

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

Mohammad Ali Babazadegan<sup>1</sup> and Ehsan Motamedian<sup>1\*</sup>

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

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

محمدعلی بابازادگان<sup>۱</sup>، دکتر احسان معتمدیان<sup>۱\*</sup>

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

### چکیده

استفاده از ابزارهای مهندسی ژنتیک برای تولید سویه صنعتی خصوصاً از ریزاندام‌واره‌های 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 آن‌ها این حداقل میزان را افزایش می‌دهند، به‌کار رفت. سپس، تنظیم‌کننده‌های آنزیم‌های بیان شده توسط ژن‌های هدف از پایگاه داده Brenda استخراج شد و اثر آن‌ها 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 فعال‌کننده (پیروات) برای افزودن به محیط انتخاب شدند و غلظت آن‌ها 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 و ساز است. روش سامانه گرای پیشنهاد شده می‌تواند در طراحی محیط کشت دیگر محصولات مهم صنعت زیست‌فناوری کشور همچون پروتئین‌های نوترکیب کاربرد داشته باشد.

### کلمات کلیدی

محیط کشت تنظیمی  
سوخت زیستی  
فعال‌کننده و ممانعت‌کننده  
پایگاه داده Brenda  
طراحی آزمایش  
مدل متابولیکی مقیاس ژنوم  
سیانوباکتر سینکوسیستیس

\*مسئول مکاتبات:

motamedian@modares.ac.ir

## 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, 2010, and Nielsen). پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهد که بازار مواد شیمیایی زیست بنیان 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 می‌شود در سال ۲۰۲۵ هر یک یورو سرمایه داری در تولید فرآورده‌های 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 ۱۹/۲/۱۳۸۴ 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 آن‌ها 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 (۱۹۹۹, Stephanopoulos). 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 (۲۰۱۲, Lee et al). روش‌های طراحی گونه که بر اساس مدل‌سازی بر پایه محدودیت (Constraint Based Modeling) (Genome-Scale Metabolic Models) توسعه یافته‌اند، نمونه‌ای موفق از تلاش‌ها در این زمینه تحقیقاتی هستند (۲۰۱۵, Liu et al). 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, 2017). 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 آن‌ها 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 آن‌هاست. اصلاحات اساسی برای اینکه کارخانه‌های سلولی سیانوباکترها به حالت تجاری درآید و تولید محصولات سازگار با محیط زیست داشته باشند، لازم است (۲۰۱۲, Rosgaard et al).

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 دست‌ورزی 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 پروموتور برای اندام-واره‌های غیر مدل (Löbs et al, 2017; Yan 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 بحث‌انگیزی است (۲۰۱۵, de Moreno de LeBlanc et al).

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

در این پژوهش، مدل  $iJN678$  (Nogales et al., 2012) شامل 678 ژن، 795 متابولیت و 863 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 بی‌هوای صفر در نظر گرفته شد. سپس، حداکثر نرخ رشد برای گونه طبیعی محاسبه شده و میزان تولید بیومس بر روی 90 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.

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

مقدار  $f_{ethanol}$  بیشتر (کم‌تر) 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 1/1 و 0/9 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 فعال‌کننده یا مهارکننده برای آن‌ها 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

محدودیت‌های خارج سلولی هستند را برای تولید بیشتر محصول مطلوب با استفاده از فنون زیست‌شناسی سامانه‌ها مورد مطالعه قرار داده‌اند و محیط کشت تعریف شده شیمیایی (Chemically Defined Medium: CDM) را توسعه داده‌اند. در واقع، آن‌ها 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 al., 2008) از شبکه متابولیکی مقیاس ژنوم و تجزیه و تحلیل موازنه شار (FBA) (Orth et al., 2010) 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 متابولیکی مقیاس ژنوم با داده‌های بیان ژن به نام TRFBA (Motamedian et al., 2016) تعیین می‌شوند. سپس، ترکیبات جدیدی به محیط کشت اضافه می‌شوند که نه به عنوان مواد مغذی بلکه به-عنوان تنظیم‌کننده‌های (فعال‌کننده‌ها یا مهارکننده‌ها) آنزیم‌های بیان شده توسط ژن‌های 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. تنظیم‌کننده‌های 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.

