲ و ۳ برش پلاسمید توسط آنزیم *Sal I*، چاهک ۴ و ۵- برش پلاسمید توسط آنزیم *Xho I*).



شکل ۶- الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد هضم آنزیمی ژن *pdc* توسط آنزیم‌های *Sal I* و *Xho I* (چاهک شماره ۱- مارکر، چاهک شماره ۲- برش ژن پیروات دکربوکسیلاز)



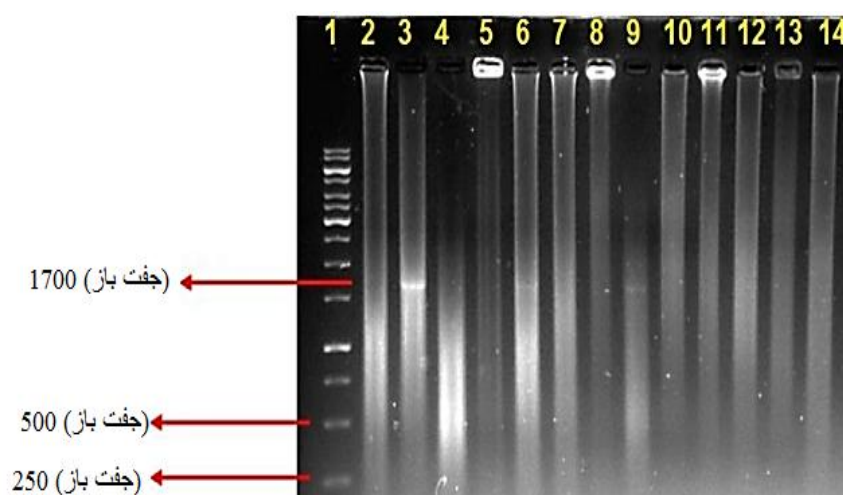
شکل ۷- سازه نو ترکیب *pdc* *pET28a* ژن پیروات دکربوکسیلاز در ناقل *pET28a* تحت کنترل راه انداز T7



شکل ۸- تشکیل کلونی باکتری‌های *اشرشیا کلای* ترانسفورم شده در محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم آنتی‌بیوتیک کانامایسین

کلونی پی سی آر و انتخاب کلونی‌های حاوی

پلاسمیدهای نو ترکیب: از کلونی‌های رشد یافته در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پیروات دکربوکسیلاز، کلونی پی سی آر انجام شد. این روش، یکی از روش‌های سریع جهت بررسی کلونی‌های نو ترکیب است. نتایج الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که امکان شناسایی تعدادی از کلونی‌های نو ترکیب حاوی ژن مورد نظر با استفاده از کلونی-PCR وجود دارد و باند مورد نظر (۱۷۰۰ جفت باز) تکثیر شد (شکل ۹).



شکل ۹- الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد محصول کلونی-PCR ژن پیروات دکربوکسیلاز. ۱: مارکر ۱۰۰۰۰ جفت باز، ۲: کنترل منفی (آب)، ۳: کنترل مثبت (ژنوم باکتری پیروات دکربوکسیلاز) ۴-۱۴: کلونی‌های (۶ و ۹ جواب مثبت).

