بررسی میزان بیان ژن های *thrB* و *thrC* در *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ATCC13032 در تولید آزمایشگاهی ترئونین

نادیا عباسی یوسف آباد[۱]، نسترن دریائی غازانی[۱]، **لیلا رهبرنیا*[۲]، علیرضا دهناد†[۳]**

[۱]موسسه آموزش عالی ربع رشید، تبریز، ایران.

[۲]مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران.

[۳]بخش تحقیقات بیماریهای باکتریایی دام موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی ، سازمان تحقیقات وآموزش کشاورزی ، کرج ، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۵

چکیده

اسید آمینه ترئونین یکی از اسید آمینه های ضروری برای دام و طیور می باشد به همین دلیل در تغذیه استفاده از آن به عنوان یک مکمل غذایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. امروزه یکی از شیوه های متداول تولید ترئونین، استفاده از میکروارگانیسم ها به ویژه باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* می باشد. تولید سریع، کشت آسان و هزینه ی پایین تولید از مزایای استفاده از این باکتری جهت تولید اسید آمینه ی ترئونین می باشد. در این مطالعه *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* (ATCC13032) در محیط کشت استاندارد به نام ISP-2 کشت داده شد و سپس جهت بهینه سازی محیط کشت ISP-2 اثر افزودنی هایی مانند آب پنیر، باگاس، ملاس و شربت ذرت بر تولید ترئونین امتحان گردید. میزان تولید ترئونین با استفاده از روش کروماتوگرافی ارزیابی شد. بعد از بررسی نتایج بهترین شرایط فیزیکی و شیمیایی جهت تولید ترئونین انتخاب شد و میزان بیان ژن های کلیدی درگیر در تولید ترئونین شامل *thrB* و *thrC* با تکنیک Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست امده از کروماتوگرافی نشان داد که غلظت ۰/۴g/L آب پنیر بهترین شرایط برای تولید ترئونین را فراهم می کند. به طوریکه غلظت ترئونین تولید شده ۳۳۲۷۱/۵۳mg/L در نمونه آب پنیر افزایش پیدا کرد. براساس نتایج Real-time PCR محیط کشت آب پنیر باعث افزایش ۲ برابر بیان ژن *thrB* و ۱/۰۸ برابر بیان *thrC* شد. براساس نتایج بدست آمده تغییرات فیزیکوشیمیایی در محیط کشت می تواند اثر قابل توجهی در تولید ترئونین توسط باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* داشته باشد.

کلید واژه : ترئونین، *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*، بیان ژن *thrB* و *thrC*.

* le.rahbarnia@gmail.com
† a.dehnad@rvsri.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

مقدمه:

ترئونین یکی از اسیدهای آمینه ضروری برای تولید صنعتی و همچنین مصرف تغذیه ای است. در میان کاربردهای صنعتی گسترده آن، قابل توجه ترین استفاده از ترئونین به عنوان افزودنی خوراک است که استفاده از فرمولاسیون خوراک کم پروتئین همراه با ترئونین باعث بهبود رشد حیوانات و رفع کمبود پروتئین میشود و به تغذیه ی دام کمک می کند و همچنین گسترش بیشتر صنعت را تحریک کرده است(۱). ترئونین، به عنوان یکی از اسیدهای آمینه حیاتی، نقش اساسی در ساختار پروتئین‌های سلولی و فعالیت‌های بیوشیمیایی دارد. با این حال، انسان و دیگر حیوانات مهره‌دار قادر به تولید ترئونین از طریق مسیرهای بیوسنتز نیستند، بنابراین ترئونین از طریق مصرف رژیم غذایی باید تأمین شود. اسید آمینه ترئونین یک اسید آمینه قطبی بدون بار است و در صنایع غذایی و دارویی اهمیت ویژه‌ای دارد، به‌طوری‌که به عنوان یک مکمل غذایی در تغذیه دام و طیور نیز استفاده می‌شود(۲). ترئونین در تشکیل بافت‌های حیاتی مانند قلب، کلاژن و الاستین نقش داشته و در تولید آنتی‌بادی‌ها و سایر آمینواسیدها مؤثر است. همچنین، ترئونین به‌عنوان یک اجزای اساسی ایمونوگلوبولین‌ها عمل می‌کند و افزایش مصرف آن می‌تواند سیستم ایمنی را تقویت کند(۳). در صنایع تولید طیور، ترئونین نقش مهمی در بهبود رشد و عملکرد پروتئینی دارد و می‌تواند بهبود زندگی طیور را ارتقاء دهد. همچنین، حضور اسید آمینه ترئونین در جیره‌های غذایی طیور باعث بهبود عملکرد گوارشی، افزایش وزن، و بهبود عملکرد سیستم ایمنی آن‌ها می‌شود(۴).

