



Cloning and surface display of xylose dehydrogenase from *Caulobacter vibrioides* Via *E.coli* transmembrane protein YiaT

Karamipoor H^a, Dehghan esmatabadi MJ^{b*}, Deldar AA^b, Bozorgmehr F^a

^a M.Sc. Faculty of Passive Defence, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

^b Ph.D, Faculty of Passive Defence, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Original Article

Use your device to scan
and read the article
online

Citation: Karamipoor H, Dehghan esmatabadi MJ Deldar AA, Bozorgmehr F. Cloning and surface display of xylose dehydrogenase from *Caulobacter vibrioides* Via *E.coli* transmembrane protein YiaT. Journal of Cell and Tissue. 2026; 17(1):1-16.

 <https://doi.org/10.61882/JCT/17..1.1>

KEYWORDS

xylosedehydrogenase
xylose
E. coli

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Concerns about fossil energy costs, environmental deterioration, and energy security has created strong motivation for the research and development of routes to provide sustainable and renewable fuels. In recent years, the use of biomass to produce highly valued chemicals has attracted widespread attention. Lignocellulosic biomass, as a promising renewable resource for biofuel production, has distinct advantages in terms of economic and environmental benefits. The conversion of renewable raw materials to hydrocarbon fuels is an attractive alternative to fossil fuels from economic and environmental perspectives. The production process of lignocellulosic biomass mainly consists of biomass accumulation, biomass decomposition, simple sugars, and conversion of sugars to biofuel. One of the crucial steps for the economic success of lignocellulosic biofuels depends on the inhibition of competitive metabolism in microorganisms to achieve high productivity. To date, there has been a growing focus on the use of *S. cerevisiae* and *E. coli* as cell lines. These two cellular factories have well known advantages. They are genetically transmissible and several tools are available for genetic manipulation. In order to produce xylonate, the engineered xylose is first converted by a dehydrogenase into the intermediate xylonolactone, which is then slowly converted to xylonate in a nonenzymatic reaction.

* Corresponding author. Tel.: 22974603; Fax: 22974603

E-mail address: mohammad.dehghan@modares.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT/17.1.1>

Received: 6 Sep.2025; Received in revised form: 8 Dec. 2025; Accepted: 13 Dec. 2025

Original Article

© Author



Aim: The organic compound D-1,2,4-Butanetriol (BT) is a valuable chemical with wide-ranging applications in various fields such as pharmaceuticals, paper, polymer materials, and military applications. However, the chemical synthesis routes for BT have many drawbacks. By genetically modifying microorganisms, the metabolic pathway for producing many substances, including BT, can be engineered. When D-xylose is supplied to the bacterium, it is first converted into an intermediate compound called xylonolactone. This compound slowly converts into xylonate through a non-enzymatic reaction. To produce xylonate, the engineered bacteria receive xylose, which is initially converted by a dehydrogenase reaction catalysed by the xylose dehydrogenase enzyme into an intermediate compound, xylonolactone. Xylonolactone is slowly converted to xylonate in a nonenzymatic reaction. Xylonate is a five-carbon organic acid. Over the past few years, xylonate has increasingly been considered as an important chemical due to its potential as an important chemical component. Xylonate has many applications in the food, chemical, and pharmaceutical industries. Specifically, xylonate can act as a precursor for the synthesis of D-1,2,4-Butanetriol and as a concrete water reducing agent. *E. coli* was chosen as the target strain for genetic and metabolic engineering due to its fast growth in inexpensive culture media, the presence of two enzymes for BT synthesis, and product formation in less than 24 hours of fermentation. This study aimed to clone and express xylose dehydrogenase from *Caulobacter vibrioides* in *E.coli*.

Materials and Methods: At first, to access the bacterial gene sequence, the genome of the target bacterium was extracted. Then, to create a strain expressing the enzymes xylose dehydrogenase and xylonolactonase, the genes for these proteins were amplified from *Caulobacter vibrioides* CB1 and transferred into *E. coli*. For this purpose, the target genes were amplified using specifically designed primers via the Polymerase Chain Reaction (PCR) method and initially cloned into a pTZ57cloning vector and then subcloned into pET 26b expression vector. At the final step, the expression of the enzyme was assessed by SDS-PAGE, and the other confirmation was the reduction of NAD⁺ to NADH, which was used as an activity indicator of the enzyme, as investigated by a change in NADH absorbance at 340 nm.

Results: Confirmatory tests were performed to ensure the presence of the gene in the vectors (using restriction enzymes and colony PCR for gene amplification). The expression and activity of the enzyme were analyzed. The recombinant protein's presence was confirmed by SDS-PAGE for the xylose dehydrogenase gene, with a molecular weight of 52.2 kDa. The estimated expression level of the recombinant protein was approximately 25%.

Conclusion: The objective of this research was solely to establish the metabolic pathway for xylonate production in *E. coli* by surface expression of enzymes in this pathway (xylose dehydrogenase). The results obtained in this study confirm that half of the pathway is active at the cell surface, but further experiments are required to determine the precise production levels and complete the pathway.



کلون و بیان سطحی آنزیم زایلوزدهیدروژناز از کلوباکتر ویبریوئیدس متصل به پروتئین عرض غشایی Yia T در باکتری اشریشیا کلی

هانیه کرمی پور^۱، محمدجواد دهقان عصمت آبادی^{۲*}، علی اصغر دلدار^۳، فاطمه بزرگمهر^۴

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران، dnaresearchcenter@gmail.com

^۲ استادیار، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران، mohammad.dehghan@modares.ac.ir

^۳ استادیار، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران، aad.phd.gene@gmail.com

^۴ دانش آموخته کارشناسی ارشد، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران، Fatemehbozorgmehr93@gmail.com

واژگان کلیدی	چکیده
زایلونات زایلوز زایلوزدهیدروژناز اشریشیا کلی	هدف: هدف از انجام این مطالعه کلون‌سازی و بیان سطحی ژن آنزیم زایلوزدهیدروژناز از کلوباکتر ویبریوئیدس در اشریشیا کلی می‌باشد. مواد و روش‌ها: برای دسترسی به باکتری ابتدا ژنوم باکتری مورد نظر استخراج شد. به منظور ساخت سویه‌ی بیان کننده آنزیم زایلوز دهیدروژناز ژن این پروتئین از باکتری کلوباکتر ویبریوئیدس CBI تکثیر و به باکتری اشریشیا کلی انتقال یافت. برای انجام این کار ژن مورد نظر با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تکثیر و ابتدا در وکتور کلونینگ pTZ57 و سپس در وکتور بیانی pET 26 کلون شد. سپس بیان این آنزیم به وسیله‌ی SDS-PAGE و عملکرد آن با تغییر در جذب طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط NADH تولید شده در فرایند عمل آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. با انجام آزمایش‌های تاییدی و اطمینان از وجود ژن در وکتورها (با استفاده از آنزیم‌های محدودالتر و تکثیر ژن به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR Colony) و فرآیند کلونینگ)، بیان و عملکرد این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: وجود پروتئین نوترکیب توسط SDS-PAGE برای ژن زایلوز دهیدروژناز با وزن مولکولی ۵۲.۲ کیلوالتون بررسی شد و میزان بیان پروتئین نوترکیب با نرم افزار ImageJ، تقریباً ۲۵ درصد تخمین زده شد. نتیجه گیری: در این تحقیق تنها ایجاد مسیر متابولیسمی تولید زایلونات در سویه اشریشیا کلی به وسیله‌ی سطحی کردن اولین آنزیم این مسیر (زایلوزدهیدروژناز) صورت گرفت که نتایج به دست آمده در این تحقیق موید فعال بودن این آنزیم در سطح سلول می‌باشد و برای تعیین میزان دقیق تولید و تکمیل کردن مسیر نیاز به آزمایش بیشتر می‌باشد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۵	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۱۷	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۲	

