Applied Research in Chemical - Polymer Engineering

Applying a system-oriented method for culture medium design to improve bio-ethanol production by *Synechocystis*

Mohammad Ali Babazadegan[1] and Ehsan Motamedian[1*]

1-Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, P.O. Box 4838-14155, Tehran, Iran.

Abstract

Research subject: The use of genetic engineering tools to produce industrial strains, especially from non-model microorganisms such as cyanobacteria, is always subject to limitations.

Research approach: In this research, a system-oriented method was used to design a culture medium instead of strain designing and its ability to increase ethanol production by Synechocystis sp. PCC 6803 was experimentally evaluated. In this method, compounds are added to the medium to regulate the activity of target enzymes not for the purpose of being consumed by the cells, and thus, the designed culture medium eliminates the intracellular constraints on the production. A metabolic model was used to determine the minimum level of ethanol production and to identify genes that increase or decrease of their expression increase this minimum level. Then, regulators of the enzyme expressed by the target genes were extracted from the Brenda database and their effect on the production was evaluated experimentally and design of experiment was performed to optimize the concentration of the selected compounds.

Main results: Among the compounds identified, two inhibitors (salicylic acid and mercuric chloride) and one activator (pyruvate) were selected to be added to the medium and their concentration was optimized using the central composite design method. The proposed regulatory medium increased the production of ethanol from 352 to 1116 mg/l, indicating the effectiveness of the added regulatory compounds on the cyanobacteria metabolism. The proposed system-oriented method can be used to design medium culture for other important bio-products such as recombinant proteins.

key words

Regulatory culture medium
bio-fuel
activator and inhibitor
Brenda database
design of experiment
genom-scale metabolic model
Synechocystis

Corresponding Author:
Email: motamedian@modares.ac.ir

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

پژوهش‌های کاربردی
مهندسی شیمی - پلیمر

فصلنامه علمی - پژوهشی بین رشته ای
سال سوم، شماره ۲، نسخه ۱
تابستان ۱۳۹۸ ، صفحه ۶۷-۵۵

به کارگیری روش سامانه گرای طراحی محیط کشت برای بهبود تولید زیست‌اتانول توسط سیانوباکتر سینکوسیستیس

محمدعلی بابازادگان[1]، دکتر احسان معتمدیان[1*]

۱ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۱۴-۱۴۱۱۵

چکیـــده

استفاده از ابزارهای مهندسی ژنتیک برای تولید سویه صنعتی خصوصاً از ریزاندام واره‌های کمتر شناخته شده همچون سیانوباکترها همواره با محدودیت‌هایی مواجه است. در این تحقیق، از روش سامانه گرا به کمک دانش بین رشته‌ای زیست‌شناسی سامانه‌ها برای طراحی محیط کشت به جای طراحی سویه استفاده شد و توانمندی آن در افزایش تولید اتانول توسط سیانوباکتر سینکوسیستیس sp. PCC 6803 مورد ارزیابی آزمایشگاهی قرار گرفت. در این روش، مواد با هدف تنظیم فعالیت آنزیم‌های هدف نه با هدف مصرف توسط سلول به محیط کشت افزوده می‌شوند و بنابراین محیط کشت طراحی شده، محدودیت‌های درون سلولی برای تولید محصول زیستی را برطرف می‌کند. مدل متابولیکی برای تعیین حداقل میزان ترشح اتانول و شناسایی ژن‌هایی که کاهش یا افزایش بیان آن ها این حداقل میزان را افزایش می‌دهند، به-کار رفت. سپس، تنظیم کننده‌های آنزیم‌های بیان شده توسط ژن‌های هدف از پایگاه داده Brenda استخراج شد و اثر آن ها بر تولید به طور تجربی ارزیابی شد و طراحی آزمایش برای بهینه‌سازی غلظت ترکیبات انتخاب شده انجام شد. در میان ترکیبات شناسایی شده، دو مهارکننده (اسیدسالیسیک و کلریدجیوه) و یک فعال کننده (پیروات) برای افزودن به محیط انتخاب شدند و غلظت آن ها با استفاده از روش طرح مرکب مرکزی بهینه‌سازی شد. محیط کشت تنظیمی پیشنهادی تولید اتانول توسط سینکوسیستیس را از ۳۵۲ به ۱۱۱۶ میلی‌گرم بر لیتر افزایش داد که نشان دهنده اثربخشی ترکیبات تنظیمی اضافه شده بر سوخت وساز است. روش سامانه گرای پیشنهاد شده می‌تواند در طراحی محیط کشت دیگر محصولات مهم صنعت زیست‌فناوری کشور همچون پروتئین‌های نوترکیب کاربرد داشته باشد.

کلمـات کلیـدی

محیط کشت تنظیمی
سوخت زیستی
فعال کننده و ممانعت کننده
پایگاه داده Brenda
طراحی آزمایش
مدل متابولیکی مقیاس ژنوم
سیانوباکتر سینکوسیستیس

*مسئول مکاتبات:
motamedian@modares.ac.ir

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

۱ مقدمه

بازار جهانی مواد شیمیایی زیست بنیان در سال ۲۰۱۰ بالغ بر ۱۵۰ میلیارد دلار بوده است که حدود ۵ درصد از بازار کل مواد شیمیایی را شامل می‌شود (Otero and Nielsen ۲۰۱۰). پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهد که بازار مواد شیمیایی زیست‌بنیان تا سال ۲۰۲۵ به بالغ بر ۶۱۴ میلیارد دلار خواهد رسید و سهم آن از بازار کل مواد شیمیایی به بیش از ۲۰ درصد می‌رسد. سرمایه‌گذاری در اقتصاد زیستی به قدری سودآور است که پیش بینی می شود در سال ۲۰۲۵ هر یک یورو سرمایه ذاری در تولید فراورده های زیست بنیان حدود ۱۰ یورو ارزش افزوده تولید می‌کند. به همین دلیل، صنایع فعال در حوزه فرآورده‌های زیستی در اروپا به تنهایی بالغ بر ۲٫۸ میلیارد یورو برای پژوهش در این زمینه سرمایه‌گذاری کرده‌اند. همچنین در ایران، طبق برآورد سند ملی زیست‌فناوری مصوب مورخ ۱۳۸۴/۲/ ۱۹ هیئت وزیران، ارزش فرآورده‌های زیستی بالغ بر ۴۰۰ میلیون دلار بوده و مقدار ناچیزی از آن صادر شده است. به استناد این سند ملی، ارزش فرآورده‌های زیستی در بلند مدت باید به ۱٫۲ میلیارد دلار برسد و ایران باید به ۳ درصد از بازار زیستی جهان دست بیابد و ۳۰ درصد از فرآورده‌های شیمیایی خود را با استفاده از زیست‌فناوری تولید کند. ۳ درصد از بازار زیستی معادل حدود ۲۰ تا ۳۰ میلیارد دلار است. دستیابی به این اهداف در برنامه چشم‌انداز ۱۴۰۴ با بهبود فرایندهای زیستی و قابل رقابت آ ن ها با روش‌های شیمیایی امکان‌پذیر است. توسعه سویه‌ها و تولید محیط کشت صنعتی مناسب برای تولید مواد شیمیایی یکی از اصلی‌ترین مباحث بالادستی در زیست-فناوری است که می‌تواند به بهبود فرایندهای زیستی منجر شود.