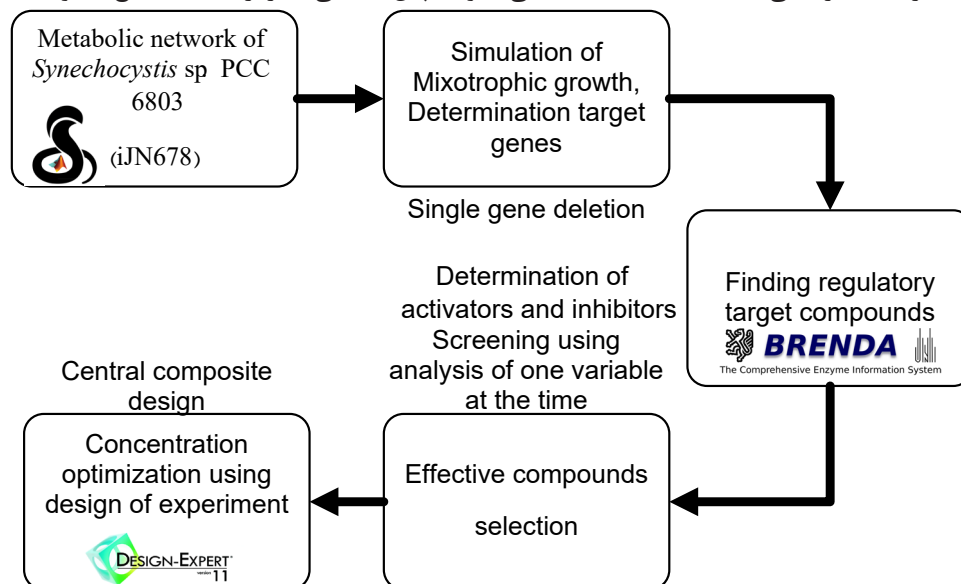
## ۲ مواد و روش‌ها

### ۲-۱ مواد و روش‌های محاسباتی

#### ۲-۱-۱ مدل متابولیکی

سیانوباکتر استفاده شد. برای تهیه مایه تلقیح، ابتدا گلوکز به محیط کشت BG۱۱ افزوده شد به طوری که غلظت نهایی آن ۱ گرم بر لیتر باشد. ۱۹ میلی لیتر از این محیط کشت در ارلن ۱۰۰ میلی لیتری ریخته شد و سپس ۱ میلی لیتر از کشت مایع حاوی سیانوباکتر به

شدند و طراحی آزمایش به کمک روش طراحی مرکب مرکزی برای بهینه سازی غلظت هر ترکیب اضافه شده مورد استفاده قرار گرفت. در طراحی آزمایش، غلظت هر ماده در پنج سطح مختلف در نظر گرفته شد. فلوجارت فرایند طراحی محیط کشت تنظیمی



شکل ۱ روش سامانه-گرای طراحی محیط کشت تنظیمی برای سیانوباکتر سینکوسیستیس ۶۸۰۳ sp. PCC 6803.  
Figure 1. Regulatory medium design using a systemic approach for *Synechocystis* sp. PCC 6803.

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 می شد 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 غلظت های به دست آمده از پایگاه داده Brenda به محیط کشت BG۱۱ حاوی گلوکز اضافه شدند.

### ۲-۲-۳ روش های اندازه گیری

برای سنجش میزان رشد از دستگاه طیف سنج نوری استفاده شد و کدورت سنجی در طول موج ۷۳۰ نانومتر انجام شد. برای اندازه گیری غلظت اتانول از دستگاه سوانگاری (کروماتوگرافی) گازی (GC) استفاده شد. برای تعیین نمودار استاندارد به منظور سنجش غلظت اتانول از روی مساحت زیر قله های 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 غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر اتانول و مجموعه دوم نمونه ها

پیشنهادی در شکل ۱ ارائه شده است.

