Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

ORIGINAL ARTICLE

Production of Conjugated Linoleic Acid by Transformed E.coli

Jamshid Farmani[1]
Mohammad Safari[1]
Farzin Roohvand[2,3]
Mohammad Reza Aghasadeghi[3]
Seyyed Hadi Razavi[1]
Fatemeh Motevalli[2,3]

[1] Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran
[2] NRGB Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3] Hepatitis and AIDS Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[4] Central Laboratory, College of Abureyhan, University of Tehran, Pakdasht, Iran

(Received December 13, 2010 ; Accepted March 15, 2011)

Abstract

Background and purpose: Due to the beneficial physiological effects of conjugated linoleic acid (CLA), there has been a growing tendency to produce it as a functional lipid in recent years. Different CLA isomers have different physiological effects; hence, production of certain CLA isomers with high purity is of great importance. CLA can be produced through both chemical and enzymatic methods; however, unlike chemical catalysts, enzymes make it possible to produce pure CLA isomers. In this study, linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes* was expressed in *E. coli* and the possibility of the production of CLA was studied.

Materials and methods: The vector containing linoleic acid isomerase, pGEX-6P-PAI, was transformed in *E. coli* . Transformants were selected based on their resistance to ampicillin and restriction digestion analysis. To express the recombinant linoleic acid isomerase, transformants were induced using isopropyl-beta-thiogalactopyranoside (IPTG). The expression of recombinant protein was confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting using anti-linoleic acid isomerase antibody. Then, the possibility of the production of CLA from Linoleic acid by using *E-coli* transformant was investigated.

Results: Recombinant linoleic acid isomerase was intracellularly produced as a glutathione S-transferase (GST) tagged protein by transformed *E-coli*. The fusion of GST to the N-terminus of linoleic acid isomerase increased its molecular weight from 49 to 75 kDa. GST-tagged enzyme acted like linoleic acid isomerase and the transformed bacterium could convert considerable amounts of linoleic acid to CLA.

Conclusion: The findings indicated that transformed *E. coli* can be used for CLA production in biocatalytic processes.

Key words: Conjugated linoleic acid (CLA), linoleic acid isomerase, *E. coli*, *Propionibacterium acnes*

J Mazand Univ Med Sci 2011; 21(82): 37-46 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم شماره ۸۲ خرداد سال ۱۳۹۰ (۴۶-۳۷)

تولید اسید لینولئیک کانژوگه به وسیله اشریشیا کلی تراریخته

جمشید فرمانی[۱]
محمد صفری[۱]
فرزین روحوند[۲،۳]
محمد رضا آقا صادقی[۳]
سید هادی رضوی[۱]
فاطمه متولی[۲،۳]

چکیده

سابقه و هدف : در سال های اخیر تمایل به تولید اسید لینولئیک کانژوگه (CLA) به عنوان یکی از لیپیدهای عملگر افزایش یافته است. مصرف CLA اثرات فیزیولوژیکی سودمند زیادی دارد. به‌دلیل متفاوت بودن اثرات فیزیولوژیکی ایزومرهای گوناگون CLA تولید ایزومرهای خاص و خالص اهمیت خواهد داشت. تولید CLA به روش‌های شیمیایی و آنزیمی امکان‌پذیر می‌باشد. مزیت روش آنزیمی، عمل ویژه آنزیم‌هاست که تولید فراورده‌های ویژه و خالص را ممکن می‌سازد. در این پژوهش، لینولئیک اسید ایزومراز از Propionibacterium acnes ، در اشرشیا کلی (E. coli) کلون و امکان تولید CLA به وسیله آن ارزیابی شد.

مواد و روش ها : از وکتور حاوی ژن لینولئیک اسید ایزومراز (pGEX-6P-PAI) در E. coli برای تراریخت کردن استفاده شد. غربالگری کلون‌های تراریخت شده برپایه مقاومت به آمپی‌سیلین و آنالیز هضم وکتور انجام شد. القای کلون‌های تراریخت شده برای تولید آنزیم نوترکیب با افزودن ایزوپروپیل‌بتا- تیو-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) انجام شد. آزمون های الکتروفورز ژل SDS- پلی اکریلامید و وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی آنتی لینولئیک اسید ایزومراز بیان نوترکیب لینولئیک اسید ایزومراز را تائید کردند. پس از تائید، امکان تولید CLA از اسید لینولئیک با استفاده از E. coli تراریخت بررسی شد.

یافته ها : E. coli تراریخته شده، لینولئیک اسید ایزومراز نوترکیب را به شکل متصل شده به دنباله گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) تولید کرد. افزوده شدن دنباله GST به سر N آنزیم باعث افزایش وزن ملکولی آن از ۴۹ به ۷۵ کیلو دالتون شد. آنزیم دارای دنباله GST در سر N خود، فعالیت لینولئیک اسید ایزومرازی داشت و باکتری تراریخت توانست مقادیر قابل توجهی CLA از اسید لینولئیک تولید کند.

