NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.12/46 , 2022

Scan online to view this article

Inhibitory role of formate dehydrogenase enzyme in the growth of BL21 industrial bacteria

Roya Razavipour[1], Abbas Akhavan Sepahi[2] , Mohammad Hossein Modarressi[3],Bijan Bambai[4*]

1. Department Of Biology, Science and Research Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department Of Microbiology, School Of Biology Sciences, North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of Medical Genetics, School Of Medicine, Tehran University Of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Department Of Biotechnology Systems, National Institute Of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: High metabolism occurs in the presence of oxygen with rapid growth rate in a wide range of organisms including bacteria, yeasts or cancer cells. The ability to grow at high yields plays an important role in biotechnology, especially during the production of proteins (preferably recombinant) or metabolic compounds such as organic acids and secondary metabolites. Increasing the growth efficiency of bacteria, especially *Escherichia coli*, which is the engine of research and industrial activities, is a noble goal in microbial biotechnology. In this study, we sought to find a solution to reduce the amount of CO_2 produced and thus increase the production efficiency of cell mass from organic matter in the process of growth and proliferation by examining the metabolic pathways of *E. coli.*

Materials and Methods: Metabolic pathways documented on the KEGG site were examined with a view to reducing the CO_2 production efficiency of formic acid. Two strains of knockout bacteria of K12 origin were obtained from Keio microbial bank. Then, selected strains were cultured in complex (LB) and simple (M9 + Glycerol) media. Cell mass production in different treatments were compared with the standard BL21 strain based on optical absorption at 600 nm.

Results: In the LB complex medium, *Escherichia col*i mutants (W3866 and W4040) grew faster than BL21 (approximately 5-fold at 8 and 10 h and 3 times at 12 h compared to samples with the dehydrogenase formate gene). However, this difference was more pronounced in the simple M9 medium, as we observed more than 6-fold growth in 24 hours of incubation in mutant samples lacking the FDH gene compared to the BL21 maternal strain.

Discussion: The experiments were completely in line with metabolic predictions and the growth of mutant bacteria was higher than that of BL21. Interestingly, most mutants grew in a simple medium containing glycerol, which showed that glycerol is a very good source for the growth of Escherichia coli bacteria. These results explain the inconsistency of predictions of previous metabolic models that declared glycerol a suitable carbon source for the growth of E. coli, but did not achieve it in practice.

Conclusion: Under normal physiological conditions, *E. coli* is not able to grow high in glycerol medium. Deletion of formate dehydrogenase gene caused fundamental changes in metabolic process and increased growth rate compared to BL21 strain, which indicates the inhibitory role of this enzyme in increased growth efficiency of *E. coli* in the presence of glycerol. In addition, the resulting strain can be used to express recombinant proteins with higher efficiency

Keywords: *Escherichia coli*, Metabolic pathways, Formate dehydrogenase, Increased growth rate, Iau Science.

Corresponding author:
Department Of Biotechnology Systems, National Institute Of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
Email: Bambai2biotech@gmail.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۲ - شماره۴۶ - بهار ۱۴۰۱
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

نقش مهاری آنزیم فورمات دهیدروژناز در رشد باکتری صنعتی BL21

رویا رضوی پور[۱]، عباس اخوان سپهی[۲]، محمد حسین مدرسی[۳]، بیژن بمبئی[۴*]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، تهران،ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴. گروه زیست فناوری سامانه‌ها، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: متابولیسم بالا در حضور اکسیژن با سرعت رشد سریع در طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، مخمرها و یا سلول‌های سرطانی رخ می‌دهد. توانایی رشد با راندمان بالا نقش مهمی در بیوتکنولوژی به‌ویژه در طی فرآیند تولید پروتئین‌ها (به‌طور ترجیحی نوترکیب) و یا ترکیب‌های متابولیک مانند اسیدهای آلی و متابلیت‌های ثانویه ایفا می‌کند. افزایش راندمان رشد باکتری‌ها به‌ویژه باکتری اشرشیاکلی که موتور فعالیت‌های تحقیقاتی و صنعتی است هدف آرمانی در بیوتکنولوژی میکربی است. در این تحقیق بر آن شدیم تا با بررسی مسیرهای متابولیکی *E. coli* راهکاری برای کاهش میزان CO_2 تولیدی و در نتیجه افزایش راندمان تولید توده سلولی از مواد آلی در فرآیند رشد و تکثیر پیدا کنیم.

مواد و روش–ها: مسیرهای متابولیکی مستند شده در وبگاه KEGG با دیدگاه کاهش راندمان تولید CO_2 از اسید فرمیک بررسی شد. دو سویه باکتری ناک اوت شده با منشاء K12 از بانک میکروبی Keio تهیه شد. سپس، سویه‌های منتخب در محیط کمپلکس (LB) و ساده (M9+Glycerol) کشت داده شدند. میزان تولید توده سلولی در تیمارهای مختلف با اندازه‌گیری جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر با یکدیگر و هم‌چنین با سویه استاندار BL21 مقایسه شدند.