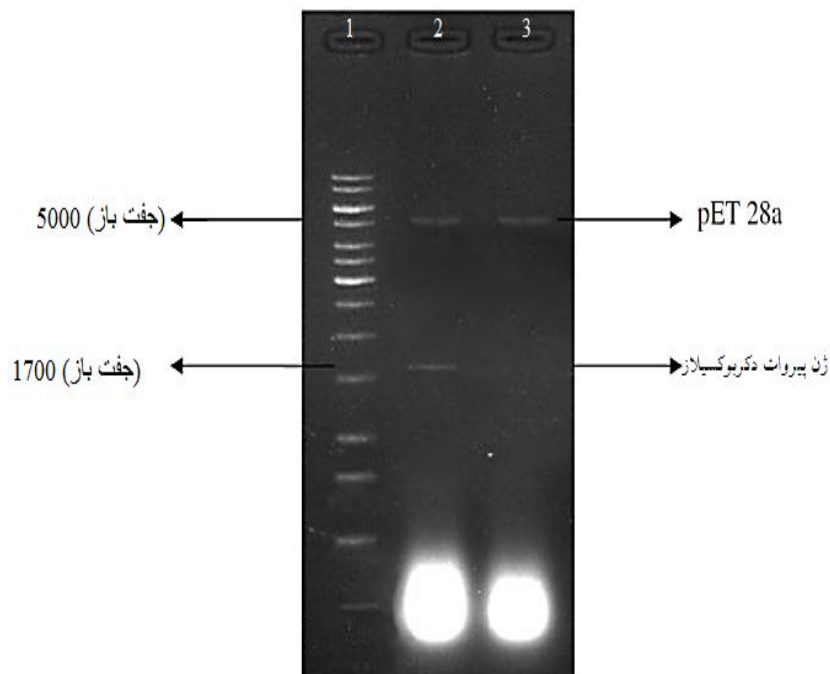
آغازگر برگشتی ژن پیرووات دکربوکسیلاز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای رفت راه انداز T7 و آغازگر برگشتی ژن پیرووات دکربوکسیلاز جهت صحیح ورود ژن در پلاسمید *pET28a* را نشان داد. در صورت وارد شدن صحیح ژن باندهای مربوط به پیرووات دکربوکسیلاز بایستی ۱۸۵ جفت باز پیوسته بزرگ تر از ژن پیرووات دکربوکسیلاز می‌شد؛ زیرا با توجه به این که ژن پیرووات دکربوکسیلاز مقابل راه انداز T7 قرار داده شده بود و اندازه این راه انداز تا ابتدای جایی که ژن در پلاسمید درج شده است ۱۸۵ جفت پیوسته است و اندازه نهایی باندهای تکثیر یافته در حدود ۱۸۸۵ جفت باز است (شکل ۱۱).

استخراج پلاسمیدهای حاوی ژن پیرووات

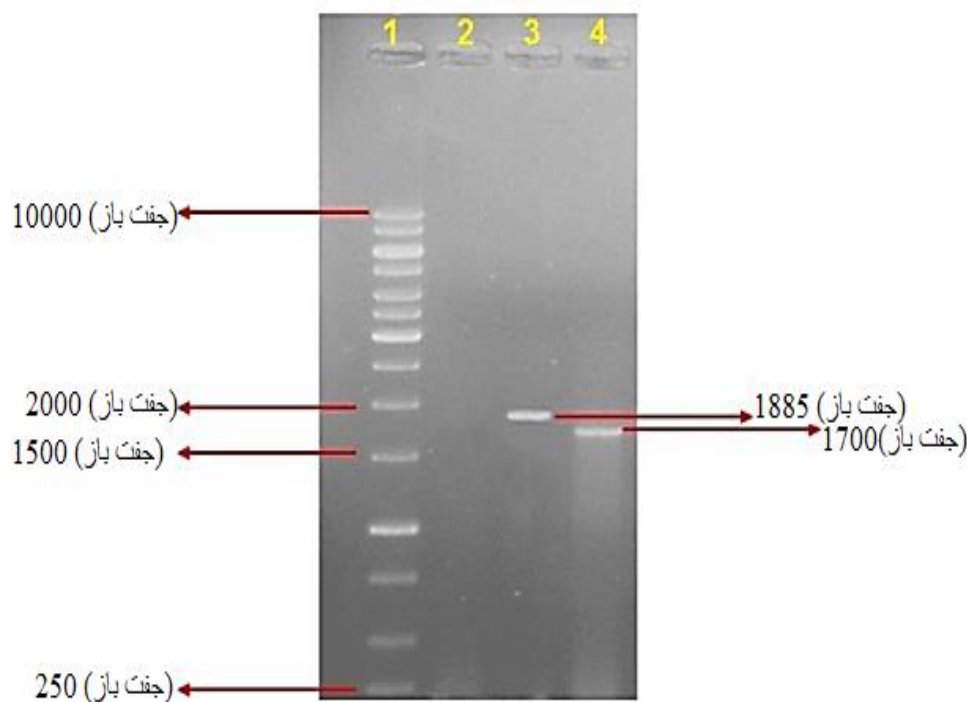
دکربوکسیلاز و هضم دوگانه آن توسط آنزیم برشی:
پلاسمید کلونی‌هایی که در مرحله قبل نسبت به کلونی-PCR جواب مثبت داده بودند استخراج شد و هضم دوگانه به منظور تأیید دوباره وجود ژن انجام شد. نتایج الکتروفورز هضم دوگانه توسط آنزیم‌های *Sal I* و *Xho I* آشکار کرد که پس از انجام هضم آنزیمی دو باند در پلاسمیدهای نو ترکیب شامل پلاسمید خطی شده (۵۰۰۰ جفت باز) و ژن (۱۷۰۰ جفت باز) پیرووات دکربوکسیلاز بر روی ژل آگارز ظاهر می‌شوند (شکل ۱۰).