استنتاج : بر اساس نتایج به دست آمده، از سلول‌های E. coli تراریخت شده می‌توان به طور مناسبی برای تولید CLA در فرآیندهای بیوکاتالیز استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اسید لینولئیک کانژوگه، لینولئیک اسید ایزومراز، اشریشیاکلی، Propionibacterium acnes

مولف مسئول: فرزین روحوند- تهران : انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز E-mail: farzin.roohvand@gmail.com
۱. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده فناوری و مهندسی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران
۲. بانک ژن نوترکیب ایران، انستیتو پاستور ایران
۳. بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت : ۸۹/۹/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۹/۱۱/۹ تاریخ تصویب : ۸۹/۱۲/۲۴

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم شماره ۸۲ خرداد سال ۱۳۹۰ ( )

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

مقدمه

در سال‌های اخیر توجه به تولید فراورده‌های غذایی ایمن و سلامتی بخش افزایش یافته است. چربی‌ها یکی نگرانی‌های زیادی در مورد مصرف آن‌ها وجود دارد(۱). علی‌رغم ماهیت ضد تغذیه‌ای گروهی از لیپیدها مانند اسیدهای چرب ترانس و اشباع(۳،۲)، گروهی دیگر از لیپیدها اثرات فیزیولوژیکی مفیدی از خود نشان داده اند و در سال های اخیر مطالعاتی برای تولید و وارد کردن آن‌ها در غذاها انجام شده است(۴). یکی از لیپیدهای سلامتی بخش یا عملگر، اسید لینولئیک کانژوگه (CLA[1]) است. CLA اصطلاحی است که به مجموعه ای از ایزومرهای کانژوگه مکانی و هندسی اسید لینولئیک (18:2 c-9, c-12) اطلاق می‌شود(۵). به تازگی، به دلیل اثرات فیزیولوژیکی سودمندش مانند اثرات ضد سرطانی، ضد تصلب شرایینی، ضد دیابتی، ضد اکسیدانی، کاهش کلسترول LDL خون، کاهش نسبت کلسترول LDL به HDL، کاهش لخته شدن پلاکت‌های خون، کاهش رگ‌سازی (موثر در جلوگیری از متاستاز سرطان)، کاهش چربی بدن (لاغر کنندگی) بدون کاهش توده استخوانی، افزایش ماهیچه بدن و بهبود سیستم ایمنی بدن، CLA توجه زیادی را به خود جلب کرده است و امیدهایی را از نظر تولید فراورده‌های چربی ایمن و سلامتی بخش ایجاد کرده است(۶).

روش تجاری تولید CLA استفاده از کاتالیزورهای شیمیایی است. با استفاده از این کاتالیزورها مخلوطی از ایزومرهای مختلف ساخته می شود و بیشترین درجه خلوص برای یک نوع ایزومر، ۴۵ تا ۵۰ درصد است(۷). از آن‌جایی‌که اثرات فیزولوژیکی ایزومرهای گوناگون CLA یکسان نیست، تولید ایزومرهای ویژه فعال زیستی به شکل خالص برای کاربردهای نوتراسوتیکال اهمیت از اجزای اصلی غذاها بوده و بدلیل ارتباط مصرف چربی‌ها با بیماری‌های قلبی- عروقی، دیابت و چاقی، پیدا می‌کند. از این دید، به دلیل ناویژه بودن کاتالیزورهای شیمیایی و ناکارا بودن روش‌های شیمیایی در تولید ایزومرهای ویژه و خالص CLA (۷)، پژوهش در جهت توسعه روش‌های جایگرین ضروری به نظر می‌رسد. بر خلاف بسیاری از کاتالیزورهای شیمیایی، آنزیم‌ها عمل ویژه دارند و تولید فراورده‌های ویژه و خالص با به کارگیری آن‌ها امکان‌پذیر است. لینولئیک اسید ایزومراز، آنزیم تولید کننده CLA است(۸). سوبسترای اصلی لینولئیک اسید ایزومرازها، اسید لینولئیک است. بر پایه ویژه گزینی، لینولئیک اسید ایزومرازها به دو گروه تقسیم می‌شوند: ۱۱و ۹- ایزومرازها که محصولشان ایزومرهای CLA c/t-9, t-11 است و ۱۲و ۱۰-ایزومرازها که محصولشان ایزومر CLA t-10, c-12 است(۹،۸). شناخته شده‌ترین آنزیم تولید کننده CLA، لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes است. این پروتئین یک فلاووآنزیم است، از ۴۲۴ اسید آمینه تشکیل شده و ساختار و مکانیسم عمل آن شناخته شده است(۱۳-۱۰). فراورده بیوکاتالیز لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes، ایزومر CLA t-10, c-12 است. ایزومر CLA t-10, c-12 به همراه ایزومر CLA c-9, t-11 دو ایزومر اصلی CLA هستند که بیشترین فعالیت‌های زیستی به آن‌ها نسبت داده می‌شود. افزون بر این، ایزومر CLA t-10, c-12 تنها ایزومر شناخته شده‌ای است که بر متابولیسم چربی‌ها اثر داشته و اثرات لاغرکنندگی از خود نشان داده است(۶). از این رو لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes به دلیل توانایی ویژه اش در تولید ایزومر CLA t-10, c-12 مورد توجه قرار گرفته است. علی‌رغم مطالعات انجام شده در زمینه ساختار و مکانیسم عمل لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes (۱۳،۱۲)، هنوز

