



Expression of the Benzoylformate Decarboxylase Enzyme Gene in *Escherichia coli*

Khayeri Dastgerdi M^a, Deldar AA^b, Dehghan MJ^{c*}, pormahdi N^d

^a Faculty of Passive Defense, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

^b Faculty of Passive Defense, Malek Ashtar University of Technology, aad.phd.gene@gmail.com, Tehran, Iran

^{c*} Faculty of Passive Defense, Malek Ashtar University of Technology, mohammad_dehghan@mut.ac.ir, Tehran, Iran

^d Faculty of Passive Defense, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Molood Khayeri Dastgerdi, Aliasghar Deldar, mohammadjavad Dehghan, nafise pormahdi. Expression of the Benzoylformate Decarboxylase Enzyme Gene in *Escherichia coli*. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(2):113-131.

<https://10.61186/JCT.16.2.113>

KEYWORDS

Include at least 3 and at most 5 keywords or phrases in separate lines.

Butanetriol (BT)

benzyl formate decarboxylase enzyme
mdlC gene

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: The construction of synthetic pathways within the framework of metabolic engineering is considered a modern approach in biotechnology, enabling the production of valuable compounds from natural biological resources. This strategy focuses on utilizing abundant biomaterials—particularly carbohydrates—for the industrial production of chemical compounds by modifying metabolic pathways in microorganisms. These processes can convert biomass derived from biological sources into fuels, chemicals, and polymers, thereby opening new opportunities for the sustainable production of chemical substances from renewable resources.

Aim: This study specifically focuses on the enzymatic production of benzoylformate decarboxylase (BFD) with the overarching goal of completing the enzymatic pathway for the biosynthesis of BT. This intricate pathway initiates with xylose as the primary carbon source and proceeds through a cascade of four distinct enzymatic reactions. Notably, *Escherichia coli* (*E. coli*), possessing two endogenous enzymes integral to this pathway, holds the potential for complete BT biosynthesis upon the introduction of the remaining two requisite genes. This research thus seeks to engineer *E. coli* as a robust biocatalyst for sustainable BT production. The strategic implementation of a fully functional enzymatic pathway within a well-characterized microbial host, such as *E. coli*, promises a more environmentally benign and potentially more efficient route to BT synthesis compared to traditional chemical methods.

* Corresponding author. Tel.:08632629002; Fax: 0863262900

E-mail address: mohammad_dehghan@mut.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61186/JCT.16.2.113>

Received: 12 Feb. 2024; Received in revised form: 18 Jun.. 2024; Accepted: 7 Jul. 2024

Original Article

© Author



Furthermore, the ability to manipulate and optimize the expression of these key enzymatic components within *E. coli* offers opportunities to enhance the overall yield and productivity of the bioproduction process. The successful establishment of such a system could pave the way for large-scale, cost-effective, and sustainable production of this valuable chemical intermediate.

Materials and Methods: To construct an *E. coli* strain capable of expressing the benzoylformate decarboxylase enzyme, the *mdlC* gene originating from *Pseudomonas putida* was amplified and subsequently cloned into both pBAD and pET28 expression vectors. Following the confirmation of successful cloning through rigorous confirmatory assays, protein expression was evaluated using Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), and the enzymatic activity was assessed.

Results: Benzoylformate decarboxylase (BFD) is a pivotal enzyme within the engineered metabolic pathway for producing 1,2,4-butanetriol (BT) in *E. coli*. In this study, the *mdlC* gene, encoding BFD from *Pseudomonas putida*, was successfully amplified and cloned into the versatile pBAD and the robust pET28 expression vectors. The pET28 system was preferred due to its ease of use and established track record in protein production, while the pBAD vector was strategically employed for its inducible expression capabilities, allowing for controlled protein synthesis. The expression of the 56 kDa target protein was confirmed through SDS-PAGE analysis, and the enzymatic function in the production of BT was subsequently verified using the sensitive and accurate HPLC method. This work lays a crucial foundation for the further optimization and development of a fully functional and efficient microbial cell factory for the sustainable production of this valuable chemical.

Conclusion: The successful transfer of the expression construct into an appropriate *E. coli* host strain was confirmed by the presence of a distinct protein band at approximately 56 kDa on the SDS-PAGE gel, unequivocally verifying the expression of the *mdlC* gene. To evaluate the functional capacity of the expressed enzyme, the recombinant vector pBAD.*mdlC* was transformed into the *E. coli* TOP10 strain. The subsequent production of BT in the culture medium was meticulously analyzed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).



بیان ژن آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز در باکتری *E. coli*

مولود خیری دستگردی^۱، علی اصغر دلدار^۲، محمدجواد دهقان عصمت آبادی^{۳*}، نفیسه پورمهدی^۴

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، مجتمع پدافند غیرعامل، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، ایران

^۲ استادیار، مجتمع پدافند غیرعامل، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، ایران (aad.phd.gene@gmail.com)

^{۳*} استادیار، مجتمع پدافند غیرعامل، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، ایران (mohammad_dehghan@mut.ac.ir)

^۴ دانشجوی دکتری، مجتمع پدافند غیرعامل، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: ۱،۲،۴- بوتان تریپول (BT)، یک ماده شیمیایی غیرطبیعی با کاربردهای دارویی و نظامی، از ویژگی‌های این ماده است. تولید زیستی BT هدف این تحقیق است، زیرا روش شیمیایی به دلیل محدودیت‌های کاتالیزوری و بازده پایین، اقتصادی نیست. تولید آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز با هدف تکمیل مسیر آنزیمی سنتز زیستی BT می‌باشد که از زیلاوز طی چهار واکنش آنزیمی انجام می‌شود و <i>E. coli</i> با دارا بودن دو آنزیم از این مسیر، با افزودن دو ژن دیگر، قادر به تکمیل آن خواهد بود. مواد و روش‌ها: به منظور ساخت سویه <i>E. coli</i> بیان‌کننده آنزیم بنزویل فرمات دکربوکسیلاز، ژن mdlc از <i>P. putida</i> تکثیر و در وکتورهای pBAD و pET28 کلون شد. پس از تایید کلونینگ با آزمایش‌های تاییدی، بیان پروتئین با ژل SDS-PAGE و عملکرد آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: پس از انتقال سازواره بیانی به سویه مناسب، حضور باند پروتئینی ۵۶ کیلودالتونی در ژل SDS-PAGE، بیان ژن mdlc را تایید کرد. برای ارزیابی عملکرد آنزیم، وکتور نو ترکیب pBAD.mdlc به سویه TOP10 ترنسفرم و تولید BT در محیط کشت با روش HPLC آنالیز شد. نتیجه‌گیری: بنزویل فرمات دکربوکسیلاز (BFD)، آنزیمی کلیدی در مسیر تولید بوتان تریپول (BT) در <i>E. coli</i> است. در این مطالعه، ژن mdlc کدکننده BFD از <i>P. putida</i> تکثیر و در وکتورهای pBAD و pET28 کلون شد. سیستم بیانی pET28 به دلیل سهولت استفاده انتخاب شد و وکتور pBAD نیز به دلیل قابلیت القا مورد استفاده قرار گرفت. بیان پروتئین ۵۶ کیلودالتونی با SDS-PAGE تایید و عملکرد آنزیم در تولید BT با HPLC بررسی شد.</p>	<p>بوتان تریپول (BT) آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز ژن mdlc <i>E. coli</i></p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۷</p>