نتایج: در محیط پیچیده LB، موتان باکتری‌های اشرشیا (W3866 و .W4040) نسبت‌به BL21 از رشد بیش‌تری (در حدود ۵ برابر درساعات ۸ و ۱۰ ساعته و ۳ برابری در زمان ۱۲ ساعته نسبت‌به نمونه‌های دارای ژن فورمات دهیدروژناز) برخوردارند. البته این تفاوت در محیط ساده M9 بارزتر بود به‌طوری‌که رشد بیش از ۶ برابری در زمان ۲۴ساعت از انکوباسیون در نمونه‌های موتان فاقد ژن فورمات دهیدروژناز نسبت‌به سویه مادر BL21 مشاهده نمودیم.

بحث: آزمایش‌ها با پیش‌بینی‌های متابولیکی به‌طور کامل مطابقت داشت و رشد باکتری‌های موتان از باکتری BL21 بیش‌تر بود. نکته جالب توجه رشد بیش‌تر موتان‌ها در محیط ساده حاوی گلیسرول بود که نشان داد گلیسرول منبع به‌طور کامل مناسبی برای رشد باکتری اشرشیاکلی است. این نتایج دلایل عدم تطابق پیش‌بینی‌های مدل‌های متابولیکی قبلی که گلیسرول را یک منبع کربن مناسب برای رشد *E. coli* اعلام کرده بود، ولی در عمل به آن دست نمی‌یافت، را توضیح می‌دهد.

نتیجه‌گیری: در شرایط فیزیولوژیکی نرمال *E. coli* قادر به رشد بالایی در محیط گلیسرول نیست، حذف ژن فورمات دهیدروژناز در آن سبب تغییرهای اساسی در روند متابولیسمی و افزایش چند برابری رشد در مقایسه با سویه بیانی BL21 گردید که بیانگر نقش این آنزیم در جلوگیری از افزایش راندمان رشد *E. coli* در حضور گلیسرول است. به‌علاوه از سویه حاصل می‌توان در بیان پروتئین‌های نوترکیب با راندمان بالاتر استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی : اشرشیاکلی، مسیر متابولیکی، فورمات دهیدروژناز، افزایش ضریب رشد، Iau Science.

مقدمه

باکتری اشرشیاکلی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ابزار در زیست شناسی مولکولی است، اما بسیاری از منابع کلیدی برای

نویسنده مسئول:
گروه زیست فناوری سامانه‌ها، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
پست الکترونیکی: Bambai2biotech@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۲

مطالعه‌های ژنتیکی عملکردی و زیست شناسی سامانه‌ایی در ارتباط با *E. coli* هنوز محدود است (۱).

بر همین اساس محققین با تعیین توالی مجدد مناطق مشخص از دو سویه MG1655 K12، W3110 K12، سکانس دقیقی از ژنوم *E. coli* را در دسترس قرار دادند و پروژه عملکردی Keio در ژاپن شروع به‌کار کرد. منطق اصلی این پروژه شناسایی نقش ژن‌های غیرضروری در اشرشیاکلی است. در این پروژه بیش از ۲۰۰۰ موتان که در هر یک یکی از ژن‌های غیرضروری (یعنی ژن‌هایی که جزو Houskeeping نبودند) حذف شده است، ساخته شدند (۲،۳).

مجموعه Keio نه تنها یک منبع اساسی برای عملکرد سیستمیک ژنومی، بلکه یک منبع از داده‌های تجربی برای بسیاری رویکردهای زیست‌شناسی رسانه‌ایی را فراهم می‌کند. این جهش‌ها می‌توانند به‌عنوان ابزاری اساسی برای بسیاری از رویکردهای ژنتیکی عمل کنند و اجازه تجزیه و تحلیل و عواقب ناشی از حذف کامل ژن را می‌دهند. از آنجائی‌که بسیاری از محصولات ژن‌های *E. coli* در طبیعت محافظت می‌شوند، مجموعه Keio نه تنها برای مطالعه *E. coli* و سایر باکتری‌ها، بلکه برای بررسی خواص ژن‌ها در طیف وسیعی از موجودات زنده مفید خواهد بود (۱). بهینه‌سازی و دست‌کاری ژنتیکی در زمینه افزایش رشد میزبان‌های باکتریایی از جمله *E. coli* با هدف‌های مختلفی نظیر تولید پروتئین‌های نوترکیب، متابولیت‌های ثانویه نظیر اسیدهای آمینه و ..... با کاربرد در صنایع مختلف بسیار رواج یافته است. مطالعه‌ها و آزمایش‌های بسیار زیادی جهت افزایش و رسیدن به تراکم بالای سلولی در محیط‌های کشت اقتصادی و مناسب، با حذف و یا انتقال ژن در میزبان *E. coli* صورت گرفته است (۴).

بر اساس تحقیقات موجود، تغییر در ساختار ژنتیکی مسیرهای متابولیکی با روش‌های مهندسی ژنتیکی در باکتری‌هایی نظیر *E. coli* می‌تواند به‌منظور تولید مواد هدف و یا رشد عمومی باکتری، تأثیرات مثبتی را به‌همراه داشته باشد. به‌عنوان مثال بیان بالای ArcA منجر به تنظیم مسیرهای تنفسی و افزایش سرعت رشد در سوبسترای گلیکولیتیکی و نیز افزایش میزان جذب و دفع استات و در نتیجه میزان بالای رشد *E. coli* می‌گردد (۵).