1. Conjugated linoleic acid

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

فرایند بیوتکنولوژیکی مناسبی برای تولید CLA توسعه نیافته است. لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes متصل به دنباله هیستیدینی در اثر بیش بیان در E. coli ، به شکل توده‌های پروتئینی نامحلول درآمده و غیر فعال شده است(۱۴،۱۱). برای بیان محلول، Hornung و همکاران (۱۰) لینولئیک اسید ایزومراز را به صورت متصل به دنباله گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) در E. coli بیان کردند. این کار باعث افزایش حل‌پذیری آنزیم شد و آن‌ها توانستند پروتئین فعال را با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی آفینیته خالص‌سازی کنند. به هر حال استفاده از روش‌های کروماتوگرافی آفینیته به دلیل هزینه‌های زیاد و بازده کم در مقیاس صنعتی مقرون به صرفه نیست. یک راه دیگر برای توسعه فرایند تولید CLA استفاده از سلول‌های در حال رشد به عنوان بیوکاتالیست است(۱۶،۱۵). در این مطالعه برای بررسی امکان تولید CLA با استفاده از سلول های در حال رشد، لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes به صورت متصل به دنباله GST در E. coli کلون و بیان شد و سپس تولید CLA با استفاده از سلول های در حال رشد E. coli تراریخت ارزیابی شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از E.coli BL21 (DE3) (Novagen, Madison, WI, USA) برای تراریخت کردن و بیان پروتئین نوترکیب استفاده شد. پلاسمید حاوی ژن لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes ، pGEX-6P-PAI و آنتی سرم خرگوش آنتی لینولئیک اسید ایزومراز طریق Ivo Feussner (Georg-August-Universität Göttingen، آلمان) اهدا شد. محیط‌های رشد باکتریایی مورد استفاده از شرکت مرک بودند (Darmstadt، آلمان). کیت‌های روش‌های ملکولی و مواد زیستی از Fermentas (مونیخ، آلمان) یا Bioneer (Alameda, CA) تهیه شدند. مواد شیمیایی از درجه فوق خالص بودند و از مرک یا سیگما (آمریکا) تهیه شدند.

خالص سازی اسید لینولئیک از روغن آفتابگردان

سوبسترای تهیه CLA، اسید لینولئیک، به روش کمپلکس کردن با اوره از روغن آفتابگردان خالص سازی شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ گرم روغن در یک ارلن ریخته شد و ۲۰۰ میلی لیتر محلول پتاس در اتانول (۱۰ درصد وزنی- حجمی) و مقداری سنگ جوش به آن اضافه شد. پس از اتصال مبرد رفلاکس به ارلن و قرار دادن آن بر روی هیتر به مدت ۱/۵ ساعت صابونی شدن انجام شد. سپس با افزودن اسید کلریدریک ۶ نرمال تا pH=۳ اسیدهای چرب آزاد شدند. در ادامه ۲۰۰ میلی‌لیتر آب نمک اشباع افزوده شد و اسیدهای چرب آزاد سه بار هر بار با ۳۰۰ میلی‌لیتر هگزان نرمال استخراج شدند. همه فازهای هگزانی با هم مخلوط شدند و هگزان در دمای $55\ ^{\circ}C$ با استفاده از اواپوراتور چرخشی از اسیدهای چرب آزاد جدا شد. سپس ۱۰۰ گرم اسید چرب آزاد تهیه شده با ۲۵۰ گرم اوره و ۷۵۰ گرم اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد و در دمای $60^{\circ}C$ تا تشکیل یک محلول یکنواخت هم زده شد. پس از سرد شدن تا دمای محیط، محلول در دمای صفر درجه سانتیگراد به مدت سه ساعت نگه داشته شد. سپس لیکور مادر در خلاء با استفاده از ارلن خلاء، کاغذ صافی واتمن ۴ و قیف بوخنری که قبلا سرد شده بودند از بخش کمپلکس شده با اوره (بخش کریستالیزه شده) جدا شد. برای جداسازی اسیدهای چرب آزاد از لیکور مادر، ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن افزوده شد و با اسید کلریدریک ۶ نرمال تا pH حدود ۲ تا ۳ اسیدی شد. پس از آن اسیدهای چرب آزاد سه بار هر بار با ۳۰۰ میلی‌لیتر هگزان نرمال استخراج شدند. همه فازهای هگزانی با هم مخلوط شدند و با افزودن مقداری سولفات سدیم بدون آب و صاف کردن آن خشک شدند. هگزان در دمای $55\ ^{\circ}C$ با استفاده از اواپوراتور چرخشی از اسیدهای چرب آزاد جدا شد(۱۷).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

کلونینگ و بیان لینولئیک اسید ایزومراز در E. coli

پلاسمید حاوی ژن لینولئیک اسید ایزومراز (pGEX-6P-PAI) در E. coli BL21 (DE3) با پیروی از روش های معمول کلون شد(۱۸). کلنی‌های تراریخت شده بر اساس مقاومت به آمپی‌سیلین (۱۰۰ μg/ml) در محیط لوریا برتانی آگار [۱ درصد (w/v) تریپتون، ۰/۵ درصد (w/v) عصاره مخمر، ۱ درصد (w/v) کلرید سدیم، ۱/۵ درصد (w/v) آگار، LB] انتخاب شدند و سپس برای تائید ملکولی کلنی‌ها، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Bioneer، پلاسمید استخراج شد و به روش آنالیز هضم با آنزیم برشی BglI تائید شد(۱۸).

کلنی‌های تائید شده در محیط مایع LB حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ μg/ml) در دمای ۳۷ °C تا رسیدن به OD برابر ۰/۵ در گرمخانه تکان دهنده (۱۵۰ rpm) کشت داده شدند. القای کلونی‌ها برای بیان آنزیم با افزودن ایزوپروپیل بتا-تیو-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) به میزان یک میلی‌مولار انجام شد(۱۹). پس از سه ساعت از باکتری‌های القا شده نمونه‌برداری شد و از نظر بیان آنزیم با الکتروفورز در ژل SDS- پلی‌اکریلامید آنالیز شد.

