

ترسیب کربن با کربنیک آنهیدراز نوترکیب در باکتری *Ralstonia eutropha*

محدثه محسن پور^۱، نور امیرمظفری^{۲*}، زهرا نورمحمدی^۲، شیوا ایرانی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

چکیده

انتشار گازهای گلخانه‌ای و پلاستیک‌ها از مهمترین معضلات زیست محیطی هستند. هدف، بررسی باکتری *Ralstonia eutropha* به عنوان میزبان آنزیم کربنیک آنهیدراز برای تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) است. توالی ژن آنزیم کربنیک آنهیدراز (CA) در وکتور بیانی کلون‌سازی و به *R. eutropha* منتقل شد. تولید PHB در باکتری‌ها با روش‌های FT-IR و GC-MS بررسی شد. میزان PHB در باکتری نوترکیب در حضور CO_2 نسبت به باکتری نوترکیب در غیاب CO_2 ، ۳۱/۴۹ درصد و نسبت به باکتری غیرنوترکیب در حضور و عدم حضور CO_2 به ترتیب ۱۸/۴۴ و ۳۴/۴۴ درصد افزایش داشت. تولید PHB در باکتری نوترکیب در محیط محدود در حضور CO_2 نسبت به باکتری نوترکیب در غیاب CO_2 ، ۲۶/۵۷ درصد و نسبت به باکتری غیرنوترکیب در حضور و عدم حضور CO_2 به ترتیب ۱۸/۳۰ و ۳۰/۶۳ درصد افزایش داشت. نتایج سنجش PHB نشان دهنده مؤثر بودن بیان CA در افزایش PHB در *R. eutropha* بود. همچنین باکتری حاصل می‌تواند در حضور CO_2 در یک محیط ساده، علاوه بر ترسیب کربن، PHB نیز تولید نماید.

واژه‌های کلیدی: ترسیب کربن، کربنیک آنهیدراز، *Ralstonia eutropha*

مقدمه

کربن دی اکسید (CO_2)، کربنیک اسید (H_2CO_3) و بی کربنات (HCO_3^-) از متابولیت‌های کلیدی سیستم‌های زنده محسوب می‌شوند. تعادل این متابولیت‌ها در سلول‌های زنده برای عملکرد فیزیولوژیکی سلول حائز اهمیت است. آنزیم کربنیک آنهیدراز (CA) با تبدیل کربن دی‌اکسید به بی‌کربنات در متابولیسم سلول، انتقال CO_2 ، تبادل یون‌ها و تنظیم pH درون سلولی

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: amirmozafari@iums.ac.ir

۳- دانشیار، گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

نقش مهمی ایفا می‌کند. شش گروه از آنزیم‌های کربنیک آنهیدراز (α , β , γ , δ , ϵ , η) در جانداران مختلف شناسایی شده‌اند. هیچ شباهت ساختاری قابل توجهی بین گروه‌های مختلف CA وجود ندارد و هر گروه به طور جداگانه و متنوع تکامل یافته‌اند. مهم‌ترین گروه‌های آنزیم CA از نظر ساختار و عملکرد، آنزیم‌های گروه α -CA (تک زیرواحدی و با آیزوایم‌های چندگانه و بیان متنوع)، آنزیم‌های گروه β -CA (حاوی دو تا شش زیرواحد متفاوت) و آنزیم‌های گروه γ -CA (دارای سه زیرواحد یکسان) هستند (Zhang et al., 2011 و Jo, 2016 و Bose & Satyanarayana, 2017).

باکتری *R. eutropha* متعلق به رده β -proteobacteria، باسیل گرم منفی، غیر بیماری‌زا، خاکزی، بدون اسپور، مزوفیل (دمای بهینه 28°C – 30°C) با متابولیسم کمولیتواتوتروفی اختیاری (Facultative chemolithotroph) و به عنوان میکروارگانسیم مدل تولید کننده پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها (Poly Hydroxy Alkanates) (PHAs) به صورت گرانول‌های ذخیره‌ای درون سلولی است. اندازه ژنوم این باکتری ۷۴۱۶۶۷۸ bp و دارای دو کروموزوم و یک مگاپلاسمید (pHG1) به ترتیب با اندازه‌های ۴۰۵۲۰۳۲ bp، ۲۹۱۲۴۹۰ bp و ۴۵۲۱۵۶ bp است. کاربرد PHA به عنوان بیوپلاستیک‌های تجزیه‌پذیر، قابلیت بالای *R. eutropha* برای تولید تجاری انواع بیوپلیمرها و سازگاری با طیف متنوعی از سوبستراها در شرایط متابولیسمی مختلف باعث جذابیت فوق‌العاده این باکتری در تحقیقات زیست‌فناوری شده است. مهم‌ترین نوع PHA، پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) است که تولید آن از طریق اپران *phaCAB* صورت می‌گیرد. به این ترتیب که ابتدا دو مولکول استیل CoA توسط آنزیم β -کتوتیولازی که توسط *phaA* رمزدهی می‌شود، به استواستیل CoA تبدیل می‌شود. سپس استواستیل CoA توسط استواستیل CoA ردوکتاز رمز شونده توسط *phaB* (*phaB1*, *phaB2*, *phaB3*) به هیدروکسی بوتیریل CoA احیا می‌شود و سرانجام پلی هیدروکسی بوتیرات در نتیجه پلیمریزه شدن هیدروکسی بوتیریل CoA توسط آنزیم PHB سنتاز کد شونده توسط ژن *phaC1* حاصل می‌شود. باکتری *R. eutropha* می‌تواند از طریق چرخه CBB (Benson Basham Calvin) طی رشد اتوتروفی CO_2 را جذب و از آن برای تولید PHB استفاده کند (Juengert et al., 2018 و Raberg et al., 2017).

انتشار روزافزون CO_2 ناشی از فعالیت‌های شهرنشینی انسانی و صنعتی و ادامه روند استفاده بیش از حد از سوخت‌های فسیلی برای تولید پلاستیک‌های مشتق شده از مواد نفتی، منجر به افزایش گرمایش جهانی و تهدیدات زیست محیطی ناشی از تغییرات آب و هوایی (اثر گلخانه‌ای) خواهد شد. یکی از مهمترین راهکارهای مدیریت کاهش کربن، تجمع کربن با روش ترسیب کردن است. تجمع و ذخیره کربن در سیستم‌های زیستی منجر به کاهش و تعدیل کربن دی اکسید اتمسفر می‌شود. تحقیقات انجام شده در این زمینه بیشتر روی ترسیب کربن با استفاده از گیاهان متمرکز بوده است و استفاده از میکروارگانسیم‌ها به منظور ترسیب کربن و تولید PHA نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (Kumar et al., 2018). مطالعه در زمینه ارایه راهکار برای جذب و ترسیب کربن در جهت تولید محصولات با ارزشی مثل بیوپلیمرهای تجزیه پذیر توسط چرخه‌های بیولوژیکی باکتری،

هدف از این پژوهش بوده که می تواند در کاهش انتشار CO₂ و از سوی دیگر تولید بیوپلاستیک تجزیه پذیر سازگار با محیط زیست، موثر باشد.