تأیید سازه *pET 28a pdc* به وسیله پی سی آر با

آغازگرهای رفت راه انداز T7 و برگشتی ژن پیرووات دکربوکسیلاز؛ به منظور تأیید اتصال صحیح ژن و امکان بیان بعدی آن، با استفاده از آغازگر رفت راه انداز T7 و



شکل ۱۰- الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد هضم دوگانه ژن (۱: مارکر ۱۰۰۰۰ جفت باز، ۲: هضم دوگانه پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن، ۳: هضم دوگانه پلاسمید شاهد بدون ژن)

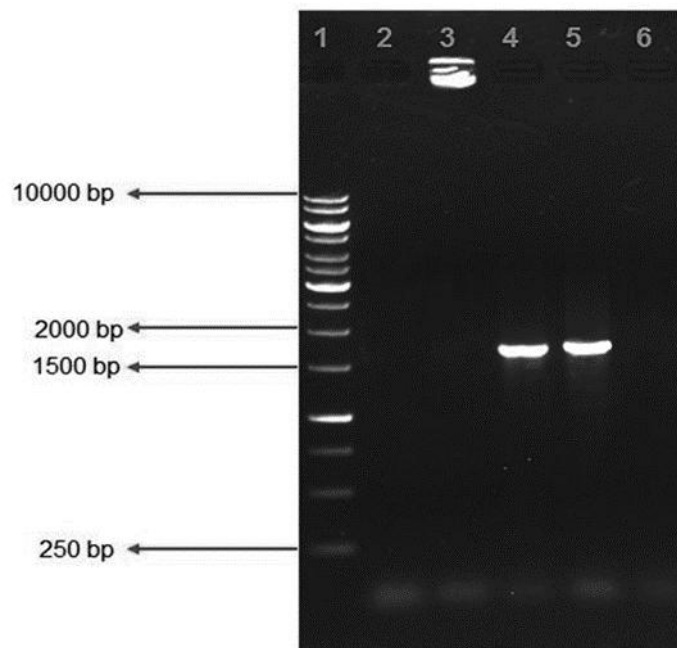


شکل ۱۱- الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR پلاسمید نو ترکیب با استفاده از آغازگر رفت راه‌انداز T7 و آغازگر برگشت ژن پیروات دکربوکسیلاز

آلوده نبودن واکنش RT با هرگونه DNA حاوی توالی ژن پیروات دکربوکسیلاز بود. باکتری‌های غیرتراریخته به عنوان کنترل منفی دوم و واکنش RT (تیمارشده با *RNase* عاری از *DNase*) و انجام واکنش با آنزیم *Taq DNA polymerase* به عنوان کنترل منفی سوم بود؛ نبود باند در این چاهک نشان دهنده آلوده نبودن نمونه‌ها به هرگونه DNA بود. باکتری‌های تراریخته مثبت در واکنش RT باند مورد انتظار ۱۷۰۰ جفت باز را نشان دادند که حاکی از بیان ژن مورد نظر در این نمونه‌ها بود (شکل ۱۲).