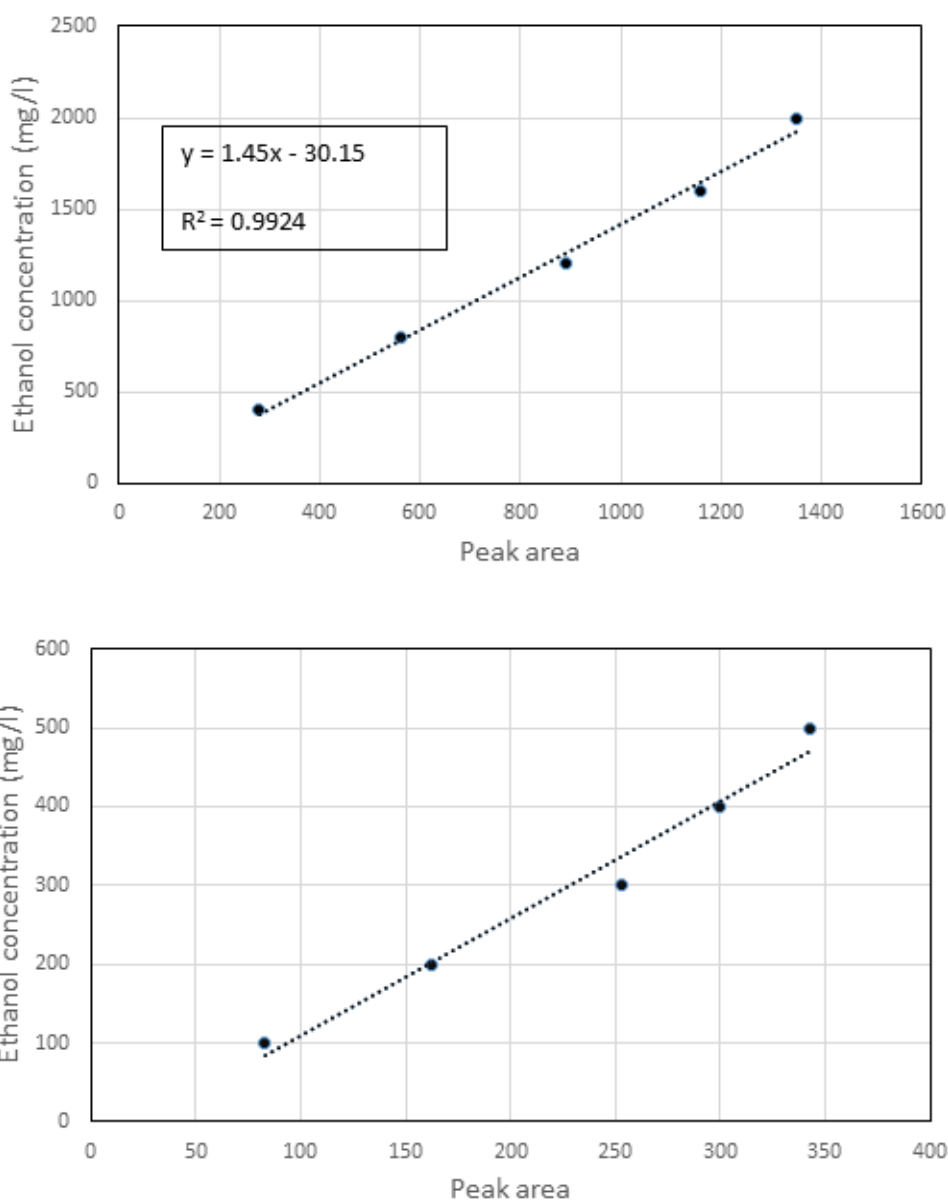
## ۲-۲ مواد و روش های تجربی

### 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 سانتی گراد در شیکر-انکوباتور، برداشت شده و در شرایط بی-هوایی نگه داری می شد و همچنین هر ۲ ماه یک بار زیر کشت جدید تهیه می شد. نگهداری سویه نیز در دمای محیط و در معرض نور طبیعی خورشید انجام می گرفت 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



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.