الکتروفورز ژل SDS- پلی اکریلامید

نمونه‌های سلول باکتری پیش و پس از القا در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند و پس از دور ریختن روشناور، سلول‌ها در بافر لیزکننده(pH =۸ ، ۸ M urea ، ۱۰۰ mM NaH_2PO_4 ، ۱۰ mM Tris·Cl) پخش شده و سپس با بافر ۱۰ X بارگذاری SDS (2-Mercoptoethonol دو درصد، Bromophenol blue ۰/۰۲ درصد، ۲ SDS درصد، Glycerol ۲۰ درصد، ۰/۰۹ M Tris-Cl درصد) مخلوط شدند. پس از ۱۰ دقیقه جوشاندن، ۲۰ µl از نمونه در ژل SDS- پلی اکریلامید ۱۲ درصد الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، ژل با کوماسی بلو، رنگ و عکس برداری شد(۱۸،۱۹).

آنالیز وسترن بلاتینگ

ابتدا نمونه‌های سلول باکتری پیش و پس از القا به روش الکتروفورز ژل SDS- پلی اکریلامید، الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، پروتئین‌های تفکیک شده، روی غشای نیتروسلولزی الکتروبلات شدند(۱۸). تشخیص باند لینولئیک اسید ایزومراز با استفاده از آنتی‌سرم آنتی‌لینولئیک اسید ایزومراز خرگوش به عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی موش ضد خرگوش برچسب‌گذاری شده با پراکسیداز ترب کوهی به عنوان آنتی‌بادی ثانویه همراه با رنگ‌آمیزی با ۳ و۳- دی آمینو بنزیدین انجام شد(۱۸).

ارزیابی تولید CLA

از یک درصد از یک کشت شبانه کلون تراریخت شده به عنوان مایه برای تلقیح ۱۰ میلی لیتر محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ μg/ml) استفاده شد. کشت تا رسیدن به OD برابر ۰/۵ در دمای ۳۷°C در گرمخانه تکان دهنده (۱۵۰ rpm) نگه داشته شد. پس از آن ۰/۱ میلی‌مولار IPTG، ۵۰ میلی‌گرم اسید لینولئیک و ۱۰ میلی‌گرم توئین ۲۰ در شرایط استریل افزوده شد و برای بیان لینولئیک اسید ایزومراز و تولید CLA در ۲۵°C به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه تکان دهنده نگهداری شد. پس از آن اسیدهای چرب به روش Coakley و همکاران(۲۰) استخراج شدند. به طور خلاصه، ۴ میلی لیتر ایزوپروپانول به کشت (۱۰ میلی‌لیتر) افزوده شد و ۳۰ ثانیه ورتکس شد. پس از آن ۳ میلی‌لیتر هگزان نرمال افزوده شد و پس از ۳۰ ثانیه ورتکس، ۶ میلی لیتر دیگر هگزان نرمال افزوده شد. پس از یک دقیقه ورتکس کردن، در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و فاز آلی (رویی) حاوی اسیدهای چرب برداشته شد. در پایان هگزان در دمای ۴۰°C زیر خلاء از اسیدهای چرب جدا شد.

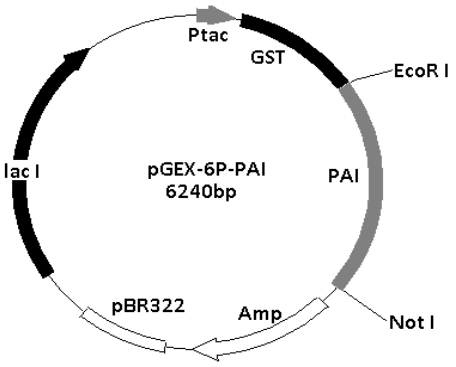
کروماتوگرافی گازی

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

برای آنالیز چربی استخراج شده با کروماتوگرافی گازی، ابتدا چربی استخراج شده متیله شد. برای این کار ۰/۵ میلی لیتر سود متانوله ۱ نرمال به چربی استخراج شده اضافه و یک دقیقه ورتکس شد. سپس مخلوط ۱۵ دقیقه در ۷۰°C نگهداری شد. پس از آن یک میلی لیتر تری فلوراید بور حاوی ۱۴ درصد متانول افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به آرامی تکان داده شد. در ادامه ۲cc هگزان افزوده شد و پس از یک دقیقه ورتکس کردن با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس فاز رویی برداشته شد و پنج سی‌سی آب مقطر به آن اضافه شد و پس از ورتکس کردن با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. شستشو با آب یک بار دیگر تکرار شد. سپس فاز آلی برداشته شد، مقدار کمی سولفات سدیم بدون آب به آن افزوده و پس از هم‌زدن با کاغذ صافی صاف شد(۲۱). دو تا چهار میکرولیتر از محلول متیل استر اسیدهای چرب به تزریقگاه کروماتوگرافی گاز- مایع تزریق شد. دستگاه، مجهز به تزریقگاه دوپاره‌کننده (Splited) و آشکارساز یونیزاسیون شعله بود. نام ستون موئینه مورد استفاده Rt-2560 (Restek Corporation PA 110 Benner Circle Bellefonte)، طول، قطر داخلی و ضخامت لایه آن به‌ترتیب ۱۰۰ متر، ۰/۲۵ میلی‌لیتر و ۰/۲ میکرومتر بود. نسبت دوپارگی (Split ratio) برابر ۵۰، گاز حامل نیتروژن (خلوص ۹۹/۹ درصد) ، فشار سر ستون ۲۲۵ کیلوپاسکال و دمای تزریقگاه و آشکارساز به ترتیب برابر ۲۲۵ و ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود. برای تفکیک مطلوب متیل استر اسیدهای چرب، ابتدا ستون ۳ دقیقه در ۱۶۰°C نگه داشته شد، سپس با سرعت ۲ °C در دقیقه تا ۲۲۰°C افزایش یافت و در پایان، ۳۰ دقیقه در ۲۲۰°C نگه داشته شد(۲۲).