بیان ژن پیروات دکربوکسیلاز در سطح mRNA:

به منظور بیان ژن پیروات دکربوکسیلاز در باکتری‌های تراریخت شده/اشرشیا کلای *pET 28a pdc* از آنالیز RT-PCR استفاده شد. در این آنالیز از ژن *18s rRNA* به عنوان کنترل داخلی به صورت نسبت ۱:۱ با پرایمر *18s rRNA -competimer* و *18s rRNA* و *18rRNA* کنترل میزان تکثیر آن استفاده شد. پلاسمید نو ترکیب *pET 28a pdc* به عنوان کنترل مثبت باند مورد انتظار ۱۷۰۰ جفت باز را تولید کرده است. واکنش RT بدون RNA الگو به عنوان کنترل منفی اول هیچ نواری تشخیص داده نشد که نبود باند در آن‌ها نشان از



شکل ۱۲-آنالیز RT-PCR برای کلونی‌های باکتری *E. coli pET 28a pdc*، ۱: نشانگر 1 Kb DNA Ladder (Fermantas)، ۲: واکنش RT بدون RNA الگو به‌عنوان کنترل منفی اول، ۳: باکتری غیر تراریخته به‌عنوان کنترل منفی دوم، ۴: پلاسمید نو ترکیب *pET 28a pdc* به‌عنوان کنترل مثبت، ۵: باکتری تراریخته *E. coli pET 28a pdc*، ۶: واکنش RT (تیمار شده با *RNase* عاری از *DNase*) و انجام واکنش با آنزیم *Taq DNA polymerase* به‌عنوان کنترل منفی سوم

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش قیمت نفت در چندین سال اخیر، کاهش منابع فسیلی، تجدیدپذیر نبودن این سوخت‌ها و نگرانی‌های زیست‌محیطی منجر به افزایش علاقه جهانیان به تولید سوخت‌های زیستی شده است. سوخت‌های زیستی تجزیه‌پذیرند و می‌توانند جایگزین سوخت‌های فسیلی و باعث کاهش گازهای گلخانه‌ای شوند، همچنین تولید آن‌ها باعث می‌شود کشورها از لحاظ نیاز به سوخت‌های فسیلی، وابسته نباشند (۱۹).

سلولز بعد از اینکه عملیات پیش‌تیمار و شیرین‌سازی آنزیماتیک بر آن انجام شد به منوساکاریدهایی مثل گلوکز، زایلوز و پنتوزهایی که می‌توانند به‌وسیله میکروارگانیزم‌ها استفاده شوند، هیدرولیز می‌شود. همه این منوساکاریدها به ماده حد واسط مهم متابولیک یعنی

پیرووات از طریق مسیر امبدن میرهوف^{۲۶} و انتنر دودروف^{۲۷} و تعدادی مسیر دیگر تبدیل می‌شوند. تبدیل پیرووات به استالدئید و CO_2 توسط آنزیم پیرووات دکربوکسیلاز یک مرحله حیاتی در فرایند تخمیر اتانول است. سرانجام استالدئید به وسیله الکل دهیدروژناز *II* و در حضور $NADH$ به اتانول تبدیل می‌شود. در این فرایند تولید، آنزیم‌های پیرووات دکربوکسیلاز و الکل دهیدروژناز *II* برای میکروارگانیزم‌هایی که به میزان کم و یا اصلاً الکلی تولید نمی‌کنند بسیار مهم هستند. در حال حاضر، به دلیل حضور آنزیم‌های پیرووات دکربوکسیلاز و الکل دهیدروژناز در میکروارگانیزم‌های زایموموناس موبیلیس و ساکارومایسس سرویزیه، از آن‌ها به‌طور گسترده در فرایند تخمیر الکلی استفاده می‌شود. گفتنی است که

یک پلاسمید بیانی و بیان این ژن‌ها به صورت ژنتیکی در سویه‌های مختلف هدف محققان برای کاربرد مهندسی ژنتیک به منظور بهبود تجزیه سلولز و تولید اتانول است (۲۳).