۱- مقدمه

ساخت سازواره بیانی یکی از روش‌های جدید عصر حاضر برای تولید مواد مورد نیاز انسان از طبیعت می‌باشد که با علم مهندسی متابولیسم طراحی و انجام می‌شود. یکی از اهداف مهندسی متابولیسم تولید مواد در حجم بالا برای مصارف صنعتی از مواد فراوان موجود در طبیعت است که با اطلاعات به دست آمده از طبیعت، پیشرفت علم زیست‌شناسی، شناسایی واکنش‌ها و مسیرهای سوخت و ساز مربوط به ارگانیسم‌ها و موجودات مختلف و آشنایی با مواد تشکیل دهنده و مواد حاصل از سوخت و ساز آن‌ها تحقیقات علمی به سمت تولید مواد شیمیایی از مولکول‌های زیستی متمایل گشت (۱، ۲). از میان مولکول‌های زیستی فراوان و در دسترس طبیعت می‌توان به کربوهیدرات‌ها اشاره کرد که بسیاری از محققان از این مولکول‌ها به عنوان سوپسترا برای

تولید انواع مواد شیمیایی از روش تخمیر میکروبی استفاده می‌کردند. تخمیر میکروبی موجب تبدیل بیومس‌های مشتق شده از قندهای پنج و شش کربنه به سوخت، مواد شیمیایی و پلیمرها می‌شود (۳، ۴). ۱ و ۲ و ۴ بوتان تریول (*BT*) یک پلی الکل ۴ کربنه غیر طبیعی با ارزش بالاست و کاربرد گسترده‌ای در صنایع نظامی و داروسازی دارد. در زمینه‌ی نظامی بوتان تریول (*BT*) برای سنتز ۱ و ۲ و ۴ بوتان تریول تری نترات استفاده می‌شود که جایگزین ایمن برای نیترو گلیسرین که در روش سنتی به‌عنوان ماده منفجره استفاده می‌شد، می‌باشد. *BT* به‌عنوان پیش‌ساز برای بعضی ترکیبات دارویی ضد سرطان از جمله سرطان روده بزرگ، سرطان سینه و سرطان ریه و ضد ویروسی از جمله ویروس‌های آنفلوآنزا، ویروس هرپس سیمپلکس و ویروس نقص ایمنی انسانی (*HIV*) قابل استفاده است. هدف از انجام تحقیق تولید آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز برای تکمیل مسیر آنزیمی تولید *BT* به‌روش زیستی می‌باشد که این روش ایمن و مقرون به‌صرفه هست. در مسیرهای سنتز مواد شیمیایی به شیوه‌ی سنتی مشکلات بسیاری مثل احتمال آلودگی و شرایط سخت خالص سازی وجود دارد. بنابراین بیوسنتز *BT* از منابع تجدید پذیر توجه زیادی به‌خود جلب کرده است. تولید زیستی *BT* چهار مرحله واکنش آنزیمی دارد و در صورت استفاده از زایلوز به‌عنوان سوبسترا، بازده بالاتر و پتانسیل بهتری برای تحقق کاربردهای تجاری درآینده را می‌توان انتظار داشت. تولید زیستی بوتان تریول نیازمند ساخت یک مسیر متابولیکی متشکل از چند آنزیم می‌باشد. با در نظر گرفتن باکتری *E. coli* به‌عنوان سویه هدف و توده‌های زیستی حاوی زایلوز به‌عنوان سوبسترا و ماده اولیه حضور آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز در انتهای این مسیر لازم و ضروری می‌باشد. تولید زیستی این ماده از اهداف پروژه‌ای است که از طریق دست کاری ژنتیک و مهندسی متابولیک در میزبان مناسب صورت می‌گیرد. سومین آنزیم در مسیر تولید *BT* آنزیم *mdlC* یا بنزیل فورمات دکربوکسیلاز می‌باشد که در پژوهش حاضر با تکثیر ژن کد کننده این آنزیم و با وارد کردن آن در وکتور بیانی وانتقال آن در سویه‌ی مناسبی از *E. coli* بخشی از مسیر تولید بوتان تریول ایجاد می‌شود. این آنزیم سومین مرحله از تولید *BT* یعنی دکربوکسیله کردن دئوکسی گلیسرول پنتولوسونیک اسید را انجام می‌دهد و با این دکربوکسیله شدن ۳-۴- د هیدروکسی بوتانول ساخته می‌شود (۵، ۶ و ۷).

واکنش‌های دکربوکسیلازها

دکربوکسیلازها آنزیم‌های مهمی هستند که در شرایط ملایم می‌توانند فرآیند حذف دی‌اکسید کربن را از مولکول‌های آلی کاتالیز کنند. این آنزیم‌ها در تثبیت دی‌اکسید کربن نیز عملکرد مطلوبی دارند، اما به‌کارگیری آن‌ها در مقیاس بزرگ هنوز چالش‌برانگیز است. با این حال، واکنش‌های دکربوکسیلاسیون آنزیمی به‌طور فزاینده‌ای در تولید مواد شیمیایی از منابع تجدیدپذیر و در تولید واسطه‌های دارویی استفاده می‌شوند. همچنین، توانایی آن‌ها برای کاتالیز واکنش‌های معکوس همچون تثبیت دی‌اکسید کربن، به‌وجود آورده است. از آن‌جا که دکربوکسیلاسیون یکی از رایج ترین فرایندها در متابولیسم طبیعی است انواع مکانیسم‌های مختلف کاتالیزوری برای تسهیل شکافتن پیوند C-C و آزادسازی CO₂ تکامل یافته است (۸، ۹ و ۱۰).

با وجود تنوع ساختاری و مکانیکی، همه دکربوکسیلازها با چالش‌های مشابه روبرو هستند به‌طوری‌که پیوند C-C از گروه کربوکسیلیک باید بی ثبات شود و جفت الکترون حاصل شده از این بی‌ثباتی باید در طول کاتالیز قرار گیرد. این می‌تواند یا با عملکرد کوفاکتور به‌عنوان یک گروه پروستتیک یا بدون آن حاصل شود. دستگاه کاتالیزوری و استفاده از کوفاکتورهای خارجی تاثیر زیادی روی دامنه‌ی سوبسترای دکربوکسیلازها دارد. برخی از آنزیم‌ها طیف گسترده‌ای از سوبستراهای مختلف و اغلب غیرفعال را می‌پذیرند. برخی دیگر، به‌ویژه آنزیم‌های فاقد کوفاکتور، فقط مختص تعداد کمی از سوبستراها که اغلب فعال شده هستند، می‌باشد (۹). در جدول ۱، دسته بندی دکربوکسیلازها بر اساس نیاز به کوفاکتور نشان داده شده است (۱۱ و ۱۲).