ایجاد سویه‌هایی از باکتری اشرشیاکلی که میزان هدر رفت انرژی آن‌ها کم‌تر باشد از ابعاد مختلفی دارای جذابیت است. یکی از روش‌های ایجاد این سویه‌ها می‌تواند حذف آنزیم‌های تولیدکننده CO_2 باشد. CO_2 یک محصول اجتناب‌ناپذیر تنفس سلولی بوده و در عین حال یک سوبسترای بالقوه برای متابولیسم میکروبی است. با بررسی مسیرهای متابولیکی تولید CO_2 در پایگاه KEGG حذف آنزیم فورمات دهیدروژناز جهت کاهش تولید CO_2 پیشنهاد شد (۶).

از اهداف اولیه تولید این چنین سویه‌هایی می‌توان به کاهش فرآیند تبدیل اسید فرمیک به CO_2 اشاره نمود. از سوی دیگر ایجاد توانایی تبدیل گاز کربنیک به فورمات می‌تواند به‌عنوان هدف ثانویه تعریف شود. اسید فورمیک ساده‌ترین اسید آلی موجود در طبیعت است. فورمات اولین واسطه پایدار در احیای CO_2 به متانول و یا متان است (۷).

آنزیمی که این واکنش را کاتالیز می‌کند فورمات دهیدروژناز نام دارد. متاسفانه بیش‌تر آنزیم‌های موجود در طبیعت تمایل زیادی در تبدیل فورمات به گاز کربنیک (CO_2) دارند و واکنش برعکس را با راندمان قابل توجهی انجام نمی‌دهند. از سوی دیگر بسیاری از این آنزیم‌ها حساس به اکسیژن هستند و تنها در شرایط بی‌هوازی فعال هستند. در ژنوم باکتری *E. coli* چهار آنزیم فورمات دهیدروژناز شناسایی شده که همگی حساس به اکسیژن بوده و به‌طور معمول سیتوپلاسمی یا متصل به غشاء سلولی هستند.

استفاده از سویه‌های Knockouts شده فورمات دهیدروژناز *E. coli* و مقایسه تغییرهای آنابولیکی آن با سویه بیانی نظیر BL21 به‌عنوان یک سویه مادر می‌تواند نقش این آنزیم در کاهش تولید CO_2 را نمایان کند.

لذا در این تحقیق بر آن شدیم تا اثر حذف ژن این آنزیم را در مقایسه با سویه BL21 که کاربرد بالایی در زیست فناوری دارد مطالعه کنیم.

مواد و روش‌ها

الف: جهت تعیین خصوصیت‌های آنزیم مؤثر فورمات دهیدروژناز در تثبیت CO_2 و مقایسه K*cat* و K*m* این آنزیم درپایگاه داده‌های اطلاعاتی www. BRENDA.org و هم‌چنین مقالات منتشر شده بررسی و در باکتری‌های مختلف مقایسه لازم انجام گردید (۸).

ب: سکانس و مشخصات ژن‌های فورمات دهیدروژناز (FDH) مربوط به باکتری *E. coli* از سایت Regulon DB.ccg.unam.mx به‌دست آمدند (۹).

پ: دو سویه *E. coli* JW 4040 و *E. coli* JW 3866 که به‌ترتیب فاقد ژن فعال (fdhF) و (fdhD) بودند از مجموعه keio انتخاب شده و از شرکت Dharmacon، سفارش و خریداری گردید. بر اساس دستورالعمل شرکت آماده سازی سویه‌ها برای کشت و بررسی رشد از حالت لیوفیلیزه در شرایط استریل صورت گرفت.

ت: سویه BL21 به‌عنوان یک سویه استاندار بیانی استاندارد از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه و کشت اولیه انجام گردید (۱۰).

ث: محیط‌های کشت میکربی شامل: محیط LB مایع (۰/۵٪ عصاره مخمر، ۱٪ پپتون و ۱٪ NaCl) به‌عنوان محیط کشت کامل و محیط کشت M9 مایع (۱۲/۸ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات، ۳ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم NaCl، و ۱ گرم آمونیوم کلرید که پس از آتوکلاو شدن ۲ میلی‌لیتر محلول منیزیوم فسفات ۱ مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر کلسیم کلرید محلول یک مولار فیلتر شده به آن اضافه شده بود و منبع کربن نیز گلیسرول ۱۰ درصد بود به حجم یک لیتر رسانده شده بود) (Merck) حاوی گلیسرول به‌عنوان محیط کشت ساده مورد استفاده شدند (۱۱،۱۲،۱۳).

ج: علاوه‌بر محیط مایع، جهت تهیه محیط کشت جامد و رشد کلونی‌ها، به هر یک از محیط های کمپلکس یا ساده مقدار ۱/۵٪ آگار اضافه گردید. هم‌چنین استوک سویه‌های Knockout (JW 4040 و JW 366) بر اساس دستور العمل شرکت فروشنده در محیط کشت مایع LB کشت ودر ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه و سپس از کلنی-های رشد یافته در محیط آگاردار نیز کشت اصلی انجام شد (۱۱).