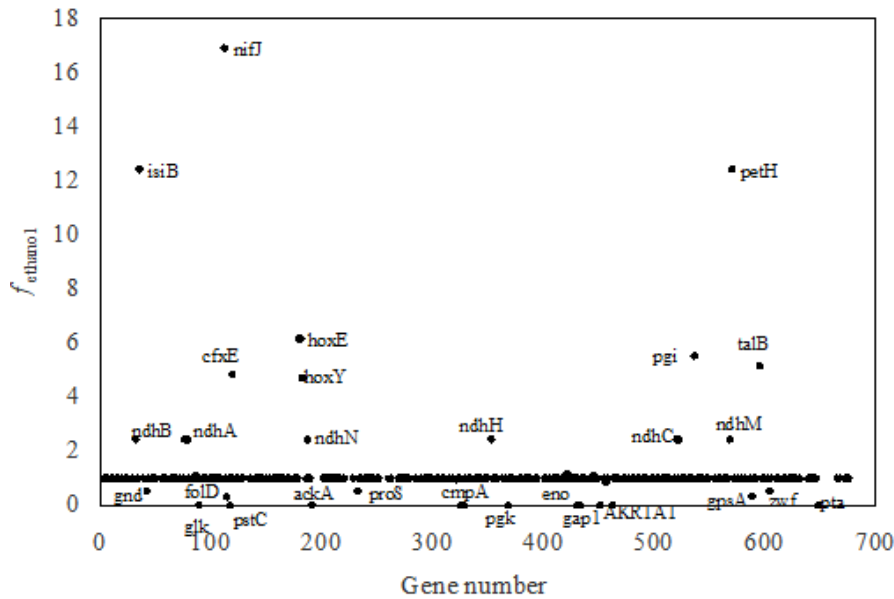
شامل ۵ نمونه با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰ و نظر گرفته شد. ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اتانول بود.

### 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 می‌دهد 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 گزینه‌ها حذف شدند. این روش ۱۴ ژن

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 میلی‌لیتر در دقیقه بود. برای تهیه نمونه از سرنگ گازی با حجم یک میلی‌لیتر استفاده شده و حجم تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر در



شکل ۳ تأثیر حذف هر ژن بر نسبت تولید اتانول.

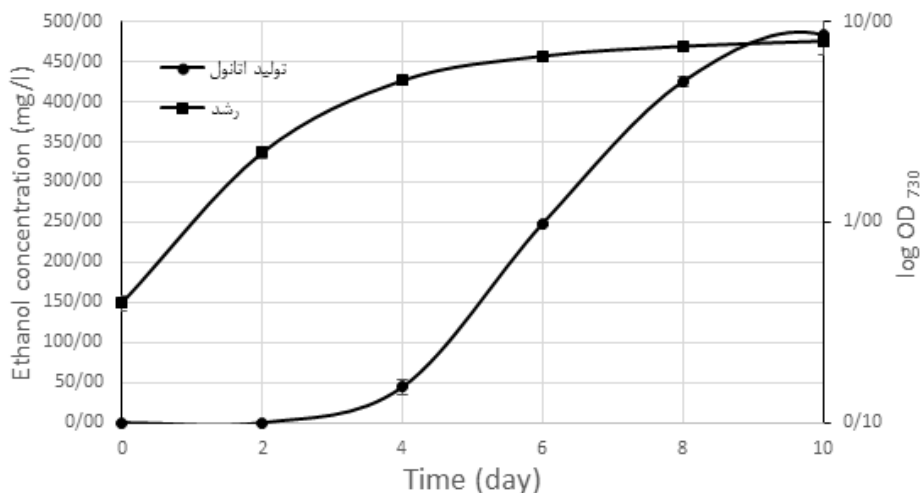
Figure 3. Effect of gene deletion on the ethanol production ratio.

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.

یافت که حذف آن‌ها 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 آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج ارائه شده در شکل ۳ و جدول ۱ نشان می‌دهد که ۱۴ ژن وجود دارد که حذف آن‌ها به طور قابل توجهی باعث کاهش نسبت تولید اتانول به کم‌تر از ۰/۹ می‌شود. Brenda برای پیدا کردن فعال‌کننده برای این ژن‌های هدف مورد بررسی قرار گرفت. از میان مواد در دسترس شناسایی شده به کمک



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 ۵ به منظور شناسایی اثر هر کدام از فعال‌کننده‌ها و

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

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			
6	Salicylic acid	ndhB	1.6.5.3	0.5	Inhibitor
		ndhA			
		ndhI			
		ndhG			
		ndhE			
		hoxF			
		hoxU			
		hoxY			
		ndhH			
		ndhC			



جدول ۲. میزان تولید اتانول و رشد سویه در حضور فعال کننده‌ها 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

در افزایش تولید اتانول در این پژوهش تأیید شد.