جدول ۱: دسته بندی دکربوکسیلازها براساس وابستگی به کوفاکتور

اورنیتین ۵-مونوفسفات دکربوکسیلاز (OMD)	دکربوکسیلازهای غیر وابسته به کوفاکتور
فنولیک اسید دکربوکسیلاز	
آریل مالونات دکربوکسیلاز	دکربوکسیلازهای وابسته به پیروکسال فسفات (PLP)
لیزین دکربوکسیلاز تولید کادوارین، پلی آمین	
L-گلوتامات دکربوکسیلاز، تولید γ -آمینو بوتیریک اسید (GABA)	
پیرووات دکربوکسیلاز (PDC)	آلفا-کتو اسید دکربوکسیلاز همتی وابسته به تیامین پیرو
کتو اسید دکربوکسیلاز شاخه دار (KdcAs)	فسفات (ThPD)

بنزیل فورمات دکربوکسیلاز (BFD) در باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها یافت شده است. منشأ یکی از مهم‌ترین و پر مصرف‌ترین‌ها، باکتری سودوموناسپوتیدا است. BFD در متابولیسم *R*-mandelate شرکت می‌کند. به‌طور خلاصه BFD *R*-mandelate به بنزیل فورمات پردازش می‌شود که توسط BFD دکربوکسیله شده است. بنزآلدئید حاصل بیشتر به استیل CoA تغییر داده شده است و می‌تواند برای تولید انرژی در چرخه تری کربوکسیلیک اسید سلول مورد استفاده قرار گیرد. برای دکربوکسیلاسیون آنزیم اولویت زیادی به سوبسترای طبیعی یعنی بنزیل فورمات نشان می‌دهد در حالی که آلفا-کتو اسید آلیفاتیک با سرعت بسیار کمتری تبدیل می‌شوند (۴). همچنین‌ها نیز به‌طور وسیعی برای مهندسی آنزیم مورد BFD استفاده قرار گرفته‌اند.

BFD یک بیوکاتالیست پایدار است که مقادیر زیادی از آن در *P.putida* یا یک سویه *E.coli* نو ترکیب که حامل ژن BFD باشد به‌دست می‌آید. BFD فعال‌ترین آنزیم ۲-کتواسید دکربوکسیلاز وابسته به ThDP شناخته شده است که تا کنون کاتالیزور هر دو دکربوکسیلاسیون (واکنش اصلی) و کاربولیگاسیون (واکنش جانبی) را با واکنش‌های اختصاصی انجام می‌دهد (۱۰).

الکل ۴ کربنه‌ی ۱ و ۲ بوتان تریول (BT) ارزش بسیار بالایی در صنعت و دارو سازی دارد. تولید این محصول به‌روش زیستی نسبت به‌روش صنعتی بهینه‌تر است. تولید زیستی BT طی چهار مرحله واکنش آنزیمی دهیدروژناسیون، دکربوکسیلاسیون و الکل دهیدروژناسیون از سوبسترای زایلوز به‌دست می‌آید. سومین مرحله‌ی این واکنش نیاز به عمل دکربوکسیلاسیون دارد که با توجه به کارکرد و اهمیت بیوکاتالیست BFD از این آنزیم در این مرحله استفاده شده است (۵). این مطالعه به‌دلیل این‌که به‌روش تولید زیستی انجام شده دارای نوآوری می‌باشد و تا به‌حال در کشور انجام نشده است، تولید این ماده که به‌صورت طبیعی در طبیعت انجام نمی‌گیرد ولی در پژوهش انجام شده نشان داده شد که می‌توان با مهندسی مسیرهای زیستی به تولید این ماده دست یافت.

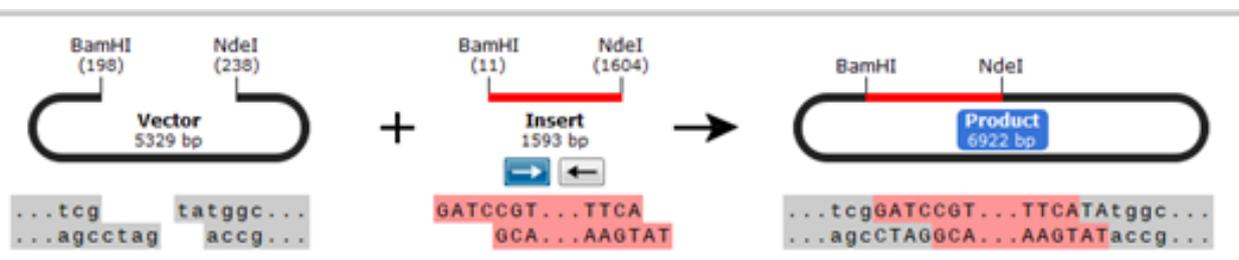
۲- مواد و روش‌ها

تکثیر قطعه ژنی *mdlC* با استفاده از نرم افزار Snap Gene 5.2 به آدرس <https://www.snapgene.com> و دانلود فایل توالی ژنومی باکتری *P.putida* از سایت NCBI به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> به شماره NBRC14164 و با توجه به آنزیم‌های موجود و جایگاه برش آنزیم‌ها در وکتورهای مورد نظر مثل pBAD پرایم‌هایی با جایگاه برش HindIII و PstI طراحی شد (جدول ۲). با توجه به وکتور pBAD و برادر نظر گرفتن همسو قرار گرفتن ژن با پروموتور *ara*، جایگاه برش PstI در پرایمر معکوس به‌عنوان یکی دیگر از مکان‌های اتصال ژن زایلوز دهیدروژناز به وکتور در نظر گرفته شد. این پرایمر دارای کدون پایان ATT می‌باشد. این پرایمر نیز از نظر ساختار و مشخصات توسط نرم افزار Oligo Analyser مورد بررسی قرار گرفت. برای تکثیر *mdlC* (ژن تولید کننده بنزیل فورمات دکربوکسیلاز) از ژنوم باکتری *P.putida* ابتدا باکتری در محیط LB کشت داده شد و در تراکم سلولی ۳ (۳OD600): مراحل استخراج ژنوم انجام شد. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و روش PCR تکثیر ژن باکتری *P.putida* طبق برنامه، ابتدا به‌صورت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه، ثانیه در ۷۲ درجه برای ۸ چرخه و بلافاصله ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه و ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه برای ۲۲ چرخه و در نهایت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه انجام گرفت. پس از انجام واکنش محصولات PCR روی ژل آگارز برده شد (۱۳).

جدول ۲: مشخصات پرایمرها

نام پرایمر	توالی	طول قطعه
put.mdlC.ps.RBS.NdeI.F	5'-CTATCTGCAGAGGAATTACATATGAAGAC TGTTACACGGCGCCACTTTACG-3'	۱۶۲۹
put.mdlC.HindIII.BamHI.R	5'-GTGTAAGCTTGGATCCGTTTCAGGGCTCGAT GGTCTG-3'	

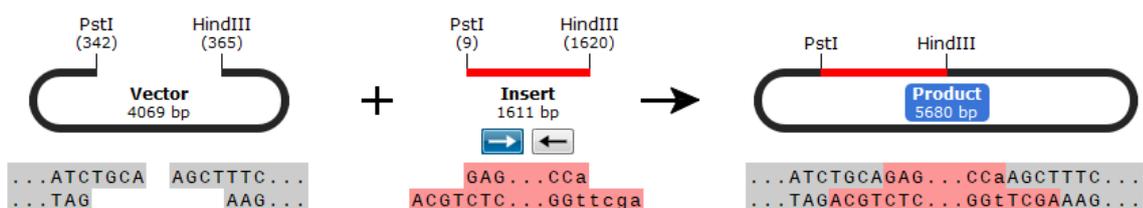
کلونینگ ژن *mdlC* در وکتور *pET28* پس انجام مراحل استخراج وکتور pET28 و تکثیر ژن، هر دو نمونه با آنزیم‌های NdeI و BamHI برش داده شدند. پس از آماده شدن قطعه و وکتور برش خورده مخلوط لایگیت آماده و در سویه DH5 ترانسفرم شد. کلونی‌های دارای وکتور pET28 قادر به رشد بر روی پلیت LB حاوی کانامایسین بوده که می‌تواند حاوی ژن مورد نظر در این تحقیق نیز باشند. با کمک پرایمرهای طراحی شده *mdlC* حضور و یا عدم حضور این ژن در کلونی‌هایی که بر روی پلیت پس از انجام مرحله ترانسفرم رشد کردند، با استفاده از ژل SDS-Page بررسی شد (۱۳) (شکل ۱).



