

زهرا نیکوئیان^۱، فاطمه تابنده^{۱*}، احسان معتمدیان^{۲*}

^۱ پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ۱۴۹۶۵/۱۶۱، تهران، ایران.
^۲ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵، تهران، ایران
نویسندگان مسئول مکاتبات: فاطمه تابنده taban_f@nigeb.ac.ir
احسان معتمدیان motamedian@modares.ac.ir

نتایج

مدل متابولیکی ارائه شده در این پژوهش، از جنبه های گوناگون کمی و کیفی ارزیابی گردید. بدین منظور ابتدا، محدودیت های لازم برای شبیه سازی محیط کشت در شرایط بی هوازی و کشت کموستات اعمال گردید و نرخ رشد با استفاده از مدل، پیش بینی گردید. پیش بینی نرخ رشد تجربی با دقت ۹۳/۳ درصد و تنها ۶/۷ درصد خطا، حاکی از آن است که مدل به خوبی می تواند رشد باکتری را در محیط کشت حاوی گلوکز و کشت کموستات پیش بینی کند. با هدف کمینه کردن اغتشاشات سلولی پس از حذف ژنی، از روش حذف ژنی تکی MOMA به صورت مکرر استفاده گردید و سویه های جهش یافته ی تکی، دو گانه و سه گانه شناسایی گردیدند. همه ی سویه های جهش یافته با استراتژی کاهش تولید زیست توده، شار کربنی را به سمت تولید هیالورونیک اسید، هدایت می کنند. سویه جهش یافته سه گانه آسپارات-سمی آلدئیددهیدروژناز، والین-ترانس آمیناز و دی-هیدرو اوروات-دهیدروژناز به عنوان مناسب ترین سویه جهش یافته، از نظر میزان زیست توده تولیدی و همچنین نرخ تولید هیالورونیک اسید بالا انتخاب گردید. بررسی نمودار توزیع شار در سویه جهش یافته و سویه وحشی نشان داد که در سویه جهش یافته سه گانه با کاهش نرخ رشد (تا ۵۰ درصد)، دسترسی به سوبستراهای موردنیاز برای سنتز هیالورونیک اسید افزایش یافته است که می تواند ناشی از آن باشد که پیش سازهای هیالورونیک اسید و تولید زیست توده مشترک هستند.

جدول ۱- نرخ رشد و نرخ تولید هیالورونیک اسید در سویه های جهش یافته تکی، دو و سه گانه درون رایانه ای

نرخ تولید هیالورونیک اسید (میلی مول بر گرم وزن خشک سلولی بر ساعت)	نسبت نرخ رشد سویه جهش یافته به سویه وحشی	سویه جهش یافته
۰	۱	سویه وحشی
۴/۵۸	۰/۷۱	حذف های تک ژنی
۳/۷۱	۰/۷۲	آسپاراژین سینتاز
۵/۷۷	۰/۲۳	آسپارات-سمی آلدئیددهیدروژناز/والین-ترانس آمیناز
۶/۹۸	۰/۳۰	آسپاراژین سینتاز/فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز
۵/۵	۰/۲۷	آسپارات-سمی آلدئیددهیدروژناز/والین-ترانس آمیناز
۷/۰۴	۰/۳۱	آسپارات-سمی آلدئیددهیدروژناز/فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز
۶/۶۶	۰/۲۷	حذف های سه گانه
۷/۳۳	۰/۵۱	آسپارات-سمی آلدئیددهیدروژناز/والین-ترانس آمیناز/آسپاراژین سینتاز
۱۳/۶۷	۰/۳۱	آسپارات-سمی آلدئیددهیدروژناز/والین-ترانس آمیناز/فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز

بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

در سویه ی جهش یافته ی سه گانه یادشده به ترتیب واکنش های آنزیمی آسپارات-سمی آلدئیددهیدروژناز، والین-ترانس آمیناز و دی-هیدرواوروات-دهیدروژناز حذف شده اند. آنزیم آسپارات-سمی آلدئیددهیدروژناز asd در فرایند تبدیل آسپارات به تره ثونین و لایزین دخالت دارد. با توجه به اینکه لایزین در شکل گیری بخشی از زیست توده دخالت دارد، کاهش نرخ تولید لایزین، نرخ رشد را از مقدار ۰/۳۹ (بر ساعت) به ۰/۲۸ (بر ساعت) تقلیل می دهد. حذف ژنی دوم، مربوط به ژن آنزیم والین-ترانس آمیناز ilvE را کد می کند. در نتیجه این حذف سنتز کاربیلوپین، پپتیدوگلیکان و لیپوتیکوئیک اسیدها محدود شده و نرخ رشد از ۰/۲۸ (بر ساعت) به ۰/۱۴ (بر ساعت) کاهش می یابد. سومین حذف ژنی مربوط به ژن pyd است که آنزیم دی-هیدرواوروات-دهیدروژناز را کد نویسی می کند. حذف ژن pyd هم سو با افزایش نرخ تولید هیالورونیک اسید، نرخ رشد را هم افزایش می دهد. حذف pyd، مسیر تولید UMP از آمینواسید آسپارات را مسدود می کند، در نتیجه در سویه جهش یافته سه گانه، UMP از مسیرهای بازیافت نوکلئوتیدها تامین می شود. به این ترتیب، فسفوریبوزیل پیروفسفات (PRPP) وارد مسیر بیوسنتز از نوکلئوتیدهای پیریمیدینی نمی شود و با شار بیش تری نسبت به سویه جهش یافته دوگانه وارد مسیر از نو بیوسنتز نوکلئوتیدهای پورینی گشته، نرخ تولید اینوزین مونو فسفات و به دنبال آن، ATP را افزایش داده و از این طریق سبب افزایش نرخ تولید هیالورونیک اسید گردیده است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۹ با موضوع بهبود تولید هیالورونیک اسید در سویه باکتریایی لاکتوکوکوس لاکتیس صورت گرفته است، اضافه کردن اینوزین به ترکیبات محیط کشت راندمان تولید هیالورونیک اسید را ۸/۲ برابر افزایش داده است (Badri et al., 2019). همچنین مقایسه توزیع شار سویه جهش یافته ی سه گانه نشان می دهد که شار عبوری از آنزیم های مسیر گلیکولیز و پنتوز فسفات در سویه جهش یافته نسبت به سویه وحشی کاهش می یابد. این موضوع، با نتایج تجربی مقالات پیشین مطابقت دارد (Shah et al., 2013).

نتیجه گیری:

با استفاده از مدل متابولیکی مقیاس ژنوم باکتری استرپتوکوکوس زوپیدمیکوس راهکارهایی با هدف بهبود تولید هیالورونیک اسید ارائه گردید. جهت اطمینان از نتایج به دست آمده از مدل متابولیکی، آزمایش های تجربی تکمیلی پیشنهاد می گردد.

منابع

- ALPER, H., JIN, Y.-S., MOXLEY, J. & STEPHANOPOULOS, G. 2005. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 7, 155-164.
BADRI, A., RAMAN, K. & JAYARAMAN, G. 2019. Uncovering Novel Pathways for Enhancing Hyaluronan Synthesis in Recombinant *Lactococcus lactis*: Genome-Scale Metabolic Modeling and Experimental Validation. *Processes*, 7, 343.
CHONG, B. F., BLANK, L. M., MCLAUGHLIN, R. & NIELSEN, L. K. 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Applied microbiology and biotechnology*, 66, 341-351.
JAGANNATH, S. & RAMACHANDRAN, K. 2010. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 148-158.
LIU, L., WANG, M., DU, G. & CHEN, J. 2008. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Letters in applied microbiology*, 46, 383-388.
MAIA, P., ROCHA, M. & ROCHA, I. 2016b. In silico constraint-based strain optimization methods: the quest for optimal cell factories. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80, 45-67.
SHAH, M. V., BADLE, S. S. & RAMACHANDRAN, K. 2013. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. *Biochemical engineering journal*, 80, 53-60.
THIELE, I. & PALSSON, B. Ø. 2010. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature protocols*, 5, 93.