میکروارگانیسم های طبیعی مقادیر بسیار کمی از ترئونین تولید می کنندکه جهت تامین نیاز بازار مقرون به صرفه نمی باشد اما تولید برخی باکتری های جهش یافته جهت تولید مقادیر زیادی ترئونین می تواند روش مناسبی جهت تولید صنعتی این اسید آمینه باشد مانند (*سراشیا مارسسنس* (۵) ، *اشرشیاکلی*(۶) ، *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*(۷) و *بروی باکتریوم* (۸)).

با توجه به اهمیت ترئونین و هزینه‌های بالای تولید آن، این پژوهش به دنبال تولید آزمایشگاهی ترئونین از طریق *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* می‌باشد. این روش، نه تنها از لحاظ اقتصادی مزایایی دارد بلکه درون سیستم باکتریایی قابلیت تولید و تبدیل از اسید آسپارتیک به ترئونین را نیز داراست. بدین ترتیب، با بهینه‌سازی مواد قندی محیط کشت و به دست‌آوردن شرایط مناسب، امیدواریم که بهترین بازده تولید ترئونین را بدست آوریم. در این مطالعه، سه هدف اصلی مورد توجه قرار می‌گیرد: به دست‌آوردن میزان مناسب تولید ترئونین توسط *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*، بهینه‌سازی شرایط تولید ترئونین و بررسی بیان ژن های *thrB* و *thrC* که ژن های کلیدی در تولید اسید آمینه ترئونین هستند(۹, ۱۰).

مواد و روش ها:

تهیه و کشت باکتری: *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* از بانک میکروبی مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با کد ATCC13032 خریداری شد. ابتدا کشت *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* (ATCC13032) را با رعایت اصول بهداشتی در محیط کشت جامد استاندارد (نوترینت اگار) انجام شد سپس جهت کشت در حجم بالا ،باکتری کورینه باکتریوم به محیط کشت ISP-2 انتقال داده و منحنی رشد با انجام اسپکتروفتومتری در بازه ۶۲۰nm بررسی شد.

بهینه سازی شرایط کشت باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم: در این مرحله منبع کربن (گلوکز) موجود در محیط کشت ISP-2 حذف شده و توسط آب پنیر، ملاس، باگاس و شربت ذرت که هم در دسترس و هم ارزان و با صرفه میباشند و همچنین برای باکتری قابل مصرف میباشد

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

جایگزین میگردد و مقادیر هر کدام توسط روش طرح مرکب مرکزی و از طریق نرم افزار Minitab با در نظر گرفتن مقادیر مینیمم و ماکزیمم و میانه ای بر اساس دستور العمل محیط کشت و تنظیم مقادیر کمکی اسید- بازی به دست آورده شد(۱۱). روش سطح پاسخ (RSM) از روشهای DOEهست. در این روش علاوه بر تحلیل داده ها و بیان معنی داری متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته، مدلسازی انجام می شود. در انتها نیز عمل بهینه سازی بر مدل ارائه شده انجام می گیرد. اصولاً روش شناسی سطح پاسخ شامل چند گام است: (الف) آزمایش های دو عاملی برای غربالگری متغیرهای ورودی مؤثر، (ب) تجزیه و تحلیل رگرسیون برای برآورد تابع برازش خروجی ها بر حسب ورودی ها و (ج) بهینه سازی به منظور تعیین سطوح بهینه متغیرهای ورودی. ۱۰g عصاره مالت ، ۴g عصاره ی مخمر، ۴g آب پنیر، ۴g شربت ذرت، ۴g ملاس و ۴g باگاس را به شکل جداگانه در فلاسک درب دار شیشه ای به حجم ۱L آب مقطر حل کرده و حرارت داده میشود و سپس در دمای ۱۲۱C° به مدت ۱۵' اتوکلاو می گردد . مقدار یک لوپ از باکتری استوک برداشته شده و کشت داده میشود و سپس در شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰rpm و دمای ۳۴C° انکوبه میگردد تا باکتری به فاز لگاریتمی رشد برسد. پس از شروع ورود به مرحله رشد لگاریتمی میزان تولید ترئونین توسط کروماتوگرافی اندازه گیری شد(۱۲).