برش خورده مخلوط لایگیت آماده شد و پس از استخراج وکتورهای نوترکیب حضور ژن با کمک آنزیم BglIII و HindIII در

شکل ۱: طراحی مسیر کلونینگ mdIC در وکتور a2ApET

سازه pBAD.mdIC مورد بررسی قرار گرفت که خروج ژن و مشاهده آن بر روی ژل آگارز موید ورود ژن در وکتور است. برای تایید ژن کلون شده و اطلاع از تغییرات ایجاد شده حین تکثیر وکتور pBAD.mdIC تعیین توالی شد و نتیجه آن با کمک نرم افزار Snap Gene با توالی mdIC سویه مقایسه شد (شکل ۲).



شکل ۲: طراحی مسیر کلونینگ mdIC در وکتور pBAD

القا و بیان آنزیم: برای بررسی بیان پروتئین هدف در وکتور pET28، پس از کشت ۱۰ ml از سویه نوترکیب BL21.mdIC، در تراکم سلولی ۰/۸، OD600 نمونه‌ها به دو حجم ۵ میلی‌لیتر تقسیم شدند. به یکی از نمونه‌های BL21 pET28.mdIC با IPTG با غلظت نهایی ۰/۲ mM القا و دیگری به‌عنوان شاهد بدون القا ماند. هر ۲ نمونه به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد شیک شدند. پس از گذشت ۳ ساعت از زمان القای میزان تراکم نمونه‌ها در OD600 خوانش و به‌میزان ۱ میلی‌لیتر از آن‌ها رسوب داد شد. همچنین پس از لیز و سونیکاسیون BL21 pET28.mdIC باند پروتئین در رسوب مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

برای بررسی بیان پروتئین هدف در وکتور pBAD، پس از کشت ۱۰ میلی‌لیتر از سویه‌های نوترکیب DH5 pBAD.mdIC در تراکم سلولی ۰/۸، OD600 نمونه‌ها به دو حجم ۵ میلی‌لیتر تقسیم شدند. به یکی از نمونه‌ها ۵۰ میکرولیتر آرابینوز ۲۰ درصد اضافه شد و دیگری به‌عنوان کنترل منفی، بدون القا باقی ماند. هر ۲ نمونه به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد شیک شدند. پس از گذشت ۳ ساعت از زمان القاس میزان تراکم نمونه‌ها در OD600 خوانش و به‌میزان ۱ میلی‌لیتر از آن‌ها رسوب داده شد (۱۳).

آزمایش تولید و بررسی آن به روش HPLC: برای بررسی عملکرد آنزیم و مسیر ایجاد شده، وکتور pBAD.mdIC که قادر به بیان پروتئین در تمام سویه‌های *E. coli* است استفاده شد. از آنجایی که pET28.mdIC تحت پروموتور T7 می‌باشد این وکتور تنها در سویه BL21(DE3) قادر به بیان پروتئین است و چون این سویه فاقد ژن دهیدراتاز مناسب یعنی مسیر دوم سنتز BT است برای انجام این آزمایش کاربردی ندارد (۵). بنابراین وکتور pBAD.mdIC در سویه TOP10 ترانسفرم و مورد آزمایش قرار گرفت. به این صورت که سویه TOP10 pBAD.mdIC به همراه TOP10 pBAD به عنوان شاهد در حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر کشت داده شدند و پس از انجام مرحله القا تمام حجم محیط سانتریفیوژ و رسوبات باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر محیط M9 حاوی زایلونات و AMP منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ rpm شیک شدند. پس اتمام زمان آزمایش محیط‌های M9 سانتریفیوژ و با اتیل استات استرات استخراج شیمیایی شدند و از جهت داشتن BT مورد بررسی قرار گرفتند (۸).

مشخصات: HPLC

ستون ODS : ۴.۶ میلی‌متر (قطر) × ۲۵ سانتی‌متر (طول)

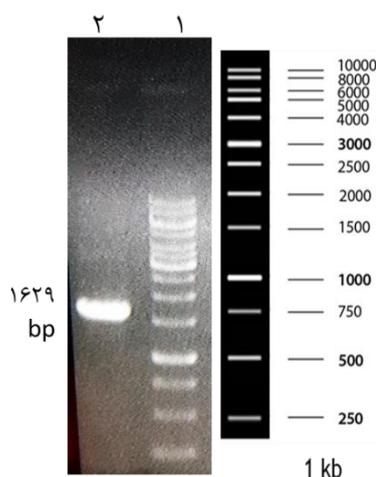
سیستم: Waters 600

آشکارساز: RID (Refractive Index Detector)

فاز متحرک: آب

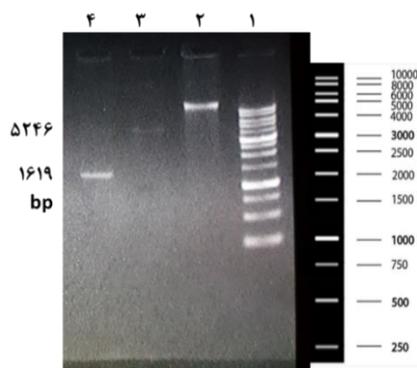
۳- نتایج

در این پژوهش به منظور تکثیر قطعه ژنی *mdlc*، واکنش زنجیره پلی‌مراز توسط پرایمرهای اختصاصی بر روی ژنوم استخراج شده باکتری *P. putida* صورت گرفت. در بررسی نتیجه و باند قطعه ژن مورد نظر بر روی ژل آگارز در سایز ۱۶۲۹ جفت باز مشاهده شد (شکل ۳).



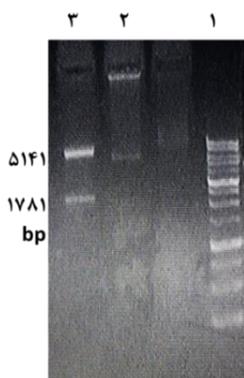
شکل ۳: تکثیر ژن *mdlc* از ژنوم *P. putida* (۱) نشانگر DNA (۲) ژن تکثیر شده

وکتور pET28 و قطعه ژن آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز (*mdlc*)، با استفاده از آنزیم‌های *NdeI* و *BamHI* برش داده شده و سپس روی ژل برده شده و استخراج شدند (شکل ۴).