یافته ها

برای تولید نوترکیب لینولئیک اسید ایزومراز از وکتور pGEX-6P-PAI استفاده شد. مهمترین ویژگی این وکتور، افزودن پروتئین گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) به پایانه N پروتئین نوترکیب است. اضافه شدن این پروتئین به پایانه N پروتئین نوترکیب باعث افزایش محلولیت پروتئین می‌شود. همچنین پروتئین نوترکیب به دست آمده حاوی GST را می‌توان به روش کروماتوگرافی آفینیته خالص کرد(۲۳). تصویر شماره ۱ طرح کلی وکتور بیان لینولئیک اسید ایزومراز استفاده شده را نشان می‌دهد. به دلیل وجود ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در این وکتور کلنی‌های تراریخت شده را می‌توان براساس مقاومت به آمپی‌سیلین جدا کرد. برای اطمینان از کلون شدن پلاسمید pGEX-6P-PAI



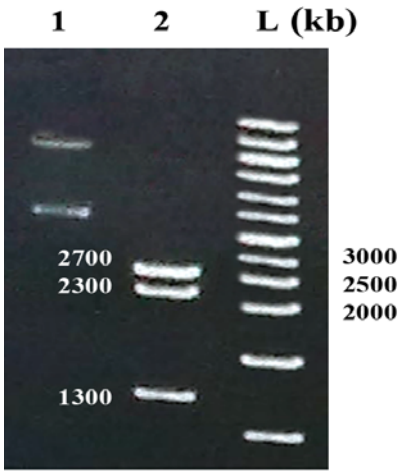
تصویر شماره ۱ : نقشه کلی وکتور بیان لینولئیک اسید ایزومراز (pGEX-6P-PAI). لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes (PAI) بین جایگاه‌های EcoRI و NotI کلون شده است.

در *E. coli*، استخراج پلاسمید از کلون‌های مقاوم به آمپی‌سیلین انجام شد. بررسی توالی وکتور pGEX-6P-PAI با نرم‌افزار Gene Runner Version 3.02 (Hastings Software, Inc.) نشان داد که درصورت هضم آن با آنزیم BglI، سه قطعه با طول‌های ۱۳۰۰، ۲۳۰۰ و ۲۷۰۰ بازی ایجاد خواهد شد. همانطور که در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است، این سه قطعه در اثر هضم پلاسمید با آنزیم BglI ایجاد شده است. پس از اطمینان از تراریخت شدن باکتری آزمون بیان پروتئین

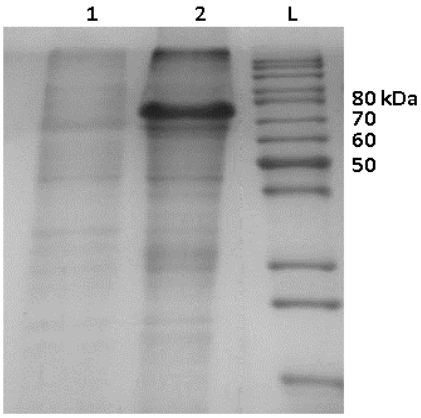
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

نوترکیب انجام شد. وزن ملکولی محاسبه شده لینولئیک اسید ایزومراز ۴۹ kDa بود که با افزوده شدن پروتئین GST (۲۶ kDa) به آن پیش‌بینی می‌شد پروتئینی با وزن ملکولی ۷۵ kDa تولید شود. تصویر شماره ۳ نتیجه الکتروفورز ژل SDS- پلی اکریلامید باکتری تراریخت، قبل و بعد از القا را نشان می‌دهد. همانطور که در تصویر شماره ۳ دیده می‌شود، پس از القا پروتئینی با وزن ملکولی حدود ۷۵ kDa به مقدار زیادی تولید شده است (محاسبه وزن ملکولی پروتئین نوترکیب با استفاده از نرم‌افزار Totallab Quant (TotalLab Ltd, Newcastle upon Tyne, UK) انجام شد. برای اطمینان از تولید لینولئیک اسید ایزومراز نوترکیب، آزمون وسترن بلاتینگ نیز انجام شد. نتیجه این آزمون در تصویر شماره ۴ نشان داده شده است. همانطورکه در تصویر شماره ۴ مشخص است، آزمون وسترن بلاتینگ نیز بیان موفقیت‌آمیز لینولئیک اسید ایزومراز به شکل جوش داده شده به پروتئین GST را تائید می‌کند.

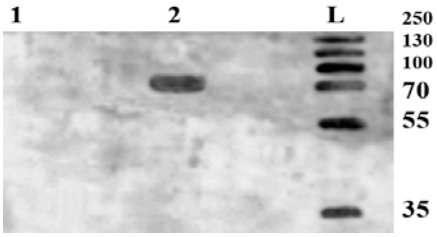
در ادامه پژوهش تولید CLA با استفاده از باکتری تراریخته ارزیابی شد. تصویر شماره ۵ کروماتوگرام متیل استر اسیدهای چرب استخراج شده از محیط کشت باکتری تراریخت نشده و تراریخت شده را نشان می‌دهد. پیک مربوط به CLA در نمونه تخمیر شده با باکتری تراریخت نشده مشاهده نمی‌شود در حالی‌که در نمونه تخمیر شده با باکتری تراریخت شده به طور مشخصی قابل مشاهده است. جدول شماره ۱ پروفیل اسید چرب روغن آفتابگردان، اسید لینولئیک خالص سازی شده، نمونه محیط تخمیر شده با باکتری تراریخت نشده و نمونه محیط تخمیر شده با باکتری تراریخت شده را نشان می‌دهد. با استفاده از روش ذکر شده در این پژوهش لینولئیک اسید با خلوص حدود ۹۴ درصد به دست آمد. باکتری تراریخت شده در شرایط ذکر شده در این پژوهش قادر به تبدیل ۴۲/۵ درصد از اسید لینولئیک به ایزومر CLA t-10, c-12 بود.