مواد و روش ها

کلون سازی ژن CA در وکتور بیانی

در این پژوهش از توالی ژن کربنیک آنهیدراز (CA) مربوط به باکتری *Caminiobacter mediatlanticus* استفاده شد. این توالی در پژوهش قبلی توسط نویسنده و همکاران بهینه سازی کدونی شده و با تغییر اسیدهای آمینه (جهت مقاومت بیشتر و فعالیت کاتالیزوری بهتر) و قرار دادن جایگاه های آنزیمی برشی مناسب در دو سوی این ژن (به منظور الحاق در وکتورهای مورد نظر)، مهندسی و سنتز شده بود (Mohsenpour et al., 2019). برای بیان ژن CA، به منظور افزودن پیشبر و پایانبر به دو سوی این ژن، وکتور بیانی pBI121 مورد استفاده قرار گرفت تا با توجه به جایگاه های آنزیمی *BamHI* و *SacI* تعبیه شده در دو انتهای ژن CA، این قطعه در وکتور تحت پیشبر دائمی *CaMV35S* و پایانبر *nos* قرار گیرد (Mohsenpour et al., 2015). به این منظور واکنش هضم آنزیمی دوگانه وکتور بیانی pBI121 با آنزیم های *BamHI* و *SacI* انجام شد و پس از الکتروفورز (مدل: EH1515، ساخت ایران) روی ژل آگارز یک درصد، باند مربوط به وکتور هضم شده pBI121 از روی ژل آگارز برش و با استفاده از کیت خالص سازی DNA از روی ژل (شرکت Bioneer) خالص سازی شد. سپس واکنش اتصال (Ligation) با نسبت سه به یک قطعه الحاقی و وکتور صورت پذیرفت.

تعیین غلظت مناسب آنتی بیوتیک کانامایسین برای باکتری *R. eutropha* نو ترکیب

با توجه به نشانگر انتخابی (ژن مقاومت به کانامایسین) موجود در وکتور pBI121، حساسیت باکتری (PTCC: 1615) *R. eutropha* H16 به غلظت های مختلف آنتی بیوتیک کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که ابتدا یک کلونی از باکتری *R. eutropha* در محیط کشت MHB (Muller-Hinton Broth) تلقیح و در دمای ۳۰ °C ۳۰ گرم گذاری شد تا به کدورت لوله استاندارد نیم مک فارلند (CFU- Colony Forming Units) $10^8 \times 1/5$ رسید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به لوله های حاوی محیط کشت MHB استریل حاوی مقادیر مختلف آنتی بیوتیک کانامایسین (50 mg.L^{-1} ، 100 mg.L^{-1} ، 150 mg.L^{-1}) منتقل شد. یک لوله حاوی محیط کشت MHB استریل به عنوان کنترل منفی و یک لوله حاوی محیط کشت MHB فاقد آنتی بیوتیک و تلقیح شده با ۱۰۰ میکرولیتر باکتری، به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. همچنین از هر کدام از لوله ها در پلیت قسمت بندی شده حاوی محیط کشت Muller-Hinton Agar (MHA)، کشت خطی انجام شد. علاوه بر این ۱۰۰ میکرولیتر از لوله حاوی باکتری *R. eutropha*، با کدورت نیم مک فارلند به محیط های کشت

جامد LB agar حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک تلقیح و پخش شد. پس از یک شب گرماگذاری در دمای ۳۰°C حساسیت باکتری نسبت به غلظت‌های مختلف کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه‌سازی برای تهیه سلول‌های مستعد *R. eutropha*

با توجه به این‌که روش‌های معمول آماده‌سازی باکتری‌ها برای انتقال ژن، در مورد باکتری *R. eutropha* مؤثر نبود، بنابراین به منظور دستیابی به یک روش مناسب برای انتقال وکتور پلاسمیدی به این باکتری، بهینه‌سازی روش تهیه باکتری مستعد (Competent Cells) با تغییر متغیرهای غلظت CaCl_2 و OD رشد باکتری انجام شد. به این ترتیب که ابتدا یک کلونی از باکتری *R. eutropha* به پنج میلی لیتر محیط کشت LB broth منتقل و پس از یک شب گرماگذاری در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰°C و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه، در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت استریل LB broth رقیق‌سازی شد و مجدداً در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰°C و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در طول مراحل رشد، OD باکتری با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در OD های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ از کشت مایع باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (۳۰۰۰ g، پنج دقیقه) رسوب داده شد. سپس محلول رویی در شرایط سترون زیر هود، کاملاً خالی شد و در سه تکرار، یک میلی لیتر محلول سرد CaCl_2 (سترون اتوکلاو شده) با غلظت‌های ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار به رسوب باکتری اضافه و به آرامی با باکتری سوسپانسیون شد (در این مرحله لوله حاوی باکتری‌ها روی یخ قرار داشتند). سپس سوسپانسیون باکتری با مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر در میکروتیوب‌ها توزیع شد.

انتقال پلاسمید pBI121-CA به باکتری *R. eutropha*

ابتدا یک میکروگرم پلاسمید به باکتری آماده‌سازی شده در مرحله قبل، اضافه شد و پس از پیپت کردن، به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و در فریزر ۲۰°C- و سپس در بن‌ماری ۳۷°C به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس به هر کدام از نمونه‌ها یک میلی لیتر محیط LB broth استریل (که به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰°C قرار داده شده بود) اضافه و در انکوباتور شیکردار ۳۰°C با چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت سه ساعت قرار داده شد. پس از اسپین کردن میکروتیوب‌ها، مایع رویی دور ریخته شد و به هر کدام از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط LB broth استریل اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به آرامی پیپت شد و به پلیت‌های حاوی محیط کشت LB agar حاوی 100 mg.L^{-1} آنتی‌بیوتیک کانامایسین منتقل و پخش شد (Sambrook, & Rusell, 2001 و Mohsenpour et al., 2008). پلیت‌ها در انکوباتور ۳۰°C قرار داده شدند و پس از دو شب گرماگذاری مورد بررسی قرار گرفتند. کلونی‌های به دست آمده با روش Colony PCR (مدل دستگاه ترموسایکلر: TC-312 ساخت انگلستان) به منظور تأیید حضور pBI121-CA در باکتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن CA، مورد بررسی قرار گرفتند

(جدول ۲). تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۷۷ bp مورد انتظار بود. در واکنش کنترل مثبت از پلاسمید pBI121-CA و در واکنش کنترل منفی PCR از کلونی باکتری *R. eutropha* غیر نوترکیب به عنوان DNA الگو استفاده شد.