چالش اساسی برای بهبود خواص و بهره‌وری ریزاندام وارهها، شناسایی مولکول هدف برای دستکاری هدفمند مسیرهای بیوشیمیایی است (Stephanopoulos ۱۹۹۹). در این راستا، مهندسی متابولیک سامانه-گرا (Systems Metabolic Engineering) به عنوان راهکار در سطح سامانه برای اصلاح مسیرهای سوخت-وساز با استفاده از داده‌های امیکس (Omics Data) و روش‌های محاسباتی زیست‌شناسی سامانه‌ها (Systems Biology) ارائه شده است (Lee et al ۲۰۱۲). روش‌های طراحی گونه که بر اساس مدل‌سازی بر پایه محدودیت (Constraint Based Modeling) و مدل‌های متابولیکی مقیاس ژنوم (Genome-Scale Metabolic Models) توسعه یافته‌اند، نمونه‌ای موفق از تلاش‌ها در این زمینه تحقیقاتی هستند (Liu et al، ۲۰۱۵). اگر توالی ژنوم وجود داشته باشد، این روش محاسباتی را می‌توان برای مطالعه حتی اندام-وارههای غیر مدل (Non-Model Microorganism) استفاده کرد (Yan and Fong، ۲۰۱۷). از این رو، مهندسی متابولیک ریزاندام وارههای غیر مدل همچون سیانوباکترها امکان پذیر بوده و این زمینه تحقیقاتی، علاقه‌مندی‌های فراوانی را به خود جلب کرده است. سیانوباکترها در رشد فتواتوتروفی، برای تبدیل دی-اکسیدکربن به پیش‌سازهای ضروری در طی فرایند فتوسنتز، انرژی‌شان را از نور خورشید و الکترون مورد نیاز را از آب می‌گیرند. این امر بیانگر این مسئله است که سیانوباکترها برای رشد خود به مواد ساده و کم-ترین هزینه نیاز دارند. بنابراین، مهندسی کردن سیانوباکترها و تبدیل شدن آن ها به کارخانه‌های سلولی میکروبی (Microbial Cell Factory) برای تولید مواد زیست شیمیایی رویکردی نویدبخش در توسعه انرژی‌های پایدار است. اصلی‌ترین چالش در به کارگیری سیانوباکترها در مقیاس تجاری، بازده تولید پایین در آن هاست. اصلاحات اساسی برای اینکه کارخانه‌های سلولی سیانوباکترها به حالت تجاری درآید و تولید محصولات سازگار با محیط زیست داشته باشند، لازم است (Rosgaard et al ۲۰۱۲).

با این حال، توسعه سویه‌های غیر مدل همچون سیانوباکترها عمدتاً به دلیل کمبود ابزارهای مهندسی ژنتیک، پیشرفت کمی داشته است. در واقع، دستکاری ژنتیکی ریزاندام وارههای غیر مدل هنوز به دلیل تفاوت‌های جزئی موجود در اندام وارهها با مشکلاتی مواجه است که مانع استفاده از ابزارهای ژنتیکی مولکولی برای همه اندام وارهها می‌شود. دست‌ورزی ژنتیکی و استفاده از ابزارهای مهندسی ژنتیک کار چندان ساده‌ای نیست و احتمال اثربخش نبودن دست‌ورزی وجود دارد. به‌علاوه ابزارهای دست ورزی ژنتیکی برای همه باکتری‌ها و قارچ‌ها در دسترس نیست. برخی از مشکلات دست‌ورزی عبارتند از توسعه راهکار کارآمد برای انتقال ژن، فقدان پلاسمید پایدار با تعداد کپی بالا، مقاومت برخی از ریزاندام وارههای غیر مدل به آنتی‌بیوتیک‌های عمومی موجود در آزمایشگاه‌ها، و پیش‌بینی مناطق پروموتر برای اندام-وارههای غیر مدل (Yan ،۲۰۱۷ ; Löbs et al،۲۰۱۷ and Fong). هدف قرار دادن چندین ژن در یک اندام واره اغلب برای مهندسی متابولیک مطلوب است، که مشکل را پیچیده‌تر می‌کند. علاوه بر این، استفاده از اندام وارههای اصلاح ژنتیکی شده و تراریخته توسط انسان، هنوز موضوع بسیار بحث انگیزی است (de Moreno de LeBlanc et al، ۲۰۱۵).

سلول‌ها همواره با دو محدودیت داخل سلولی و خارج سلولی برای تولید مواجه هستند. با توجه به محدودیت‌های دست‌ورزی ژنتیکی، برخی محققان تنها نیازهای تغذیه‌ای ریزاندام وارهها که همان

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

محدودیت‌های خارج سلولی هستند را برای تولید بیشتر محصول مطلوب با استفاده از فنون زیست شناسی سامانه‌ها مورد مطالعه قرار داده‌اند و محیط کشت تعریف شده شیمیایی (Chemically Defined Medium: CDM) را توسعه داده‌اند. در واقع، آن ها ترجیح دادند که تولید را با حذف محدودیت‌های خارج سلولی و نیازهای تغذیه‌ای به جای دستکاری در مسیرهای متابولیک داخل سلولی بهبود بخشند. به عنوان مثال، سونگ و همکاران (Song et، ۲۰۰۸ al) از شبکه متابولیکی مقیاس ژنوم و تجزیه و تحلیل موازنه شار (FBA) (Orth et al، ۲۰۱۰) برای توسعه CDM برای ریزاندام واره غیر مدل Mannheimia succiniciproducens از طریق شناسایی ترکیبات غذایی ضروری برای رشد سلول استفاده کردند.