تصویر شماره ۲: آنالیز هضم وکتور pGEX-6P-PAI با آنزیم BglI. ۱، قبل از هضم؛ ۲، پس از هضم؛ L، لدر DNA. pGEX-6P-PAI در اثر هضم با آنزیم BglI سه قطعه با طول‌های ۱۳۰۰، ۲۳۰۰ و ۲۷۰۰ باز ایجاد می‌کند.

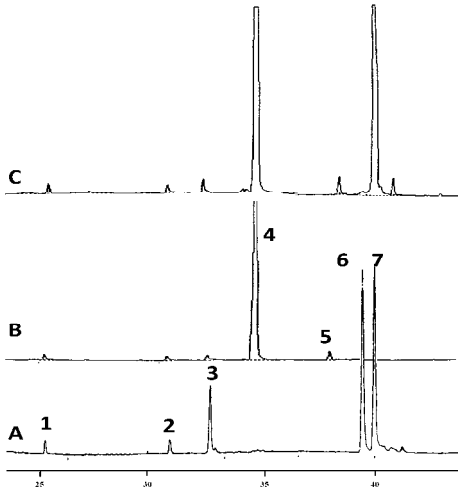


تصویر شماره ۳: تصویر ژل SDS- پلی اکریلامید الکتروفورز شده. پروتئین‌های سلولی E. coli تراریخت شده۱، قبل از القا؛ ۲، پس از القا؛ L، لدر پروتئین. باند ۷۵ kDa در نمونه القا شده به خوبی قابل مشاهده است.



تصویر شماره ٤: آنالیز وسترن بلاتینگ پروتئین‌های سلولی E. coli تراریخت شده ۱، قبل از القا؛ ۲، پس از القا؛ L، لدر پروتئین. همان‌طورکه مشاهده می‌شود باند مربوط به لینولئیک اسید ایزومراز به‌طور اختصاصی با آنتی‌بادی آنتی لینولئیک اسید ایزومراز واکنش داده و ظاهر شده است.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018



تصویر شماره ۵: کروماتوگرام آنالیز GC. A، نمونه استاندارد CLA؛ B، نمونه کشت تخمیر شده توسط E. coli تراریخت نشده؛ C، نمونه کشت تخمیر شده توسط E. coli تراریخت شده. ۱، 16:0؛ ۲، 18:0؛ ۳، 18:1 c9؛ ۴، 18:2 c9, c12؛ ۵، 18:3 c9, c12, c15؛ ۶، CLA (18:2 c9, t11)؛ ۷، CLA (18:2 t10, c12).

جدول شماره ۱ : پروفیل اسیدهای چرب روغن آفتابگردان، کشت تخمیر شده با اشریشیاکلی E. coli تراریخت نشده و تراریخت شده

	16:0	18:0	18:1	18:2 9c, 12c	18:3 9c, 12c, 15c	CLA, 10t, 12c	درصد تبدیل
روغن آفتابگردان	۶/۷±۰/۳	۳/۳±۰/۳	۳۰/۵±۰/۸	۵۷/۲±۰/۹	۱/۰±۰/۲	---	---
اشریشیاکلی تراریخت نشده	۰/۵±۰/۳	۰/۴±۰/۳	۲/۳±۰/۳	۹۴/۵±۱/۲	۲/۰±۰/۴	---	---
اشریشیاکلی تراریخت شده	۱±۰/۴	۱±۰/۳	۱/۵±۰/۵	۵۴/۰±۱	۱/۶±۰/۵	۴۰±۰/۹	۴۲/۵

بحث

آنزیم لینولئیک اسید ایزومراز (LAI) واکنش تبدیل اسید لینولئیک به CLA را کاتالیز می‌کند. فعالیت لینولئیک اسید ایزومرازی در گونه‌هایی از *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *Propionibacterium*، *Bifidobacterium*، *Megasphaera elsdenii*، *Butyrovibrio fibrisolvens* و *Clostridium sporogenes* مشاهده شده است(۲۷-۲۴). از بین باکتری‌های گوناگون شناخته شده، تنها توالی ژن لینولئیک اسید ایزومراز *P. acnes*، *Lactobacillus reuteri*، *Lactobacillus acidophilus*، *Lactobacillus plantarum*، *Lactococcus lactis ssp. Lactis*، *Bifidobacterium dentium*، *Bifidobacterium breve* و *Rhodococcus erythropolis* شناخته شده است(۸). طی سال‌های اخیر، لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes به دلیل ویژگی‌های مطلوب، مانند محلول بودن و داشتن فعالیت ۱۲ و ۱۰-ایزومرازی، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes در میزبان‌های E. coli (۱۰،۱۱،۲۸)، *Lactococcus lactis* (۲۸)، *Saccharomyces cerecisiae* (۱۰) *Nicotina tabacum* و *Oryza sativa* (۲۹) کلون و بیان شده است. Hornung و همکاران (۱۰) بیان درون سلولی لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes در S. cerevisiae را بررسی کردند. S. cerevisiae تراریخت، پس از ۷۲ ساعت تخمیر در حضور اسید لینولئیک قادر به تجمع ایزومر CLA t-10, c-12 به مقدار ۰/۵ درصد در بخش اسیدهای چرب استری شده سلولی بود. به منظور افزایش تولید CLA، آن‌ها کدون ۲۰ اسید آمینه