ژن *پیروات دکربوکسیلاز* به دلیل نقش کلیدی که در متابولیسم *پیروات* و تولید اتانول دارد و همچنین میزان فعالیت بالای این ژن در باکتری *زایموموناس موبیلیس*، به عنوان ژن کاندید جهت جداسازی و همسانه‌سازی در این پژوهش انتخاب شد.

به دلیل نقش مهم متابولیسم *پیروات*، پژوهش بر ژن‌های *پیروات دکربوکسیلاز* و *الکل دهیدروژناز* دارای اهمیت بیشتری در جهت ساخت سویه‌های مهندسی ژنتیک است که می‌توانند در تخمیر و هیدرولیز سلولز به اتانول استفاده شوند. از دهه ۱۹۹۰ تاکنون پژوهش بر ژن‌های *پیروات دکربوکسیلاز* و *الکل دهیدروژناز* افزایش یافته است (۵).

در پژوهشی که اینگرام^{۲۹} و همکاران انجام دادند، ژن *پیروات دکربوکسیلاز* از باکتری *زایموموناس موبیلیس* به باکتری *اشرشیا کلای* انتقال یافت. مقایسه سویه‌های والدینی و نو ترکیب از باکتری *اشرشیا کلای* نشان داد که میزان تولید اتانول زیستی در باکتری‌های نو ترکیب افزایش می‌یابد، این بدین معنی است که جریان کربن به طور مؤثر از *پیروات* به سوی تولید اتانول روانه می‌شود (۲۴). باکتری *زایموموناس موبیلیس* تنها میکروارگانیسمی است که گلوکز را به طریق بی‌هوازی از مسیر *انترودر ف* متابولیزه می‌کند. تمامی آنزیم‌های درگیر در مسیر تخمیر با تمام توان بیان می‌شوند (۲۵).

تولان و فین^{۳۰} یک پلاسمید چند کپی شامل ژن *پیروات دکربوکسیلاز* از *زایموموناس موبیلیس* با اندازه ۱۷۰۷ جفت باز را تهیه و به باکتری *کلبسیلا spp* منتقل

توالی کدکننده این ژن‌ها در این دو میکروارگانیسم متفاوت است. ژن ساختاری *پیروات دکربوکسیلاز* از *زایموموناس موبیلیس*، ۱۷۰۷ نوکلئوتید طول دارد که پلی پپتیدی به اندازه ۵۶۸ اسید آمینه به وزن ۶۰،۶۹۰ دالتون را کد می‌کند. چهارچوب خواندن اصلی ژن ۱۶۴۷ جفت پیوسته است. رونویسی از ژن در ۳۰- و پایان رونویسی ۱۰۰ پیوسته پایین دست از کدون پایان اتفاق می‌افتد (۲۰).

پیروات دکربوکسیلاز یکی از آنزیم‌های کلیدی و مشترک در تمامی موجودات تولیدکننده اتانول است. اگرچه این آنزیم به طور وسیع در گیاهان، مخمرها و قارچ‌ها توزیع شده است، این آنزیم در جانوران وجود ندارد و در باکتری‌ها نادر است (۲۱). فعالیت این آنزیم در باکتری *زایموموناس موبیلیس* در حدود ۶۰۰ (میکرومول. دقیقه^{-۱}) است که بالاتر از هر منبع دیگری است. این میزان فعالیت بالای آنزیم را حتی مخمرها نیز ندارند (۲۲).