چ: جهت رشد ۲۴ ساعته باکتری‌ها، برای کشت اولیه از یک کلنی از محیط آگاردار برداشت نموده و در محیط مایع تلقیح و پس از رشد ۳ برابری در شرایط انکوباتور شیکردار در ۳۷ درجه به محیط اصلی انتقال صورت پذیرفت. کشت مایع با حجم حداکثر ۵۰ سی‌سی در ارلن ۲۵۰ سی‌سی انجام شده در انکوباتور شیکر دار با سرعت ۱۸۰ تا ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

ح: جهت مقایسه میزان رشد نمونه‌های باکتری‌های Knockout و سویه بیانی BL21 در مقاطع زمانی نشان داده شده در بخش نتایج، از هر کشت مایع ۲-۳ میلی‌لیتر نمونه برداشته شده و میزان رشد را بر اساس جذب نوری نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. زمان جمع‌آوری نمونه کم‌تر از ۳۰ ثانیه بوده تا هیچ‌گونه تأثیر قابل اندازه‌گیری بر رشد سلولی نداشته باشد.

خ: الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE): جهت ارزیابی و مقایسه میزان پروتئین‌های تولیدی ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۲۰ میکرولیتر بافر نمونه مخلوط شد و پس از یک دقیقه قرارگرفتن در آب جوش به سرعت به درون یخ منتقل شد بعد از ۵ دقیقه از یخ خارج شده و با ۱ دقیقه سانتریفوژاز مقدار ۳۰ میکرولیتر در هر چاهک وارد ژل ۱۰٪ پلی آکریل امید گردید و پروتئین‌های با ولتاژ ۱۱۰ ولت از یکدیگر جدا شدند. پس از حدود ۹۰ دقیقه، ژل‌ها به محلول رنگ‌آمیزی و سپس رنگ‌زدایی منتقل شده تا بتوان میزان پروتئین‌های تولیدی را مشاهده نمود (۱۱).

نتایج

با هدف بررسی نقش آنزیم فورمات دهیدروژناز(شکل ۱)، مسیر تثبیت دی اکسید کربن از سایت KEGG مشخص شد (۶،۱۴).

$$CO_2 + 2H^+ \xleftarrow{\text{FDH}} HCOOH$$

شکل۱- واکنش دوطرفه آنزیم فورمات دهیدروژناز(FDH)

اغلب آنزیم‌های فورمات دهیدروژنازدر بسیاری از باکتری‌ها نظیر *E. coli* تمایل به تبدیل فورمات به گاز کربنیک دارند.

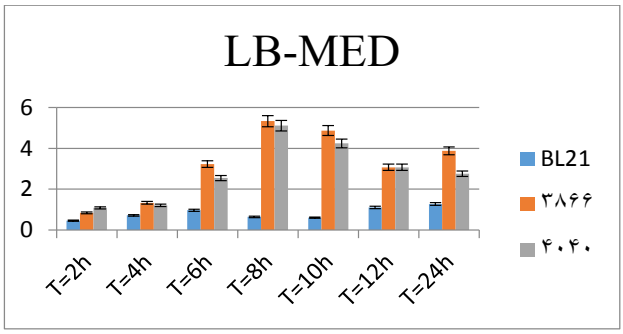
نمونه BL21 به‌عنوان یک سویه بیانی استاندارد در آزمایش-های مختلف مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی همواره مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق علاوه‌بر نمونه‌های ناک اوت شده از *E. coli*، سویه BL21 به‌عنوان سویه استاندارد رشد مورد استفاده بود که میزان رشد این سویه بیانی در شرایط مشابه از کشت باکتریایی، باکشت سویه‌های *E. coli* *W*4040 و *E. coli* W3866 با ۲ بار تکرار بررسی و مشخص شد که باکتری‌های فاقد زنجیره تولید کننده فورمات دهیدروژناز و زنجیره مکمل فورمات دهیدروژناز از رشد بسیار بالاتری نسبت‌به BL21 سویه استاندارد برخوردار هستند.

نتایج حاصل از نمونه‌ها در محیط پیچیده LB براث (جدول۱) و محیط ساده مینیمال M9 (جدول۲) به‌صورت متوسط از نتایج حاصل از تکرار به‌شرح زیر بود:

جدول ۱. نتایج میزان رشد باکتری‌های موتان و کنترل BL21, ۳۸۶۶،۴۰۴۰ در زمان‌های مختلف در محیط *L*B براث در ۶۰۰ نانومتر

زمان بر حسب ساعت	BL21	۳۸٦٦	۴۰۴۰
۲	۰/۴۶	۰/۸۴۵	۱/۰۹
۴	۰/۷۲	۱/۳۳۵	۱/۲۱۵
۶	۰/۹۷	۳/۲۳۵	۲/۵۵
۸	۰/۶۴۵	۵/۳۳	۵/۱۱
۱۰	۰/۶۱	۴/۸۷	۴/۲۴
۱۲	۱/۱۱	۳/۰۷	۳/۰۷
۲۴	۱/۲۷۵	۳/۸۷۵	۲/۷۶

آنالیز نتایج و نمودار حاصل از آن (شکل ۳) نشان داد که کشت در شرایط یکسان ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور *rpm* ۲۰۰ به‌مدت ۲۴ ساعت باکتری‌های BL21 و*E. coli* 4040 و*E. coli* 3866 در محیط پیچیده LB، باکتری موتان از رشد بسیار بیش‌تری درحدود ۵ برابر در ساعات ۸ و ۱۰ ساعته از انکوباسیون و ۳ برابری در زمان ۱۲ ساعته رشد نسبت‌به نمونه‌های دارای ژن فورمات دهیدروژناز برخوردارند.