در این تحقیق، روش جدید طراحی محیط کشت تعریف شده تنظیمی (Regulatory Defined Medium: RDM) به عنوان روش جایگزین پیشنهادی برای حل چالش دستکاری ژنتیکی توسعه داده ایم. در حقیقت، تلاش کرده‌ایم تا راهکاری ارائه کنیم که محدودیت‌های داخل سلولی برای تولید را با اضافه کردن ترکیبات به محیط کشت خارج سلولی به جای دستکاری ژنتیکی برطرف کنیم. اینکار تاکنون با رویکرد سامانه گرا در دنیا انجام نشده است. در این روش، ژن‌های کلیدی برای بهبود عملکرد سلولی با استفاده از الگوریتم ادغام مدل متابویکی مقیاس ژنوم با داده‌های بیان ژن به نام TRFBA (Motamedian et، ۲۰۱۶ al) تعیین می‌شوند. سپس، ترکیبات جدیدی به محیط کشت اضافه می شوند که نه به عنوان مواد مغذی بلکه به‌عنوان تنظیم کننده‌های (فعال کننده‌ها یا مهارکننده‌ها) آنزیم‌های بیان شده توسط ژن های هدف عمل می‌کنند. این روش بر روی سیانوباکتر سینکوسیستیس sp. PCC 6803 اجرا شد تا توانایی روش در بهبود تولید اتانول مورد بررسی قرار گیرد. حداقل میزان تولید اتانول در نرخ‌های جذب گلوکز مختلف محاسبه شد و سپس، حذف ژن‌هایی که موجب افزایش یا کاهش قابل ملاحظه تولید اتانول می‌شوند، شناسایی شد و آن ژن‌ها به ترتیب به عنوان ژن‌های کلیدی برای افزایش یا کاهش فعالیت تعیین شدند. تنظیم کننده‌های آنزیم‌های تولیدی توسط ژن‌های هدف از پایگاه داده Brenda استخراج و آزمایش شدند. در نهایت، طراحی آزمایش (DOE) برای بهینه‌سازی غلظت هر ترکیب افزوده شده، به کار رفت.

۲ مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد و روش‌های محاسباتی

۲-۱-۱ مدل متابولیکی

در این پژوهش، مدل iJN۶۷۸ (Nogales et al، ۲۰۱۲) شامل ۶۷۸ ژن، ۷۹۵ متابولیت و ۸۶۳ واکنش با-توجه به ارزیابی اولیه در توانمندی مدل برای پیش‌بینی رشد، استفاده شد. مدل مورد استفاده فاقد واکنش تولید اتانول بود که این واکنش به مدل افزوده شد. به منظور اجرای مدل و حل معادلات آن، از نرم افزار MATLAB و جعبه‌ابزارهای COBRA و SBML و بسته نرم‌افزاری GLPK استفاده شد. برای طراحی آزمایش نیز از نرم‌افزار Design Expert و روش طراحی مرکزی مرکب استفاده شد.

۲-۱-۲ روش سامانه گرا برای طراحی محیط کشت تنظیمی

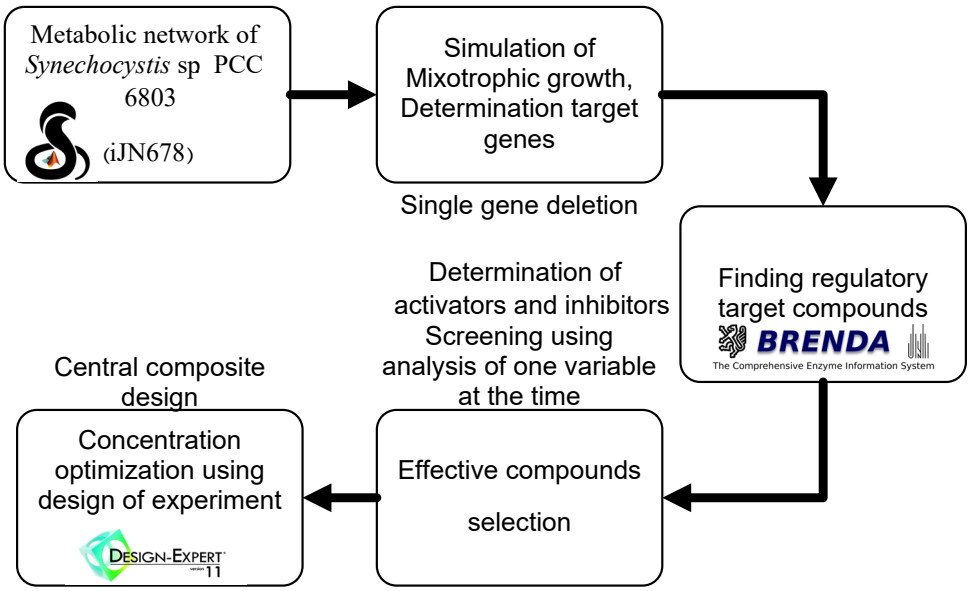
هر دستکاری ژنتیکی‌ای که حداقل تولید اتانول را افزایش دهد، یک هدف مناسب برای بهبود تولید است. از این رو، استراتژی چندمرحله‌ای برای شناسایی ژن‌های مناسب برای افزایش و کاهش بیان و طراحی هدفمند اجزای محیط کشت به کار گرفته شد. شرایط رشد میکسوتروف با در نظر گرفتن گلوکز، بی‌کربنات و فوتون به عنوان منابع کربنی و انرژی شبیه‌سازی شد و میزان جذب اکسیژن برای شبیه‌سازی رشد بی‌هوازی صفر در نظر گرفته شد. سپس، حداکثر نرخ رشد برای گونه طبیعی محاسبه شده و میزان تولید بیومس بر روی ۹۰ درصد رشد بهینه محدود شد. با تغییر تابع هدف به واکنش تولید اتانول، حداقل اتانول تولیدی برای گونه طبیعی محاسبه شد. در ادامه، برای تعیین تأثیر هر یک از ژن‌ها بر رشد و افزایش یا کاهش تولید اتانول، آزمون حذف ژن به کار گرفته شد و نسبت حداقل تولید اتانول ($f_{ethanol}$) مطابق روش فوق برای گونه حذف ژن شده به گونه طبیعی محاسبه شد.

$$f\text{ethanol} = \frac{\text{حداقل نرخ تولید اتانول در گونه حذف ژن شده}}{\text{حداقل نرخ تولید اتانول در گونه طبیعی}}$$