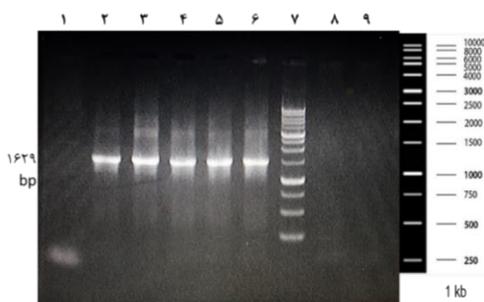
شکل ۴: آماده سازی و برش آنزیمی وکتورها و ژن (۱) نشانگر، (۲) وکتور برش نخورده *pET28* (۳) وکتور *pET28* برش خورده با *NdeI*, *BamHI* (۴) ژن *mdIC* برش خورده با *NdeI*, *BamHI*

سپس وکتور و ژن آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز به هم متصل شده و پس از آن با تهیه سلول مستعد و همچنین انجام مرحله ترانسفورماسیون، کلونی‌هایی که درون پلیت ظاهر می‌شوند دارای وکتور *pET28* نوترکیب حاوی ژن *mdIC* می‌باشد و توسط کلونی *PCR* حضور ژن آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز درون وکتور نوترکیب (*pET28.mdIC*) تایید شد (شکل ۵).



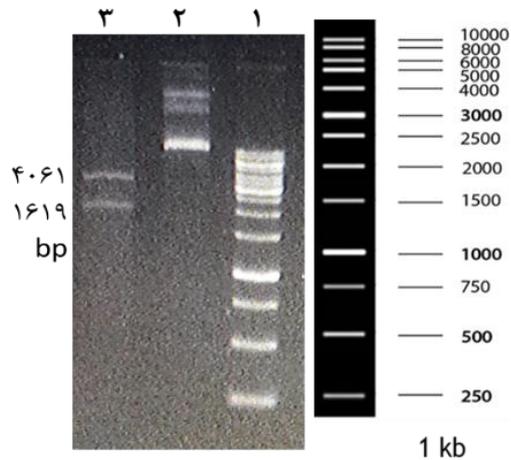
شکل ۵: تایید وکتور *pET28.mdIC* با برش آنزیمی

به منظور اطمینان کامل از حضور قطعه ژن درون وکتور نوترکیب برش آنزیمی توسط آنزیم‌های محدود کننده *NdeI* و *BamHI* انجام شد. قطعه ۱۷۸۱ بازی مربوط به ژن *mdIC* و قطعه ۵۱۴۱ مربوط به وکتور برش خورده است (شکل ۶).



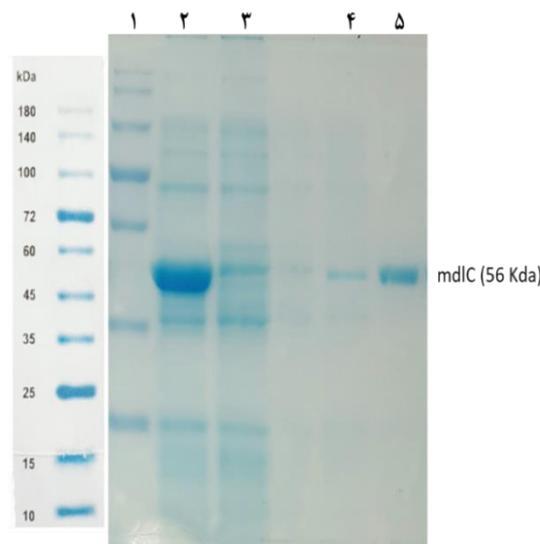
شکل ۶: *PCR* از کلونی‌های نوترکیب *pET28.mdIC* (۷) نشانگر DNA (۸، ۱) کلونی بدون قطعه، (۲، ۳، ۴، ۵، ۶) کلونی نوترکیب دارای ژن *mdIC* (۹) کنترل منفی

کرده که می‌تواند به دلیل تفاوت ژن باکتری ما با توالی موجود در *NCBI* باشد.

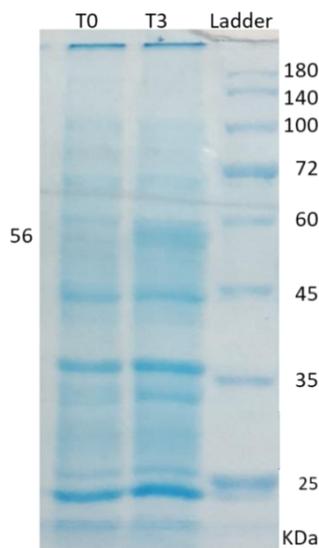


شکل ۹: تایید *pBAD.mdIC* با برش آنزیمی

بعد از انجام موفقیت آمیز مرحله کلونینگ ژن *mdIC* از سودووناس پوتیدا با توجه به بزرگ بودن قطعه ژنی ($1629bp$) و با در نظر گرفتن خوانش از دو سوی ژن و تایید آن در وکتور، این محصول را به عنوان ژن هدف پذیرفته شد. سپس تعیین توالی این ترکیب انجام شد و وکتور نهایی مورد تایید گرفت. در مراحل بعدی برای القا بیان از طریق مقادیر 0/2 درصد ال-آرابینوز برای وکتور *pBAD* و 0/2 میلی مولار *IPTG* برای وکتور *pET28* طبق کارهای انجام شده در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاصل آن به روی ژل *SDS* نشان داد که در هر دو سیستم در باکتری میزبان نسبت به باکتری فاقد وکتور، پروتئین در سایز مناسب ($56 KDa$) بیان شده است (شکل ۱۰ و ۱۱). مشاهده باندهای پروتئین در عصاره سلولی حاصل از شکست و لیز باکتری نشان دهنده محلول بودن، ساختار مناسب و فعال بودن آنزیم بود.

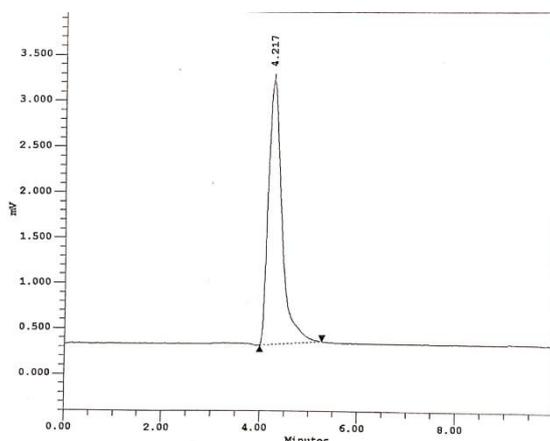


شکل ۱۰: بررسی بیان *BL21 pET28.mdIC*



شکل ۱۱: بررسی بیان *DH5 pBAD.mdIC* نشانگر پروتئین، (۲ T 3h، ۳ T0، ۴ سوپ، ۵) رسوب

در مرحله‌ی بعد باید بررسی فعالیت آنزیم انجام شود. بعد از بیان ژن بنا به شرایط موجود این مطالعه به صورت دو مرحله ای صورت پذیرفت. گلوکونوباکتر اکسیدا که در پروژه مورد استفاده قرار گرفته بود توانایی تولید زایلونات را در محیط کشت داشت. بر همین اساس *mdIC* وارد شده در وکتورهای مذکور را به سویه‌ی *TOP10*، ترنسفرم شد و *TOP10 pBAD.mdIC* را در محیط کشت حاوی زایلونات کشت داده شد که از زایلونات موجود در محیط به عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گرفت که نتیجه قابل توجهی داشت. نتایج از طریق *HPLC* مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱۲ الی ۱۵). در *HPLC* به دلیل شباهت پیک به کنترل مثبت و نیز اختلاف پیک نسبت به باکتری القا نشده بیانگر این است که این آزمایش دوباره باید تکرار شود. برای بررسی فعالیت آنزیم به روش *HPLC* به مقایسه‌ی چهار نمونه استاندارد *BT*، استاندارد زایلونات، نمونه شاهد و نمونه‌ی اصلی نیاز بود. در این پروسه ژن مورد نظر با تولید آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز منجر به تبدیل زایلونات موجود در محیط به *BT* می‌گردد.