اندازه گیری ترئونین تولید شده با روش HPLC:
پس از رسیدن باکتری ها به مرحله ی رشد لگاریتمی چون در این مرحله باکتری ها بیشترین رشد و تولید ترئونین را دارند در این مرحله سوپرناتانت باکتری ها از طریق سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰rpm به مدت ۲۰' جدا شده و سپس مایع رویی را جدا کرده و ۲۵ml مایع رویی را با ۲ml استیک اسید و ۴ml نین هیدرین و ۳ /۰% به مقدار ۱/۵ml اسکوربیک اسید و آب مقطر مخلوط کرده و ترکیب را در دمای ۸۵C° به مدت ۴۰' در حمام بن ماری قرار داده و بعد از سرد شدن به اپراتورکروماتوگرافی ستون اسید امینه آزمایشگاه تخصصی اطهر دانه تحویل داده شد (۱۳).

تجهیزات HPLC شامل ستون C18، فاز متحرک، نمونه ترئونین و محلول استاندارد ترئونین است. فاز متحرک مخلوطی از آب و استونیتریل است و نمونه ها فیلتر و رقیق می شوند. دستگاه HPLC متصل و آشکارسازی UV-VIS روی ۲۱۰nm تنظیم شد.کروماتوگرام ها آنالیز شده و مقادیر ترئونین در نمونه های محیط کشت محاسبه می شود.

استخراج RNA: در مرحله بعد برای بررسی بیان ژن های *thrB* و*thrC* ، استخراج RNA از نمونه های آب پنیر و استاندارد انجام شد. برای این کار ابتدا از محیط کشت ها داخل میکروتیوب ها ریخته و در سانتریفیوژ یخچال دار در دور ۹۰۰۰rpm گذاشته تا باکتری ها از محیط کشت جدا شود سپس ۱ml ترایزول به میکروتیوب ها برای لیز کردن سلول ها اضافه و ورتکس شد سپس به ازای هر ml ۱ ترایزول ۲۰۰µl کلروفرم اضافه کرده پس از انکوبه شدن در دمای اتاق به مدت ۵' ، میکروتیوب ها به مدت ۱۵' با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و مایع رویی با احتیاط به میکروتیوب جدید منتقل شد. بعد از اضافه کردن نسبت یک به یک ایزوپروپرانول سرد و سانتریفیوژ به مدت ۳۰' با سرعت ۱۲۰۰۰rpm مایع رویی تخلیه گردید و رسوب RNA با اتانول ۷۵٪ از طریق سانتریفیوژ به مدت ۱' با سرعت ۷۵۰۰rpm شست و شو داده شد. 35µl DEPC Water به محتویات درون میکروتیوب جهت حل کردن RNA اضافه گردید. آنزیم DNase جهت حذف آلودگی DNA استفاده شد. به منظور غیر فعال کردن DNase نمونه ها در بنماری با دمای ۷۵C° و زمان ۵'-۱۰ انکوبه شدند. خلوص RNA استخراج شده توسط دستگاه نانو دراپ با اندازه گیری میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ OD محاسبه گردید.

سنتز cDNA : پس از استخراج RNA ، با توجه به غلظت RNA استخراج شده سنتز cDNA با استفاده از کیت SinaClon انجام گردید. جهت سنتز cDNA ابتدا ۲µg - 500ng نمونه RNA به همراه ۱µl پرایمر Random Hexamerو ۱µl میکس dNTP داخل میکروتیوب استریل ریخته و سپس با استفاده از DEPC-water به حجم ۱۰µl

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

رسانده شده و به مدت '۵ در دمای °۷۰C و سپس به مدت '۲ روی یخ انکوبه کرده در ادامه ۴µl بافر X۵ به همراه ۱µl RNase inhibitor و سپس با استفاده از DEPC-water به حجم ۱۰µl رسانده شد. مخلوط فوق به مدت '۱ در دمای °۴۲C قرار گرفت.سپس ۱µl Reverse Transcriptase به نمونه ها اضافه شده و به مدت '۶۰ در دمای °۴۲C و در آخر به مدت '۱۵ در دمای °۷۰C (برای غیر فعال کردن انزیم) انکوبه گردید. میزان غلظت cDNA توسط دستگاه نانو دراپ با اندازه گیری میزان جذب نوری در طول موج OD 260/280 محاسبه گردید.