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

انتهای N لینولئیک اسید ایزومراز را برای S. cerevisiae بهینه کردند. با این کار میزان CLA استری شده در سلول‌های مخمری که با آنزیم کدون- بهینه شده تراریخت شده بود، ۸ برابر (۴ درصد) افزایش یافت. میزان CLA ذخیره شده در دانه تنباکوی تراریخت شده با لینولئیک اسید ایزومراز به صورت استری شده و آزاد به ترتیب، ۰/۳ و ۱۵ درصد بود(۱۰). دانه برنج تراریخت شده با لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes حاوی حدود ۱/۳ درصد CLA (نسبت به کل اسید های چرب) بود (۲۹). بیان درون سلولی آنزیم در میزبان‌های پروکاریوتی بازده بیشتری داشت. سلول‌های E. coli و L. lactis تراریخت شده با لینولئیک اسید ایزومراز طبیعی پس از ۷۲ ساعت تخمیر با اسید لینولئیک، به ترتیب ۳۷/۳ و ۳۹ درصد CLA در سلول هایشان ذخیره کردند(۲۸). توانایی بیشتر تراریخت های پروکاریوتی در تولید CLA به صورت In vivo می‌تواند به دلیل ماهیت پروکاریوتی لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes و فعالیت بیشتر آن در میزبان‌های پروکاریوتی باشد. براساس مطالعات Deng و همکاران(۱۱) افزودن دنباله هگزا هیستیدینی به پایانه C آنزیم، فعالیت آنزیمی آن را ده برابر کمتر کرد. یکی دیگر از مشکلات تولید باکتریایی لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes نامحلول شدن و غیر فعال شدن آن در اثر بیش بیان در E. coli است(۱۴،۱۱). استفاده از سیستم‌های بیانی که تشکیل پروتئین محلول را تشویق کند می‌تواند نامحلول شدن پروتئین را کم کرده و فعالیت آن را حفظ کند. دنباله پروتئینی GST (۲۶ kDa) یکی از پروتئین‌های محلول است که اتصال آن به پایانه N پروتئین می‌تواند باعث تشویق محلول شدن آن شود(۲۳). از این رو در این مطالعه لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes به شکل متصل شده به GST در E. coli بیان شد. آزمون‌های الکتروفورز SDS- پلی‌اکریلامید و وسترن بلاتینگ بیان موفقیت‌آمیز لینولئیک اسید ایزومراز را به صورت متصل به GST تائید کردند. از سوی دیگر سلول‌های E. coli تراریخت در صورت رشد در مجاورت اسید لینولئیک قادر به تبدیل آن به CLA بودند. در شرایط آزمایشی بهینه نشده ۴۰ درصد CLA در محیط کشت قابل تشخیص بود. این موضوع فعال بودن لینولئیک اسید ایزومراز به‌صورت متصل شده به GST را نشان می‌دهد. به عبارت دیگر اتصال دنباله GST به پایانه N به محلول شدن پروتئین در سیتوپلاسم کمک کرد و باعث از بین بردن فعالیت آن نشد.

در مقایسه با میزبان‌های یوکاریوتی گزارش شده در مقالات، E. coli تراریخت شده در این پژوهش مقدار CLA بیشتری تولید کرد (۴۰ درصد در مقابل ۴ درصد در S. cerevisiae (۱۰)، ۱۵ درصد در N. tabacum (۱۰) و ۱/۳ درصد در O. sativa (۲۹). مقدار CLA تولید شده توسط E. coli قادر به بیان لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes به صورت متصل شده به دنباله GST، در حد مقدار گزارش شده برای E. coli و L. lactis قادر به بیان لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes به صورت طبیعی (۲۸) بود. این موضوع عدم تاثیر قابل توجه افزودن دنباله GST به لینولئیک اسید ایزومراز را نشان می‌دهد. بنابراین E. coli تراریخت شده می‌تواند به طور مناسبی برای تولید CLA در فرایندهای بیوکاتالیز با سلول کامل مورد استفاده قرار بگیرد.

در نهایت می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در این پژوهش لینولئیک اسید ایزومراز P. acnes به صورت متصل به دنباله GST در E. coli کلون و بیان شد. تراریخت شدن باکتری از طریق استخراج پلاسمید و آنالیز هضم با آنزیم برشی تائید شد. E. coli تراریخت شده قادر به بیان درون سلولی آنزیم به شکل متصل شده به دنباله GST بود. بیان درون سلولی آنزیم نوترکیب به روش الکتروفورز SDS- پلی اکریلامید و وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی آنتی لینولئیک اسید ایزومراز تائید شد. اتصال دنباله GST به آنزیم باعث افزایش وزن ملکولی آن از ۴۹ به ۷۵ کیلو دالتون شد. افزوده شدن دنباله GST به پایانه N لینولئیک اسید ایزومراز باعث از

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

بین بردن فعالیت آن نشد و آنزیم نوترکیب قادر به تولید مقادیر قابل توجهی CLA بود.

سپاسگزاری

این پژوهش توسط صندوق حمایت از پژوهشگران کشور حمایت مالی شد (شماره طرح ۸۷۰۴۰۰۸۷). بدین وسیله از مدیران و کمیته علمی صندوق سپاسگزاری می شود. تمامی روش‌های بیولوژی ملکولی استفاده شده در این پژوهش در بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران انجام شد. از جناب آقای پروفسور Ivo Feussner (Georg-August - Universität Göttingen، آلمان) بدلیل تامین وکتور pGEX-6P-PAI و آنتی‌بادی آنتی‌لینولئیک اسید ایزومراز و از جناب آقای دکتر آرش معمارنژادیان (انستیتو پاستور ایران) بدلیل نظرات ارزشمندشان صمیمانه تشکر می کنیم.