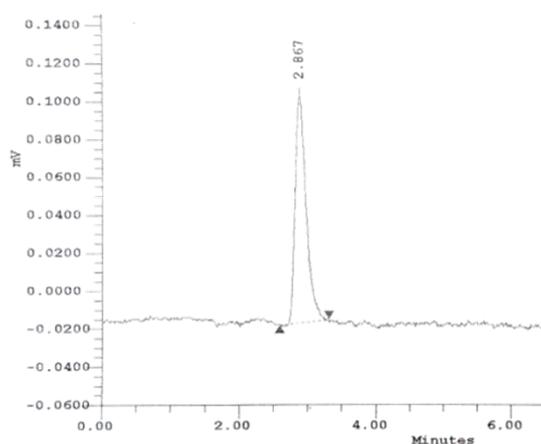


شکل ۱۲: پیک نمونه استاندارد *BT*

کروماتوگرام مربوط به استاندارد BT نشان می‌دهد که نمونه دارای یک ترکیب اصلی است که در زمان حدود ۴.۲ دقیقه جدا شده و با شدت نسبتاً بالا توسط آشکارساز ثبت شده است (شکل ۱۲ و جدول ۳).

جدول ۳: پیک نمونه استاندارد BT

#	Ret Time (min)	Start Time (min)	End Time (min)	Area (uV sec)	Area
1	4.217	3.983	5.267	56485	100

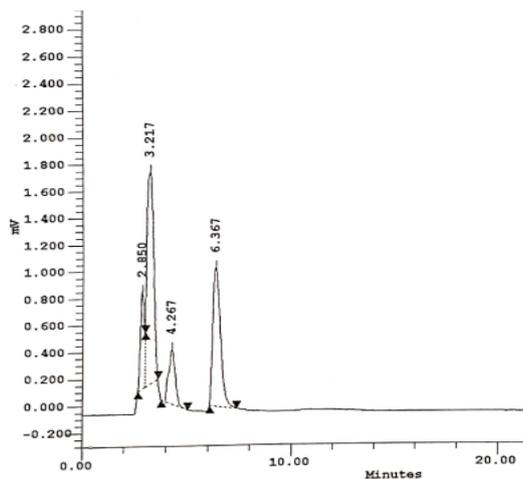


شکل ۱۳: پیک نمونه استاندارد زایلونات

کروماتوگرام مربوط به استاندارد زایلونات وجود یک ترکیب مشخص که همان زایلونات می‌باشد را در نمونه نشان می‌دهد که در زمان حدود ۲.۹۷ دقیقه آشکارسازی شده است (شکل ۱۳ و جدول ۴)

جدول ۴: پیک نمونه استاندارد زایلونات

#	Ret Time (min)	Start Time (min)	End Time (min)	Area (uV*sec)	% Area
1	2.867	2.583	3.300	1351	100.00

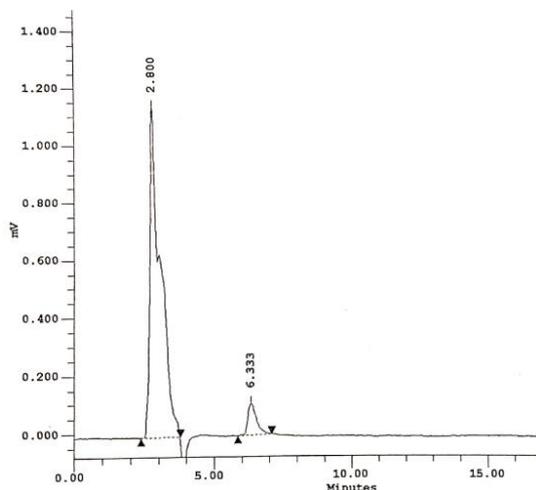


شکل ۱۴: پیک نمونه *TOP10 pBAD.mdlC* – ۴۸ ساعت

کروماتوگرام مربوط به نمونه اصلی، یک نمودار کروماتوگرافی است که مربوط به تحلیل نمونه‌ای از سویه باکتریایی *TOP10* حاوی پلاسمید *pBAD.mdlC* یک وکتور بیان پروتئین تحت کنترل پروموتور *araBAD*، که با ال-آرابینوز القا می‌شود) پس از ۴۸ ساعت کشت است. این نمودار برای ارزیابی بیان پروتئین *mdlC* در طول زمان کشت (۴۸ ساعت، که نشان‌دهنده فاز *stationary* پس از القا است) استفاده شده است (شکل ۱۴ و جدول ۵).

جدول ۵: پیک نمونه *TOP ۱۰ pBAD.mdlC* – ۴۸ ساعت

#	Ret Time (min)	Start Time (min)	End Time (min)	Area (uV*sec)	% Area
1	2.850	2.650	2.967	8236	10.41
2	3.217	2.967	3.600	35769	45.23
3	4.267	3.767	5.033	8954	11.32
4	6.367	6.083	7.383	26131	33.04



شکل ۱۵: پیک نمونه شاهد *TOP10 pBAD* – ۴۸ ساعت

کروماتوگرام مربوط به نمونه شاهد سویه باکتریایی TOP10 حاوی پلاسمید pBAD (بدون القا یا بیان هدفمند پروتئین mdIC) پس از ۴۸ ساعت کشت است. این نمونه شاهد برای مقایسه با نمونه TOP10 pBAD.mdIC استفاده شده و نشان دهنده فعالیت پایه (baseline activity) باکتری بدون القا با آرابینوز است (شکل ۱۵ و جدول ۶).

جدول ۶: پیک نمونه شاهد TOP10 - ۴۸pBAD ساعت

#	Ret Time (min)	Start Time (min)	End Time (min)	Area (uV*sec)	% Area
1	2.800	2.367	3.767	30245	92.79
2	6.333	5.850	7.083	2350	7.21

۴- بحث

اهمیت تولید الکل چهار کربنه‌ی بوتان تریول در صنایع، دارو سازی و صنعت نظامی می‌باشد. به دلیل این که تولید این الکل به روش شیمیایی از نظر هزینه و خطرات زیستی مقرون به صرفه نیست دانشمندان زیادی برای تولید زیستی محصول، تلاش‌های فراوانی کرده‌اند، تا محصول نهایی از نظر کمیت و کیفیت بهینه باشد.

BT تا قبل از سال ۲۰۰۳ تنها به روش شیمیایی قابل تولید بود (۱۴ و ۱۵). از مشکلاتی که این روش دارد تولید مواد جانبی نظیر لاکتید، لاکتون، مالئیک اسید و نمک بورات می‌باشد که باعث کاهش سرعت احیا و بازده، افزایش هزینه تولید و آلودگی محیط زیست می‌شود (۱۶ و ۱۷).