۱- مقدمه

زایلوز دومین قند فراوان در طبیعت و یکی از اجزای اصلی همی سلولز در زیست توده لیگنوسلولزی است. استفاده از زایلوز مشتق شده از زیست توده به عنوان یک منبع تجدید پذیر غیرخوراکی فراوان و ارزان برای تولید مواد شیمیایی مبتنی بر زیست، مزایای زیادی نسبت به مسیرهای سنتی پتروشیمی دارد، زیرا از منابع تجدیدپذیر ساخته شده است، دارای شرایط تغییر شکل ملایم است و آلودگی زیست محیطی را کاهش می‌دهد. تعدادی از گونه‌های میکروبی نوع وحشی یا سویه‌های مهندسی شده متابولیک

برای تخمیر زایلوز به منظور تولید اتانول (۱)، زایلیتول (۲)، سوکسینات (۳)، لاکتات (۴)، بوتان تریول و سایر محصولات مهم جدا شده یا ساخته شده‌اند (۵).

زایلونات یک اسید آلی پنج کربنه است. در چند سال گذشته، زایلونات به دلیل پتانسیل آن به عنوان یک ماده شیمیایی مهم مورد توجه فزاینده‌ای قرار گرفته است. زایلونات کاربردهای گسترده‌ای مشابه بسیاری از اسیدهای قندی دیگر مانند گلوکونات دارد و می‌تواند در صنایع غذایی، شیمیایی و دارویی استفاده شود (۶، ۷). به طور خاص، زایلونات می‌تواند به عنوان یک پیش ماده برای سنتز ۱،۲،۴-بوتانتتریول (۸) و کاهش دهنده آب بتن (۹) عمل کند. زایلونات ممکن است از هیدرولیز همی سلولز غیرغذایی تولید شود که جایگزین ارزان قیمتی برای گلوکونات است. در گزارشی از وزارت انرژی ایالات متحده، زایلونات در میان ۳۰ ماده شیمیایی با ارزش افزوده برتر تولید شده از زیست توده است (۱۰).

اگرچه بسیاری از گونه‌های باکتریایی نوع وحشی می‌توانند زایلونات را با بازده بالا تولید کنند، این تولیدکنندگان طبیعی همیشه به محیط‌های گران قیمت مواد مغذی نیاز دارند و چندین روز طول می‌کشد تا به حداکثر تیترا برسند. در این میان جداسازی و خلص سازی زایلونات از آبگوشت تخمیر نیز کار دشواری است (۵). همچنین اگرچه اکسیداسیون شیمیایی زایلوز برای تولید زایلونات را می‌توان با استفاده از پلاتین یا طلا به عنوان کاتالیزور به دست آورد (۱۱) اما گزینش پذیری ضعیف باعث می‌شود این مسیرهای مصنوعی از نظر اقتصادی برای مقاصد صنعتی امکان پذیر نباشد (۶).

از مواد مهم که توسط روش‌های مهندسی متابولیک و مهندسی پروتئین توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند، انواع الکل‌ها هستند. یکی از این الکل‌ها بوتان تریول (BT) می‌باشد. Butantriol (BT)-1,2,4 یک پلی ال چهار کربنه با سه گروه هیدروکسیل آب دوست است. به عنوان یک ماده شیمیایی کارآمد، BT کاربردهای همه جانبه‌ای در زمینه‌های مختلف دارد. به عنوان مثال، BT را می‌توان برای ساخت فوم‌های پلی یورتان استفاده کرد. این فوم‌ها دارای ویژگی‌های خمشی-فشرده‌گی مشابه لاستیک طبیعی هستند (۱۲). BT همچنین در ساخت جوهرهای با کیفیت بالا نقش به‌سزایی دارد. BT فعال نوری همچنین یک بلوک ساختمانی بالقوه برای سنتز داروهای مختلف مانند Crestor و Zetia3 است. در نهایت، BT پیش ساز مستقیم برای ساخت بوتانتتریول تری نیترات است، یک نرم کننده پراثری عالی برای جایگزینی نیتروگلیسرین که فراریت کمتری دارد، از نظر حرارتی پایدارتر است و خواص بهتری در دمای پایین ارائه می‌دهد (۱۳).

تا به امروز، تمرکز فزاینده‌ای بر استفاده از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری *اشریشیا کلی* به عنوان کارخانه‌های سلولی وجود دارد. این دو کارخانه سلولی دارای مزایایی هستند که به خوبی مشخص می‌شوند. آن‌ها از نظر ژنتیکی قابل حمل هستند و ابزارهای متعددی برای دستکاری ژنتیکی در آن‌ها در دسترس هستند. همچنین آن‌ها برای سنتز طیف متنوعی از سوخت‌ها و مواد شیمیایی، عمدتاً شامل الکل‌ها، تریپن‌ها و محصولات مبتنی بر اسیدهای چرب از زایلوز اصلاح شده‌اند (۱۴).

برای تولید زایلونات، باکتری مهندسی شده زایلوز را دریافت کرده و ابتدا توسط یک واکنش دهیدروژنازی توسط آنزیم زایلوز دهیدروژناز، آن را تبدیل به ماده‌ی حد واسط زایلونولاکتون می‌نماید. زایلونولاکتون به آهستگی و طی یک واکنش غیرآنزیمی به زایلونات تبدیل می‌شود. زایلونولاکتوناز در این مرحله نقش کاتالیزوری را ایفا کرده و طی انجام یک واکنش شیمیایی دو طرفه به انجام فرایند سرعت بسیار بیشتری می‌بخشد. زایلونولاکتوناز عضو مهمی از خانواده‌ی پروتئینی SMP30 می‌باشد که طبق گزارش‌های پیشین پروتئین‌های این خانواده در حضور یون‌های فلزی دو ظرفیتی مانند Fe، از خود فعالیت موثر نشان می‌دهند (۱۵، ۱۶). از یک منظر دیگر برای تولید زیستی بوتان تریول، به یک مسیر متابولیسمی متشکل از آنزیم‌های مختلف نیاز داریم.

آنزیم اول این مسیر یعنی زایلوزدهیدروژناز از آنزیم‌های کلیدی این مسیر بوده و در حضور آن مرحله‌ی اول یعنی تولید زایلونیک اسید به‌عنوان یک ترکیب واسط حیاتی برای ادامه‌ی مسیر تولید حاصل می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

پلاسمید و سویه‌های باکتری: سویه *شریشیا کلی* به دلیل رشد سریع در محیط کشت ارزان، دارا بودن دو آنزیم مسیر سنتز BTO و تولید محصول در کمتر از ۲۴ ساعت تخمیر به‌عنوان سویه هدف مهندسی ژنتیک و متابولیسم انتخاب شد. همچنین اطلاعات ژنوم، توالی و متابولیسم این سویه شناخته شده می‌باشد. سویه DH5 α جهت ترانسفرم (کلون سازی) و سویه BL21 به‌عنوان سلول هدف مهندسی ژنتیک و تولید محصول در نظر گرفته شد. به‌منظور تکثیر ژن زایلوز دهیدروژناز از ژنوم باکتری *کلوباکتر ویبریویئیدس* ابتدا باکتری در محیط ۸۳۰R2A کشت داده و در OD:600 مراحل استخراج آن انجام شد.