استفاده از میکروارگانیسم‌های *زایموموناس موبیلیس* و *ساکارومایسس سرویزیه* در تولید صنعتی اتانول با محدودیت‌هایی نظیر تحمل به اتانول، تحمل به اسید، توانایی تجزیه سلولز، محدودیت متابولیسم منوساکاریدها و ... مواجه هستند (۲۳).

بینگ زائو^{۲۸} و همکاران طی پژوهش‌هایی به این نتیجه رسیدند که عملکرد تولید اتانول به بیان سطوح بالایی از ژن‌های *پیروات دکربوکسیلاز* و *الکل دهیدروژناز* که در سرعت و کارایی تولید اتانول تاثیر می‌گذارند و به عنوان فاکتورهای مهم و کلیدی در مسیر کاتابولیک تخمیر اتانول هستند، بستگی دارد. بنابراین همسانه‌سازی ژن‌های *پیروات دکربوکسیلاز* و *الکل دهیدروژناز* از باکتری *زایموموناس موبیلیس* با ساخت

افزایش تولید اتانول شده است؛ بنابراین در این پژوهش، این ژن جهت جداسازی و همسانه‌سازی انتخاب شد. هدف اصلی در این پژوهش همسانه‌سازی ژن مدنظر بود ولی جهت بیان مناسب و افزایش تولید آنزیم پیروات دکربوکسیلاز، این ژن تحت راه انداز قوی T7 در داخل پلاسمید *pET 28a* قرار داده شد و به باکتری *اشرشیا کلای* انتقال یافت. انتظار می‌رود با افزایش بیان این ژن تحت پروموتور قوی T7، در باکتری *اشرشیا کلای* میزان تولید اتانول در این باکتری نیز افزایش یابد.

References

- (1) Dien B.S., Jung H.J., Vogel K.P., Casler M.D., Lamb J.A., Iten L., et al. Chemical composition and response to dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass and switchgrass. *Biomass and Bioenergy In Press* 2006; 30 (10): 880- 90.
- (2) Champagne P. Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada Conservation and Recycling. *Resources, Conservation and Recycling* 2007; 50 (3): 211- 30.
- (3) Chandel K., Chan E.S., Rudravaram R., Narasu M., Lakshmi R., Enkateswar L.V., et al. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies. *Biotechnology and Molecular Biology* 2007; 2 (1): 014- 032.
- (4) Nyguen QA., Saddler JN. An integrated model for technical and economic evaluation of an enzymatic biomass conversion process. *Bioresource Technology* 1991; 35 (3): 275-282.
- (5) Dien B., Cotta M.A., Jeffries T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production. current status. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003; 63 (3): 258- 66.

کردند. بعد از غربال سویه‌ها، آن‌ها سویه نوترکیبی از کلبسیلا پلنتی کلا^{۳۱} ATCC 33531 را به دست آوردند که بیان ژن پیروات دکربوکسیلاز به‌طور چشمگیری در آن افزایش یافته بود. ژن بیان‌شده در باکتری کلبسیلا بر ژل الکتروفورز بانندی به اندازه ۱۷۰۷ جفت باز نمایان کرد. عملکرد اتانول در این سویه نوترکیب از زایلوز ۳/۱ مول/مول (۲۵/۱ گرم/لیتر) بود. هم‌زمان با افزایش اتانول، افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در عملکرد فورمات، استات، لاکتات و بوتان دی‌ال مشاهده شد. این محققان همچنین ژن‌های پیروات دکربوکسیلاز و الکل دهیدروژناز II از باکتری *زایموموناس موبیلیس* را به باکتری *اروینیا spp*^{۳۲} منتقل کردند. ژن پیروات دکربوکسیلاز بر روی ژل آگارز بانندی به اندازه ۱۷۰۰ جفت باز و ژن الکل دهیدروژناز بانندی به اندازه ۱۱۵۰ جفت باز را نمایان کردند. بیان این ژن‌ها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای عملکرد اتانول را (در زایلوز از ۷/۰ مول/مول به ۴/۱) افزایش و عملکرد فورمات، استات و لاکتات را کاهش داد (۲۶). در این پژوهش ژن پیروات دکربوکسیلاز از باکتری *زایموموناس موبیلیس* با اندازه ۱۷۰۰ جفت باز جداسازی شد. پس از انتقال این ژن به باکتری *اشرشیا کلای*، این ژن بر روی ژل الکتروفورز بانندی با اندازه ۱۷۰۰ جفت باز را نمایان کرد.