طراحی و انتخاب پرایمرها: توالی ژن های *thrB* و *thrC*، به عنوان ژن های هدف و توالی ژن *oprF* به عنوان ژن کنترل داخلی از سایت NCBI دریافت شد. سپس توسط نرم افزار Primer3 پرایمرهای اختصاصی طراحی شدند و توسط سایت Primer BLAST دقت و اختصاصیت پرایمرها مورد بررسی قرار گرفت(جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات و توالی پرایمرهای مورد استفاده

Gene	Primer Sequence
thrB-F	ATGGCAATTGAACTGAACGTCG
thrB-R	GGGAGCCATCAAGAGGGA
thrC-F	CGACTATGTACTGCTTAACTGC
ThrC-R	AGGTCAACACCCCAATCATC
oprF-F	CTTCGACAAGTCCAAGGTCA
oprF-R	AAGTGGACGGGTACTGCTTC

Real-time PCR : میزان بیان ژن های *thrB* و *thrC* تولید شده در محیط های کشت مختلف با روش Real-time PCR تعیین گردید. جهت انجام واکنش ابتدا 1µl cDNA به همراه ۰.۵µl پرایمر forward و ۰.۵µl پرایمر reverse و ۶.۵µl مستر میکس حاوی سایبر گرین داخل میکروتیوب استریل ریخته و سپس با استفاده از DEPC-water به حجم ۱۳µlرسانده شد سپس واکنش Real-time PCR در ۴۰ سیکل با استفاده از برنامه زیر، انجام شد:

°۹۵C به مدت '۲ ، °۹۵C به مدت "۵ و °۵۵C الی ۵۷ به مدت "۳۰ انجام شد.

آنالیز آماری: تحلیل و آنالیز آماری داده های واکنش Real-time PCRبا استفاده از نرم افزار GenEx انجام گرفت. رسم نمودارها توسط نرم افزار office Microsoft (Excel)انجام شد.

نتایج:

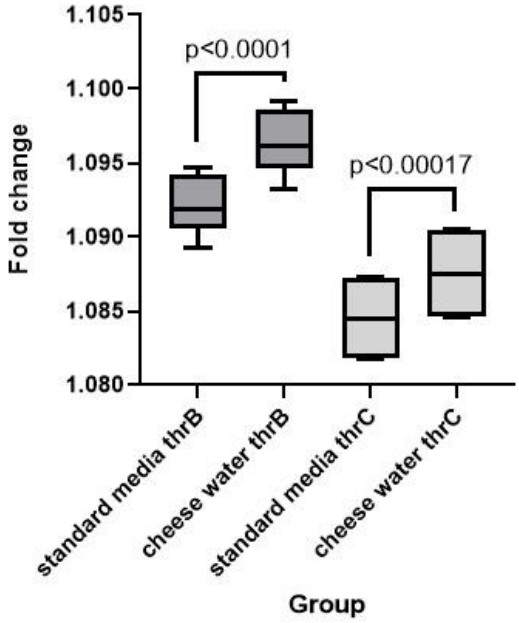
نتایج HPLC: بر اساس نتایج بدست آمده از کروماتوگرافی میانگین تولید آزمایشگاهی ال- ترئونین در محیط کشت حاوی ملاس ۱۳۴۴۰mg/L، در محیط کشت حاوی باگاس ۱۱۱۱۸/۷ mg/L، در محیط کشت حاوی شربت ذرت ۶۸۴۳/۲ mg/L و در محیط کشت حاوی آب پنیر ۳۳۲۷۱/۵۳mg/L می باشد که در این میان آب پنیر با بیشترین غلظت بازده بهتر و بیان بیشتری نسبت به بقیه منابع دارد(جدول ۲). کروماتوگرافی جهت شناسایی اسیدآمینه ترئونین به صورت تک استاندارد انجام شده است.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

جدول۲: نتایج کروماتوگرافی تولید ترئونین در نمونه های ملاس، باگاس، شربت ذرت و آب پنیر

ردیف	شرح آزمون	نتیجه آزمون	واحد اندازه گیری
۱	محیط کشت حاوی ملاس	۱۳۴۴۰	mg/L
۲	محیط کشت حاوی باگاس	۱۱۱۱۸/۷	mg/L
۳	محیط کشت حاوی شربت ذرت	۶۸۴۳/۲	mg/L
۴	محیط کشت حاوی آب پنیر	۳۳۲۷۱/۵۳	mg/L