بهترین آنزیم زایلوزدهیدروژناز گزارش شده برای مسیر تولید BTO که فعالیت کینتیکی بالایی نسبت به سایر سویه‌های شناخته شده دارد در *کلوباکتر کرسنتوس* بیان می‌شود. لیکن به دلیل شباهت بسیار بالای این باکتری به *کلوباکتر ویبریویئیدس* از باکتری اخیر استفاده شد به طوری که ژن xyIB,C آن ۹۶ درصد شباهت به xyIB,C سویه *کلوباکتر کرسنتوس* دارد. وکتور pTZ57 R از مجموعه T وکتورها می‌باشد که برای کلون قطعات ژنی به کار گرفته شد به علاوه وکتور pET 26 از دسته وکتورهای بیانی می‌باشد که توسط lacI promoter بیان ژن مورد نظر را کنترل می‌کند. استفاده از این وکتور برای تنظیم و کنترل بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت.

به‌منظور ساخت سویه‌ی بیان کننده آنزیم زایلوز دهیدروژناز ژن این پروتئین از باکتری *کلوباکتر ویبریویئیدس* CB1 تکثیر و به باکتری *شریشیا کلی* انتقال یافت. برای این منظور ژن مورد نظر با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) تکثیر و ابتدا در وکتور کلونینگ و سپس در وکتور بیانی کلون شد.

تکثیر قطعه ژنی xyIB: در این پژوهش به‌منظور تکثیر قطعه ژنی xyIB به روش PCR، با استفاده از نرم افزار Snap Gene 5.2 و همچنین داندلود فایل توالی ژنومی باکتری *کلوباکتر ویبریویئیدس* از سایت NCBI به شماره دستیابی CP023314.2 و با توجه به جایگاه برش آنزیم‌ها در وکتور مورد نظر pET26، پرایمرهایی با جایگاه برش NCO1 و Pst1 طراحی شد. پرایمر xyIB-NcoI.F با جایگاه برش NcoI و به اندازه ۳۷ جفت باز و پرایمر xyIB.R(stop-) با اندازه 40 جفت باز با جایگاه برش Pst1 انتخاب شد (جدول ۱). به دلیل استفاده از جایگاه برش NcoI و اضافه شدن یک نوکلئید G برای جلوگیری از تغییر ترتیب کدون‌ها، آمینواسید دوم این پروتئین از سرین به گلایسین که شباهت ساختاری به یکدیگر دارند تغییر یافت.

ابتدا باید ژنوم باکتری مورد نظر استخراج می‌شود. بدین منظور باکتری کشت داده شده را در دور ۷۰۰۰ rpm، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf) کرده و پس از دور ریختن محیط رویی اقدام به استخراج ژنوم باکتری با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت GTP¹، ایران)، به ترتیب مراحل زیر انجام شد.

- اضافه کردن یک میلی‌لیتر بافر استخراج به رسوب باکتری
- انتقال محلول ایجاد شده به میکروتیوپ ۱/۵

¹ Gene Transfer Pioneers

- اضافه کردن یک میکرولیتر پروتئیناز k
- اضافه کردن ۶۰ میکرولیتر SDS ۲۰ درصد
- اضافه کردن ۱۵ میکرولیتر Triton x100
- قراردادن میکروتیوپ به مدت یک ساعت در بن ماری ۶۵ درجه سانتی گراد
- سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد (۱۲۰۰۰ rpm ، ۵ min)
- انتقال محلول رویی به ستون و ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ rpm)
- اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو (wash buffer) به ستون و ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ (۲بار)
- انجام یک دور سانتریفیوژ خالی جهت خروج مواد و الکل اضافی در فیلتر
- انتقال ستون به میکروتیوپ ۱/۵
- اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر Elution buffer به ستون و بعد از گذشت ۵ دقیقه، ستون سانتریفیوژ شد.
- اضافه کردن یک میکرولیتر RNase به ژنوم استخراج شده
- محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و سپس در دمای ۲۰- دزجه سانتی گراد نگهداری شد.

سپس ساختار و مشخصات پرایمرها توسط نرم افزار OligoAnalyzer مورد بررسی قرار گرفت. برای تکثیر ژن زایلوز دهیدروژناز از ژنوم باکتری کلوباکتر ویبریوئیدس ابتدا باکتری در محیط R2A۸۳۰ کشت داده و پس از این که دانسیته نوری (JENWAY6310) در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۲ رسید استخراج ژنوم، صورت گرفت. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و روش PCR تکثیر ژن و زایلونولاکتوناژ به طول ۱۸۰۰ جفت باز از ژنوم استخراج شده باکتری کلوباکتر ویبریوئیدس صورت گرفت. در خصوص شرایط واکنش زنجیره ای پلی مراز، ابتدا به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد واسرشت سازی اولیه انجام گرفت. سپس ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد واسرشت سازی، ۳۰ ثانیه در ۵۳ درجه سانتی گراد اتصال، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد گسترش برای ۱۰ چرخه انجام شد و بلافاصله ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد واسرشت سازی، ۳۰ ثانیه در ۶۳ درجه سانتی گراد اتصال و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد گسترش برای ۲۰ چرخه انجام گرفت و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد گسترش نهایی انجام گرفت. پس از انجام واکنش محصولات PCR روی ژل آگارز (Sigma، آمریکا) برده شد.

جدول ۱: پرایمر های استفاده شده در این پژوهش

نام پرایمر	توالی پرایمر	درصد GC	دمای T _M
xyIB-NcoI.F:	5'ACAGGAGAATTAACCATGGCCTCAGCCATCTATCCC 3'	51.4%	۶۶,۵
xyIC.R(stop-):	5' CCATATGGTACCAGCTGCAGGTGTAGACAAGGCGGACCTC 3'	57.5%	۶۹,۱
T7 پروموتور	5'TAATACGACTCACTATAGGG3'	40.0%	۵۶
T7 ترمیناتور	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG3'	52.6%	47.3

کلونینگ ژن xyIB, C در وکتور pET26: پس از تکثیر ژن با آنزیم Taq پلی مراز، به علت اضافه شدن نوکلئوتید A توسط این آنزیم در هردو انتهای ژن، این قطعه به کمک آنزیم T4 لیگاز به T وکتور خطی pTZ57R اتصال یافت. میزان معین و

مناسب از نمونه مورد نظر (به عنوان مثال: ۵ میکرولیتر از مخلوط ligation) به ۵۰ میکرولیتر سلول مستعد که روی یخ قرار دارد اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ در یخچال نگه داری شد. سپس به مدت ۹۰ ثانیه میکروتیوپ را در بن ماری (Grant Instrument) با دمای ۴۲ درجه سانتی گراد حرارت داده و دوباره روی یخ قرار گرفت. پس از گذشت ۲ دقیقه به سلول ها یک میلی لیتر محیط LB برات (Sigma، آمریکا) اضافه و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه (Stuart) شد تا باکتری ها رشد کنند. در آخر ۶۰ میکرولیتر از محیط مایع بر روی پلیت آگار حاوی آنتی بیوتیک و مواد مناسب کشت داده شد تا باکتری های نو ترکیب و حاوی وکتور رشد کنند.