طی تحقیقات انجام شده در ۲۰ سال اخیر، نشان داده شد، که در تولید زیستی این محصول که طی ۴ مرحله واکنش آنزیمی صورت می‌پذیرد، در مرحله سوم واکنش آنزیمی، آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز که از ژن MdlC نشات می‌گیرد، نقش فعالی را ایفا می‌نماید. در میان این چهار مرحله واکنش آنزیمی دو مرحله‌ی آخر از جمله، آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز ثابت ولی آنزیم‌های ابتدایی بسته به نوع سوبسترا تغییر می‌کنند. به طور خلاصه تولید BT در Ecoli به بیان دو آنزیم زایلوز دهیدروژناز و بنزیل فورمات دکربوکسیلاز و مسدود کردن مسیرهای متابولیک طبیعی دی-زایلوز و دی-زایلونات (۱۸) و همچنین مسیرهایی که سوبسترای آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز را از مسیر تولید BT، خارج می‌کند (۶ و ۱۹)، نیاز دارد. بنابراین، برای ایجاد مسیر تولید BT، در مرحله سوم به آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز که، ژن MdlC، آن را کد می‌کند نیاز است.

آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز سومین مرحله واکنش آنزیمی در تولید BT می‌باشد که دکربوکسیله کردن دئوکسی گلیسرول پنتولوسونیک اسید را بر عهده دارد و عامل تولید ۳-۴ دهیدروکسی بوتانال می‌شود (۷ و ۲۰). در این پژوهش‌ها برای تولید میکروبی الکل BT، چون بعضی از آنزیم‌هایی که در تولید این الکل نقش داشتند در باکتری Ecoli وجود داشت، از سویه‌هایی از این باکتری و برای دسترسی به آنزیم‌های تکمیل کننده، باکتری سودوموناس پوتیدا مورد استفاده قرار گرفت، که ژن MdlC از همین باکتری انتخاب شد (۶ و ۷).

والدزا و همکاران (۱۸)، آنزیم کتواسید دکربوکسیلاز (بنزیل فورمات دکربوکسیلاز) را از سودوموناس پوتیدا جدا و به باکتری *E. coli* وارد کردند. ونگ و همکاران (۲۱) برای بهینه سازی تولید بوتان تریول در *E. coli* مطالعاتی انجام دادند. آن‌ها در این مطالعات به غربالگری ژن‌های همولوگ مثل ۲-کتو اسید دکربوکسیلاز پرداخته، پس از غربالگری به ۴ عدد ۲-کتواسید دکربوکسیلاز، دست یافتند که از ژن *KdcA* کد می‌شدند و از باکتری *Lactococcus lactis* به دست می‌آمدند. بیان این ژن‌ها در کنار بیان ژن‌های همولوگ دیگر در افزایش تولید BT تاثیر داشت. در سال ۲۰۱۸ به وسیله ی چندین استراتژی توسط جینگ و همکاران (۵)، *E. coli* نو ترکیبی جهت افزایش میزان بوتان تریول ساخته شد، یکی از استراتژی‌های طراحی شده جایگزینی ژن *kivD* از *Lactococcus.lactis* که یک دکربوکسیلاز با کارایی بالا می‌باشد به جای *MdIC* از سودوموناس پوتیدا بود که باعث افزایش قابل توجهی در تولید BT داشت. طی این پژوهش گونه‌ی دیگری از دکربوکسیلاز به نام ایندول پیرووات دکربوکسیلاز (*IpcD*) از *Enterobacter.cloacae* استفاده شد ولی هیچ BT در عصاره محیط کشت گونه ی مخفی نو ترکیب ژن *ipdC* تشخیص داده نشد.

باتوجه به تحقیقات انجام شده و بهره‌وری از میکروارگانیسم‌های متعدد به‌ویژه سودوموناس پوتیدا جهت دسترسی به آنزیم بنزیل فورمات دکربوکسیلاز توسط پژوهشگران، در این پژوهش نیز میکروارگانیسم سودوموناس پوتیدا استفاده شد. در ابتدا به دلیل عدم دسترسی به سویه پوتیدا، بررسی‌هایی انجام شد و نتایجی که از بررسی توالی دو ژن *MdIC* در *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomona putida* به دست آمد، نشانگر بالای ۸۰ درصد هم‌ترازی میان دو ژن بود. به همین دلیل ابتدا از سودوموناس سویه آثرژینوزا که ژنوم آن در NCBI موجود است استفاده شد و بعد از دسترسی به سودوموناس پوتیدا همان مراحل کلون و بیان روی آن انجام شد.

بر اساس تحقیقات انجام شده توسط دانشمندان مختلف مثل فراست و والدزا (۱۸) طی سال‌های اخیر که از این ژن (*MdIC*) از سودوموناس)، در کنار دیگر ژن‌ها در باکتری *E. coli* برای تولید BT استفاده کرده اند، به همین منظور از این ژن (نه ژن باکتری میزبان) در کنار ژن دیگر آنزیم‌ها در باکتری *E. coli* استفاده شد. برای تولید BT نیاز به سیستم بیانی داشتیم. در واقع ژن *MdIC* بعد از استخراج از سودوموناس و تکثیر باید از طریق یک وکتور با سیستم بیانی به باکتری میزبان منتقل می‌شد.

کائو و همکاران (۲۲) از باکتری *E. coli* BL21 star(DE3) به عنوان میزبان استفاده کردند. ویژگی ژنوتایپ این سویه در بالا بردن پایداری mRNA و تولید پروتیین آن را برای استفاده پروموتور T7 که تعداد کپی کم دارد، ایده آل می‌کرد. بنابراین ۲-کتو اسید دکربوکسیلاز از *P. putita* در وکتور pET28a بین سایت های *NcoI* و *EcoRI* برای ایجاد pET-mdIC کلون شدند).

طبق کارهای انجام شده توسط دانشمندان که برای بیان این ژن و تولید BT از سیستم بیانی PET استفاده کردند و با توجه به در دسترس بودن، تجربه‌ی استفاده از این سیستم بیانی و سادگی استفاده از آن، از وکتور بیانی pET و از میان آن‌ها از سیستم بیانی pET28 برای بیان ژن *MdIC* استفاده شد. علاوه بر آن، از وکتور pBAD که سیستم بیانی، با قابلیت القا و بیان مناسب می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت .

بعد از انجام موفقیت آمیز مرحله کلونینگ ژن *MdIC* از سودوموناس آثرژینوزا و در مرحله‌ی بعد سودوموناس پوتیدا با توجه به بزرگ بودن قطعه ژنی (۱۶۲۹ bp) و با در نظر گرفتن خوانش از دو سوی ژن و تایید آن در وکتور، این محصول را به عنوان ژن هدف پذیرفته شد. سپس تعیین توالی این ترکیب انجام شد و وکتور نهایی مورد تایید گرفت. در مراحل بعدی برای القا بیان از طریق مقادیر ۰/۲ درصد ال-آرابینوز برای وکتور pBAD و ۰/۲ میلی‌مولار IPTG برای وکتور pET28 طبق کارهای انجام شده

در پروژه مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاصل آن به روی ژل آگارز نشان داد که در هر دو سیستم در باکتری میزبان نسبت به باکتری فاقد وکتور، پروتئین در سایز مناسب بیان شده است. در مرحله‌ی بعد باید بررسی فعالیت آنزیم انجام شود.