با توجه به پژوهش‌های انجام‌شده بر این ژن توسط محققان می‌توان چنین نتیجه گرفت که ژن پیروات دکربوکسیلاز از باکتری *زایموموناس موبیلیس* اصلی‌ترین و کلیدی‌ترین ژن تولیدکننده الکل است و همچنین آنزیم‌هایی که تولید کرده، دارای بیشترین فعالیت آنزیمی در میان تمامی آنزیم‌های مشابه در دیگر میکروارگانیسم‌ها است که همسانه‌سازی و انتقال این ژن از این باکتری به دیگر میکروارگانیسم‌ها همواره باعث

- (6) Rogers P.L., Lee J., Skotnicki M.L., Tribe D.E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 1982; 23(6): 37- 84.
- (7) Sprenger G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters Oxford Journals* 1996; 145 (303): 301- 07.
- (8) Candy J.M., Duggleby R.G., Mattick J.S. Expression of active yeast pyruvate decarboxylase in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 1991; 137 (12): 2811- 15.
- (9) Ohta K., Beall D.S., Mejia J.P., Shanmugam K.T., Ingram L.O. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57 (10): 2810- 15.
- (10) Guedon E., Desvaux M., Petitdemange H. Improvement of cellulolytic properties of *clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68 (1): 53- 8.
- (11) Jiang Y., You S., Ren J., Xie L.Y. Molecular cloning and expression of pyruvate decarboxylase cDNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University* 2002; 19 (4): 291- 3.
- (12) Ren J., Jiang Y.H. Molecular cloning and expression of *pyruvate decarboxylase* gene from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University* 2006; 23 (11): 735- 8.
- (13) Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manua*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- (14) Lillie., R. D. *H. J. Conn's Biological Stains*. 9th ed. New York: The Williams and Wilkins Baltimore Md; 1977.
- (15) SobanaPiriya P., Thirumalai Vasan P., Padma V. S., Vidhyadevi U., Archana K., John Vennison S. Cellulosic ethanol production by recombinant cellulolytic bacteria harbouring *pdc* and *adh II* genes of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology research international* 2012; 2012 (10): 1155- 62.
- (16) Sambrook J., Russell DW. *Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprepation*. New York: Cold Spring Harb Protoc; 2006. doi:10.1101/pdb.prot4084.
- (17) Sambrook J., Russell DW. *The condensed protocols from molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.
- (18) Ish-Horowicz D. and Burke J.F. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research Oxford Journals* 1981; 9 (13): 2989- 98.
- (19) Walter A.F., Rosillo Calle., Mase D. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. *Biomass & Bioenergy* 2008; 32 (8): 730- 48.
- (20) Alan D., Robert K., Richard E., Wettenhall H., Hoogenraad J. Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis*. *Nucleic Acids Research Oxford Journals* 1987; 15 (4): 1753- 61.
- (21) Krishnan C.R., Lee A., Talarico K., Lonnie O., Julie A. Maupin-furlow department of microb and cell science. University of Florida, Gainesville, Florida 32611-0700. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68 (2): 2869- 76.
- (22) Algar E.M and Scopes R. KStudies. on cell-free metabolism: ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology* 1985; 2 (5): 275-287.
- (23) Bingzhao M., Zhang H., Qian D., Yang L.O., Xiangdong F., Zhang B., et al. Mechanism and research progress of ethanol fermentation related genes *pdc* and *adhII* involved in fuel ethanol production.

Department of Life Science and Engineering
2007; 7 (2): 171- 8.