References

1. Akoh C, Min DB. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. 3rd ed. New York: CRC Press, 2008.
2. Farmani J, Safari M, Hamedi M. Trans-free fats through interesterification of canola oil/palm olein or fully hydrogenated soybean oil blend. Eur J Lipid Sci Technol 2009; 111(12): 1212-1220.
3. Farmani J, Hamedi M, Safari M. Production of zero trans Iranian vanaspati using chemical transesterification and blending techniques from palm olein, rapeseed and sunflower oil. Int J Food Sci Technol 2008; 43(3): 393-399.
4. Akoh C. Handbook of Functional lipids. 1st ed. New York: CRC Press, 2005.
5. Watkins B A, Li Y. Conjugated linoleic acids Nutrition and Biology. In: Akoh C, Min DB, editors. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. 3rd ed, New York: CRC Press; 2008. P 579-600.
6. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. J Nutr Biochm 2006; 17(12): 789-810.
7. Sæbø A. Commercial Synthesis of Conjugated Linoleate. In: Sébédio J-L, Christie WW, Adlof R, editors. Advances in Conjugated Linoleic Acid Research. 1st ed. Vol. 2, Champaign, Illinois: AOCS Press; 2003. P 71-81.
8. Farmani J, Safari M, Roohvand F. Razavi SH, Aghasadeghi MR, Noorbazargan H. Conjugated linoleic acid-producing enzymes: a bioinformatics study. Eur J Lipid Sci Technol 2010; 112(10): 1088-1100.
9. Liavonchanka A, Feussner I. Biochemistry of PUFA double bond isomerases producing conjugated linoleic acid. Chem Bio Chem 2008; 9(12): 1867-1872.
10. Hornung E, Krueger C, Pernstich C, Gipmans M, Porzel A, Feussner I. Production of (10E, 12Z)- conjugated linoleic acid in yeast and tobacco seeds. Biochim Biophys Acta 2005; 1738(1-3): 105-114.
11. Deng MD, Grund AD, Schneider KJ, Langley KM, Wassink SL, Peng SS, et al. Linoleic Acid Isomerase from Propionibacterium acnes: Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Heterologous Expression. Appl Biochem Biotechnol 2007; 143(3): 199-211.
12. Liavonchanka A, Hornung E, Feussner I, Rudolph MG. Structure and mechanism of the Propionibacterium acnes polyunsaturated fatty acid isomerase. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(8): 2576-2581.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:59 +0330 on Monday December 10th 2018

13. Liavonchanka A, Rudolph MG, Tittmann K, Hamberg M, Feussner I. On the Mechanism of a Polyunsaturated Fatty Acid Double Bond Isomerase from Propionibacterium acnes. J Biol Chem 2009; 284(12): 8005-8012.
14. Farmani J. Ph.D. Thesis, University of Tehran, Karaj (Iran) 2011.
15. Sieber R, Collomb M, Aeschlimann A, Jelen P, Eyer H. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products—a review. Int Dairy J 2004; 14(1): 1-15.
16. Ogawa J, Kishino S, Ando A, Sugimoto S, Mihara K, Shimizu S. Production of Conjugated Fatty Acids by Lactic Acid Bacteria, J Biosci Bioeng 2005; 100(4): 355-364.
17. Wu M, Ding H, Wang S, Xu S. Optimizing Conditions for the Purification of Linoleic Acid from Sunflower Oil by Urea Complex Fractionation. J Am Oil Chem Soc 2008; 85(7): 677-684.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
19. The QIAexpressionist™, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5th ed. Qiagen, 2003.
20. Coakley M, Ross RP, Nordgren M, Fitzgerald G, Devery R, Stanton C. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived Bifidobacterium species. J App Microbiol 2003; 94(1): 138-145.
21. Roman-Nunez M. Production of Conjugated Linoleic Acid by Lactobacillus reuteri, MSc Thesis, Oklahoma State University, 2005.
22. Christie WW, Dobson G, Adlof RO. A Practical Guide to the Isolation, Analysis and Identification of Conjugated Linoleic Acid. Lipids 2007; 42(12): 1073-1084.
23. GST gane fusion system. Amersham Biosciences. 2002.
24. Kundríková K, Čertík M. Biotechnological production of conjugated linoleic acid. Biologia Bratislava, 2005; 60(6): 641-647.
25. Adamczak M, Bornscheuer UT, Bednarski W. Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. Eur J Lipid Sci Technol 2008; 110(6): 491-504.
26. Kim YJ, Liu RH, Rychlik JL, Russell JB. The enrichment of a ruminal bacterium (Megasphaera elsdenii YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. J App Microbiol 2002; 92(5): 976-982.
27. Peng SS, Deng MD, Grund AD, Rosson RA. Purification and characterization of a membrane-bound linoleic acid isomerase from Clostridium sporogenes. Enzyme Microb Technol 2007; 40(4): 831-839.
28. Rosberg-Cody E, Johnson MC, Fitzgerald GF, Ross PR, Stanton C. Heterologous expression of linoleic acid isomerase from Propionibacterium acnes and anti-proliferative activity of recombinant trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. Microbiology 2007; 153(8): 2483-2490.
29. Kohno-Murase J, Iwabuchi M, Endo-Kasahara S, Sugita K, Ebinuma H, Imamura J. Production of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in rice. Transgenic Res 2006; 15(1): 95-100.