واکنش Real-time PCR: میزان بیان ژن های *thrB* و *thrC* با واکنش Real-time PCR در محیط کشت حاوی آب پنیر که بالاترین میزان تولید ترئونین را طبق نتایج کروماتوگرافی از خود نشان داد، مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل مشخص شد که نسبت های Fold change ژن های *thrB* و *thrC* در محیط کشت آب پنیر به طور قابل توجهی بیشتر از محیط کشت استاندارد ISP-2 بود. این نشان می دهد که بیان این ژن ها در محیط کشت آب پنیر افزایش یافته است. بر اساس آنالیز داده های آماری، داده های حاصل مشخص کرد چون مقدار P-value کمتر از مقدار آستانه معین یعنی ۰/۰۰۱ است تفاوت مشاهده شده در بیان ژن به عنوان معنادار تلقی می شود و احتمالا بیولوژیکی است (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار بررسی میزان تغییر نسبی ژن های *thrB* و *thrC* در سطح بیان ژن در نمونه استاندارد و آب پنیر

بحث:

اسید آمینه ترئونین یکی از اسیدهای آمینه اصلی است که در پروتئین ها و دیگر ترکیبات بیولوژیکی یافت می شود واحد شیمیایی آن C4H9NO3 است. اثرات فیزیولوژیکی روی بدن دارد. بعد از اسید گلوتامیک، متیونین و لیزین، ترئونین یکی از مهم ترین اسیدهای آمینه است که تقریباً به طور انحصاری در صنعت خوراک استفاده می شود. در دسترس بودن گسترده آن در سرتاسر جهان باعث می شود که خرید و استفاده از آن به راحتی در دسترس مردم باشد. تولید

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

بیولوژیکی ترئونین یک فرایند چند فازی، چند متغیره و غیر خطی است که می تواند تحت تاثیر متغییرهایی نظیر نوع میزبان، دمای تخمیر، pH، میزان هوادهی، نوع منبع گلوکز محیط و فاکتورهای مهم دیگر مثل غلظت سوبسترا و غلظت محصول باشد. این متغیرها می توانند با تغییر در میزان بیان ژن های مرتبط، باعث تغییرات در سطح ترئونین شود(۱۴). در این تحقیق، ما تأثیر منابع مختلف گلوکز را بر میزان تولید ترئونین در سلول های *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ATCC13032 مورد مطالعه قرار دادیم.

در سال های اخیر، مطالعات زیادی پیرامون مدلسازی، بهینه سازی و شبیه سازی فرآیند تخمیر صورت گرفته است .در سال ۱۹۹۷، بونا و موس، مدلسازی تولید گلوتامیک اسید توسط *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ATCC13869 را تحت شرایط مختلف مطرح کردند. آن ها توانستند مدل رشد را برای مدل های لجستیک و سینتیک بررسی کنند. انتخاب شرایط بهینه برای تخمیر ترئونین، تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی است .در همین راستا، مطالعات متعددی انجام گرفته است و از طراحی آزمایش برای انتخاب و بهینه سازی فاکتورهای مؤثراستفاده شده است .در مطالعاتی که در زمینه بهینه سازی تخمیر انجام گرفته است، فاکتورهایی مثل pH ، دما، منبع کربن و نیتروژن ، غلظت بیوتین، شدت هوادهی، میزان تلقیح اولیه باکتری و... مؤثر بوده اند. در این مطالعه تاثیر دو فاکتور دور همزن و میزان تلیح باکتری به محیط کشت در تولید بیشتر ترئونین مورد مطالعه قرار گرفته است(۱۵). برای اولین بار در ایران در سالهای ۲۰۱۰ و ۲۰۱۲ ، مطالعاتی مبنی بر بهینه سازی تولید گلوتامیک اسید توسط *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* 690CECT از سوبسترای ضایعات خرما به روش فاکتوریل جزئی و سطح پاسخ، انجام گرفت .نتایج بهینه سازی این دو بررسی، ضایعات خرما را به عنوان منبع کربنی مناسب برای تخمیر گلوتامیک اسید معرفی کرد، همچنین اثر غلظت بیوتین، غلظت اوره، شدت هوادهی و... بر تخمیر گلوتامیک اسید تأیید شد که با بررسی برخی فاکتورهای اعمال شده در این مطالعه نشان میدهد که شرایط رشد و بهینه سازی تولید آن با نتایج این مطالعه مطابقت دارد(۱۶, ۱۷). یافته های حاصل از بررسی صورت گرفته در سال ۲۰۱۳ ، با استفاده از سویه و روش بهینه سازی مشابه با این پژوهش، بیانگر آن است که دمای ۳۰C° ، چرخش ۱۸۰rpm و غلظت گلوکز ۱۰۰g/L عنوان بهترین شرایط تولید گلوتامیک اسید هستند(۱۸).