- (24) Ingram L.O and Conway T. Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 1988; 54 (2): 397- 404.
- (25) Bringer M., Schimz S, Sahm H. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* isolation and partial characterization. *Archives of Microbiology Journal* 1986; 146 (2): 105- 10.
- (26) Tolan S.J., Finn R.K. Fermentation of D-Xylose to ethanol by genetically modified *Klebsiella planticola*. *Applied and Environmental Microbiology* 1987; 53 (9): 2039- 44.

¹- C₂H₅OH

²- *Escherchia coli*

³- *Zymomonas mobiles*

⁴- *Klebsiella oxytoca*

⁵- *Saccharomyces cerevisiae*

⁶- PFL

⁷- ADH

⁸- PDC

⁹- Candy

¹⁰- Guedon

¹¹- *Cyanobacteria cellulotricum*

¹²- Jiang

¹³- Ren

¹⁴- *Sacharomyces cervisiae*

¹⁵- Over Expression

¹⁶- PTCC

¹⁷- Primer

¹⁸- www.nebcutter.com

¹⁹- Takapouzist

²⁰- incubation

²¹- Miniprep

²²- Forward

²³- Reverse

²⁴- Fermentase

²⁵- Vivantis

²⁶- EMP

²⁷- ED

²⁸- Bingzhao

²⁹- Ingram

³⁰- Tolan and Finn

³¹- *Klebsiella planticola*

³²- *Erwinia spp*

Cloning of affecting pyruvate decarboxylase gene in the production bioethanol of agricultural waste in the *E.coli* bacteria

Masome Zeinali

M.Sc. of Agricultural biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, masome.zeinali@yahoo.com

Bahman Hosseini *

Associate Professor of Plant Biotechnology of Agriculture College and Institute of Biotechnology of Urmia University, Iran, b.hosseini@urmia.ac.ir

Soodabeh Jahanbakhsh

Associate Professor of Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, soodabehjahanbakhsh@yahoo.com

Mahmod Rezazadeh bari

Associate Professor of Food Industry of Urmia University, Iran, mahmoud114@hotmail.com

Meisam Tabatabaee

Assistant Professor of Microb Biotechnology, Institute of Biotechnology, Karaj, Iran, meisam_tabatabaee@abrii.ac.ir

Abstract

Introduction: Ethanol made by a biomass is one of the useful strategies in terms of economic and environmental and as a clean and safe energy to replace fossil fuels considered and examined.

Materials and methods: In this study, key enzyme in the production of ethanol (Pyruvate decarboxylase) from *Zymomonas mobilis* bacteria was isolated and cloned at *E. coli* bacteria by freeze and thaw method. For gene cloning, we used specific primers of *pdC* and PCR reaction and then *pdC* gene isolated and pET 28a plasmid double digested with (*Sal I* and *Xho I*) enzymes. Digestion Products were ligated by T4 DNA ligase in 16 °C for 16 hours.

Results: Results of bacteria culture showed that a few colonies containing pET 28a plasmid could grow. Result of colony pcr of *pdC* gene with specific primers revealed 1700 bp bands in 1% agarose gel electrophoresis. The results of PCR with T7 promotor forward primer and *pdC* revers primer have proved the accurate direction of integration of *pdC* gene into plasmid and revealed 1885 bp band. Double digestion of recombinant plasmid with *Sall* and *XhoI* enzymes revealed same bands. Finally, RT showed the expected band of 1700 bp that implies the desired gene expression in the samples.

Discussion and conclusion: Due to the increased production of ethanol via pyruvate decarboxylase gene cloning in expression plasmids with a strong promoter upstream of the cloning site can conclude that, pyruvate decarboxylase cloning as a key gene would be useful and according to beneficial properties of *E. coli* bacteria, transferring the gene to bacteria appears to be reasonable.

Key words: Bioethanol, fermentation, gene transformation, lignocellulosic material, *pdC* gene, pET 28a plasmid

* Corresponding author

Received: February 16, 2014 / **Accepted:** April 22, 2015