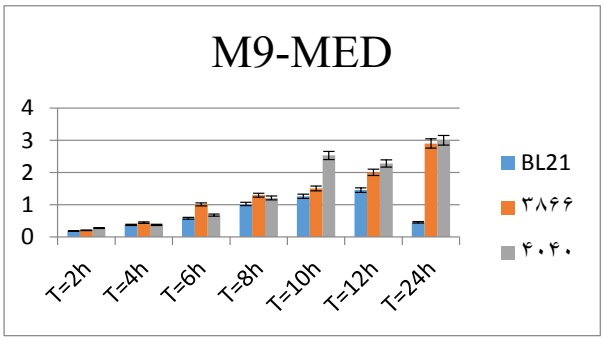


شکل ۳. نمودار متوسط میزان رشد در باکتری‌های موتان و مادر*BL21*, ۳۸۶۶،۴۰۴۰ و در زمان‌های مختلف در محیط LB:رشد بیش از ۵ برابری در زمان ۸ و ۱۰ساعت از انکوباسیون در نمونه‌های فاقد ژن فورمات دهیدروژناز نسبت‌به سویه مادر BL21 و رشد ۳ برابری در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته در نمونه موتان بوده که می‌تواند به‌دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه ممانعت کننده رشد باشد.

جدول ۲. نتایج میزان رشد باکتری‌های موتان و مادر*BL21*, ۴۰۴۰، ۳۸۶۶ در زمان‌های مختلف در محیط مینیمال *M9* در ۶۰۰ نانومتر

زمان بر حسب ساعت	BL21	3866	4040
۲	۰/۱۹	۰/۲۰۵	۰/۲۸
۴	۰/۳۷۵	۰/۴۴۵	۰/۳۷۵
۶	۰/۵۸	۱/۰۱	۰/۶۷۵
۸	۱/۰۲	۱/۲۹۵	۱/۲۱
۱۰	۱/۲۶	۱/۵۰۵	۲/۵۳
۱۲	۱/۴۵۵	۲/۰۰۵	۲/۲۸
۲۴	۰/۴۵۳۵	۲/۹	۳

آنالیز نتایج و نمودار حاصل از آن (شکل ۴) درمحیط ساده M9 نیز، نشان‌دهنده رشد بیش از۶ برابری در زمان ۲۴ساعت از انکوباسیون در نمونه‌های موتان فاقد ژن فورمات دهیدروژناز نسبت‌به سویه مادر BL21 است.



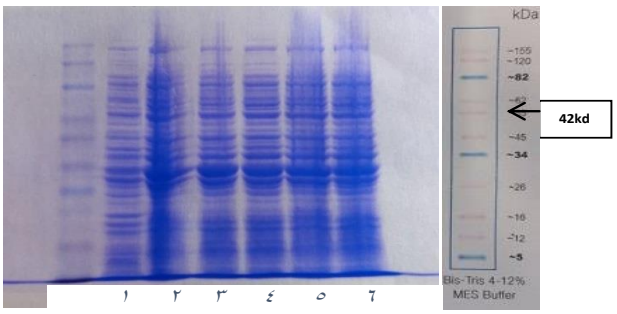
شکل ۴. نمودار متوسط میزان رشد در باکتری‌های موتان و مادر *BL21*، ۳۸۶۶،۴۰۴۰ و در زمانه‌ای مختلف در محیط مینیمال *M9*: رشد بیش از۶ برابری در زمان ۲۴ ساعت از انکوباسیون در محیط ساده M9 در نمونه‌های موتان ۴۰۴۰ و ۳۸۶۶ فاقد ژن فورمات دهیدروژناز نسبت‌به سویه مادر BL21 است.

نتیجه حاصل از بررسی میزان پروتئین FDH تولیدی با اندازه 42 KDa در ژل اکریل آمید ۱۰٪ (شکل ۵) در باکتری بیانی BL21 و نمونه‌های موتان JW 4040,JW 3866 بر اساس مارکر پروتئینی VIVANTIS با کد (390606) به‌شرح زیر است.

بحث

یکی از مهم‌ترین اهداف بیوتکنولوژی میکروبی دست‌یابی به سویه‌هایی است که راندمان رشدی بالایی دارند. استفاده از روش حذف ژن‌های غیرضروری می‌تواند راهکار مناسبی برای دست‌یابی به این هدف باشد. تاکنون مطالعه‌های متعددی در خصوص حذف و نیز فعال نمودن بسیاری از ژن‌ها صورت پذیرفته است.

یکی از راهبردهای افزایش نرخ رشد، کاهش نشت کربن آلی، یعنی انتشار CO_2 به‌عنوان یکی از محصول‌های نهایی اصلی در فرآیند تنفس است. سویه‌های مختلف *E. coli* نیروی کار برای تولید برخی از داروهای زیستی شناخته شده مانند G-CSF، Romiplostim و Asparaginase هستند. بنابراین، *E. coli* یک میکروارگانیسم مدل مناسب است و توسعه سویه‌ای از *E. coli* با سرعت رشد بالاتر بسیار مورد تقاضا است.