با توجه به اینکه مهم ترین و اولین قدم در تولید محصولات زیستی، انتخاب سویه مناسب میکروبی می باشد.*کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* که یک باکتری گرم مثبت غیر بیماری زا در جنس *کورینه باکتریوم* ها است که به دلیل ویژگی های متعدد و مناسب آن به طور گسترده برای تولید صنعتی اسیدهای آمینه استفاده شده است و به عنوان یک سویه میکروبی مناسب برای تولید آزمایشگاهی ترئونین به دلیل هزینه کمتر و بازده بالاتر نسبت به روش های دیگرمورد استفاده قرار می گیرد(۱۹).

تنظیم بیان ژن در *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* یک مسئله مهم است زیرا این باکتری گرم مثبت یک تولید کننده اسید آمینه صنعتی قابل توجه است. همچنین ژن ها نقش بسیار مهمی در فرآیند تولید اسیدهای آمینه دارند و تاثیر زیادی بر کیفیت و کمیت تولید آنها دارند به همین دلیل با تاثیر مستقیم در مسیرهای بیوشیمیایی منجر به تولید اسیدهای آمینه می شوند. بنابراین چون ژن ها نقش اساسی در روند تولید اسیدهای آمینه ایفا می کنند بررسی بیان آنها در از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

در این مطالعه اثر افزودن چندین منبع گلوکز شامل آب پنیر، ملاس، باگاس و شربت ذرت روی تولید ترئونین با روش کروماتوگرافی مورد ارزیابی قرار گرفت و براساس نتایج بالاترین میزان تولید ترئونین در محیط کشت آب پنیر مشاهده گردید. بررسی میزان بیان ژن های *thrB* و *thrC* با روش Real-Time PCR در محیط کشت آب پنیر، نشان دهنده بیان قابل توجه این ژن ها در مقایسه با محیط کشت استاندارد Isp-2 بود. در این مطالعه میانگین تولید ترئونین در محیط کشت حاوی ملاس ۱۳۴۴۰mg/L، در محیط کشت حاوی باگاس ۱۱۱۱۸/۷ mg/L، در محیط کشت حاوی شربت ذرت

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

mg/L ۶۸۴۳/۲ و در محیط کشت حاوی آب پنیر mg/L ۳۳۲۷۱/۵۳ بود که براساس نتایج کروماتوگرافی تعیین گردید تایید کننده بالاترین میزان تولید در آب پنیر بود. انتخاب منابع گلوکز در این مطالعه بر اساس مطالعات قبلی انجام شده بود. طبق مطالعات انجام شده باگاس و ملاس به طور خاص در تولید اسید آمینه هایی مانند لیزین و گلوتامات با استفاده از *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* مؤثر هستند(۲۰) همچنین شربت ذرت و آب پنیر نیز در فرآیند های تخمیری مورد استفاده قرار میگیرد(۲۱).

چرخه ی تولید ترئونین یک چرخه ی پیچیده می باشد که چندین ژن در مراحل مختلف می تواند در تولید ترئونین نقش داشته باشد مانند ژن های *thrA, thrB, thrC, asd, lysC* . ژن های *thrB* و *thrC* جز ژن های کلیدی در تولید ترئونین است که براساس مطالعات، تغییر در بیان این ژن ها رابطه ی مستقیم با میزان تولید ترئونین دارد. معمولا ژن *thrB* در مقایسه با ژن *thrC* بیان بیشتری دارد زیرا به عنوان نقطه کنترلی اولیه در مسیر بیوسنتز ترئونین عمل میکند و به طور مستقیم در تنظیم کلی فرآیند بیوسنتز آمینواسیدها نقش دارد(۲۲-۲۴).