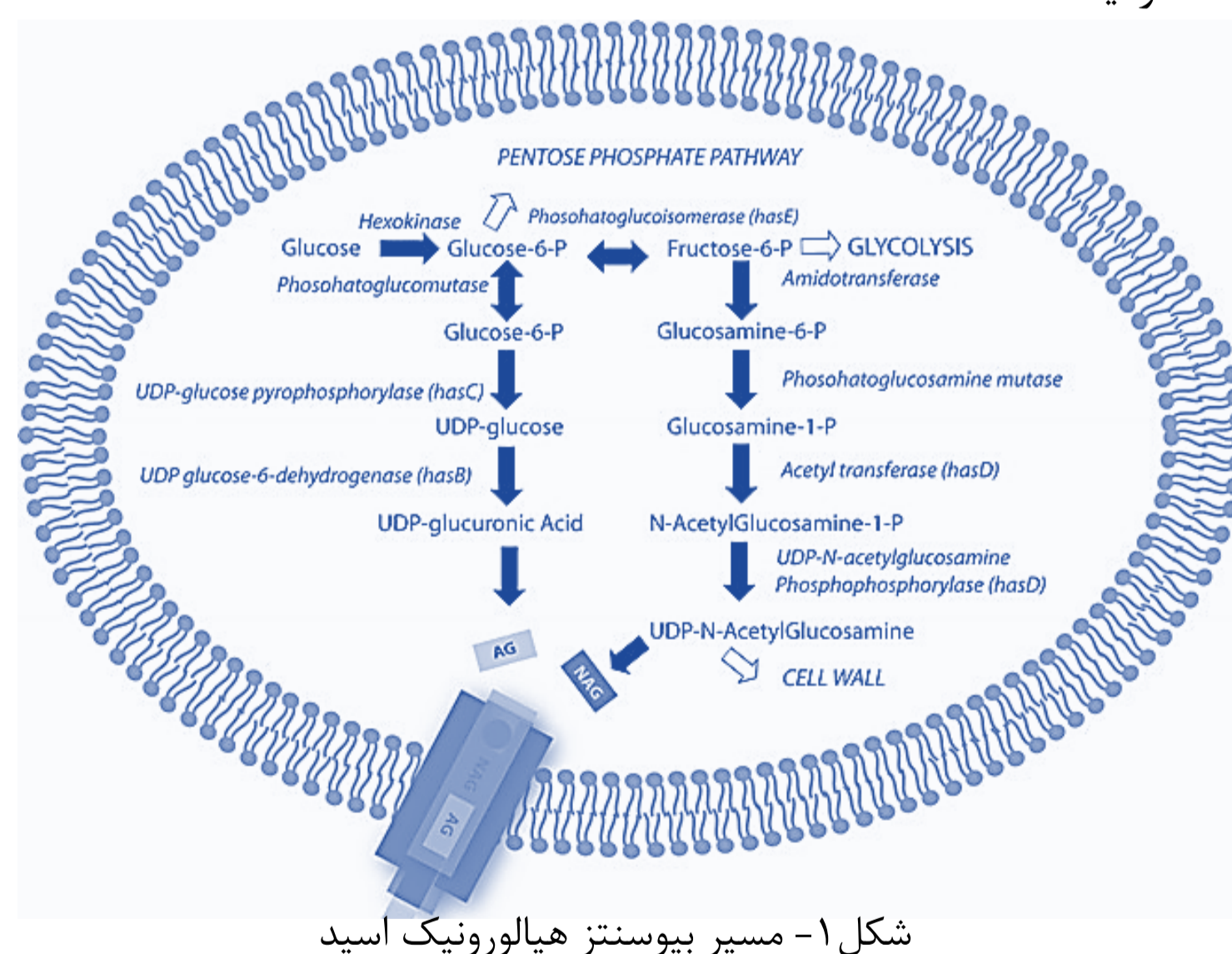
چکیده

هیالورونیک اسید، پلی ساکاریدی خطی است که از واحدهای تکرارشونده ی N-استیل گلوکز آمین و گلوکورونیک اسید تشکیل شده است و به صورت تجاری از طریق تخمیر استرپتوکوک های گروه C به ویژه استرپتوکوکوس زوپیدمیکوس تولید می شود و به عنوان یک محصول تجاری، بهبود تولید آن از طریق تخمیر میکروبی حائز اهمیت است. از آنجائیکه عوامل و ژن های گوناگونی در تولید هیالورونیک اسید موثر هستند، نگاهی جامع بر فرایند تولید هیالورونیک اسید می تواند راهگشا باشد. بنابراین ابتدا با روش مبتنی بر زیست شناسی سامانه ها مدل متابولیکی مقیاس ژنوم سویه باکتریایی استرپتوکوکوس زوپیدمیکوس برای اولین بار ارائه شد. هدف از این پژوهش، شناسایی حذف های ژنی موثر بر بهبود تولید هیالورونیک اسید در این سویه بود. برای این منظور، با رویکرد حذف های ژنی مکرر در این مدل متابولیکی، مشخص شد با حذف درون رایانه ای واکنش های آنزیمی آسپارات-سمی آلدئیددهیدروژناز، والین-ترانس آمیناز و دی-هیدرو اوروات-دهیدروژناز، نرخ تولید هیالورونیک اسید از صفر در سویه ی وحشی به ۳۳/۷ میلی مول بر گرم وزن خشک سلولی بر ساعت افزایش می یابد. نهایتاً سویه ی جهش یافته سه گانه با هدف بهبود تولید هیالورونیک اسید پیشنهاد گردید.