کشت و آماده‌سازی *R. eutropha* نوترکیب برای سنجش PHB

ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری *R. eutropha* با کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند به غلظت‌های محیط کشت LB (LB، نیم LB) در دو گروه شاهد و نوترکیب با سه تکرار تلقیح شد. یک گروه از باکتری‌های شاهد و نوترکیب در دمای ۳۰ °C و گروه دیگر در ۳۰ °C همراه با پنج درصد گاز CO₂ به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. پس از سانتریفیوژ (۵۰۰۰ g، ۱۵ دقیقه) و خالی کردن مایع رویی، رسوب باکتری‌ها دو بار با آب مقطر شستشو و در ۵۰ °C به مدت ۷۲ ساعت خشک شد. در مرحله بعد تولید PHB در نمونه‌ها توسط کروماتوگرافی گازی (GC-MS) و FT-IR مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش PHB با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC-MS)

به ۱۰ میلی‌گرم از رسوب خشک باکتری‌ها، دو میلی لیتر متانول اسیدی (۹۷ درصد متانول و سه درصد اسید سولفوریک) و دو میلی لیتر کلروفرم در لوله‌های شیشه‌ای کیماکس در پیچ‌دار (150 mm × 20 mm screw-cap Kimax tubes) اضافه و پس از محکم بستن درب لوله‌ها، محتویات آن‌ها به شدت مخلوط شد. لوله‌ها به مدت سه ساعت در حمام آب گرم ۹۵ °C و پنج دقیقه روی یخ قرار داده شدند. پس از اضافه کردن یک میلی لیتر آب مقطر دیونیزه، لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه به شدت مخلوط شدند (Juengert *et al.*, 2018). بعد از یک دقیقه، سه فاز در لوله‌ها قابل مشاهده بود که فاز بالایی حاوی متانول اسیدی، فاز میانی شامل بقایای میکروبی و فاز پایینی، فاز آلی حاوی بیوپلیمر محلول در کلروفرم بود که یک میکرولیتر از فاز پایینی برای تزریق در دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل B۷۸۹۰، شرکت Agilent آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات ستون و عملکرد دستگاه عبارت بود از: ستون موئین HP-5MS (بیست و پنج صدم میلی متر قطر داخلی، طول ۳۰ متر)، دمای حسگر: ۲۸۰ درجه سلسیوس؛ دمای تزریق: ۲۳۰ درجه سلسیوس؛ دمای اولیه: ۸۰ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه، سرعت افزایش دما: هشت درجه در دقیقه و بالاترین دما: ۱۶۰ درجه سلسیوس به مدت شش دقیقه. همچنین ۱۰ میلی گرم از پودر PHB استاندارد با روش فوق آماده سازی و سنجش شد.

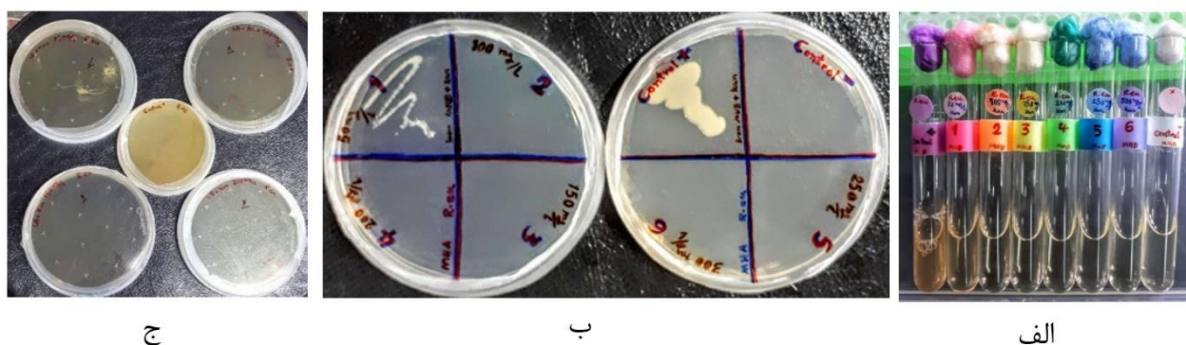
سنجش PHB با استفاده از FT-IR (Fourier-Transform Infrared spectroscopy)

به منظور ارزیابی محتوای بیوشیمیایی بیوپلیمر و گروه‌های عاملی متفاوت موجود در آن‌ها، طیف چند نمونه از بیوپلیمرهای استخراج شده با روش بالا از باکتری‌های شاهد و نوترکیب رشد یافته در محیط عادی و محیط حاوی CO₂، پس از تبخیر کلروفرم، خشک شدن کامل بیوپلیمر و مخلوط کردن حدود یک میلی گرم از آن با ۳۰۰ میلی گرم برمید پتاسیم و تهیه قرص در دستگاه پرس با استفاده از FT-IR (Spectrum65 PerkinElmer، ساخت آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت (Hassan *et al.*)

2016). سپس با استفاده از کتابخانه موجود در نرم افزار IRPal نسخه 2010- V2.0 داده پردازی اطلاعات و شناسایی طیف‌های جذبی انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج کشت خطی و مقایسه آن با کنترل مثبت برای تعیین میزان تحمل آنتی‌بیوتیک کانامایسین توسط باکتری *R. eutropha*، رشد محدود باکتری در غلظت 50 mg.L^{-1} کانامایسین را نشان داد ولی در سایر غلظت‌ها رشد باکتری کاملاً مهار شده بود (شکل ۱، الف) که این نتیجه با کشت خطی در پلیت‌های حاوی محیط کشت MHA و عدم رشد باکتری از غلظت 100 mg.L^{-1} تأیید شد (شکل ۱، ب). همچنین نتایج رشد باکتری در محیط‌های کشت LB حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین، عدم رشد باکتری از غلظت 100 mg.L^{-1} کانامایسین و حساسیت باکتری به کانامایسین را در این غلظت تأیید نمود (شکل ۱-ج). در بهینه‌سازی روش تهیه سلول‌های مستعد *R. eutropha*، تعداد کلونی‌های نو ترکیب به دست آمده در محیط کشت انتخابی LB حاوی 100 mg.L^{-1} کانامایسین که در $\text{OD}_{600\text{nm}}$ برابر 0.8 و غلظت 20 میلی مولار CaCl_2 آماده سازی شده بودند، بیشتر بود (جدول ۱).



شکل ۱: الف) بررسی حساسیت باکتری *R. eutropha* به غلظت‌های کانامایسین: کنترل مثبت، محیط کشت LB broth حاوی غلظت‌های 50 mg.L^{-1} ، 100 mg.L^{-1} ، 150 mg.L^{-1} ، 200 mg.L^{-1} ، 250 mg.L^{-1} ، 300 mg.L^{-1} کانامایسین و کنترل منفی (به ترتیب از چپ به راست). ب) کشت خطی از لوله‌های محیط کشت MHA حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین تلقیح شده با باکتری *R. eutropha* روی پلیت‌های حاوی محیط کشت MHA و مشاهده رشد فقط در نمونه کشت داده شده از لوله شماره یک (غلظت 50 mg.L^{-1}) و کنترل مثبت. ج) کشت باکتری *R. eutropha* در محیط‌های کشت LB agar حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین (75 mg.L^{-1} ، 100 mg.L^{-1} ، 150 mg.L^{-1} و 200 mg.L^{-1}) و کشت باکتری در محیط LB agar فاقد آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل مثبت (پلیت میانی) و مشاهده رشد باکتری فقط در کنترل مثبت.