ژن *thrB* یکی از اصلی ترین ژن هایی است که نقش مهمی در مسیر بیوسنتز ترئونین در برخی از باکتری ها و سایر میکروارگانیسم ها دارد و در کد کردن یکی از آنزیم های مهم در مسیر تولید ترئونین که در مرحله پایانی سنتز ترئونین نقش دارد. عملکرد ژن *thrB* ارتباط مستقیم با فعالیت آنزیم هموسرین کیناز دارد. این آنزیم در مرحله اولیه تولید ترئونین نقش دارد که به همراه ATP و هموسرین وارد یک واکنش فسفریلاسیون می شود که نتیجه آن تولید هموسرین فسفات است سپس این فراورده در مراحل بعدی بیوسنتز ترئونین استفاده میشود تا ترئونین نهایی تولید شود (۲۵). ژن *thrC* در باکتری ها نظیر *E.coli* و *C.glutamicum* کدگذاری برای آنزیم هوموسرین کیناز را انجام میدهد. این آنزیم نقش اساسی در مسیر بیوسنتز ترئونین و متیونین ایفا میکند. هوموسرین کیناز، هوموسرین را به هوموسرین فسفات تبدیل میکند که یک مرحله کلیدی در تولید ترئونین است(۲۶).

نتایج این مطالعه نشان دهنده اثر قابل توجه محیط کشت حاوی آب پنیر به عنوان یک منبع غنی از گلوکز که یک منبع طبیعی، ارزان و مقرون بصرفه جهت تولید ترئونین دارد.نتایج نشان دهنده یک رابطه مستقیم بین تولید ترئونین و میزان بیان ژن های *thrB* و *thrC* را نشان می دهد.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

منابع

.1 Kidd M, Zumwalt C, Chamblee D, Carden M, Burnham D. Broiler growth and carcass responses to diets containing L-threonine versus diets containing threonine from intact protein sources. Journal of applied poultry research. 2002;11(1):83-9.

.2 Taillon BE ,Little R, Lawther RP. Analysis of the functional domains of biosynthetic threonine deaminase by comparison of the amino acid sequences of three wild-type alleles to the amino acid sequence of biodegradative threonine deaminase. Gene. 1988;63(2):245-52.

.3 Parsons C. Digestibility of amino acids in feed stuffs and digestible amino acid requirements for poultry. Biokyowa technical report. St. Louis, MD. Biokyowa, Inc; 1990.

.4 Decedue C, Hofler J, Burns R. Threonine deaminase from Salmonella typhimurium. Relationship between regulatory sites. Journal of Biological Chemistry. 1975;250(4):1563-70.

.5 Komatsubara S, Kisumi M, Murata K, Chibata I. Threonine production by regulatory mutants of Serratia marcescens. Applied and Environmental Microbiology. 1978;35.40-834:(5)

.6 Furukawa S, Ozaki A, Nakanishi T. L-threonine production by L-aspartate-and L-homoserine-resistant mutant of Escherichia coli. Applied microbiology and biotechnology. 1988;29:550-3.

.7 Duan M, Chen S, Liu X, Liu J, Zhu D. The Application of Corynebacterium glutamicum in l-Threonine Biosynthesis. Fermentation. 2023;9(9):822.

.8 Morinaga Y, Takagi H, Ishida M, Miwa K, Sato T, Nakamori S, Sano K. Threonine production by co-existence of cloned genes coding homoserine dehydrogenase and homoserine kinase in Brevibacterium lactofermentum. Agricultural and biological chemistry. 1987;51(1):93-100.

.9 Shiio I, MIYAJIMA R. Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in Brevibacterium flavum. The Journal of Biochemistry. 1.59-849:(6)65;969

.10 Dong X, Zhao Y, Zhao J, Wang X. Characterization of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from Corynebacterium glutamicum IWJ001 and systematic investigation of L-isoleucine biosynthesis. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2016;43(6):873-85.

.11 Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. Wiley interdisciplinary reviews: Computational statistics. 2010;2(2):128-49.

.12 Giovanni M. Response surface methodology and product optimization. Food technology (Chicago). 1983;37(11):41-83.

.13 Skoog DA, Holler F, Crouch S. Principles of Instrumental Analysis, ; Brooks. Cole Publishing: Belmont, CA, USA; 2006.

.14 Georgiev T, Ratkov A. Mathematical modelling of fed-batch fermentation processes for amino acid production. Mathematics and computers in simulation. 1997;44(3):271-85.

.15 Niaz B, Nadeem S, Muzammil HM, Khan JA, Zahoor T. Optimization of Fermentation Conditions for Enhanced Glutamic Acid Production by a Strain of Corynebacterium glutamicum NIAB BNS-14. Pakistan Journal of Zoology. 2009;41.(4)

.16 Davati N, Hamidi EZ, Shojaosadati S. Optimization of medium composition for microbial production of glutamic acid from Date fruit wastes using fractional factorial method. 2010.