با انجام مراحل ترانسفرم در سویه *DH5α* از بین کلونی های سفید و آبی؛ کلونی های سفید مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور کلونی ها به روش کلونی PCR ارزیابی شدند و از کلونی هایی که مثبت بودند استخراج پلاسمید صورت گرفت. سپس این پلاسمید ها به وسیله ی آنزیم Pst1 برش داده شد. این آنزیم دارای یک جایگاه برش بر روی T وکتور و یک جایگاه برش Pst1 نیز بر روی پرایمر (-Stop) xylC-R می باشد. بنابراین ابتدا و انتهای قطعه توالی یکسانی داشته و قطعه می تواند در دو جهت قرار گیرد. برای تشخیص صحت قرارگیری قطعه در جهت مناسب (هم جهت با ژن lacZ) از روش همضم آنزیمی می توان استفاده کرد. بخش MCS (Multiple Cloning Site) این T وکتور و ابتدای قطعه مورد نظر ما جایگاه برش آنزیم pst1 (Fermentas) وجود دارد. زمانی که قطعه خلاف جهت متصل شده باشد این دو جایگاه با فاصله ۲۶ نوکلئوتید در کنار هم قرار می گیرند و با برش توسط این آنزیم وکتور بر روی ژل به صورت تک باند و خطی دیده می شود. اگر قطعه در جهت lacZ قرار گرفته باشد فاصله دو جایگاه به اندازه قطعه یعنی ۱۷۴۰ نوکلئوتید خواهد بود. بنابراین بر روی ژل دو باند مشاهده خواهد شد که شامل بدنه ی وکتور و قطعه ی کامل Xyl BC(-Stop) می باشد. برش دیگر این وکتور با آنزیم BamHI (Fermentas) و EcorI (Fermentas) حضور قطعه (با هر جهتی) در وکتور را تایید شد.

پس از تایید اولیه ی قطعه، وکتور pTZ57R.xylBC(-Stop) با آنزیم HindIII و NcoI برش خورده و قطعه ژن xylB,C از روی ژل آگارز استخراج شد. سپس در وکتور بیانی pET26 کلون شد و پس از انجام مرحله ترانسفرم در باکتری DH5، کلونی های رشد یافته بر روی پلیت حاوی کانامیسین کشت داده و مراحل تایید آن با PCR انجام شد. پلاسمید از باکتری هایی که کلونینگ موفق داشتند استخراج و به باکتری بیانی Bl21-Rosetta منتقل شد.

بیان پروتئین: در این روش با مقایسه نمونه باکتری های کشت داده شده در محیط LB به دو صورت القا شده و القا نشده، می توان به بیان آنزیم مورد نظر پی برد. برای این منظور باکتری نو ترکیب به همراه نمونه شاهد (سویه وحشی بدون وکتور) کشت داده و در تراکم سلولی 0.7×10^6 OD₆₀₀ مورد القاء با IPTG 1mM (Sigma، آمریکا) قرار گرفت. برای بررسی میزان بیان و یا عدم بیان پروتئین در ساعات های مختلف، نمونه برداشته و به میکروتیوپ ۱/۵ منتقل و سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد رسوب باکتری برای ژل SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت. رسوب باکتری ها بر اساس میزان جذب با بافر نمونه مخلوط و ۱۰ دقیقه در آب جوشانده شد. پس از جوشیدن، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در در چاهک های ژل SDS (Merck، آلمان) ریخته شد. سپس ژل به جریان برق با قدرت ۱۲۰ ولت متصل شد. با خارج شدن بافر نمونه از ژل و مشاهده اولین باند نشانگر پروتئین در پایین ژل می توان جریان برق را قطع و ژل را جدا نمود. به منظور تهیه ۱۰ میلی لیتر بافر نمونه، ۵ میلی لیتر بافر ژل بالا، ۲/۵ میلی لیتر گلیسرول (Merck، آلمان) ۱۰۰ درصد، ۰/۵ گرم پودر SDS و ۱ میلی لیتر ۲- مرکاپتواتانول (Sigma، آمریکا) به کمک آب دیونیزه به حجم رسانده شد. میزانی از پودر بروموفنول بلو حل شد تا رنگ محلول به آبی تیره تغییر کند.

نسبت بافر نمونه: ۵۰ میکرولیتر بافر نمونه به ازای رسوب یک میلی‌لیتر باکتری با تراکم سلولی یک در OD₆₀₀ مورد استفاده قرار گرفت.

در این پژوهش، پس از کشت و القای سویه نوترکیب در حجم ۱۰ میلی‌لیتر به رسوب باکتری ۱۰ میلی‌لیتر بافر NPI با pH: ۸ اضافه و به خوبی مخلوط شد. سپس مخلوط با توجه به بیان سطحی آنزیم سوسپانسیون باکتری بدون این که سونیکه شود برای بررسی فعالیت آنزیم بیان شده مورد مطالعه قرار گرفت. تهیه بافر 10-NPI سدیم کلرید (Merck، آلمان) ۳۰۰ میلی‌مولار، مونو سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار و ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار را شامل می‌شود. برای تهیه ۵۰ میلی‌لیتر از این بافر ۰/۳۹ گرم (Merck)، آلمان) NaH₂PO₄، ۰/۸۷ گرم سدیم کلرید را در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و پس از تنظیم pH با آب به حجم رسانده و اتوکلاو شد.

پس از کشت و القا، به منظور بیان پروتئین مورد نظر، باکتری‌ها رسوب داده می‌شوند. به اندازه حجم کشت اولیه، بافر به رسوب باکتری اضافه و به خوبی مخلوط شد (نوع بافر براساس پروتئین مورد بررسی انتخاب می‌شود). سپس این مخلوط درون بشری که بر روی یخ قرار دارد ریخته و سونیکه شد. سپس مخلوط را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده تا پروتئین و سایر اجزا سلول جدا شوند. در این پروژه، پس از کشت و القای سویه نوترکیب در حجم ۱۰ میلی‌لیتر به رسوب باکتری ۱۰ میلی‌لیتر بافر NPI (این بافر حاوی سدیم کلرید ۳۰۰ میلی‌مولار، مونو سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار و ایمیدازول ۱۰ میلی‌مولار می‌باشد. برای تهیه ۵۰ میلی‌لیتر از این بافر ۰/۳۹ گرم NaH₂PO₄، ۰/۸۷ گرم سدیم کلرید را در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و پس از تنظیم pH با آب به حجم رسانده و اتوکلاو می‌شود) با pH: ۸ اضافه و به خوبی مخلوط شد (توصیه می‌شود بافر سرد استفاده شود و تمام مراحل بعدی باید بر روی یخ انجام شود). سپس مخلوط در بشر استریل ۲۵ میلی‌لیتری ریخته و طبق برنامه (۱۹۰ ولت، ۶ ثانیه روشن، ۴ ثانیه خاموش: ۸ دقیقه) سونیکه و سپس ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاوی تمام پروتئین‌های سلول می‌باشد.

۳،۵-دی‌نیترو سالیسیلیک اسید طی واکنش با قند به ۳ آمینو ۵ نیترو سالیسیلیک اسید تبدیل می‌شود. این روش برای تشخیص اکثر قندها استفاده می‌شود. در این روش نمونه‌ی رقیق شده (۱:۱۰) به نسبت ۱:۱ با معرف تازه ساز مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. پس از سرد شدن، جذب نمونه در طول موج ۵۷۵ نانومتر خوانده شد.