Ladder BL21(1,2)4040(3,4) 3866(5,6)

شکل ۵. *نتایج حاصل از ژل* SDS-PAGE نمونه‌های *Mass* مربوطبه BL21, ۳۸۶۶،۴۰۴۰: ژل حاصل از الکتروفورزبیان پروتئین در نمونه‌های باکتری مادر *BL21* و نمونه‌های موتان ۴۰۴۰ و ۳۸۶۶ ازباکتری *E. coli* با دو تکرار،که نشان‌دهنده غلظت بالای پروتئین فورمات دهیدروژناز با وزن مولکولی ۴۲ کیلو دالتون در باکتری‌های موتان در ستون ۳و۴ (۴۰۴۰) و ستون ۵ و۶ (۳۸۶۶) نسبت‌به ستون اول و دوم که مربوط به باکتری استاندارد *BL21* حاوی ژن فورمات دهیدروژناز است که نشان‌دهنده رشد بیش‌تر و در نتیجه میزان بالاتری از بیان پروتئین در نمونه‌های موتان است.

بر اساس مطالعه‌های متعدد در خصوص بررسی حذف و یا فعال نمودن یک بخش ژنی که منجر به افزایش سرعت رشد گردیده، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد. به‌عنوان مثال، بررسی‌ها نشان داد که بیان بالای بسیاری از ژن‌ها از جمله ژن ArcA می‌تواند در جهت افزایش سرعت و میزان رشد باکتری *E. coli* مؤثر باشد. بیان بالای این ژن منجر به تنظیم مسیرهای تنفسی و افزایش سرعت رشد در سوبسترای گلیکولیتیکی با میزان جذب پایین، نظیر مانوز و در نتیجه افزایش جذب کربن و دفع استات می‌شود. تحقیقات نشان داد که استفاده از مهندسی ژنتیک در سرکوب تنفس و کنترل بیان بیش از حد ژن ArcA منجر به استفاده از مسیر تخمیری و اجرای چرخه TCA در جهت تولید انرژی در شرایطی که منبع کربنی، سوبستراهایی با جذب پائین است، افزایش سرعت رشد بسیار بالاست و این افزایش در رشد با دفع تولیدات تخمیری نظیر استات و افزایش جذب کربن همراه است (۵).

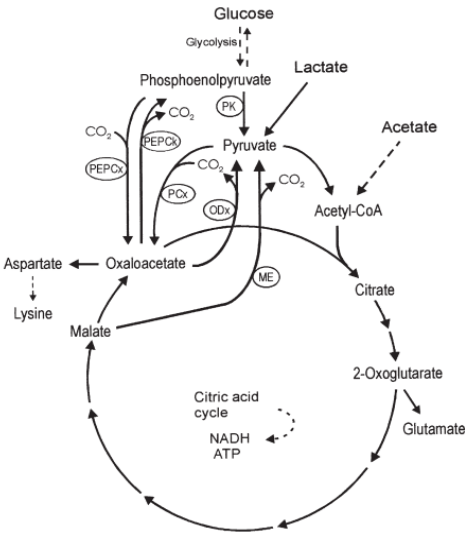
در تحقیقات دیگر با استفاده از منابع متعدد برای تعیین نقش-های جدید سلولی بسیاری از ژن‌ها با عملکرد ناشناخته و حذف تک ژن‌ها در ساکارومیسس سرویزیه و تأثیر در متابولیسم سلولی مطالعه‌های متعددی صورت پذیرفته است (۱۵،۱۶).

علاوه‌بر نقش حذف ژن در افزایش میزان رشد، مطالعه‌هایی در زمینه فعالیت آنزیم‌های مؤثر در مسیرهای متابولیکی تثبیت CO_2 صورت گرفته که بر اساس این مطالعه‌های دو آنزیم مهم کربوکسیلاز در سلول وجود دارد. یکی فسفوانول پیروات کربوکسیلاز و دیگری استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز. هر دوی این آنزیم‌ها توانایی تثبیت CO_2 را در حین واکنش مربوطه دارند. افزایش فعالیت هر دو این آنزیم منجر به افزایش واکنش‌های آنابولیکی می‌گردند. برای مثال نشان داده شده که در باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم (*Corynebacterium glutamicum*) افزایش فعالیت آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز می‌تواند منجر به افزایش تولید اسیدهای آمینه خانواده آسپارتیک (آسپارتیک، لیزین، متیونین و ایزولوسین) گردد. پیروات کربوکسیلاز نیز به‌عنوان یک آنزیم آناپلروتیک وابسته‌به غلظت بی‌کربنات (HCO_3^-) است که جهت تأمین انرژی در چرخه TCA در طول رشد بر روی منابع کربنی مورد نیاز بوده و واکنش مرکزی اکسیداسیون پیروات را کاتالیز می-کند که کاهش داخل سلولی بی‌کربنات (HCO_3^-) سبب کاهش سرعت رشد باکتری و ایجاد فاز تأخیری در مراحل رشد می‌گردد. (۱۹)

با توجه‌به مسیرهای آنابولیکی به‌احتمال افزایش بی‌کربنات موجب فعالیت بالاتر آنزیم فسفو انول پیروات کربوکسیلاز و در نتیجه تولید بالای اسیدهای آمینه ضروری و به‌دنبال آن افزایش رشد را سبب شده است. به این ترتیب با افزایش تولید فومارات غلظت سیتوپلاسمی آن به فرم بی‌کربنات (HCO_3^-) افزایش یافته و موجب فعال‌سازی مسیر سنتز اسیدهای آمینه مشتق از اگزالواستات گردد (۱۹).