بعد از بیان ژن بنا به شرایط موجود و با توجه به دو مرحله‌ای بودن کار فراست، کار را به صورت دو مرحله‌ای پیش رفت. گلوکونوباکتر اکسیدا که در پروژه مورد استفاده قرار گرفته بود توانایی تولید زایلونات را در محیط کشت داشت. بر همین اساس MdlC وارد شده در وکتورهای مذکور را به سویه‌ی TOP10، ترنسفرم کردیم و TOP10 pBAD.mdlc را در محیط کشت حاوی زایلونات کشت داده شد که از زایلونات موجود در محیط به‌عنوان سوسترا مورد استفاده قرار گرفت که نتیجه قابل توجهی داشت. نتایج از طریق HPLC چک شد. در HPLC شباهت پیک نسبت به کنترل مثبت و اختلاف پیک نسبت به باکتری القا نشده نشان داده شد که این دوباره باید تکرار شود.

۵- نتیجه‌گیری

یکی از آنزیم‌های اصلی برای ساخت مسیر تولید BT در *E. coli* بنزوئیل فرمات دکربوکسیلاز می‌باشد که در این پروژه با کلونینگ ژن کد کننده این آنزیم این مسیر ایجاد شد. ابتدا ژن mdlc از سویه *P. putida* با کمک پرایمرهای طراحی شده تکثیر و با برش آنزیمی در وکتورهای pBAD و pET28 کلون شد. طبق کارهای انجام شده توسط دانشمندان که برای بیان این ژن و تولید BT از سیستم بیانی PET استفاده کردند (۲۳) و با توجه به در دسترس بودن، تجربه‌ی استفاده از این سیستم بیانی و سادگی استفاده از آن، از وکتور بیانی pET و از میان آن‌ها از سیستم بیانی pET28 برای بیان ژن MdlC استفاده شد. علاوه بر آن، از وکتور pBAD که سیستم بیانی، با قابلیت القا و بیان مناسب می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد بیان ژن با کمک ژل SDS-PAGE بررسی شد که حضور باند پروتئین در ۵۶ KDa موید بیان پروتئین بود. برای بررسی عملکرد آنزیم وکتور نو ترکیب pBAD.mdlc در سویه TOP10 ترنسفرم گردید و مراحل آزمایش تولید BT انجام گرفت و محیط کشت بدست آمده به روش HPLC بررسی شد. در HPLC و مقایسه‌ی آن که بین نمودارها صورت گرفت، پیک مشابه با پیک اسناندارد BTO دیده شد که می‌تواند موید حضور و تولید BTO با آنزیم تولید شده توسط القای ژن mdlc باشد.

۵- تشکر و قدردانی

از دانشگاه صنعتی مالک اشتر برای فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی لازم جهت انجام این تحقیق، صمیمانه سپاسگزاریم.

۸- منابع

1. Yim H, Haselbeck R, Niu W, Pujol-Baxley C, et. al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1, 4-butanediol. *Nature chemical biology*. 2011 Jul;7(7):445-52.
2. Saxena R, Adhikari D, Goyal H. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renew Sustain Energy Rev*. 2009;13(1):167-78.
3. Valdehuesaa G, Nn K. Direct bioconversion of d-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered *Escherichia coli*. *Process Biochem*. 2013;49:25-32.
4. Park SJ, Kim EY, Noh W, Park HM, et. al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 5-aminovalerate and glutarate as C5 platform chemicals. *Metabolic engineering*. 2013 Mar 1;16:42-7.
5. Jing P, Cao X, Lu X, Zong H, et. al. Modification of an engineered *Escherichia coli* by a combined strategy of deleting branch pathway, fine-tuning xylose isomerase expression, and substituting

- decarboxylase to improve 1, 2, 4-butanetriol production. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2018 Nov 1;126(5):547-52.
6. Saffron C, Frost JW, MI MBIL. Large Scale Green Synthesis of 1, 2, 4-Butanetriol. 2007.
 7. Frost JW. Synthesis of 1, 2, 4-butanetriol enantiomers from carbohydrates. Google Patents; 2011.
 8. Zhang N, Wang J, Zhang Y, Gao H. Metabolic pathway optimization for biosynthesis of 1, 2, 4-butanetriol from xylose by engineered *Escherichia coli*. *Enzyme and microbial technology*. 2016 Nov 1;93:51-8.
 9. Kourist R, Guterl JK, Miyamoto K, Sieber V. Enzymatic decarboxylation—an emerging reaction for chemicals production from renewable resources. *ChemCatChem*. 2014 Mar;6(3):689-701.
 10. Iding H, Dünnwald T, Greiner L, Liese A, et. al. Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. *Chemistry—A European Journal*. 2000 Apr 17;6(8):1483-95.
 11. Wu N, Mo Y, Gao J, Pai EF. Electrostatic stress in catalysis: structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 Feb 29;97(5):2017-22.
 12. Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*. 2008;451(7174):86-9.
 13. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; [date unknown]. Chapter, Restriction Enzymes: A Key to Molecular Cloning and DNA Manipulation.
 14. Lau M. Synthesis and downstream purification of 1, 2, 4-butanetriol [dissertation]. Ann Arbor (MI): Pro Quest LLC; 2006. UMI Microform 3348145.
 15. Mandava VNBR, Varanasi G, Areveli S, Vempati CS, NarayanaR, et al. Preparation of fosamprenavir calcium. 2011. p. 22.
 16. Ikai K, Mikami M, Furukawa Y, Urano T, et. al. Process for preparing 1, 2, 4-butanetriol. United States patent US 6,949,684. 2005 Sep 27.
 17. Stiteler CH, inventors; Pittsburgh Plate Glass Co, assignee. Method of preparing esters of 1, 2, 4-butanetriol. Google Patents, US 2,559,742. 1951 Jul 10.
 18. Valdehuesa KN, Liu H, Ramos KR, Park SJ, et. al. Direct bioconversion of d-xylose to 1, 2, 4-butanetriol in an engineered *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 2014 Jan 1;49(1):25-32.
 19. Frost JW, Niu W, inventors; Board of Trustees of the University of Illinois, assignee. Microbial synthesis of d-1, 2, 4-butanetriol. Google Patents, US 7,935,518 B2. 2011 May 3.
 20. Niu W, Molefe MN, Frost J. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1, 2, 4-butanetriol. *J Am Chem Soc*. 2003;125(43):12998-9.
 21. Wang X, Xu N, Hu S, Yang J, et. al. d-1, 2, 4-Butanetriol production from renewable biomass with optimization of synthetic pathway in engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 2018 Feb 1;250:406-12.
 22. Cao Y, Niu W, Guo J, Xian M, Liu H. Biotechnological production of 1,2,4-butanetriol: An efficient process to synthesize energetic material precursor from renewable biomass. *Sci Rep*. 2015;5:16621.

23. Gao Q, Wang X, Hu S, Xu N, et. al. High-yield production of D-1, 2, 4-butanetriol from lignocellulose-derived xylose by using a synthetic enzyme cascade in a cell-free system. *Journal of biotechnology*. 2019 Feb 20;292:76-83.