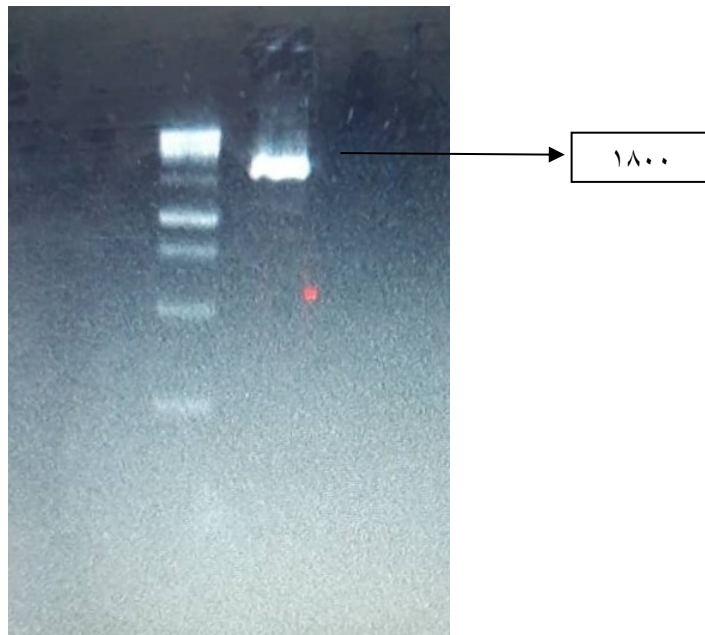
برای بررسی بیان پروتئین هدف پس از کشت ۱۰ میلی‌لیتر از سویه نوترکیب، نمونه‌ها با تراکم سلولی ۱: OD₆₀₀ تهیه شدند. به نمونه‌ها ۱۰ میکرولیتر IPTG (Sigma، آمریکا) اضافه و پس از گذشت ۴ و ۱۷ ساعت از زمان القا، میزان تراکم همه نمونه‌ها در OD₆₀₀ خوانش و به میزان ۱ میلی‌لیتر از آن‌ها رسوب داده شد.

۳- نتایج

کلونینگ ژن xyIB, C در وکتور pET26

پس از تکثیر ژن، این قطعه به کمک آنزیم T4 لیگاز به T وکتور خطی pTZ57R اتصال یافت. در بررسی نتیجه، قطعه‌ای به طول 1800 جفت باز از ژن زایلوزدهیدروژناز تکثیر شد (شکل ۱). با انجام مراحل ترانسفرم در سویه DH5α کلونی‌های سفید-آبی بر روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین، IPTG، X-gal مشاهده شد که کلونی‌های سفید حاکی از وکتور نوترکیب می‌باشد.

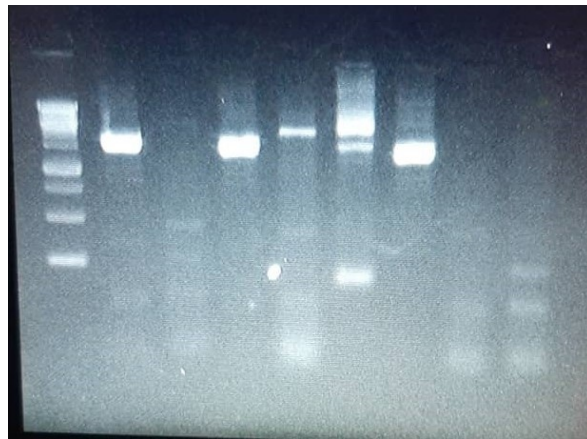
۲ ۱



شکل ۱: ۱-قطعه ی تکثیر شده، ۲- نشانگر ۱ کیلوبازی

برای اطمینان از حضور ژن‌های *xyIB,C* در کلونی‌های سفید با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند که در این بین تکثیر ژن چند کلونی مثبت بود (شکل ۲).

۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱



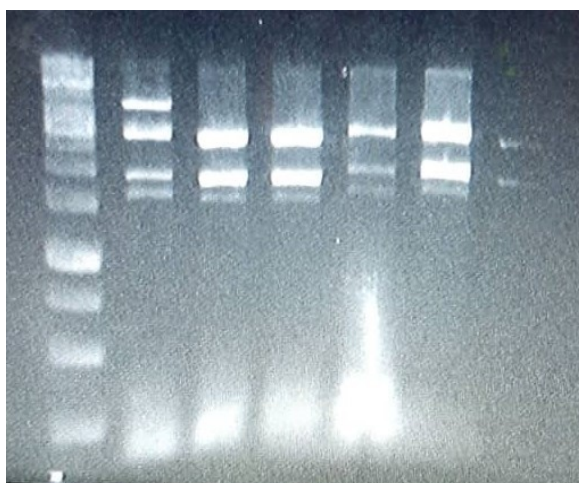
شکل ۲: تایید حضور ژن‌های *xyIB,C* در کلونی‌های سفید با کمک کلنی PCR: ۱ تا ۵-PCR مثبت کلنی ها، ۶- نشانگر ۱ کیلوبازی.

گام بعدی برای تایید حضور قطعه در وکتور استفاده از آنزیم‌های محدود کننده می‌باشد. با برش به‌وسیله‌ی این آنزیم‌ها دو قطعه روی ژل ظاهر می‌شوند که یکی از آن‌ها بدنه وکتور و دیگری *Xyl BC* می‌باشد (شکل ۳).

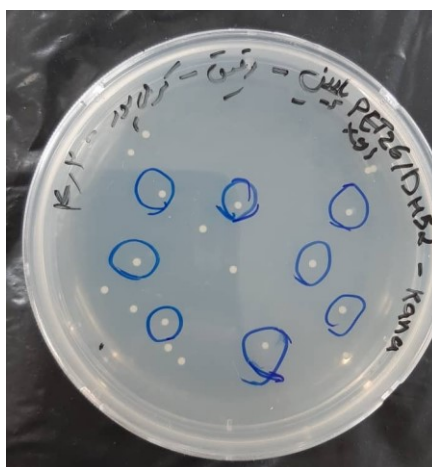
پس از تائید قطعه، وکتور *pTZ57R.xyIBC* با آنزیم *HindIII* و *NcoI* برش خورده و قطعه ژن *xyIB,C* از روی ژل آگارز استخراج شد. سپس در وکتور بیانی *pET26-yiaT* در پایین دست ژن عرض غشایی *yiaT* کلون شد (شکل ۴ و شکل ۶) و پس از انجام مرحله ترانسفرم در باکتری *DH5*، کلونی‌های رشد یافته بر روی پلیت حاوی کانامیسین کشت داده شد (شکل

۴). تصاویر شماتیک این کلونینگ نیز در شکل‌های ۵ و ۶ نمایش داده شده‌اند.