جدول ۱: اثر غلظت CaCl_2 و OD رشد باکتری در کارایی انتقال ژن به باکتری *R. eutropha*

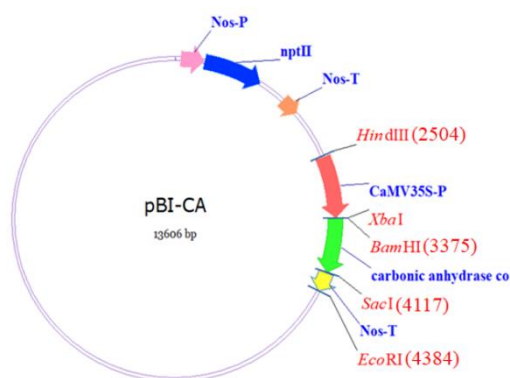
	Variable agents											
	0.2			0.4			0.6			0.8		
OD	0.2			0.4			0.6			0.8		
Vector (pBI121)	1 μg			1 μg			1 μg			1 μg		
Heat shock	37°C, 10'			37°C, 10'			37°C, 10'			37°C, 10'		
Time	72 h			72 h			72 h			48 h		
CaCl ₂ (mM)	20	50	100	20	50	100	20	50	100	20	50	100
Number of colonies	-	-	-	-	-	-	2	1	-	13*	5	3

* تعداد کلونی‌های نوترکیب در OD برابر هشت دهم و غلظت 20 mM CaCl_2 بیشتر بود.

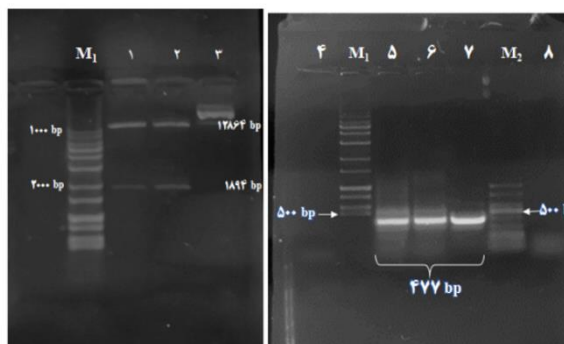
صحت کلون‌سازی ژن CA در وکتور بیانی و انتقال آن به باکتری‌های مستعد *R. eutropha*، با استفاده از Colony PCR و تکثیر قطعه‌ای به طول 477 bp و مقایسه با کنترل مثبت و منفی پس از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد با استفاده از نشانگر اندازه وزن مولکولی (High range DNA Ladder (Jina Bioscience) تأیید شد (شکل ۲).

جدول ۲: توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ناحیه داخلی ژن CA

Primers	Sequence	PCR product
CA-F	CCAGAGCCCGATTGATATTAGC	477 bp
CA-R	TTCAGCACAAACCAACGCAC	



ج



ب

الف

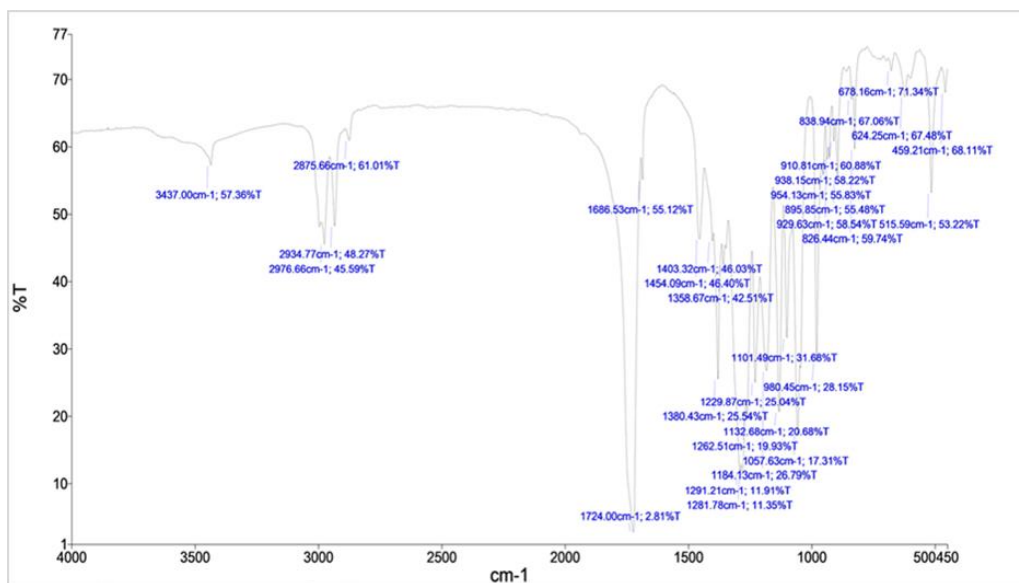
شکل ۲: الف) الکتروفورز ژل آگارز یک درصد، M1: نشانگر اندازه وزن مولکولی High Range DNA Ladder، M2: نشانگر اندازه وزن مولکولی Low Range DNA Ladder، ۱ و ۲: هضم وکتور PBI121 با آنزیم‌های *BamHI* و *SacI*؛ ۳: پلاسمید *uncut*؛ ۴: کنترل منفی PCR (بدون DNA الگو)، ۵ و ۶ و ۷: باند 477 bp حاصل از Colony PCR با پرایمرهای ژن CA و کلونی باکتری *R. eutropha* به عنوان الگو. ۸: کنترل منفی (Colony PCR) با باکتری غیرنوترکیب *R. eutropha* به عنوان شاهد. ب) نقشه وکتور بیانی نوترکیب pBI121-CA با طول 13606 bp.