کلمات کلیدی: استرپتوکوکوس زوپیدمیکوس، مدل متابولیکی مقیاس ژنوم، هیالورونیک اسید

مقدمه

هیالورونیک اسید پلی ساکاریدی خطی و غیر ایمنی زاست که به دلیل قابلیت های ویژه زیستی در زمینه های پزشکی، دارورسانی و صنایع آرایشی بهداشتی کاربرد دارد. (Chong et al., 2005) سویه رایج باکتریایی برای تولید هیالورونیک اسید، S. zooepidemicus است که در شرایط کشت مناسب قابلیت تولید ۶ تا ۷ گرم بر لیتر را دارد. رشدمایه های موردنیاز برای تولید هیالورونیک اسید و رشد سلولی یکسان هستند، بنابراین هر عاملی که سبب افت فرایند گلیکولیز و رشد سلولی شود افزایش تولید و وزن مولکولی هیالورونیک اسید را در پی دارد. به عنوان مثال، با ایجاد شرایط استرس قلیایی با تغییر pH از مقدار بهینه ۷ به مقدار ۵/۸ رشد سلولی نسبت به حالت بهینه کاهش پیدا کرده و تولید هیالورونیک اسید از مقدار ۵ گرم بر لیتر به ۵/۶ گرم بر لیتر افزایش می یابد (Liu et al., 2008). تغییر شرایط دمایی از دمای بهینه ۳۷ به ۳۰ درجه سلسیوس (کاهش رشد سلولی) و اضافه کردن پیرووات (افت فرایند گلیکولیز) می تواند موجب افزایش قابل توجه تولید هیالورونیک اسید شود (Jagannath and Ramachandran, 2010). در پژوهش حاضر به منظور بررسی همه جانبه مسیرهای متابولیکی در استرپتوکوکوس زوپیدمیکوس و ارائه پیشنهادات با هدف بهبود تولید هیالورونیک اسید از شبکه متابولیکی مقیاس ژنوم و حذف های ژنی درون رایانه ای استفاده گردید.



شکل ۱- مسیر بیوسنتز هیالورونیک اسید

مواد و روش ها

با توجه به اهمیت مدل های متابولیکی مقیاس ژنوم در شناخت دقیق تر متابولیسم سلولی و شناسایی راهکارهای مناسب جهت بهینه سازی تولید محصول، مدل متابولیکی مقیاس ژنوم سویه باکتریایی استرپتوکوکوس زوپیدمیکوس مطابق با پروتکل ساخت شبکه متابولیکی مقیاس ژنوم (Thiele and Palsson, 2010) و با تکیه بر داده های تفسیر ژنوم و گزارش مقالات تجربی، بازسازی گردید. به منظور افزایش نرخ تولید هیالورونیک اسید با استفاده از این مدل متابولیکی، از روش آلپر و همکارانش استفاده شد (Alper et al., 2005). در این روش از حذف ژنی های تکی مکرر با استفاده از روش MOMA (Maia et al., 2016) و تابع هدف بایومس، استفاده شد و پس از هر بار حذف ژنی، نرخ تولید هیالورونیک اسید از روی شار واکنش تبادل هیالورونیک اسید تعیین شد. در اجرای بعدی فرایند حذف ژنی، حدود بالا و پایین واکنش های مربوط به ژنی که در دور قبلی، به عنوان ژن مناسب پیشنهاد شده بود بر روی صفر تنظیم گردید و مجدداً فرایند حذف ژنی MOMA انجام شده تا در نهایت حذف سه گانه ژنی مناسب انتخاب شد.