.17 Tavakkoli M, Hamidi-Esfahani Z, Azizi MH. Optimization of Corynebacterium glutamicum glutamic acid production by response surface methodology. Food and bioprocess technology. 2012;5:92-9.

.18 Niaz B, Rajoka M, Al-Ghanim K, Yousaf S, Mahboob S, Nadeem S. Optimizing the concentration of biotin for L-glutamic acid production by a locally isolated coryneform strain. 2017.

.19 Additives EPo, Feed PoSuiA, Bampidis V, Azimonti G, Bastos MdL, Christensen H, et al. Safety and efficacy of l-threonine produced by fermentation with Corynebacterium glutamicum KCCM 80117 for all animal species. EFSA Journal. 2019;17(2):e05602.

.20 Anusree M. Utilisation of agro residual biomass for L-Lysine production by Corynebacterium glutamicum: Biotechnology Division, National Institute for Interdisciplinary Science and …; 2016.

.21 Mohammadzade Ferizhandi Z, Labbeiki G. The Effect of Using Native Carbon Sources (Whey, Oat bran, Rice Flour) in the Fermentative Production of Lysine by Corynebacterium glutamicum. Journal of Food Microbiology. 2019;6(1):67.78-

.22 Miyajima R, SHIIO I. Regulation of Aspartate Family Amino Acid Biosynthesis in Brevibacterium flavum III. Properites of Homoserine Dehydrogenase. The Journal of Biochemistry. 1970;68(3):311-9.

.23 Theze J, Saint-Girons I. Threonine locus of Escherichia coli K-12: genetic structure and evidence for an operon. Journal of Bacteriology. 1974;118(3):990-8.

.24 Follettie M, Shin H, Sinskey A. Organization and regulation of the Corynebacterium glutamicum hom-thrB and thrC loci. Molecular microbiology. 1.62-53:(1)2;988

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

.25 Petit C, Kim Y, Lee S-K, Brown J, Larsen E, Ronning DR, et al. Reduction of feedback inhibition in homoserine kinase (ThrB) of Corynebacterium glutamicum enhances l-threonine biosynthesis. ACS omega. 2018;3(1):1178-86.
.26 Wang J, Ma W ,Fang Y, Yang J, Zhan J, Chen S, Wang X. Increasing L-threonine production in Escherichia coli by overexpressing the gene cluster phaCAB. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2019;46(11):1557-68.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

Investigating the expression of *thrB* and *thrC* genes of *Corynebacterium glutamicum ATCC13032* in the laboratory production of threonine

Nadiya Abbasi Yusef Abad[1], Nastaran Daryai Ghazani[1], **Leila Rehbarnia**[*2], **Alireza Dehnad**[†3]

[1] Rabe Rashid Institute of Higher Education, Tabriz, Iran.

[2]Infectious and Tropical Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Iran.

[3] Department of Livestock Bacterial Diseases Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Abstract

The amino acid threonine is one of the essential amino acids for livestock and poultry, therefore its use as a food supplement is of particular importance in nutrition. Today, one of the common methods of threonine production is the use of microorganisms, especially *Corynebacterium glutamicum*. Fast production, easy cultivation and low production cost are the advantages of using this bacterium to produce threonine amino acid. In this study, *C.glutamicum* (ATCC13032) was cultured in the standard culture medium called ISP-2, and then to optimize the ISP-2 culture medium, the effect of additives such as cheese water, bagasse, molasses, and corn syrup on threonine production tested Threonine production rate was evaluated using chromatography method. After reviewing the results, the best physical and chemical conditions for threonine production were selected and the expression levels of key genes involved in threonine production, including *thrB* and *thrC*, were analyzed by Real-time PCR technique. The results obtained from chromatography showed that the concentration of 0.4 grams per liter of cheese water provides the best conditions for the production of threonine. So that the concentration of threonine produced increased by 33271.53 mg/L in the cheese water sample. Based on Real-time PCR results, cheese water culture medium increased *thrB* gene expression by 2 times and *thrC* expression by 1.08 times. Based on the obtained results, physicochemical changes in the culture medium can have a significant effect on threonine production by *C.glutamicum* bacteria.

Keywords: threonine, *Corynebacterium glutamicum*, *thrB* and t*hrC* gene expression.

[*] le.rahbarnia@gmail.com
[†] a.dehnad@rvsri.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]