گروه‌های عاملی مهم تشکیل دهنده ساختمان PHB ($\text{C}=\text{O}$ ، CH ، CH_2 ، CH_3 ، OH ، O و ...) بر اساس طیف

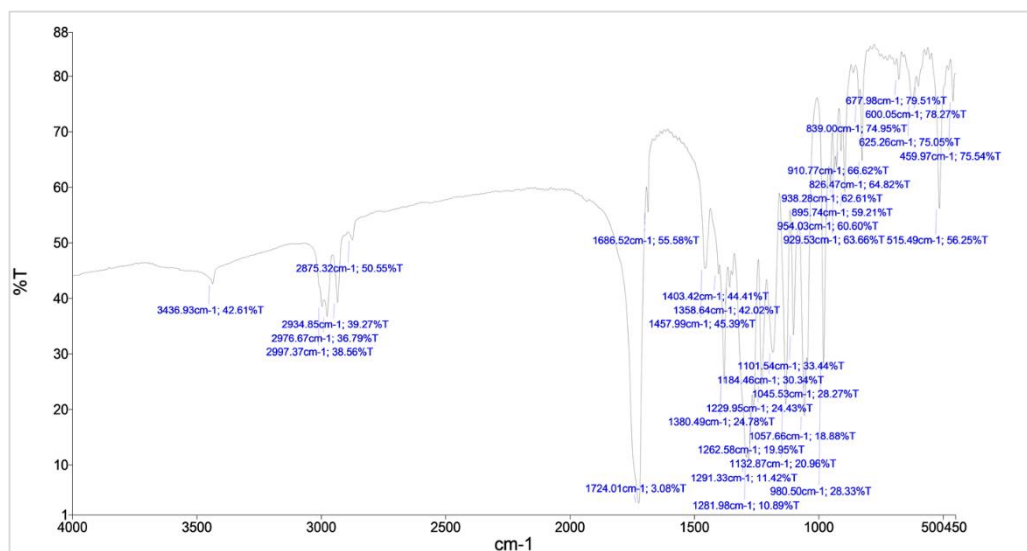
جذبی حاصل از FT-IR در جدول شماره ۳ نشان داده شده‌اند. نتایج FT-IR با بررسی پیک‌ها با استفاده از کتابخانه نرم افزار

IRPal و مقایسه طیف بیوپلیمر استخراج شده با طیف PHB استاندارد، نشان دهنده تطابق بیوپلیمر استخراج شده با PHB بود

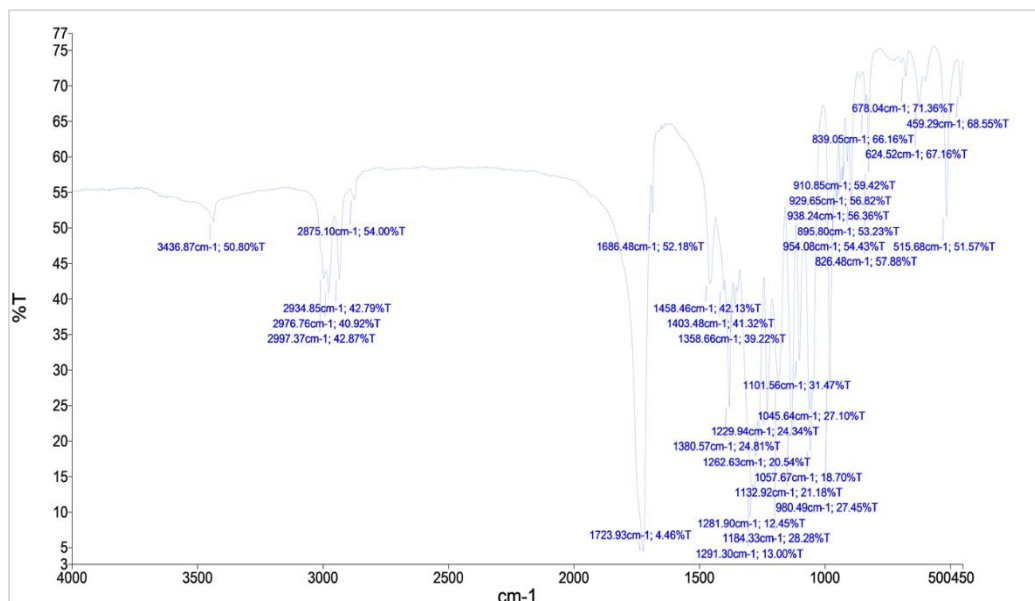
(جدول ۳، شکل های ۳ و ۴ و ۵).



شکل ۳: نتایج FT-IR مربوط به PHB استاندارد



شکل ۴: نتایج FT-IR مربوط به بیوپلیمر استخراج شده از *R. eutropha* نو ترکیب



شکل ۵: نتایج FT-IR مربوط به بیوپلیمر استخراج شده از *R. eutropha* غیر نوترکیب

جدول ۳: ساختار PHB و طیف FT-IR مربوط به PHB استخراج شده از *R. eutropha*

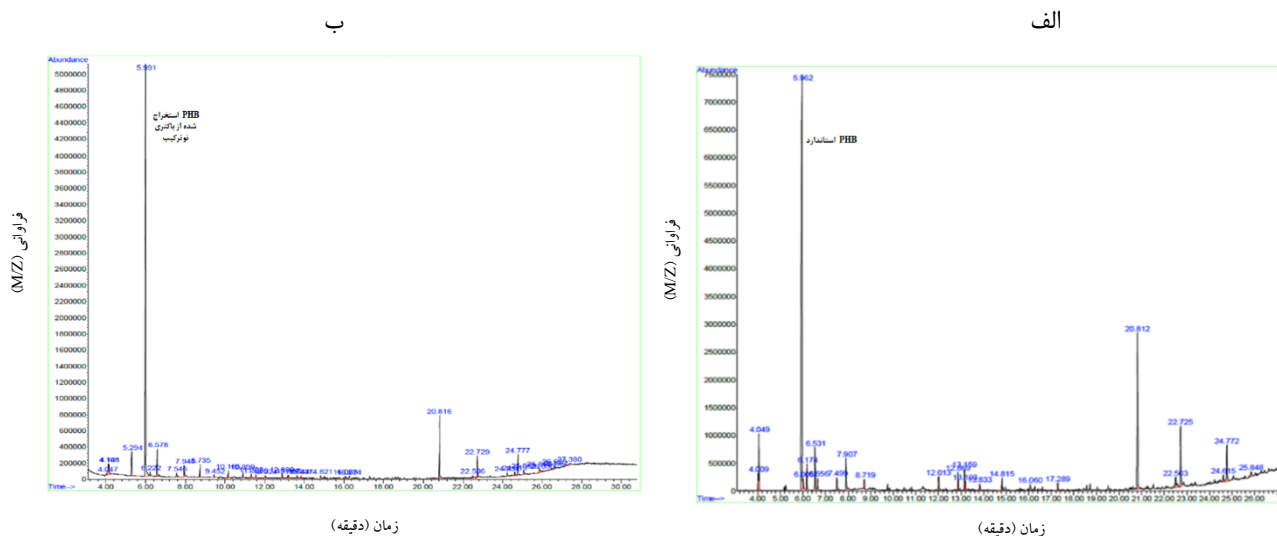
Wave number (cm ⁻¹)	Type of bond	PHB structure
1050-1096-1128-1180	C-O	
1128-1163-1278-1289-1259-1302	C-O-C	
1378-1449	CH ₃	
1458	CH ₂	
*1723-1724-1727-1740-3436	C=O	
2875	CH ₂ -CH, CH-CH ₃	
2933	CH ₂ asymmetric stretch	
2967-2974-2983-2995-3009	CH ₃ asymmetric stretch	

* پیک در محدوده cm⁻¹ ۱۷۲۰ تا ۱۷۳۰ مربوط به گروه کربنیل و پیک شاخص شناسایی PHB است.