مقدار $f_{ethanol}$ بیشتر (کم تر) از یک برای هر ژن نشان می‌دهد که حذف آن منجر به افزایش (کاهش) میزان تولید اتانول می‌شود و آن ژن مناسب برای حذف (افزایش بیان) است. برای تعیین ژن‌های با بیشترین تأثیر، حدهای ۱/۱ و ۰/۹ برای $f_{ethanol}$ به منظور تعیین ژن‌های هدف برای به ترتیب کاهش و افزایش بیان در نظر گرفته شد. آنزیم‌های بیان شده توسط ژن‌های هدف، تعیین شده و با توجه به مقدار $f_{ethanol}$، ترکیبات فعال کننده یا مهارکننده برای آن ها از پایگاه داده Brenda استخراج شد. ترکیبات پیدا شده ممکن است بر اجزای دیگر سلول تأثیر منفی بگذارد و از این رو، هر ترکیب به طور جداگانه به محیط اضافه شد تا تأثیر آن بر تولید اتانول به صورت تجربی ارزیابی شود. ترکیبات موثر برای استفاده در محیط کشت تنظیمی انتخاب

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

شدند و طراحی آزمایش به کمک روش طراحی مرکب مرکزی برای بهینه‌سازی غلظت هر ترکیب اضافه شده مورد استفاده قرار گرفت. در طراحی آزمایش، غلظت هر ماده در پنج سطح مختلف در نظر گرفته شد. فلوچارت فرایند طراحی محیط کشت تنظیمی پیشنهادی در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱ روش سامانه¬گرای طراحی محیط کشت تنظیمی برای سیانوباکتر سینکوسیستیس ۶۸۰۳ .sp. PCC

Figure 1. Regulatory medium design using a systemic approach for Synechocystis sp. PCC 6803.

۲-۲ مواد و روش‌های تجربی

۲-۲-۱ سویه مورد استفاده و شرایط نگهداری

سیانوباکتر سینکوسیستیس sp. PCC 6803 مورد استفاده در این پژوهش، از شرکت تحقیقاتی آرین گستر خریداری شد و قابلیت تولید اتانول به مقدار کم را دارد. برای اطمینان از عدم آلودگی، سویه به صورت مایع و در شرایط اتوتروف و در محیط کشت BG۱۱ که فاقد منبع کربنی است، رشد داده شد تا به وسیله باکتری یا قارچ آلوده نشود. به دلیل ضعیف بودن دیواره سلولی این سویه، نمونه محیط کشت مایع در شرایط اتوتروف رشد داده و پس از ۴ روز رشد با نوردهی به صورت پیوسته و در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد در شیکر-انکوباتور، برداشت شده و در شرایط بی‌هوازی نگه‌داری می‌شد و همچنین هر ۲ ماه یک بار زیرکشت جدید تهیه می‌شد. نگهداری سویه نیز در دمای محیط و در معرض نور طبیعی خورشید انجام می‌گرفت تا سویه کم ترین میزان رشد ممکن را داشته باشد و زنده نیز بماند.