#### ۳-۴ 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

بازدارنده‌ها در تولید اتانول تأثیر هر کدام 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 آن‌ها 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 پیرووات، کلرید جیوه (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 بازدارندگی 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

جدول ۳. 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	Abbreviation	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

ترکیبات A تا C به طور معنی داری باعث افزایش تولید اتانول شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که تولید اتانول تابعی درجه دو از متغیرها است. همچنین، برهم‌کنش‌های پیرووات با کلریدجیوه و کلریدجیوه با اسیدسالیسیلیک معنی دار 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

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 و ساز و نه

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 <sub>730</sub>
	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

ژن‌ها باعث افزایش نسبت تولید اتانول می‌شود. در واقع، مدل متابولیکی نیز برهم‌کنش بین این ژن‌ها و بازدارنده‌های آن‌ها را در تطابق با نتایج تجربی تأیید می‌کند. بهینه‌سازی با درجه مطلوبیت ۱ با نرم‌افزار طراحی

مصرف به عنوان سوستر تولید را بهبود داده‌اند. تحلیل واریانس (ANOVA) برای ارزیابی مولفه‌های آماری استفاده شد. طبق جدول ۵، مدل با *F-value* معادل ۸۵/۳۲ و مقدار  $p\text{-value} < 0/05$  معنی دار است. عبارت‌های معنی دار جدول ۵ نشان می‌دهد که

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 <sup>2</sup>	202.56	0.0001	Significant
B <sup>2</sup>	51.83	0.0001	Significant
C <sup>2</sup>	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 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 و ساز 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 می‌شوند. در مقایسه با دست‌ورزی ژنتیکی، محیط کشت تنظیمی را می‌توان با زمان و هزینه کم تر و با حداقل تجهیزات آزمایشگاهی،

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

این نوع مدل‌سازی به آسانی قابل تهیه است ولی، دستکاری ژنتیکی در بعضی موارد، با محدودیت مواجه است. در این تحقیق، راهبردی سامانه گرا و روش جدید طراحی محیط کشت مبتنی بر بهبود حد پایین تولید محصول برای توسعه محیط تعریف شده تنظیمی، برای غلبه بر محدودیت‌های داخل سلولی پیشنهاد شده است. این راهبرد را می‌توان به راحتی برای هر سلول به خصوص سلول‌های غیر مدل به کار برد و حتی، استفاده از آن همراه با دستکاری ژنتیکی و حذف محدودیت‌های تغذیه‌ای می‌تواند تولید را تا آنجا که ممکن است، بهبود بخشد. همچنین، این راهبرد توانایی غربالگری ترکیبات موجود در دسترس برای یافتن ترکیبات موثر بر سوخت و ساز را فراهم می‌کند.

مورد استفاده قرار داد. به راحتی می‌توان برای هر گونه محصول و اندام واره مخصوصاً برای اندام‌های غیر مدل که دستکاری ژنتیکی آن‌ها ممکن است با برخی از مشکلاتی همراه باشد یا شرایطی که محدودیت استفاده از ریزاندام‌های اصلاح شده ژنتیکی وجود دارد، استفاده کرد. علاوه بر این، طراحی محیط همراه با دستکاری ژنتیکی سلول‌های شناخته شده صنعتی می‌تواند تولید را تا حداکثر مقدار ممکن بهبود بخشد.

#### ۴ نتیجه‌گیری

دو محدودیت داخل سلولی و خارج سلولی می‌توانند کارایی سلول را کاهش دهند و از این رو، مدل‌سازی بر پایه محدودیت می‌تواند برای شناسایی اهداف ژنتیکی داخل سلولی در راستای مهندسی سوخت و ساز سامانه گرا و نیز شناخت محدودیت‌های تغذیه‌ای خارج سلولی مورد استفاده قرار گیرد. محیط کشت پیشنهادی توسط

## 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.