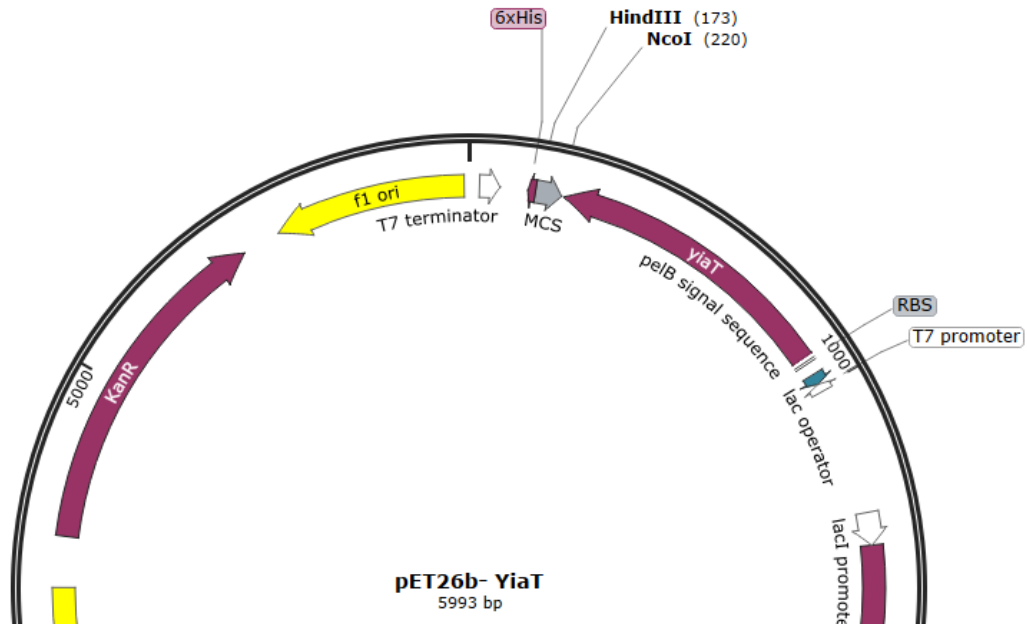
۱



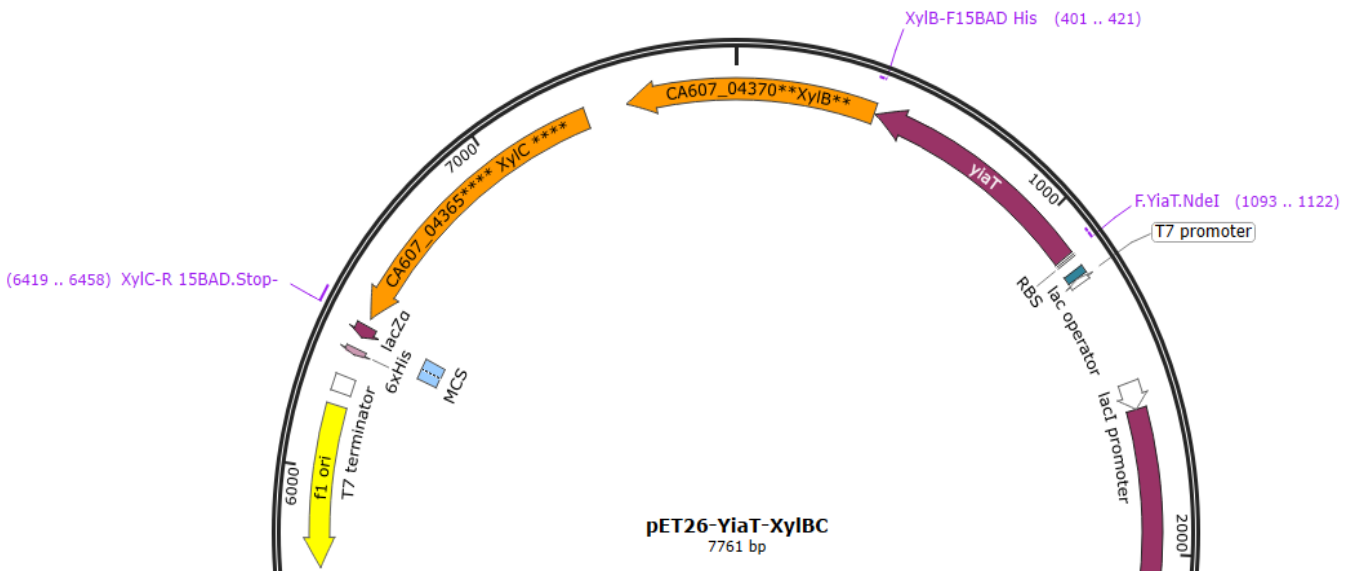
شکل ۳: هضم آنزیمی کلنی‌ها برای اطمینان از حضور ژن‌های xylB,C در کلونی‌های سفید ۲-۷ کلنی‌های برش خورده با آنزیم‌های HindIII و NcoI و جدا شده قطعه ی xylB,C (۱) نشانگر ۱ کیلوبازی.



شکل ۴: پلیت کانامایسین که باکتری‌های نوترکیب حاصل لایگیشن Yia T 26 pET و XylBC، بر روی آن رشد کرده‌اند.



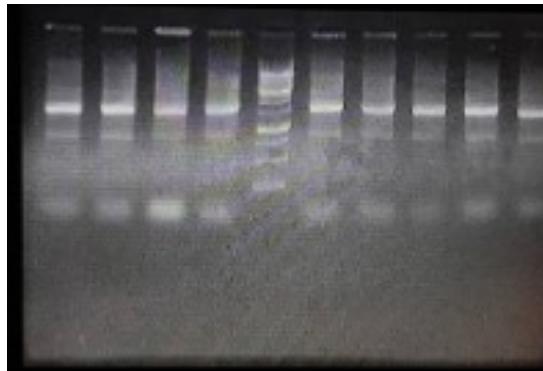
شکل ۵: تصویر شماتیک وکتور pET26b-yiaT و جایگاه آنزیمی کلون کردن قطعه‌ی xylBC.



شکل ۶: تصویر شماتیک وکتور pET26-yiaT-XylBC حاصل از کلون کردن ژن‌های xylBC در وکتور pET26b-yiaT.

سپس وکتور pET26-yiaT-XylBC از باکتری DH5 استخراج شده و در باکتری *E.coli-Rosetta* و *E.coli-B121* ترانسفورم شد و به‌وسیله‌ی PCR به وسیله‌ی پرایمرهای عمومی T7 پروموتور و ترمیناتور، تایید حضور وکتور و قطعه انجام گرفت (شکل ۷).

1 2 3 4 10 5 6 7 8 9



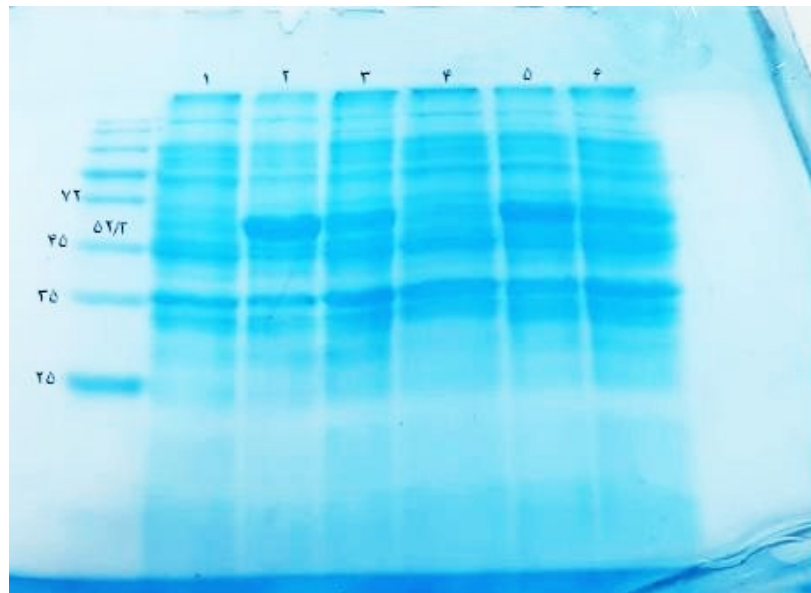
شکل ۷: تست PCR کلنی‌های ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب pET26-yiaT-XylBC کد کننده ی ژن yiaT-xylB

۱ تا ۵) باکتری *E. coli-Rosetta* ترانسفورم شده با پلاسمید pET26-yiaT-XylBC ، ۶ تا ۹) باکتری *E. coli-BL21* ترانسفورم شده با پلاسمید pET26-yiaT-XylBC (۱۰ نشانگر یک کیلو بازی.

بیان پروتئین هدف

بیان پروتئین زایلوز دهیدروژناز به همراه قطعه ی YiaT مجموعاً با وزن مولکولی ۵۲/۲ کیلو دالتون در عصاره سلولی سویه‌های بیانی *E. coli Rosetta*، *E. coli BL21* و سویه ی غیربیانی *E. coli DH5* به عنوان کنترل منفی مورد بررسی قرار گرفت.

همان‌طور که مشاهده می‌شود xylB به همراه قطعه ی YiaT مجموعاً با وزن مولکولی ۵۲/۲ کیلو دالتون (XDH = ۲۶/۶ KDa) در سویه‌های *E. coli Rosetta*، *E. coli BL21* چهار ساعت و ۱۶ ساعت پس از القا به‌طور مشهودی بیان نشان می‌دهد (شکل ۸).



شکل ۸: بیان XylC و XylB به همراه YiaT شماره ۱ و ۲: القا و بیان طی ۴ ساعت، شماره ۳ و ۴: القا و بیان طی ۱۷ ساعت (اورنایت)

۱، ۴) *E. coli DH5*، ۲، ۵) *E. coli Rosetta*، ۳، ۶) *E. coli BL21*.

XylB به همراه YiaT در عرض ۴ ساعت و در باکتری *E. coli-Rosetta* و *E. coli-B121* بیان مشهودی دارند.

واحد آنزیمی یعنی مقدار آنزیمی که در یک دقیقه، یک ماکرومول سوبسترا را به فرآورده تبدیل می‌کند. با استفاده از نمودار استاندارد، غلظت NADH تولید شده در هر نمونه بر اساس میزان جذب خوانش شده آن به دست می‌آید و سپس با در نظر گرفتن وزن مولکولی NADH میزان ماکرومول آن حساب می‌شود که برابر واحد آنزیمی می‌باشد. در نهایت با احتساب میزان رقیق سازی مقدار واحد آنزیم مشخص می‌شود. (MW NAD⁺ : 663/43 g/mol)

۴- بحث

از سال ۲۰۰۳ تاکنون گروه‌های مختلف در جهان برای تولید زایلونات که کاربرد فراوانی در صنایع دارد، سویه‌های میکروبی و قارچی را طراحی کردند. تولید زیستی این محصول نیازمند آنزیم زایلوز دهیدروژناز که در میکروارگانیسم‌های گوناگون با فعالیت کاتالیتیکی مشابه یافت می‌شود. تا به امروز XDH و زایلونولاکتوناز سویه *C. crecentus* در مطالعات مولکولی مورد بررسی و بهره برداری قرار گرفته است و به‌عنوان کارآمدترین نوع این آنزیم‌ها شناخته شده است و اکثر گروه‌ها از توالی ژنی این سویه برای ساخت مسیر متابولیسمی خود استفاده کردند. مقایسه‌ی ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی این ژن‌ها در سویه‌ی *کلوباکتر ویبریوئیدس* NA1000 از طریق NCBI مورد بررسی قرار گرفت نشان دهنده‌ی شباهتی قریب به ۹۸ درصد می‌باشد. بدین ترتیب در این پژوهش از ژن‌های سویه‌ی اخیر استفاده شد.

ساخت مسیر تولید زایلونات در سویه‌های مختلف *ای.کلی* به دلیل وجود انتقال دهنده زایلوز و سرعت بالا رشد و تخمیر، مورد هدف بسیاری از گروه‌ها قرار گرفته است. در این میان آقای فراس XDH سویه *P. fragi* را در سویه *adH5* و آقای والدوزا (17) XDH سویه *C. crecentus* را در سویه *W3110* بیان کردند. آقای کائو (5) این مسیر را در سویه *BL21* مهندسی کردند. آقای کائو بیان می‌کند این سویه برخلاف خانواده *E. coli K12* به دلیل دارا نبودن ژن *yagF/yjhG* قادر به مصرف زایلونات به‌عنوان منبع کربن نمی‌باشد و همچنین ژن جهش یافته *rne* پروتئین RNase E کوتاه شده‌ای را کد می‌کند که توانایی تخریب mRNA را ندارد. بنابراین منجر به ماندگاری mRNA و بیان پروتئین می‌شود. در اکثر این گروه‌ها بجز آقای والدوزا از وکتورهای با پرموتر T7 استفاده شده است.

از سوی دیگر تبدیل زیستی اجزای زیست توده توسط تثبیت شده به‌عنوان یک روش موثر و امیدبخش برای تولید پایدار ترکیبات شیمیایی ارزشمند در شرایط واکنش ملایم ارائه شده است (۱۸ و ۱۹). استفاده از گلوکز دهیدروژناز و زایلوز دهیدروژناز (XDH) به این دلیل مورد توجه است که این آنزیم‌های وابسته به NAD⁺ به ترتیب تبدیل گلوکز به گلوکونیک اسید و زایلوز به زایلونیک اسید با کاربردهای صنعتی را کاتالیز می‌کنند (20 و 21).

در این پروژه با مقایسه کار گروه‌های مختلف طراحی این مسیر با استفاده از *xyIB,C* سویه *کلوباکتر ویبریوئیدس* CB1 که توالی آن کاملاً مشابه NA1000 می‌باشد در سویه *ای.کلی* انجام شد. بر خلاف دیگر پروژه‌ها که *xyIB,C* را با واسطه‌ی وکتور بیانی pET و به‌صورت بیان درون سلولی انجام داده بودند در این پژوهش بیان همراه با YiaT به‌عنوان یک پروتئین عرض‌غشایی صورت گرفت. بدین صورت که از pET وکتور دارای YiaT استفاده شد تا زایلوز دهیدروژناز تولید شده به سطح سلول رفته و در آن‌جا فعالیت خود را نشان دهد.

بیان خارج سلولی به صورت سطحی مشابه بیان موفقیت آمیز لیپاز فعال در سطح سلول توسط Mee-Jung و همکاران (22)، الگوبرداری شد. الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات - پلی آکریل آمید، لکه گذاری وسترن، میکروسکوپ ایمونوفلورسانس و اندازه گیری فعالیت آنزیم کل سلولی بیان پروتئین های ادغامی را بر روی سطح/اشریشیا کلی تایید کرد (22).

بر همین اساس و با توجه به این که در پژوهش حاضر نیز پروتئین بیان شده فعالیت آنزیمی قابل اندازه گیری دارد از سلول کامل برای این منظور استفاده شد و فعالیت تشکیل کامل مشهود قابل اندازه گیری بود و با توجه به وزن مولکولی پروتئین بیان شده در ژل SDS-PAGE که کاملاً تایید می کرد که این دو پروتئین به صورت ادغامی ظاهر شده اند همه موید این بود که بیان صورت گرفته مشابه تیم های تحقیقاتی دیگر سطحی بوده و می تواند به خوبی سوبسترا را به زایلونیک اسید تبدیل کند.

همان طور که بیان شد با توجه به بیان سطح سلولی لیپاز فعال که بدون نیاز به شکستن سلول فعالیت آنزیم قابل محاسبه بود، سوبیه ی تولید کننده ی زایلوزدهیدروژناز نیز پس از القای بیان و اطمینان از تولید پروتئین فیوز شده با YiaT با وزن مولکولی متناظر با آن (۵۲/۲ کیلودالتون) که در نتایج SDS-PAGE مشاهده شد، فعالیت آنزیمی باکتری هضم نشده بررسی شد.

بررسی فعالیت آنزیم بر اساس خوانش جذب NADH در 340nm انجام و مقادیر و روش کار طبق مقاله آقای کائو محاسبه شد (۶). در این آزمایش با اضافه شدن سوبسترا به سوسپانسیون سلولی به همراه افزودن NAD^+ جذب در طول موج 340 نانومتر به سرعت و میزان بالایی نمایان شد که بیان گر تولید NADH به عنوان محصول جانبی تبدیل زایلوز به زایلونات می باشد.

طبق داده های طول موجی، هر سه نمونه که شامل دو نمونه Ros و یک نمونه BL21 بودند در ۳۴۰ نانومتر در یک دقیقه جذب داشتند (به ترتیب ۰/۸، ۰/۱۹ و ۰/۸۵) که به وضوح نشان دهنده ی فعالیت آنزیم در سطح سلول می باشد.

پژوهش های انجام شده جهت بیان درون سلولی زایلوزدهیدروژناز نشان می دهند که در ساعت اول به دلیل حضور آنزیم با میزان بیان بالا و فعال نبودن مسیر کاتابولیسم، زایلوز به سرعت به زایلونات تبدیل می شود. اما با گذشت زمان و فعال شدن مسیرهای فرعی مصرف زایلوز افزایش و تولید زایلونات در رقابت با دیگر آنزیم ها کاهش می یابد. به نظر می رسد با افزایش بیان دو آنزیم مسیر رقابتی مصرف زایلوز یعنی XylA و XylB این قند پس از تبدیل به زایلولوز توسط زایلوز ایزومراز و زالوکیناز، وارد چرخه پنتوز فسفات و گلیکولیز شده و تولید و تجمع استات، گلایکول آلدهید، گلایکولات و زایلونات باعث کاهش pH محیط، رشد باکتری و فعالیت آنزیم می شود.

اما طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش، با انتقال زایلوز دهیدروژناز به سطح سلول، دیگر مشکل ورود زایلوز به مسیرهای فرعی و کاهش pH محیط که باعث کاهش بازدهی می شود را نخواهیم داشت. مشاهدات پژوهش حاضر نیز موید عدم کاهش در میزان فعالیت آنزیم بیان شده در سطح باکتری در بازه ی زمانی مشابه می باشد.

۵- نتیجه گیری

ترکیب 1,2,4-Butantriol (BT) یک پلی ال چهار کربنه با سه گروه هیدروکسیل آب دوست است. به عنوان یک ماده شیمیایی کارآمد، BT کاربردهای همه جانبه ای در زمینه های مختلف دارد.

از لحاظ سنتزی تا به امروز ۲ روش سنتزی شامل یک روش بر پایه تولید شیمیایی و دیگری، روش بر پایه تولید زیستی برای الکل BTO در مقالات و اختراعات بین المللی ارائه شده است

اما در اقتصادی ترین و معمول ترین روش تولید شیمیایی ترکیب BTO، ترکیب دی و ال مالیک اسید استری شده، توسط ترکیب سدیم بورهیدرات (NaBH₄) احیا و ترکیب BTO تولید می شود.

واکنش احیای اسید مالیک در مجاورت NaBH₄ جهت تولید الکل BTO به دلایل مختلف از راندمان کمی برخوردار است از سوی دیگر به دلیل چالش های پیش روی سنتز شیمیایی الکل BTO، چندی است که محققین حوزه زیستی به فکر تولید این ماده از طریق فرایند زیستی افتاده اند.

۶- منابع

1. Escorcia AM, van Rijn JP, Cheng GJ, Schrepfer P, Brück TB, Thiel W. Molecular dynamics study of taxadiene synthase catalysis. *Journal of Computational Chemistry*. 2018;39(19):1215-25.
2. Ignea C, Pontini M, Motawia MS, Maffei ME, Makris AM, Kampranis SC. Synthesis of 11-carbon terpenoids in yeast using protein and metabolic engineering. *Nature Chemical Biology*. 2018;14(12):1090-8.
3. Oberhauser C, Harms V, Seidel K, Schröder B, Ekramzadeh K, Beutel S, et al. Exploiting the synthetic potential of sesquiterpene cyclases for generating unnatural terpenoids. *Angewandte Chemie International Edition*. 2018;57(36):11802-6.
4. Xu N, Liu Y, Jiang H, Liu J, Ma Y. Combining protein and metabolic engineering to construct efficient microbial cell factories. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;66:27-35.
5. 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. *Scientific reports*. 2015;5(1):18149.
6. Cao Y, Xian M, Zou H, Zhang H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of xylonate. *Plos one*. 2013;8(7):e67305.
7. Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology & Biotechnology*. 2006;44.(۲)
8. Niu W, Molefe MN, Frost J. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1, 2, 4-butanetriol. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(43):12998-9.
9. Chun B-W, Dair B, Macuch PJ, Wiebe D, Porteneuve C, Jeknavorian A, editors. The development of cement and concrete additive: based on xylonic acid derived via bioconversion of xylose. *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*; 2006: Springer.
10. Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass: volume I--results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. *National Renewable Energy Lab.(NREL), Golden, CO (United States)*; 2004.
11. Governo A, Proença L, Parpot P, Lopes M, Fonseca I. Electro-oxidation of D-xylose on platinum and gold electrodes in alkaline medium. *Electrochimica acta*. 2004;49(9-10):1535-45.
12. Gmitter GT. Cellular polyetherurethanes and methods of making same. *Google Patents*; 1964.

13. Shirota K, Fukushima K, Koike S. Ink, ink-jet recording process, and instrument using the ink. Google Patents; 1992.
14. Li X, Chen Y, Nielsen J. Harnessing xylose pathways for biofuels production. *Current opinion in biotechnology*. 2019;57:56-65.
15. Pääkkönen J, Hakulinen N, Andberg M, Koivula A, Rouvinen J. Three-dimensional structure of xylonolactonase from *Caulobacter crescentus*: A mononuclear iron enzyme of the 6-bladed β -propeller hydrolase family. *Protein Science*. 2022;31(2):371-83.
16. Paakkonen J, Penttinen L, Andberg M, Koivula A, Hakulinen N, Rouvinen J, et al. Xylonolactonase from *Caulobacter crescentus* is a mononuclear nonheme iron hydrolase. *Biochemistry*. 2021;60(41):3046-9.
17. Kris Niño G, Valdehuesaa,1, Huaiwei Liua,1, Kristine Rose M. Ramosa, Si Jae Parka, Grace M. Nisola, Won-Keun Leeb, Wook-Jin Chunga. Direct bioconversion of d-xylose to 1,2,4-butanetriol in an engineered *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 2014;49: 25–32.
18. Pongtharangkul T, Chuekitkumchorn P, Suwanampa N, Payongsri P, Honda K, Panbangred W. Kinetic properties and stability of glucose dehydrogenase from *Bacillus amyloliquefaciens* SB5 and its potential for cofactor regeneration. *Amb Express*. 2015;5(1):68.
19. Twala BV, Sewell BT, Jordaan J. Immobilisation and characterisation of biocatalytic co-factor recycling enzymes, glucose dehydrogenase and NADH oxidase, on aldehyde functional ReSyn™ polymer microspheres. *Enzyme and microbial technology*. 2012;50(6-7):331-6.
20. Ferri S, Kojima K, Sode K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases :a bird's eye view of glucose sensing enzymes. *Journal of diabetes science and technology*. 2011;5(5):1068-76.
21. Zdarta J, Pinelo M, Jesionowski T, Meyer AS. Upgrading of biomass monosaccharides by immobilized glucose dehydrogenase and xylose dehydrogenase. *ChemCatChem*. 2018;10(22):5164-73.
22. Mee-Jung H, Lee SH. An efficient bacterial surface display system based on a novel outer membrane anchoring element from the *Escherichia coli* protein YiaT. *FEMS microbiology letters*. 2015;362(1):1-7.