نتایج GC-MS برای بررسی درصد PHB تولید شده در میزان مساوی از باکتری‌های آماده‌سازی شده (CDW=۱۰ mg) با مشاهده پیک PHB در دقیقه ۵/۹ (شکل ۶)، بیشترین درصد PHB تولید شده را در *R. eutropha* نوترکیب حاوی ژن CA رشد یافته در محیط‌های کشت LB و نیم LB در حضور CO₂ نشان داد. میزان تولید PHB در باکتری نوترکیب رشد یافته در محیط کشت LB و آنکوباتور CO₂ دار نسبت به باکتری نوترکیب در آنکوباتور معمولی، ۳۱/۴۹ درصد و نسبت به باکتری غیرنوترکیب در آنکوباتور CO₂ دار و معمولی به ترتیب ۱۸/۴۴ درصد و ۳۴/۴۴ درصد افزایش نشان داد. میزان تولید PHB در باکتری نوترکیب رشد یافته در محیط کشت نیم LB و آنکوباتور CO₂ دار نسبت به باکتری نوترکیب در آنکوباتور معمولی، ۲۶/۵۷ درصد و نسبت به باکتری غیرنوترکیب در آنکوباتور CO₂ دار و معمولی به ترتیب ۱۸/۳۰ درصد و ۳۰/۶۳ درصد افزایش نشان داد. (جدول ۴).

جدول ۴: نتایج سنجش PHB تولید شده در باکتری‌های شاهد و نوترکیب رشد یافته در محیط معمولی و حاوی CO₂ با روش

GC-MS				
PHB percent				
Medium	0.5 LB	0.5 LB	LB	LB
Incubator	-	CO ₂	-	CO ₂
<i>R. eutropha</i>	26.03	38.36	25.1	41.1
Recombinant <i>R. eutropha</i>	30.09	56.66	28.05	59.54



شکل ۶: قسمتی از نتایج GC-MS. مشاهده پیک مربوط به PHB در دقیقه ۵/۹. الف) PHB استاندارد. ب) PHB استخراج شده از باکتری‌های نوترکیب

باکتری *R. eutropha* H16 در این پژوهش برای مطالعه تولید PHB مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری یک میکروارگانیزم ارزشمند برای تولید PHAها است (Raberg *et al.*, 2017). در تحقیقات متعددی بهینه‌سازی شرایط کشت این باکتری برای تولید PHAها و انتقال ژن‌های مسئول بیوسنتز PHA به سویه‌های نوترکیب *Escherichia coli* به دلیل نرخ سریع رشد این باکتری برای تولید صنعتی این بیوپلیمرها مورد مطالعه قرار گرفته و پس از بهینه‌سازی شرایط کشت تجمع بالای ۸۰ درصد P(3HB) در سلول‌ها به دست آمد (Raberg *et al.*, 2017). همچنین از این باکتری برای تولید سیانوفازین CGP (Cyanophacin Granule Polypeptide) (Voss & Steinbuchel, 2006)، هیدروکسی ایزوبوتیرات (Rohwerder *et al.*, 2010)، متیل سیتریک اسید (Ewering *et al.*, 2006)، فرولیک اسید (Overhage *et al.*, 2002)، متیل کتون‌ها (Mueller *et al.*, 2013)، الکل‌ها (Lu *et al.*, 2012 و Schirmer *et al.*, 2010)، آلکان‌ها و آلکن‌ها (Raberg *et al.*, 2017)، اسیدهای چرب با زنجیره متوسط (Mueller *et al.*, 2013) که در صنعت و داروسازی کاربرد دارند، استفاده شده است.

روش معمول برای انتقال ژن به این باکتری روش الکتروپوریشن است (Aneja *et al.*, 2009). با توجه به اهمیت *R. eutropha* در زیست‌فناوری، بهینه‌سازی روش تهیه سلول‌های مستعد برای انتقال ژن بدون واسطه به این باکتری، در مطالعه حاضر ارائه شده است که می‌تواند برای انتقال وکتورهای پلاسمیدی مورد استفاده قرار گیرد. دمای بهینه برای رشد باکتری حدود 28°C - 30°C است. بنابراین دمای 37°C برای شوک حرارتی در بهینه‌سازی روش تهیه سلول‌های مستعد *R. eutropha* در نظر گرفته شد. تعداد کلونی‌های نوترکیب به دست آمده در محیط کشت انتخابی LB حاوی 100 mg.L^{-1} کانامایسین که در $\text{OD}_{600\text{nm}}$ برابر $0/8$ و غلظت 20 میلی مولار CaCl_2 آماده سازی شده بودند، بیشتر بود. این غلظت از CaCl_2 کمترین غلظت استفاده شده در آزمایش بود و در غلظت‌های بالاتر از آن، تعداد باکتری‌های نوترکیب به دست آمده به طور واضح کمتر بودند (جدول ۱). با توجه به این که CaCl_2 باعث افزایش نفوذپذیری باکتری برای ورود DNA خارجی می‌شود؛ بنابراین کم شدن تعداد کلونی‌ها پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های بالاتر از 20 میلی مولار و شوک حرارتی می‌تواند به دلیل آسیب به غشای باکتری و از بین رفتن آن باشد.

وکتور پلاسمیدی pBBR1 دارای پیشبر القایی *pBAD* با طیف وسیع میزبانی به عنوان یک وکتور بیانی برای انتقال به باکتری *R. eutropha* معرفی و استفاده شده است. در مورد این وکتور بی‌ثباتی و ناپایداری پلاسمید در سلول‌ها در چندین مطالعه گزارش شده است (Kumar *et al.*, 2016 و Kumar *et al.*, 2018). با توجه به این که این وکتور، دارای پیشبر القایی می‌باشد و علاوه بر مساله گزارش ناپایداری آن در سلول‌ها، رایج و در دسترس نیز نیست، در این پژوهش از وکتور بیانی pBI121 به دلیل وجود پیشبر قوی و دائمی *CaMV35S* استفاده شد تا ژن *CA* بدون نیاز به ماده القا کننده، با روشی ارزان تر و سریع تر نسبت به وکتورهای دارای پیشبرهای القایی، بیان شود. در این مطالعه غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای غربالگری باکتری‌های نوترکیب *R. eutropha* به میزان 100 mg.L^{-1} تعیین شد. ژن مقاومت به کانامایسین به عنوان نشانگر انتخابی بسیاری از وکتورهای رایج می‌باشد (Tohidfar *et al.*, 2014) و تعیین غلظت این آنتی‌بیوتیک برای غربالگری می‌تواند برای انتقال سایر وکتورها به *R. eutropha* مورد استفاده قرار گیرد.