مطالعه‌ها نشان می‌دهد که ارتباط مستقیمی بین بیان بالای استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز و رشد سلولی وجود دارد. استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز به‌عنوان آنزیم اصلی کنترل

کننده مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب در باکتری *E. coli* بوده که افزایش فعالیت ژن‌های کد کننده، سبب افزایش بیان زیر واحد استیل کوآنزیم A و در نتیجه افزایش هم‌زمان داخل سلولی مالونیل CoA می‌شود که این افزایش، تولید بالای اسیدهای چرب را در سلول به‌دنبال دارد که نقش مهمی در سنتز و نگهداری غشاهای سلولی و تکثیر باکتری به‌دنبال دارد (۱۷،۱۸).



شکل۶. چرخه اسید سیتریک

بر اساس مطالعه‌های انجام شده حذف و یا فعال نمودن برخی ژن‌ها و به‌دنبال آن تولید و یا عدم تولید برخی آنزیم‌ها نقش‌های اساسی در مسیرهای متابولیکی خواهند داشت. در بررسی حاضر مسیرهای متابولیکی در پایگاه داده‌های KEGG با هدف بررسی‌های راهکارهای جلوگیری از نشت CO_2 ما را بر آن داشت بر روی آنزیم فورمات دهیدروژناز تمرکز کنیم، چرا که این آنزیم در اکثر میکروارگانیسم‌ها از جمله *E. coli* تمایل زیادی به تبدیل اسید فورمیک به CO_2 دارند و به‌طور معمول تمایلی‌به واکنش برگشتی تبدیل CO_2 به فورمات را در شرایط فیزیولوژیک ندارند (۶).

جهت جلوگیری از نشت متابولیکی CO_2 که راندمان رشد را کاهش می‌دهد و بررسی اثرهای ضد آنابولیکی ژن فورمات دهیدروژناز (شکل ۶) بر آن شدیم مقایسه‌ایی بین سویه‌های استاندارد نظیر BL21 که در بیوتکنولوژی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود و سویه‌هایی که به‌طور اختصاصی فورمات دهیدروژناز در آن‌ها ناک اوت شده بود را انجام دهیم. به‌همین جهت در این پروژه بر اساس بررسی‌های Keio از دو سویه باکتری *E. coli* JW 4040 و سویه *E. coli* JW3866 که هر کدام در یک زنجیره از ژن فورمات دهیدروژناز دچار حذف شده بودند استفاده گردید تا نتیجه حذف ژن در عملکرد متابولیسمی باکتری مورد بررسی قرار گیرد (۱).

برای اثبات این تئوری، رشد موازی دو سویه ناک اوت با سویه بیانی BL21 در محیط‌های کمپلکس LB و محیط ساده M9+GLY بررسی شد که با نتایج خوبی همراه بوده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که در محیط‌های کمپلکس، سویه‌های ناک اوت شده در مقایسه با سویه استاندارد بیانی BL21 از رشد بیش‌تری برخوردار بوده است. نکته حائز اهمیت این‌که با تغییر در نوع محیط کشت و استفاده از محیط فقیری نظیر M9 با منبع کربن گلیسرول، اختلاف رشد سلولی به‌شدت به‌سمت افزایش رشد درسویه‌های ناک اوت بوده که این نشان دهنده آن است که حضور ژن فورمات دهیدروژناز در محیط‌های فقیر با حضور گلیسرول، در کاهش رشد *E. coli* بسیار بارز بوده و حذف ژن سبب افزایش رشد *E. coli* بوده که این از لحاظ تئوری و بررسی‌های بیوانفورماتیکی با مطالعه‌های انجام شده در خصوص رشد اپتیمال و بالای *E. coli* در محیط حاوی گلیسرول نسبت‌به محیط‌های قندی مطابقت دارد (۲۰).

در این تحقیق مشخص شد که اگر چه BL21 به‌عنوان میکرو ارگانیسم ترجیحی در بیوتکنولوژی به‌دلیل رشد سریع و بهره‌وری بالا مورد توجه بوده، *E. coli* ناک اوت شده در ژن فورمات دهیدروژناز، می‌تواند در یک میزان بسیار بالاتر از سویه بیانی BL21 رشد داشته و حذف این ژن در متابولیسم سلولی، به‌دلیل جلوگیری از نشت CO_2 در ضریب رشد سلول بسیار مؤثر بوده است.

در مطالعه‌های انجام شده استفاده از گلیسرول به‌عنوان تنها منبع کربنی موجود در محیط کشت نسبت‌به سایر محیط‌های حاوی کربن نظیر استات،گلوکز، مالات وسوکسینات منجر به افزایش رشد وتولید میزان بالایی از محصولات هدف می‌شود (۲۱).

در این مطالعه، نشان داده شد حذف ژن فورمات دهیدروژناز و جلوگیری از نشت CO_2 در مسیرهای متابولیکی، نرخ رشد *E. coli* سویه BL21 و هم‌چنین سویه‌های حذفی (W4040 و W3688) K12 را با مقادیر به‌نسبت بالا افزایش می‌دهد.

در این مطالعه نشان داده شد که در ساعات اولیه انکوباسیون، سرعت رشد بین سویه بیان‌کننده BL21 و*E. coli* 4040. (زنجیره F با کد ۴۵۰۹) و *E. coli* 3866 (زنجیره D با کد ۴۵۹۸) کمابیش برابر بود، در حالی‌که در ۸ و ۱۰ ساعت در محیط پیچیده LB و۲۴ ساعت در محیط ساده گلیسرول نرخ رشد باکتری‌های سویه‌های ناک اوت W4040, JW3866 بسیار بالاتر از کنترل BL21 بود که نشان دهنده تأثیر ژن فورمات دهیدروژناز بر متابولیسم *E. coli* است. به‌عبارت دیگر، با حذف زنجیره‌های ذکر شده در سویه‌های ناک اوت، نرخ رشد بسیار بالاتری وجود دارد.

نتیجه‌گیری

از دید گاه میکروبیولوژی و زیست فناوری ایجاد سویه‌های باکتریایی با توانایی راندمان بالای رشد، بویژه در باکتری اشرشیاکلی که موتور فعالیت‌های تحقیقاتی و صنعتی است، یک هدف آرمانی در بیوتکنولوژی میکروبی است. از آنجایی‌که مشکلات اصلی در مورد مطالعه بیش‌تر FDHهای منتشر شده تاکنون، بی‌ثباتی پروتئین، حساسیت به اکسیژن و نرخ تبدیل پایین آن است، در این مطالعه، نشان داده شد که حذف ژن فورمات دهیدروژناز به‌دلیل جلوگیری از نشت CO_2 در مسیرهای متابولیکی، نرخ رشد در سویه‌های حذفی (W4040 و W3688) K12 را با مقادیر به‌نسبت بالایی در مقایسه با سویه BL21 حاوی ژن فورمات دهیدروژنازافزایش می‌دهد.

در بررسی حاضر بر اساس نتایج حاصل شده، به‌رغم این‌که در شرایط نرمال و از لحاظ فیزیولوژیکی *E. coli* قادر به رشد بالایی در محیط گلیسرول به‌عنوان تنها منبع کربنی مورد استفاده نیست، حذف ژن فورمات دهیدروژناز در آن سبب تغییرات اساسی در روند متابولیسمی و افزایش چند برابری رشد در مقایسه با سویه بیانی BL21 گردید و بیانگر این است که این آنزیم در جلوگیری از افزایش راندمان رشد *E. coli* در حضور گلیسرول مؤثر است. هم‌چنین از سویه حاصل می‌توان در بیان پروتئین‌های نوترکیب با راندمان بالاتر استفاده نمود. در این راستا کلیه شرکت‌هایی که در زمینه تولید محصولات نوترکیب هستند می‌توانند به‌عنوان ذینفع مطرح شوند.

منابع

1. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. 2006;2(1):2006.0008.

2. Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. science. 1997 Sep 5;277(5331):1453-62.

3. Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, Ohtsubo E, Baba T, Wanner BL, Mori H, Horiuchi T. Highly accurate genome sequences of Escherichia coli K-12 strains MG1655 and W3110. Molecular systems biology. 2006;2(1):2006-0007.

4. Nazari N, Moghimi HJMJoB. Optimization of the effective factors in E. coli growth producing recombinant β-NGF using response surface methodology. 2017;8(2):53-63.

5. Basan M, Hui S, Williamson JRJSR. ArcA overexpression induces fermentation and results in enhanced growth rates of E. coli. 2017;7(1):1-7.

6. KEGG Pathway database

7. Reda T, Plugge CM, Abram NJ, Hirst JJPotNAoS. Reversible interconversion of carbon dioxide and formate by an electroactive enzyme. 2008;105(31):10654-8.

8. WWW.Berenda.org

9. Regulon DB.ccg.unam.mx

10. National Institute Of Genetic Engineering and Biotechnology

11. Sambrook, J., Russel, D. W., Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001.

12. Jiang C-H, Wu F, Yu Z-Y, Xie P, Ke H-J, Li H-W, et al. Study on screening and antagonistic mechanisms of Bacillus amyloliquefaciens 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by Acidovorax avenae subsp. citrulli. 2015;170:95-104.

13. Nikaido, H.. The Limitations of LB Medium. Small things considered - The Microbe Blog. (2009)

14. Gong F, Cai Z, Li YJSCLS. Synthetic biology for CO 2 fixation. 2016;59(11):1106-14.

15. Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, André B, Arkin AP. Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome. nature. 2002 Jul;418(6896):387-91.

16. Pierce SE, Davis RW, Nislow C, Giaever GJNp. Genome-wide analysis of barcoded Saccharomyces cerevisiae gene-deletion mutants in pooled cultures. 2007;2(11):2958-74.

17. Polyak SW, Abell A, Wilce MCJ, Zhang L, Booker GWJAm, biotechnology. Structure, function and selective inhibition of bacterial acetyl-coa carboxylase. 2012;93(3):983-92.

18. Davis MS, Solbiati J, Cronan Jr JEJJoBC. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in Escherichia coli. 2000;275(37):28593-8.

19. Riedel C, Rittmann D, Dangel P, Möckel B, Petersen S, Sahm H, et al. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from Corynebacterium glutamicum and significance of the enzyme for growth and amino acid production. 2001;3(4):573-83.

20. Willrodt C, David C, Cornelissen S, Bühler B, Julsing MK, Schmid AJBj. Engineering the productivity of recombinant Escherichia coli for limonene formation from glycerol in minimal media. 2014;9(8):1000-12.

21. Ibarra RU, Edwards JS, Palsson BOJN. Escherichia coli K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. 2002;420(6912):186-9.