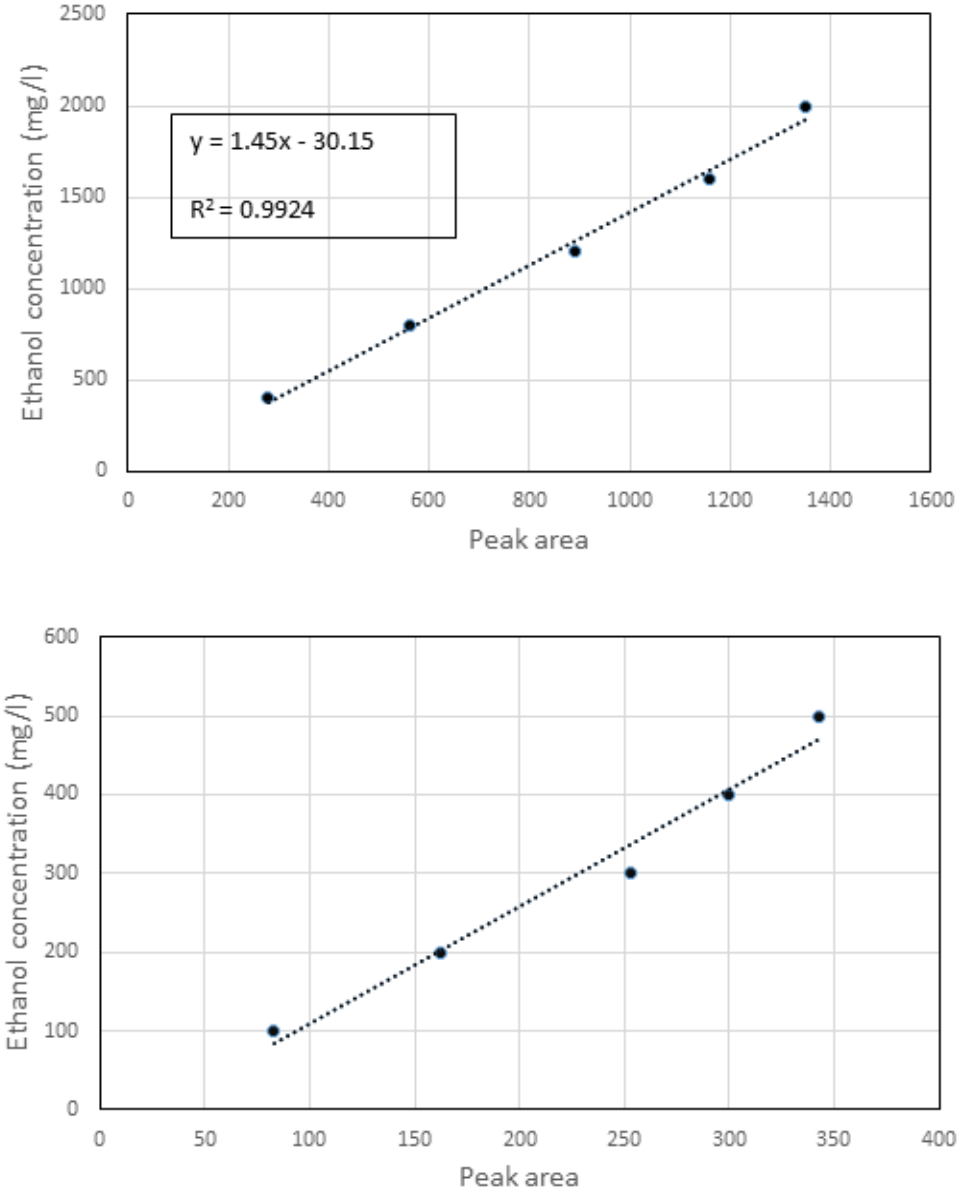
۲-۲-۲ تهیه مایه تلقیح و محیط کشت

از محیط کشت BG۱۱ برای تهیه مایه تلقیح و کشت سیانوباکتر استفاده شد. برای تهیه مایه تلقیح، ابتدا گلوکز به محیط کشت BG۱۱ افزوده شد به طوریکه غلظت نهایی آن ۱ گرم بر لیتر باشد. ۱۹ میلی لیتر از این محیط کشت در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از کشت مایع حاوی سیانوباکتر به آن اضافه شد. محیط کشت به مدت ۴ روز در انکوباتور در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد با دور همزن ۱۵۰ دور در دقیقه و نوردهی پیوسته با شدت ۳۰۰۰ لوکس نگه داری شد. سپس، ۱ میلی لیتر از مایه تلقیح به ۱۹ میلی لیتر محیط کشت BG۱۱ حاوی گلوکز ۱ گرم بر لیتر اضافه می‌شد و در انکوباتور در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد و دور همزن ۱۵۰ دور در دقیقه و نوردهی پیوسته با شدت ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۱۰ روز رشد داده شد. ترکیبات پیدا شده با استفاده از روش سامانه گرا مطابق غلظت‌های به دست آمده از پایگاه داده Brenda به محیط کشت BG۱۱ حاوی گلوکز اضافه شدند.

۲-۲-۳ روش‌های اندازه‌گیری

برای سنجش میزان رشد از دستگاه طیف سنج نوری استفاده شد و کدورت سنجی در طول موج ۷۳۰ نانومتر انجام شد. برای اندازه‌گیری غلظت اتانول از دستگاه سوانگاری (کروماتوگرافی) گازی (GC) استفاده شد. برای تعیین نمودار استاندارد به منظور سنجش غلظت اتانول از روی مساحت زیر قله‌های نمایش داده شده روی دستگاه GC، دو مجموعه نمونه در غلظت کم و زیاد اتانول تهیه شد (شکل ۲). مجموعه اول شامل ۵ نمونه با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر اتانول و مجموعه دوم نمونه‌ها

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]



شکل ۲ نمودار کالیبراسیون دستگاه سوانگاری گازی به منظور سنجش غلظت اتانول در غلظت‌های الف) زیاد و ب) کم.

Figure 2. Calibration curve of GC to measure ethanol concentration at A) high and B) low level.

شامل ۵ نمونه با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اتانول بود.

برای سنجش میزان اتانول از دستگاه GC طیف گستر فراز مدل TG۲۵۵۲ استفاده شد. در این دستگاه، از هیدروژن به عنوان گاز حامل با دبی ۲ میلی‌لیتر در دقیقه با نسبت جداسازی ۱ به ۱۰ استفاده شد. دمای ستون، آشکارساز و محل تزریق به ترتیب ۱۲۰، ۲۵۰ و ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. دبی هیدروژن و هوای استفاده شده برای آشکارساز یون شعله به ترتیب ۳۰ و ۲۰۰ میلی لیتر در دقیقه بود. برای تهیه نمونه از سرنگ گازی با حجم یک میلی لیتر استفاده شده و حجم تزریق ۰/۵ میلی لیتر در نظر گرفته شد.

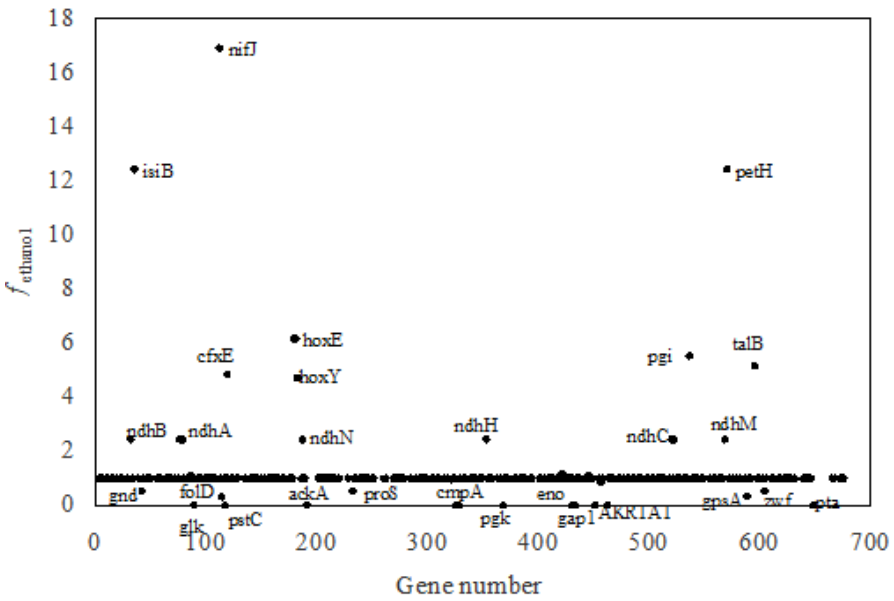
۳ نتایج و بحث

۳-۱ شناسایی مواد موثر

روش سامانه گرای پیشنهاد شده برای شناسایی ژن‌های موثر که حداقل سطح تولید اتانول را بالا می‌برد، مورد استفاده قرار گرفت. شکل ۳ نشان می دهد که حذف اکثر ژن‌ها بر $f_{ethanol}$ موثر نیست.

حذف ژنی که به طور قابل توجهی نرخ رشد را کاهش دهد، مطلوب نیست و بنابراین، ژن‌هایی با نرخ رشد صفر از فهرست گزینه ها حذف شدند. این روش ۱۴ ژن

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]



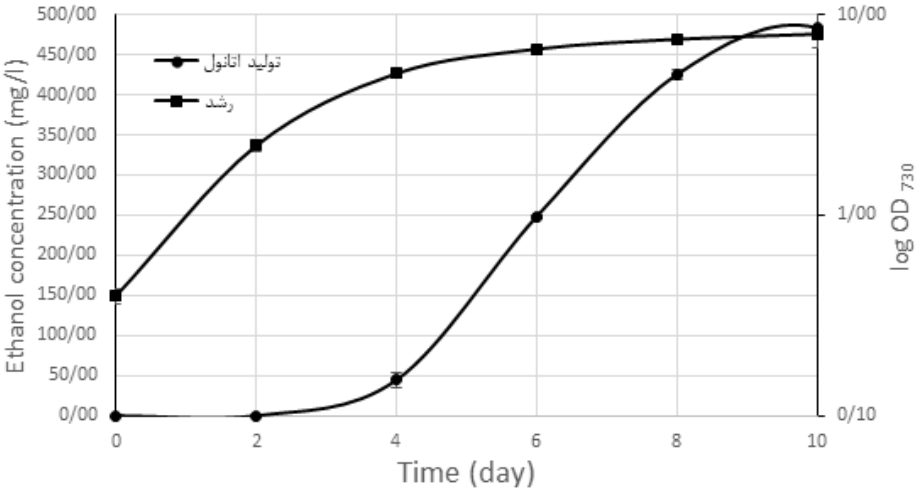
شکل ۳ تأثیر حذف هر ژن بر نسبت تولید اتانول.

Figure 3. Effect of gene deletion on the ethanol production ratio.

یافت که حذف آن ها باعث افزایش نسبت تولید اتانول به بیش از ۱/۱ شد (شکل ۳) و بنابراین، بازدارنده‌های این ژن‌ها از Brenda استخراج شد. اطلاعات این ژن‌ها و مهارکننده‌های آن ها در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج ارائه شده در شکل ۳ و جدول ۱ نشان می‌دهد که ۱۴ ژن وجود دارد که حذف آن ها به طور قابل توجهی باعث کاهش نسبت تولید اتانول به کم تر از ۰/۹ می‌شود. Brenda برای پیدا کردن فعال کننده برای این ژن‌های هدف مورد بررسی قرار گرفت. از میان مواد در دسترس شناسایی شده به کمک Brenda، ماده ای به عنوان فعال‌کننده و پنج ماده به عنوان بازدارنده انتخاب شدند. در جدول ۱ ژن‌های هدف و فعال‌کننده‌ها و بازدارنده‌های آن‌ها معرفی شده‌اند. همچنین غلظت مورد استفاده از هر افزودنی نیز از Brenda استخراج و در جدول ۱ ارائه شده است.

۳-۲ نتایج کشت سیانوباکتر در محیط عاری از افزودنی

نمودار رشد زیست‌توده و تولید اتانول برای سینکوسیستیس در محیط کشت عاری از افزودنی در شکل ۴ ارائه شده است. ملاحظه می‌شود که بعد از ۱۰ روز رشد، سلول به انتهای فاز لگاریتمی و غلظت اتانول به حداکثر میزان ۴۸۴ میلی گرم بر لیتر رسیده است.



شکل ۴ میزان تولید اتانول و رشد سیانوباکتر در محیط کشت عاری از افزودنی.

Figure 4. Ethanol production and growth in an additive-free medium.

۳-۳ ارزیابی تأثیر هر یک از ترکیبات شناسایی شده

به منظور شناسایی اثر هر کدام از فعال‌کننده‌ها و

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

جدول ۱ افزودنی‌های شناسایی¬شده به کمک پایگاه داده Brenda و ژن‌های هدف.
Table 1. Additives identified by Brenda and target genes.

Row	Compound	Target gene	EC number	Concentration (mmol/l)	Predicted effect
1	Pyruvate	pta	2.3.1.8	5	Activator
2	Sodium chloride	nifJ	1.2.7.1	30	Inhibitor
3	Mercury chloride (II)	cfxE	5.1.3.1	0.1	Inhibitor
4	Copper chloride (II)	hoxH	1.12.1.2	0.2	Inhibitor
5	Calcium chloride	ndhB	1.6.5.3	50	Inhibitor
		ndhA			
		ndhI			
		ndhG			
		ndhE			
		hoxF			
		hoxU			
		hoxY			
		ndhH			
		ndhC			
		ndhJ			
6	Salicylic acid	ndhB	1.6.5.3	0.5	Inhibitor
		ndhA			
		ndhI			
		ndhG			
		ndhE			
		hoxF			
		hoxU			
		hoxY			
		ndhH			
		ndhC			

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

جدول ۲. میزان تولید اتانول و رشد سویه در حضور فعال‌کننده‌ها و بازدارنده‌ها
Table 2. Ethanol production and growth in the presence of activators and inhibitors.

Compound	Concentration (mmol/l)	Predicted effect	Produced ethanol (mg/l)	OD730
No additive	-	-	327 ± 3	9.32 ± 0.21
Pyruvate	5	Activator	485 ± 50	8.56 ± 0.2
Sodium chloride	30	Inhibitor	361 ± 9	8.3 ± 0.22
Mercury chloride (II)	0.1	Inhibitor	622 ± 69	8.05 ± 0.39
Copper chloride (II)	0.2	Inhibitor	309 ± 8	9.22 ± 0.27
Calcium chloride	50	Inhibitor	311 ± 11	8.88 ± 0.39
Salicylic acid	0.5	Inhibitor	550 ± 3	8.43 ± 0.17

بازدارنده‌ها در تولید اتانول تأثیر هرکدام به صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان از نتایج، هر کدام از آزمایش‌ها به صورت دو بار تکرار انجام پذیرفت و نتایج حاصل در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به نرخ رشد کم سینکوسیستیس، موادی که افزودن آن ها ممانعت کننده رشد باشد، انتخاب مناسبی حتی در صورتی که تولید اتانول را بهبود دهند، نیست. ملاحظه می‌شود که مواد مورد استفاده تأثیر کمی بر کاهش رشد داشته‌اند. از میان مواد مورد بررسی، سه ماده پیروات، کلریدجیوه (II) و اسیدسالیسیلیک بیشترین تأثیر را در افزایش تولید اتانول داشته‌اند و آن را به میزان به ترتیب ۴۸/۳، ۹۹/۲ و ۶۸/۲ درصد افزایش داده‌اند؛ حال آنکه میزان رشد را به میزان به ترتیب ۸/۲، ۱۳/۶ و ۹/۵ درصد کاهش دادند. تحقیقات پیشین (van der Merwe and Dubery، ۲۰۰۶) نشان می‌دهد که اسیدسالیسیلیک تأثیر بازدارنگی بر تولید آنزیم با کد ۳،۵،۶،۱ داشته که باعث غیر فعال کردن اثر ژن‌های hox و ndh می‌شود و تأثیر این امر در افزایش تولید اتانول در این پژوهش تأیید شد.

۴-۳ تعیین غلظت بهینه مواد با استفاده از طراحی آزمایش

در مرحله بعد به منظور تعیین غلظت بهینه هر کدام از سه ماده انتخابی در محیط کشت، با بهره‌گیری از روش طرح مرکب مرکزی طراحی آزمایش انجام شد. با توجه به تعداد سه متغیر، این طرح در مقایسه با روش فاکتوریل کامل، تعداد آزمایش‌های کم تری را پیشنهاد می‌دهد و در عین حال انحنای مدل نیز سنجیده می‌شود. بازه غلظت مورد استفاده از هر ماده در جدول ۳ آورده شده است. این بازه‌ها با توجه به غلظت‌های پیشنهادی در پایگاه داده Brenda تعیین شده است. در این آزمایش، غلظت هر ماده در پنج سطح مختلف در نظر گرفته شد و با در نظر گرفتن شش آزمایش در نقطه مرکزی، در مجموع ۲۰ آزمایش توسط طرح مرکب مرکزی مطابق جدول ۴، پیشنهاد شد. میزان تولید اتانول به عنوان پاسخ طراحی آزمایش و غلظت

جدول۳ مواد افزودنی به کار رفته در طراحی آزمایش و بازه غلظت آن‌ها.
Table 3. Additive used in the design of experiments and their concentration range.

Compound	Abbbreviation	Predicted effect	EC number	Concentration interval (mmol/l)	
				Low level	High level
Pyruvate	A	Activator	2.3.1.8	0	10
Mercury chloride (II)	B	Inhibitor	5.1.3.1	0	0.1
Salicylic acid	C	Inhibitor	1.6.5.3	0	1

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

زیست توده در این جدول ارائه شده است. همچنین، نتایج برای دو آزمایش کنترل فاقد هرگونه افزودنی در انتهای جدول ۴ ارائه شده است.

همان طور که مشاهده می‌شود، میزان رشد در تمامی آزمایش‌ها نسبت به میزان رشد در محیط کشت کنترل تغییر چشمگیری نکرده و این امر تأیید می‌کند که در طی فرایند رشد سویه، مواد افزودنی نقش تنظیمی داشته‌اند و با کنترل سوخت وساز و نه ترکیبات A تا C به طور معنی‌داری باعث افزایش تولید اتانول شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که تولید اتانول تابعی درجه دو از متغیرها است. همچنین، برهم‌کنش‌های پیروات با کلریدجیوه و کلریدجیوه با اسیدسالیسیلیک معنی‌دار است. بررسی برهم‌کنش ژن cfxE با بازدارنده کلریدجیوه و ژن‌های ndh و hox با بازدارنده اسیدسالیسیلیک به کمک تحلیل حذف ژن دوتایی نشان داد که حذف هم زمان این

جدول ۴ نتایج آزمایش‌های پیشنهادی توسط طرح مرکب مرکزی به همراه دو آزمایش کنترل فاقد هرگونه افزودنی.

Table 4. Results of the proposed experiments by the central composite design with two control experiments without any additives.

Row	Concentration (mmol/l)			Produced ethanol (mg/l)	Biomass OD_{730}
	Pyruvate	Mercury chloride (II)	Salicylic acid		
1	2	0.04	0.2	605	8.56
2	8	0.04	0.2	654	8.45
3	2	0.16	0.2	660	8.93
4	8	0.16	0.2	1012	8.14
5	2	0.04	0.8	632	8.56
6	8	0.04	0.8	629	8.64
7	2	0.16	0.8	658	8.27
8	8	0.16	0.8	1032	8.04
9	0	0.1	0.5	430	9.21
10	10	0.1	0.5	752	8.73
11	5	0	0.5	470	8.78
12	5	0.2	0.5	975	8.31
13	5	0.1	0	723	8.67
14	5	0.1	1	745	8.75
15	5	0.1	0.5	947	8.86
16	5	0.1	0.5	971	9.01
17	5	0.1	0.5	932	8.79
18	5	0.1	0.5	955	8.65
19	5	0.1	0.5	932	8.77
20	5	0.1	0.5	929	8.87
21	0	0	0	342	9.52
22	0	0	0	335	9.38

مصرف به عنوان سوبسترا تولید را بهبود داده‌اند.

تحلیل واریانس (ANOVA) برای ارزیابی مولفه های آماری استفاده شد. طبق جدول ۵، مدل با F-value معادل ۸۵/۳۲ و مقدار p-value <۰/۰۵ معنی‌دار است. عبارت‌های معنی‌دار جدول ۵ نشان می دهد که ژن‌ها باعث افزایش نسبت تولید اتانول می‌شود. در واقع، مدل متابولیکی نیز برهم‌کنش بین این ژن‌ها و بازدارنده‌های آن ها را در تطابق با نتایج تجربی تأیید می کند.

بهینه‌سازی با درجه مطلوبیت ۱ با نرم‌افزار طراحی

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

جدول ۵ عبارت‌های معنی‌دار ارائه شده توسط تحلیل واریانس.
Table 5. The ANOVA results.

Variable	F-value	P-Value	Comment
Model	85.32	0.0001	Significant
A: Pyruvate	58.32	0.0001	Significant
Mercury chloride (II) :B	225.36	0.0001	Significant
Salicylic acid :C	5.19	0.0436	Significant
AB	93.3	0.0001	Significant
BC	5.19	0.0437	Significant
A^2	202.56	0.0001	Significant
B^2	51.83	0.0001	Significant
C^2	90.94	0.0001	Significant

جدول ۶ غلظت بهینه مواد افزودنی پیشنهاد شده توسط مدل آماری (واحد: mmol/l).
Table 6. Optimal concentration of additives suggested by the statistical model (unit: mmol/l).

Pyruvate	Mercury chloride (II)	Salicylic acid
8	0.19	0.52

جدول ۷ نتایج آزمون اعتبارسنجی مدل آماری. بیشینه تولید اتانول پیشنهادی توسط مدل آماری برابر با ۱۱۱۶ میلی گرم بر لیتر است.
Table 7. Results of validation test proposed by the statistical model. The predicted maximum ethanol production by statistical model is 1116 mg/l.

Sample number	Produced ethanol (mg/l)
1	1074
2	1143
3	1129
4	1159
5	1094

آزمایش Design Expert انجام شد و آزمایش اعتبارسنجی پیشنهاد شده توسط مدل آماری انجام شد. به منظور حصول اطمینان در درستی نتیجه، این آزمایش به صورت پنج بار تکرار انجام شد که نتایج پیش‌بینی مدل را تأیید کرد. در جدول ۶ میزان غلظت بهینه مواد افزودنی پیشنهاد شده آورده شده است. بیشینه اتانول تولید شده ۱۱۱۶ میلی گرم بر لیتر توسط مدل آماری پیشنهاد شد و بازه اعتبار جواب‌های آزمایش اعتبارسنجی ۱۰۵۸ تا ۱۱۷۳ میلی گرم بر لیتر اتانول توسط نرم‌افزار برآورد شد. در جدول ۷ نتایج آزمایش اعتبارسنجی مدل مشاهده می‌شود. این میزان تولید حدود ۳/۲ برابر بیشتر از اتانول تولیدی در نمونه کنترل است. در واقع، استراتژی پیشنهادی قادر به تغییر جریان کربن در سوخت وساز با افزودن تعدادی از ترکیبات تنظیمی بود به طوری که تولید اتانول افزایش یابد. ترکیبات پیشنهادی به راحتی در دسترس هستند در حالی که اندام‌واره‌های جهش یافته عموماً در آزمایشگاه نگه داری می شوند. در مقایسه با دست‌ورزی ژنتیکی، محیط کشت تنظیمی را می‌توان با زمان و هزینه کم تر و با حداقل تجهیزات آزمایشگاهی،

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

مـورد اسـتفاده قـرار داد. بـه راحتـی می‌تـوان بـرای هـر گونـه محصـول و انـدام واره مخصوصـاً بـرای انـدام واره‌هـای غیـر مـدل کـه دسـتکاری ژنتیکـی آن هـا ممکـن اسـت بـا برخـی از مشـکلاتی همـراه باشـد یـا شـرایطی کـه محدودیت اسـتفاده از ریزانـدام واره‌هـای اصـلاح شـده ژنتیکـی وجـود دارد، اسـتفاده کـرد. عـلاوه بـر ایـن، طراحـی محیـط همـراه بـا دسـتکاری ژنتیکـی سـلول‌های شـناخته شـده صنعتـی می‌توانـد تولیـد را تـا حداکثـر مقـدار ممکـن بهبـود بخشـد.

۴ نتیجه‌گیری

دو محدودیـت داخـل سـلولی و خـارج سـلولی می‌تواننـد کارایـی سـلول را کاهـش دهنـد و از ایـن رو، مـدل سـازی بـر پایـه محدودیـت می‌توانـد بـرای شناسـایی اهـداف ژنتیکـی داخـل سـلولی در راسـتای مهندسـی سـوخت وسـاز سـامانه گـرا و نیـز شـناخت محدودیت‌هـای تغذیـه‌ای خـارج سـلولی مـورد اسـتفاده قـرار گیـرد. محیط کشـت پیشـنهادی توسـط ایـن نـوع مدل‌سـازی بـه آسـانی قابـل تهیـه اسـت ولـی، دسـتکاری ژنتیکـی در بعضـی مـوارد، بـا محدودیـت مواجـه اسـت. در ایـن تحقیـق، راهبـردی سـامانه گـرا و روش جدیـد طراحـی محیـط کشـت مبتنـی بـر بهبـود حـد پاییـن تولیـد محصـول بـرای توسـعه محیـط تعریـف شـده تنظیمـی، بـرای غلبـه بـر محدودیـت هـای داخـل سـلولی پیشـنهاد شـده اسـت. ایـن راهبـرد را می‌تـوان بـه راحتـی بـرای هـر سـلول بـه خصـوص سـلول‌های غیـر مـدل بـه کار بـرد و حتـی، اسـتفاده از آن همـراه بـا دسـتکاری ژنتیکـی و حـذف محدودیـت هـای تغذیـه‌ای می‌توانـد تولیـد را تـا آنجـا کـه ممکـن اسـت، بهبـود بخشـد. همچنیـن، ایـن راهبـرد توانایـی غربالگـری ترکیبـات موجـود در دسـترس بـرای یافتـن ترکیبـات موثـر بـر سـوخت وسـاز را فراهـم می‌کنـد.

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]

مراجع

1-de Moreno de LeBlanc, A., Del Carmen, S., Chatel, J.-M., Miyoshi, A., Azevedo, V., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G., LeBlanc, J. G., Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models, Gastroenterology Research and Practice. ,2015 2015.
2-Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S., Lee, S. Y., Systems Metabolic Engineering of Microorganisms for Natural and Non-Natural Chemicals, Nature Chemical Biology. ,536 ,8 2012.
3-Liu, R., Bassalo, M. C., Zeitoun, R. I., Gill, R. T., Genome Scale Engineering Techniques for Metabolic Engineering, Metabolic Engineering. 2015 ,154-143 ,32.
4-Löbs, A.-K., Schwartz, C., Wheeldon, I., Genome and Metabolic Engineering in Non-Conventional Yeasts: Current Advances and Applications, Synthetic and Systems Biotechnology. 2017 ,198 ,2.
5-Motamedian, E., Mohammadi, M., Shojaosadati, S. A., Heydari, M., TRFBA: An Algorithm to Integrate Genome-Scale Metabolic and Transcriptional Regulatory Networks with Incorporation of Expression Data, Bioinformatics. 2016 ,1063-1057 ,33.
6-Nogales, J., Gudmundsson, S., Knight, E. M., Palsson, B. O., Thiele, I., Detailing the Optimality of Photosynthesis in Cyanobacteria Through Systems Biology Analysis, Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012 ,2683-2678 ,109.
7-Orth, J. D., Thiele, I., Palsson, B. O., What is Flux Balance Analysis?, Nature Biotechnology. 2010 ,245 ,28.
8-Otero, J. M., Nielsen, J., Industrial Systems Biology, Biotechnology and Bioengineering. 460,2010-105139.
9-Rosgaard, L., de Porcellinis, A. J., Jacobsen, J. H., Frigaard, N.-U., Sakuragi, Y., Bioengineering of Carbon Fixation, Biofuels, and Biochemicals in Cyanobacteria and Plants, Journal of Biotechnology. 2012 ,147-134 ,162.

10-Song, H., Kim, T. Y., Choi, B.-K., Choi, S. J., Nielsen, L. K., Chang, H. N., Lee, S. Y., Development of Chemically Defined Medium for Mannheimia succiniciproducens Based on Its Genome Sequence, Applied Microbiology and Biotechnology. 2008 ,272-263 ,79.
11-Stephanopoulos, G., Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering, Metabolic Engineering. 1999 ,11-1 ,1.
12-van der Merwe, J. A., Dubery, I. A., Benzothiadiazole Inhibits Mitochondrial NADH: Ubiquinone Oxidoreductase in Tobacco, Journal of Plant Physiology. ,882-877 ,163 2006.
13-Yan, Q., Fong, S. S., Challenges and Advances for Genetic Engineering of Non-Model Bacteria and Uses in Consolidated Bioprocessing, Frontiers in Microbiology. 2017 ,2060 ,8.

[Downloaded from arcpe.modares.ac.ir on 2023-06-07]