محققان توانایی برخی از میکروارگانیسم‌ها برای تولید *CA* به منظور استفاده در *CO2 Capture Storage* (CCS) را شناسایی کرده‌اند (Mitchell *et al.*, 2010). با این حال سطح تولید *CA* بسیار پایین است و روش‌های تولید *CA* باید بهینه‌سازی شوند (Kumar *et al.*, 2014 و Mesbah & Wiegel, 2012). در میکروارگانیسم‌های طبیعی، تولید *CA* به پارامترهای رشد مربوط است و بهینه‌سازی این شرایط باعث بهبود میزان تولید آنزیم خواهد شد. اما با توجه به این که میکروارگانیسم‌های مقاوم به حرارت و قلیا دارای آنزیم‌های مناسب‌تری از نظر کارایی و پایداری هستند (Kumar *et al.*, 2018 و Kumar *et al.*, 2014)، بنابراین انتقال ژن رمزساز آنزیم *CA* مربوط به این باکتری‌ها به سویه‌های مورد نظر در افزایش بیان آنزیم، مؤثر خواهد بود. در این مطالعه از توالی بهینه‌سازی کدونی شده ژن *CA* ی مربوط به باکتری *Caminibacter mediatlanticus* (باسیل گرم منفی،

بی‌هوازی با متابولیسم کمولیتوتروفی) که از نظر مقاومت، سرعت واکنش و نیمه عمر طولانی یکی از مناسب ترین انواع CA است، استفاده شد (Mohsenpour *et al.*, 2019). توالی این ژن با تغییرات اسیدهای آمینه، بر اساس مطالعات انجام شده با روش طراحی منطقی (Rational Design) (Bi & Mueller, 2013 و Borchert & Saunders, 2013 و Bose & Satyanarayana, 2017)، برای افزایش پایداری و عملکرد آنزیم، مهندسی و سنتز شده بود. همچنین اکثر جایگاه‌های آنزیمی معمول در وکتورهای رایج مورد استفاده در مهندسی ژنتیک، در این توالی کور شده‌اند و این مزیت استفاده از این ژن را به منظور کلون‌سازی‌های مجدد جهت اهداف مختلف، تسهیل می‌کند (Mohsenpour *et al.*, 2019). بهینه سازی کدونی علاوه بر اینکه باعث افزایش بیان ژن در شرایط طبیعی می‌شود، در شرایط تنش نیز در پایداری و افزایش بیان ژن نسبت به شرایط طبیعی مؤثر است (Chamani *et al.*, 2020).

در طیف FT-IR بیوپلیمر استخراج شده از باکتری‌های شاهد و نوترکیب، گروه کربونیل (C=O) در عدد موج 1720 cm^{-1} تا 1730 cm^{-1} به عنوان پیک شاخص پلی هیدروکسی بوتیرات است. علاوه بر این در ناحیه 500 cm^{-1} تا 1300 cm^{-1} حدود ده پیک قابل مشاهده است (ناحیه اثر انگشت PHB نامیده می‌شود) که همراه با پیک شاخص، نوع بیوپلیمر PHB را تأیید می‌کند. پیک‌هایی که با طیف‌های 800 cm^{-1} تا 1000 cm^{-1} مشاهده می‌شوند، مربوط به پیوندهای کششی C-C در ساختمان PHB هستند. پیک‌های جذبی با عدد موج حدود 1128 cm^{-1} – 1163 cm^{-1} – 1278 cm^{-1} – 1289 cm^{-1} – 1259 cm^{-1} – 1302 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن و ارتعاشات کششی متقارن C-O-C است. پیک‌هایی با عدد موج 1378 cm^{-1} – 1449 cm^{-1} مربوط به گروه متیل CH₃ است. پیک‌های مربوط به گروه‌های هیدروکسیل انتهایی در عدد موج بین 3100 cm^{-1} تا 3680 cm^{-1} مشاهده می‌شوند (Hassan *et al.*, 2016) (جدول ۳، شکل‌های ۳ و ۴ و ۵). نتایج رشد باکتری و سنجش PHB با روش GC-MS و مقایسه آن در باکتری وحشی و نوترکیب رشد یافته در شرایط مختلف نشان دهنده مؤثر بودن بیان ژن CA در افزایش تولید PHB در *R. eutropha* نوترکیب حاوی این ژن بود. در همه آزمایش‌ها میزان برابری از وزن خشک باکتری‌های شاهد و نوترکیب برای سنجش PHB توسط GC-MS استفاده شد. در این مطالعه از محیط کشت کامل و محدود LB برای رشد باکتری استفاده شد و به دلیل عدم امکان استفاده از شیکر در انکوباتور CO₂ دار به منظور یکسان بودن شرایط، همه نمونه‌ها بدون استفاده از شیکر کشت شدند که انتظار می‌رود میزان رشد باکتری و تولید PHB پس از استفاده از بیوراکتور و بهینه‌سازی محیط کشت افزایش یابد.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه از میکروارگانیسم‌ها برای جذب و ترسیب کربن و از سوی دیگر تولید محصولات با ارزشی مثل بیوپلیمرهای تجزیه پذیر توسط چرخه‌های بیولوژیکی باکتری استفاده شده است. با توجه به اینکه باکتری *R. eutropha* غیر بیماریزا و قادر به رشد در دمای محیط (بدون نیاز به انکوباتور) و محیط کشت پیچیده است، نتایج این مطالعه اثبات می‌کند که

باکتری نوترکیب حاصل حتی در محیط کشت نیم LB قادر است به میزان مؤثری رشد کرده و بیوپلیمر تولید کند. بنابراین انتظار می‌رود که این باکتری بتواند در محیط‌های کشت حداقل و دارای کربن دی اکسید بالا رشد کرده و PHB تولید کند. علاوه بر ترسیب و کاهش CO₂ محیط زیست توسط باکتری، بیوپلیمرهای تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها می‌توانند کاربردهای بسیاری در زمینه جایگزینی با پلاستیک های مرسوم داشته باشند. با توجه به اینکه این کاربردها به دلیل هزینه‌های بالای بازیافت بیوپلیمر محدود می‌شوند؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود که از بیوپلیمرهای میکروبی در صنایع دارویی و پزشکی به عنوان حامل دارو، نخ بخیه، بیوپلیمر جایگزین استخوان و در تحقیقات به عنوان مواد سازنده داربست سلولی و ساخت چیپ‌های میکروفلوئیدیک برای کشت چند بعدی سلول‌ها در جهت دستیابی به نتایج نزدیک به آزمایش‌های در زیوه (in vivo) استفاده گردد.

سیاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی برای همکاری و در اختیار قرار دادن تجهیزات انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- Aneja, K.K., Ashby, R.D. and Solaiman, D.K. (2009). Altered composition of *Ralstonia eutropha* poly(hydroxyalkanoate) through expression of PHA synthase from *Allochromatium vinosum* ATCC 35206. *Biotechnology Letters*, 31: 1601–1612.
- Bi, C., Su, P. and Mueller, J. (2013). Development of a broad host synthetic biology toolbox for *Ralstonia eutropha* and its application to engineering hydrocarbon biofuel production. *Microbial Cell Factories*, 12: 107-116.
- Borchert, M. and Saunders, P. (2013). Heat-stable carbonic anhydrases and their use. Patent US 8697428 B2.
- Bose, H. and Satyanarayana, T. (2017). Microbial carbonic anhydrases in biomimetic carbon sequestration for mitigating global warming: prospects and perspectives, *Frontiers in Microbiology*, 8: 1615-1635.
- Chamani Mohasses, F., Solouki, M., Ghareyazie, B., Fahmideh, L., Mohsenpour, M. (2020). Correlation between gene expression levels under drought stress and synonymous codon usage in rice plant by in-silico study. *PLoS ONE*, 15: 1-21.
- Crepin, L., Lombard, E. and Guillouet, S.E. (2016). Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic alka(e)ne production. *Metabolic Engineering*, 37: 92–101.
- Ewering, C., Heuser, F. and Benuolken, J.K. (2006). Metabolic engineering of strains of *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas putida* for biotechnological production of 2-methylcitric acid. *Metabolic Engineering*, 8: 587–602.
- Hassan, M.A., Bakhiet, E.K., Ali, S.G. and Hussien, H.R. (2016). Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus* sp. isolated from Egypt. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6: 046-051.

- Jo, B. H. (2016). Engineering de novo disulfide bond in bacterial α -type carbonic anhydrase for thermostable carbon sequestration. *Scientific Reports*, 6: 29322-29330.
- Juengert, J.R., Bresan, S. and Jendrossek, D. (2018). Determination of polyhydroxybutyrate (PHB) content in *Ralstonia eutropha* using gas chromatography and Nile red staining. *BioProtocol*, 8: 2748-2762.
- Kumar, M., Gupta, A. and Thakur, I.S. (2016). Carbon dioxide sequestration by chemolithotrophic oleaginous bacteria for production and optimization of polyhydroxyalkanoate. *Bioresource Technology*, 213: 249–256.
- Kumar, M., Sundaram, S., Gnansounou, E., Larroche, C. and Thakur, I.S. (2018). Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review, *Bioresource Technology*, 247: 1059-1068.
- Kumar, V., and Satyanarayana, T. (2014). Production of thermo-alkali-stable xylanase by a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1 in cane molasses medium and its applicability in making whole wheat bread. *Bioprocess. Biosystems Engineering*, 37: 1043–1053.
- Lu, J., Brigham, C.J. and Gai, C.S. (2012). Studies on the production of branched-chain alcohols in engineered *Ralstonia eutropha* H16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 283–297.
- Mesbah, N. M., and Wiegel, J. (2012). Life under multiple extreme conditions: diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles. *Appl. Environmental Microbiology*, 78: 4074–4082.
- Mitchell, A. C., Dideriksen, K., Spangler, L. H., Cunningham, A. B. and Gerlach, R. (2010). Microbially enhanced carbon capture and storage by mineral-trapping and solubility-trapping. *Environmental Science and Technology*, 44: 5270–5276.
- Mohsenpour, M., Babaeian, J.N., Touhidfar, M. and Habashi A.A. (2008). Design and construction of four recombinant plasmid vectors containing chitinase, glucanase and BT genes, suitable for plant transformation. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 15: 69-80
- Mohsenpour, M., Noormohammadi, Z., Irani, S. and Amirmozafari, N. (2019). Expression of an environmentally friendly enzyme, engineered carbonic anhydrase, in *Escherichia coli*. *International Journal of Environmental Research*, 3: 295-301.
- Mohsenpour, M., Tohidfar, M., Jelodar, N.B. and Jouzani G.S. (2015). Designing a new marker-free and tissue-specific platform for molecular farming applications. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24: 433-440.
- Mueller, J., MacEachran, D. and Burd, H. (2013). Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for autotrophic and heterotrophic production of methyl ketones. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 4433–4439.
- Overhage, J., Steinbüchel, A. and Priefert, H. (2002). Biotransformation of eugenol to ferulic acid by a recombinant strain of *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4315–4321.
- Raberg, M., Volodina, E., Lin, K. and Steinbüchel, A. (2017). *Ralstonia eutropha* H16 in progress: Applications beside PHAs and establishment as production platform by advanced genetic tools. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38: 494-510.
- Rohwerder, T and Mueller. R.H. (2010). Biosynthesis of 2-hydroxyisobutyric acid (2-HIBA) from renewable carbon. *Microbial Cell Factories*, 9: 13-22.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3th Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schirmer, A., Rude, M.A. and Li, X. (2010). Microbial biosynthesis of alkanes. *Science*, 329: 559–562.

- Voss, I. and Steinbuuchel, A. (2006). Application of a KDPG-aldolase gene-dependent addiction system for enhanced production of cyanophycin in *Ralstonia eutropha* strain H16. *Metabolic Engineering*, 8: 66–78.
- Tohidfar, M., Ghoreyshi, E., Fakheri, B. and Mohsenpour, M. (2014). Design and construction of specific chloroplast vectors for rice plants containing betaine aldehyde dehydrogenase (badh) and flavodoxin (fld) genes for resistance to abiotic stress. *Crop Biotechnology*, 4: 47-59.
- Zhang, Z., Lian, B., Hou, W., Chen, M., Li, X. and Shen, W. (2011). Optimization of nutritional constituents for carbonic anhydrase production by *Bacillus mucilaginosus* K02. *African Journal of Biotechnology*. 10: 8403–8413.

Carbon sequestration by recombinant carbonic anhydrase in *Ralstonia eutropha*

M. Mohsenpour¹, N. Amirmozafari^{2*}, Z. Noormohammadi³, Sh. Irani⁴

Received: 2019.4.26

Accepted: 2019.12.7

Abstract

Emission of greenhouse gases and plastic wastes are one of the most important environmental problems in the world. The purpose of this study was to use the bacterium *Ralstonia eutropha* as the host for recombinant carbonic anhydrase enzyme which is used for carbon sequestration and poly hydroxyl butyrate (PHB) production. The carbonic anhydrase gene (*CA*) was inserted in the expression vector and transformed into *Ralstonia eutropha*. Then PHB production was assayed by FT-IR and GC-MS methods in recombinant and non-recombinant bacteria in different concentrations of LB medium in the presence and absence of CO₂. Production of PHB in LB medium increased 31.49 percent in recombinant bacteria in the presence of CO₂. These increases were 18.44 and 34.44 percent compared to non-recombinant bacteria in presence and absence of CO₂, respectively. In 0.5 LB medium, the recombinant bacterium produced 26.57 percent PHB in presence of CO₂ more than in its absence. Non-recombinant bacterium in this medium produced 18.30 and 30.63 percent PHB less than the recombinant cell in the presence and absence of CO₂, respectively. The quantity of PHB production using GC-MS revealed that *CA* gene expression was effective for increasing PHB production in recombinant *R. eutropha*. In the presence of CO₂ and by using a simple medium, the recombinant bacterium is able to produce PHB. This bacterium can also be effective in carbon sequestration.

Keywords: Carbonic anhydrase, Carbon sequestration, *Ralstonia eutropha*.

1 - PhD student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 - Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Science and Health Services, Tehran, Iran

*(Corresponding Author: amirmozafari@iums.ac.ir)

3 - Associate professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4 - Associate professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran